

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mirna N. Jovanović

**RAZVOJ ANTITUMORSKE STRATEGIJE PRIMENOM
INHIBICIJE TIOREDOKSIN-REDUKTAZE 1 U ĆELIJSKIM
MODELIMA GLIOBLASTOMA I NEUROBLASTOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirna N. Jovanović

**DEVELOPMENT OF ANTITUMOR STRATEGY BY
INHIBITION OF THIOREDOXIN REDUCTASE 1 IN
GLIOBLASTOMA AND NEUROBLASTOMA CELL
MODELS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

MENTORI

dr Ana Podolski-Renić, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Sanja Dacić, docent
Biološki fakultet,
Univerzitet u Beogradu

KOMISIJA

dr Milica Pešić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Laketa, docent
Biološki fakultet,
Univerzitet u Beogradu

dr Miodrag Dragoj, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratoriji za molekularnu neuroonkologiju na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata „Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ (ev. br. III41031, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije) i ERA.Net RUS+ projekta „THIOREDIN – Development of thioredoxin reductase inhibitors towards new anti-cancer agents“ (RUS_ST2017-309), finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

IZJAVA ZAHVALNOSTI

Najveću zavalnost dugujem svojoj mentorki, dr Ani Podolski-Renić, koja je kvalitetno osmislila ovu disertaciju i pružila podršku u svim fazama njene izrade. Zahvaljujem se na nesebično podeljenom znanju, iskustvu, vremenu, strpljenju i uvažavanju mišljenja, kao i na ogromnom ukazanom poverenju koje mi je ukazala u toku izrade ove disertacije.

Dr Sanji Dacić se zavaljujem na uloženom trudu i vremenu, kao i komentarima prilikom izlaganja idejnog projekta istraživanja, dobijenih rezultata i oblikovanju disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Milici Pešić, na ukazanom poverenju i podršci, pruženim prilikama za profesionalno usavršavanje, komentarima u toku pisanja radova i disertacije, idejama za istraživanje i posvećenom vremenu i trudu.

Zahvaljujem se dr Raivisu Žalubovskisu i dr Iloni Domračev na pruženoj prilici za sticanje istraživačkog iskustva na Letonskom institutu za organsku sintezu (LIOS) u Rigi, Letonija. Zahvaljujem se i svim članovima istraživačkog tima dr Ilone Domračev na gostoprimstvu, razumevanju i pruženoj pomoći tokom boravka i rada na LIOS-u.

Dr Mikhailu Krasavinu, rukovodiocu istraživačke grupe Laboratorije za hemijsku farmakologiju Hemijskog instituta, Univerziteta u Sankt Peterburgu, se zahvaljujem na novosintetisanim supstancama, nazvanim "Ugi-tip Majklovih akceptora", i na ukazanom gostoprimstvu prilikom boravka u Sankt Peterburgu.

Zavaljujem se kolegamicama dr Marini Stanić, sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, i dr Tijani Cvetić-Antić, sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na svom pruženom iskustvu u radu sa kolorimetrijskim enzimskim testovima u toku i nakon izrade master rada, za koje se pokazalo od neprocenjivog značaja u istraživanju ove doktorske disertacije.

Veliku zavalnost dugujem kolegama iz laboratorije za molekularnu neuroonkologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković": dr Tijani Stanković, dr Jeleni Dinić, dr Miodragu Dragoju, dr Sonji Stojković-Burić i Mariji Nešović, na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, iskustvu, podršci, razumevanju, savetima, humoru i prijatnoj, radnoj atmosferi. Kolegama sa Odelenja za neurobiologiju se zahvaljujem na entuzijazmu, druženju i dobrom raspoloženju.

Neizmerno sam zahvalna porodici, posebno roditeljima, na pruženoj podršci, prilici za obrazovanje i ispunjen život.

Kevcima, Lazaru, Mariji i prijateljima, hvala što postojite.

Razvoj antitumorske strategije primenom inhibicije tioredoksin-reduktaze 1 u ćelijskim modelima glioblastoma i neuroblastoma

Sažetak

Tioredoksinski sistem, ćelijski redoks regulator, ima važnu ulogu u nastanku tumora, progresiji, metastazi i sticanju rezistencije na lekove. Povišena ekspresija tioredoksin-reduktaze 1 (TrxR1) je u korelaciji sa stepenom maligniteta glioblastoma i neuroblastoma. Cilj ove disertacije bio je ispitivanje potencijala Ugi-tipa Majklovih akceptora (UMA) – inhibitora TrxR1 za lečenje glioblastoma i neuroblastoma, kao i u prevazilaženju višestruke rezistencije na hemioterapeutike. Shodno tome, ispitana je efikasnost UMA u inhibiciji TrxR1; zatim, dejstvo UMA inhibitora na rast ćelija neuroblastoma, glioblastoma i normalnih ćelija. Pokazano je da UMA inhibitori snažnije inhibiraju rast proliferišućih ćelija (neuroblastoma, glioblastoma i keratinocita) u odnosu na neproliferišuće mononuklearne ćelije krvi. Mehanizam antitumorskog dejstva dva najpotentnija inhibitora, DVD-444 i DVD-445, je ispitan na senzitivnim i rezistentnim ćelijama glioma. UMA inhibitori su prouzrokovali oksidativni stres, depolarizaciju mitohondrija i povišenu ekspresiju antioksidativnih enzima u ćelijama glioma. Utvrđeno je da imaju citotoksično, antiproliferativno i antiinvazivno dejstvo na ćelije glioma, kao i da povećavaju njihovu osetljivost na temozolomid. UMA inhibitori su suprimirali aktivnost P-glikoproteina (P-gp) i povećali osetljivost rezistentnih ćelija glioma na paklitaksel. Okarakterisani su antitumorski efekti serije inhibitora TrxR1 analognih DVD-445. Analizi DVD-445, su indukovali oksidativni stres, ćelijsku smrt i inhibirali aktivnost P-gp u ćelijama glioma u većoj meri od DVD-445. Rezultati ove disertacije ukazuju da je inhibicija TrxR1 perspektivna strategija za lečenje glioblastoma i neuroblastoma, i da su UMA inhibitori TrxR1 dobri kandidati za razvoj novih hemioterapeutika.

Ključne reči: tioredoksinski (Trx) sistem, tioredoksin-reduktaza 1 (TrxR1), inhibitori TrxR1, gliomi, neuroblastomi, Ugi-tip Majklovih akceptora (UMA), oksidativni stres, rezistencija na lekove.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna neuroonkologija

Development of antitumor strategy by inhibition of thioredoxin reductase 1 in cell models of glioblastoma and neuroblastoma

Abstract

Thioredoxin system, cell redox regulator, has important role in tumor development, progression, metastasis and chemoresistance. Thioredoxin reductase 1 (TrxR1) high expression is in correlation with glioblastoma and neuroblastoma malignancy. Goal of this dissertation was investigating potential of Ugi-type Michael acceptors (UMAs) – TrxR1 inhibitors, for glioblastoma and neuroblastoma treatment, as well as in overcoming multidrug resistance. Accordingly, potential of TrxR1 inhibition by UMA was tested *in vitro*, followed by testing of UMA inhibitors on cell growth of neuroblastoma, glioblastoma and normal cells. UMA inhibitors demonstrated a stronger inhibitory effect on proliferating cells (neuroblastoma, glioblastoma, keratinocytes) in comparison to non-proliferating blood mononuclear cells. Antitumor effect mechanism of two most potent compounds, DVD-444 and DVD-445, was tested in sensitive and resistant glioma cells. UMA inhibitors caused oxidative stress, mitochondrial depolarisation and elevated expression of antioxidant enzymes in glioma cells, showed cytotoxic, antiproliferative and anti-invasive effect, and sensitized glioma cells to temozolomide. UMA inhibitors suppressed P-glycoprotein (P-gp) activity and sensitized resistant glioma cells to paclitaxel. Antitumor effects of DVD-445 analogue compounds were investigated. DVD-445 analogues induced oxidative stress, cell death and inhibited P-gp activity in glioma cells, at greater extent than DVD-445. Results presented here suggest that TrxR1 inhibition is a promising strategy in treating glioblastoma and neuroblastoma and that UMA inhibitors are aspiring candidates for novel chemotherapy development.

Key words: thioredoxin (Trx) system, thioredoxin reductase 1 (TrxR1), thioredoxin reductase 1 inhibitors, glioma, neuroblastoma, Ugi-type Michael acceptors (UMAs), oxidative stress, multidrug resistance.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular neuro-oncology

LISTASKRAĆENICA:

ABC	ATP-vezujući transporter, eng. <i>ATP-binding cassette</i>
ACTB	eng. <i>β-actin</i>
AIF	faktor indukcije apoptoze, eng. <i>apoptosis inducing factor</i>
ALK	kinaza anaplastičnog limfoma, eng. <i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ANOVA	analiza varijanse, eng. <i>analysis of variance</i>
AP-1	aktivator protein-1
APS	amonijum-persulfat
ARE	element antioksidativnog odgovora, eng. <i>antioxidant response element</i>
ASK1	kinaza regulacije signala apoptoze 1, eng. <i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATCC	Američka kolekcija tipova ćelijskih kultura, eng. <i>American Type Culture Collection</i>
ATM	natrijum-aurotiomalathidrat
ATP	adenozin trifosfat, eng. <i>adenosine triphosphate</i>
ATRX	eng. <i>alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
AV	aneksin-V-FITC
Bad	eng. <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	eng. <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	eng. <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	bicinhoninska kiselina, eng. <i>bicinchonic acid</i>
Bcl-2	familija pro- i antiapoptotskih proteina, eng. <i>B cell lymphoma-2</i>
Bcl-XL	engl. <i>B cell lymphoma extra large</i>
BCNU	bis-hloroetilnitrozourea, eng. <i>bis-chloroethylnitrosourea</i>
BCRP	protein rezistencije tumora dojke, eng. <i>breast cancer resistance protein</i>
BER	bazna ekciziona reparacija, eng. <i>base pare excision repair</i>
BSA	goveđi serum albumin, eng. <i>bovine serum albumin</i>
Cas	kaspaza, eng. <i>caspase</i>
CAT	katalaza, eng. <i>catalase</i>
CCCP	eng. <i>carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone</i>
CDKN2A	ciklin-zavisnakinaza 2A, eng. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CFSE	karboksifluorescein sukcimidil ester, eng. <i>carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester</i>
CI	indeks kombinacije, eng. <i>combination index</i>
CLS	eng. <i>Cell Lines Service</i>
CNS	centralni nervni sistem
CoQ	koenzim Q
Cys	amino-kiselina cistein
C_t	eng. <i>cycle threshold</i>
dATP	dezoksiadenozin-trifosfat, eng. <i>deoxyadenosine triphosphate</i>
dCTP	dezoksicitozin-trifosfat, eng. <i>deoxycytidine triphosphate</i>
DEPC	dietil pirokarbonat, eng. <i>diethyl pyrocarbonate</i>
dGTP	dezoksiguanozin-trifosfat, eng. <i>deoxyguanosine triphosphate</i>
DHE	dihidroetidijum
DHR	dihidrorodamin
DMEM	Dulbekov modifikovani esencijalni medijum, eng. <i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DTNB	5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoeva kiselina
dTTP	dezoksitimidin-trifosfat, eng. <i>deoxythymidine triphosphate</i>

EDTA	etilen-diamino-tetrasirćetnakiselina, eng. <i>ethylene-diamine-tetra acetic acid</i>
EGF	epidermalni faktor rasta, eng. <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta, eng. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	etilen-glikol-tetrasirćetna kiselina, eng. <i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ER	endoplazmatični retikulum
ERK	kinaza regulisana vanćelijskim signalima, eng. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ETL	elektron-transportni lanac
FAD/FADH₂	flavin adenin dinukleotid, oksidovana i redukovana forma
FBS	fetalni goveđi serum, eng. <i>fetal bovine serum</i>
FDA	Agencija za hranu i lekove, eng. <i>Food and Drug Administration</i>
FDG	fluorescein di-β-D-galaktopiranozid
FMN/FMNH₂	flavin adenin mononukleotid, oksidovana i redukovana forma
GA3PD, GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, eng. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G6PD	glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, eng. <i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GBM	glioblastoma multiforme
G-CIMP	eng. <i>glioma CpG island methylator phenotype</i>
GCL	γ-glutamilcistein ligaza
GGT	γ-glutamil-transpeptidaza
GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSC	stem ćelije glioma, eng. <i>glioma stem cells</i>
GSH	redukovani glutation
GSSG	oksidovani glutation
GST	glutation-S-transferaza
Gy	grej, jedinica za apsorbovanu dozu radijacije, eng. <i>gray</i>
HIF	hipoksijom indukovani faktor, eng. <i>hypoxia-inducible factor</i>
IC₅₀	koncentracija inhibicije 50% u odnosu na kontrolu, eng. <i>inhibition concentration</i>
IDH	izocitrat dehidrogenaza
IgG	imunoglobulin G
iNOS	inducibilna sintaza azot-oksida, eng. <i>inducible nitrogen oxide synthase</i>
INPC	Međunarodna patološka klasifikacija neuroblastoma, eng. <i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
iRNK	informaciona ribonukleinska kiselina
JNK	c-Jun N-terminalnakinaza
Keap1	eng. <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
Maf	protoonkogeni transkripcioni faktor, eng. <i>musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza
Mcl-1	protein indukovane diferencijacije ćelija mijeloidne leukemije, eng. <i>myeloid cell leukemia 1</i>
MDR	višestruka rezistencija na lekove, eng. <i>multi-drug resistance</i>
MEM	minimalni esencijalni medijum
MGMT	metilguanin metiltransferaza
MMP	matriksna metaloproteinaza
MMR	reparacija pogrešno sparenih baznih parova, eng. <i>mismatch repair</i>
MRP	protein višestruke rezistencije, eng. <i>multi-drug resistance protein</i>

MsrA	metionin sulfoksid reduktaza A, eng. <i>methionine sulfoxide reductase A</i>
MTT	eng. 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromida
MYCN	eng. <i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)</i>
NAD⁺/NADH	nikotinadenin dinukleotid, oksidovana i redukovana forma
NADP⁺/NADPH	nikotinadenin dinukleotid fosfat, oksidovana i redukovana forma, eng. <i>nicotine adenine dinucleotide phosphate</i>
NER	reparacija ekcizijom nukleotida, eng. <i>nucleotide excision repair</i>
NF-κB	nuklearni faktor κB
NFM	eng. <i>non-fat milk</i>
NGF	nervni faktor rasta, eng. <i>nerve growth factor</i>
NO	azot-monoksid
NOS	azot-oksidi sintetaza, eng. <i>nitrogen oxide synthase</i>
NOX	NADPH oksidaza, eng. <i>NADPH oxidase</i>
Nrf2	nuklearni faktor poput eritroidnog faktora 2, eng. <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
ONOO⁻	peroksinitrit
PARP	poli(ADP-riboza) polimeraza
PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu, eng. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	fosfatni pufer, eng. <i>phosphate buffer</i>
PBMCs	periferne mononuklearne ćelije krvi, eng. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	lančana reakcija polimeraze, eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	receptor faktora rasta izvedenih iz trombocita, eng. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PFA	paraformaldehid
P-gp	P-glikoprotein
PI	propidijum jodide, eng. <i>propidium iodide</i>
Prx	peroksiredoksin, eng. <i>peroxiredoxin</i>
PTEN	homolog fosfataze i tenzina, eng. <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTX	paklitaksel, eng. <i>paclitaxel</i>
PVDF	eng. <i>polyvinylidene fluoride</i>
qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze, eng. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
Rho123	rodamin 123
RIPA	radioimunoprecipitacioni esej, eng. <i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNR	ribonukleotid reduktaza
RNS	reaktivne azotne vrste, eng. <i>reactive nitrogen species</i>
RONS	reaktivne kiseonične i azotne vrste, eng. <i>reactive oxygen and nitrogen species</i>
ROS	reaktivne kiseonične vrste, eng. <i>reactive oxygen species</i>
SD	standardna devijacija
SDS	natrijum-dodecilsulfat, eng. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sec	amino-kiselina selenocistein
SEM	standardna greška srednje vrednosti, eng. <i>standard error of mean</i>
SOD	superoksid-dismutaza
SSA	sulfosalicilna kiselina
TBE	TRIS boratni EDTA pufer
TBST	TRIS pufer sa dodatkom Tween-20, eng. <i>TRIS buffer solution – Tween-20</i>
TEMED	tetrametil etilendiamin

TERT	reverzna transkriptaza telomeraze, eng. <i>telomerase reverse transcriptase</i>
TMZ	temozolomid
TNB	2-nitro-5-tiobenzoična kiselina
TNF	faktor nekroze tumora, eng. <i>tumor necrosis factor</i>
TrkA	tropomiozinska receptorska kinaza A
tRNK	transportna ribonukleinska kiselina
Trx	tioredoksin, eng. <i>thioredoxin</i>
TrxR	tioredoksin-reduktaza, eng. <i>thioredoxin reductase</i>
TxNIP	tioredoksin inhibitorni protein, eng. <i>thioredoxin inhibitory protein</i>
TQ	tarikvidar, eng. <i>tariquidar</i>
UMA	Ugi-tip Majklovih akceptora
WHO	Svetska zdravstvena organizacija, eng. <i>World Health Organization</i>

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Osobine tumora	1
1.2. Tumori centralnog nervnog sistema	3
1.2.1. Gliomi	5
1.2.2. Terapijske strategije u lečenju glioma	6
1.3. Neuroblastomi	7
1.3.1. Terapijske strategije u lečenju neuroblastoma	9
1.4. Rezistencija na hemioterapiju	10
1.5. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidativni sistemi	11
1.5.1. Uloga oksidativnog stresa u razvoju i progresiji tumora	15
1.5.2. Manipulacija oksidativnog stresa u terapijskom pristupu lečenja tumora	17
1.6. Tiol redoks sistemi	17
1.6.1. Glutationski sistem	18
1.6.2. Tioredoksinski sistem	19
1.7. Inibitori TrxR u kliničkoj primeni i razvoju novih lekova	23
1.7.1. Ugi-tip Majklovih akceptora (UMA)	24
2. Ciljevi	27
3. Materijal i metode	28
3.1. Supstance	28
3.2. Hemikalije i reagensi	28
3.3. Čelijske linije	28
3.4. Izolacija perifernih mononuklearnih ćelija krvi	29
3.5. Kolorimetrijski testovi aktivnosti TrxR	30
3.5.1. Izolacija proteina za određivanje aktivnosti TrxR	30
3.5.2. Test za određivanje aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu	30
3.5.3. Test za određivanje aktivnosti rekombinantnog enzima TrxR1 pacova	34
3.5.4. Insulinski test za određivanje aktivnosti Trx sistema	34
3.6. Određivanje broja ćelija	35
3.7. MTT test metaboličke aktivnosti ćelija	35
3.7.1. Pojedinačni tretmani ćelija	35
3.7.2. Kombinovani tretmani ćelija	36
3.7.3. Analiza efekta kombinovanih tretmana	37
3.8. Analiza oksidativnog stresa prouzrokovanog tretmanom	37
3.9. Analiza ekspresije gena	38
3.9.1. Izolacija i provera kvaliteta RNK	38
3.9.2. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije	38

3.9.3. Analiza ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu	39
3.10. Analiza ekspresija proteina metodom imunoblota.....	40
3.10.1. Izolacija proteina iz ćelija i određivanje koncentracije proteina u izolatu	40
3.10.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE).....	40
3.10.3. Prenos proteina sa gela na polivinildifluoridnu membranu (PVDF)	41
3.10.4. Imunološka detekcija proteina hemiluminiscencijom	41
3.10.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova	42
3.11. Kolorimetrijska detekcija glutationa.....	42
3.12. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom.....	42
3.12.1. Merenje količine proteina RNR, ASK1 i TrxR1.....	42
3.12.2. Analiza mitohondrijalnog membranskog potencijala.....	43
3.12.3. Analiza ćelijske smrti.....	43
3.12.4. Analiza proliferacije ćelija	44
3.12.5. Akumulacije rodamina 123	44
3.13. Test degradacije želatina	45
3.14. Test invazije i migracije ćelija	45
3.15. Statistička analiza rezultata	46
4. Rezultati.....	47
4.1. Inhibitorna svojstva UMA.....	47
4.1.1. UMA inhibiraju aktivnost TrxR u ćelijskom lizatu	47
4.1.2. UMA specifično inhibiraju TrxR1.....	48
4.1.3. UMA inhibiraju celokupan tioredoksinski sistem	48
4.1.4. Određivanje tipa inhibicije TrxR1 od strane UMA.....	50
4.2. Ispitivanje selektivnosti UMA ka tumorskim ćelijama.....	51
4.2.1. Ekspresija komponenti Trx sistema u ćelijskim linijama.....	51
4.2.2. Upoređivanje efekta UMA na rast tumorskih i normalnih ćelija	52
4.2.3. Indukcija oksidativnog stresa pod dejstvom UMA.....	53
4.2.4. Selektivnost UMA ka tumorskim ćelijama na nivou indukcije ćelijske smrti	54
4.3. Mehanizam dejstva UMA u modelima senzitivnih i višestruko rezistentnih ćelija glioma.....	57
4.3.1. Efekat UMA na rast senzitivnih i višestruko rezistentnih ćelija glioma	57
4.3.2. UMA prouzrokuju oksidativni stres kod ćelija glioma	57
4.3.3. DVD-444 i DVD-445 povećavaju koncentraciju GSH kod ćelija glioma	59
4.3.4. DVD-444 i DVD-445 menjaju ekspresiju antioksidativnih enzima	60
4.3.5. DVD-444 i DVD-445 menjaju ekspresiju proteina ASK1, RNR i TrxR1	62
4.3.6. Depolarizacija mitohondrija pod dejstvom DVD-444 i DVD-445.....	64
4.3.7. Analiza indukcije ćelijske smrti pod dejstvom DVD-444 i DVD-445	65
4.3.8. Antiproliferativni efekat DVD-444 i DVD-445 na ćelije humanih glioblastoma. 67	

4.3.9. Efekat DVD-444 i DVD-445 na invaziju i migraciju ćelija glioma.....	68
4.4. DVD-444 i DVD-445 u kombinaciji sa drugim antitumorskim supstancama.....	73
4.4.1. DVD-444 i DVD-445 povećavaju osetljivost ćelija glioma na TMZ.....	73
4.4.2. Supstance DVD-444 i DVD-445 utiču na aktivnost P-gp pumpe i povećavaju osetljivost rezistentnih humanih glioblastoma na PTX.....	76
4.5. Analози supstance DVD-445.....	77
4.5.1. Ispitivanje selektivnosti analoga DVD-445 ka tumorskim ćelijama.....	78
4.5.2. Indukcija oksidativnog stresa.....	79
4.5.3. Interakcija analoga DVD-445 sa P-gp pumpom.....	79
5. Diskusija.....	82
5.1. Inhibicija aktivnosti TrxR1 u prisustvu UMA.....	82
5.2. Selektivnost UMA ka ćelijama neuroblastoma i glioblastoma.....	83
5.3. Mehanizam delovanja DVD-444 i DVD-445 u senzitivnim i rezistentnim ćelijama glioma.....	85
5.4. DVD-444 i DVD-445 povećavaju osetljivost ćelija glioma na citostatike.....	87
5.5. Inhibitorne i anti-tumorske osobine serije analoga DVD-445.....	88
6. Zaključci.....	90
7. Literatura.....	91

1. UVOD

1.1. Osobine tumora

Tumor (lat. „otok“) ili neoplazma (od starogrčkog *neo-* „nov“ i *plasma-* „formiranje“) predstavlja atipičnu, autonomnu masu tkiva u organizmu, koja nastaje nekontrolisanom proliferacijom ćelija. Tumori su sačinjeni od različitih ćelija, koje ostvaruju međusobne složene interakcije, kao i interakcije sa normalnim ćelijama u okolini tumora [1]. Tumori mogu biti benigni, lokalizovani, bez metastatskog potencijala, ili maligni, koji se odlikuju infiltrativnim rastom i širenjem na okolna tkiva.

U normalnoj ćeliji, rast i proliferacija su pod kontrolom protoonkogeni i tumor-supresora [2, 3]. Protoonkogeni kodiraju proteine koji promovišu ćelijski rast i deobu [4]. Nasuprot tome, proteini koje kodiraju tumor-supresor geni sprečavaju rast i deobu, a promovišu programiranu ćelijsku smrt [3]. Do transformacije normalnih u neoplastične ćelije dolazi akumulacijom mutacija u genima za protoonkogene, tumor-supresore ili proteine zadužene za održavanje stabilnosti genoma [2, 3, 5]. Mutirani protoonkogeni postaju onkogeni, aktivnost njihovih proteinskih produkta se prekomerno povećava, dok mutacije tumor-supresora doprinose transformaciji ćelija smanjenjem funkcije proteina [2-4]. Pored toga, mutacije u genima za proteine koji učestvuju u reparaciji oštećenja molekula DNK omogućavaju dalju akumulaciju mutacija [6, 7]. Hanahan i Weinberg su 2000. godine definisali šest osnovnih bioloških osobina, koje neoplastične ćelije postepeno zadobijaju transformacijom normalnih ćelija [8]. Lista od šest osnovnih osobina tumora, nakon decenije istraživanja u oblasti biologije tumora je dalje proširena, sa dodatnim karakteristikama, koje su neophodne za progresiju tumora (Slika 1) [9]:

1) Autonomna proliferacija – Jedna od osnovnih osobina ćelija tumora je stimulisanje sopstvene proliferacije, i to autokrinom stimulacijom proliferacije sintezom faktora rasta, zatim stimulacijom normalnih ćelija tumorske strome da snabdevaju ćelije tumora faktorima rasta, povećanjem broja receptora za koje se vezuju faktori rasta, kao i konstitutivnom aktivacijom receptora i nishodnih signalnih puteva.

2) Izbegavanje signala koji sprečavaju ćelijski rast i proliferaciju - Tumorske ćelije sprečavaju aktivnost tumor-supresora, proteina koji negativno regulišu ćelijski rast i proliferaciju. Pored toga, tumorske ćelije menjaju mehanizme kontaktne inhibicije, odnosno sprečavanja ćelijskog rasta i proliferacije, uslovljenih ćelijskim kontaktima.

3) Izbegavanje ćelijske smrti – Programirana ćelijska smrt ima važnu ulogu u održavanju funkcionalne građe tkiva i predstavlja jedan od mehanizama normalnih ćelija kojim se sprečava razvoj tumora. Ćelije tumora imaju različite strategije za izbegavanje programirane ćelijske smrti kao što su mutacije u genima zaduženim da prepoznaju oštećenja u ćeliji i/ili promena u zastupljenosti anti-apoptotskih i pro-apoptotskih proteina. Pored toga, ćelije tumora mogu koristiti druge mehanizme ćelijske smrti (poput autofagije i nekroze) za sopstveni rast i preživljavanje. Ćelije tumora, podvrgnute različitim stresnim faktorima, poput zračenja ili tretmana hemioterapeuticima, mogu autofagijom da redukuju svoju veličinu i ostanu u stanju mirovanja, dok se ne poboljšaju uslovi sredine, koji favorizuju njihov rast. Nekrozom se u mikrosredinu oslobađaju proinflamatorni faktori, koji privlače proinflamatorne ćelije imunskog sistema, a one pak deluju tumor promovišuće. Takođe, nekrozom se oslobađaju u sredinu faktori koji direktno stimulišu proliferaciju okolnog (tumorskog) tkiva.

4) Neograničen replikativni potencijal – Normalne ćelije mogu da se podele ograničen broj puta („Hejflikov limit“), a nakon određenog broja ćelijskih deoba, usled skraćivanja heksanukleotidnih ponovaka DNK - telomera, ulaze u fazu mirovanja (senescencija) ili podležu ćelijskoj smrti. Nasuprot njima, ćelije tumora mogu da prolaze kroz neograničen broj deoba, zbog povećane aktivnosti telomeraze i alternativne rekombinacije telomera.

5) Indukcija angiogeneze – Tumorsko tkivo zahteva dotok kiseonika, hranljivih materija i uklanjanje produkta metabolizma i ugljen-dioksida. U tumorskom tkivu je konstantno prisutna angiogeneza, proces formiranja novih iz postojeće mreže krvnih sudova, kako bi se podržao rast i razvoj tumora.

6) Aktivacija invazije i metastaze – Ćelije tumora invadiraju u okolna tkiva i ulaze u okolne krvne i limfne sudove, nakon čega krvno-limfnim sistemom dospevaju do udaljenih tkiva i organa, gde formiraju manje čvorove sačinjene od tumorskih ćelija (mikrometastaze) i potom proliferacijom formiraju makroskopski tumor. Kako bi razvile metastatski potencijal, ćelije tumora podležu reprogramiranju koje je poznato kao epitelijalno-mezenhimalni prelaz, pri čemu epitelijalne ćelije stiču sposobnost invazije i diseminacije svojstven mezenhimalnom tipu ćelija.

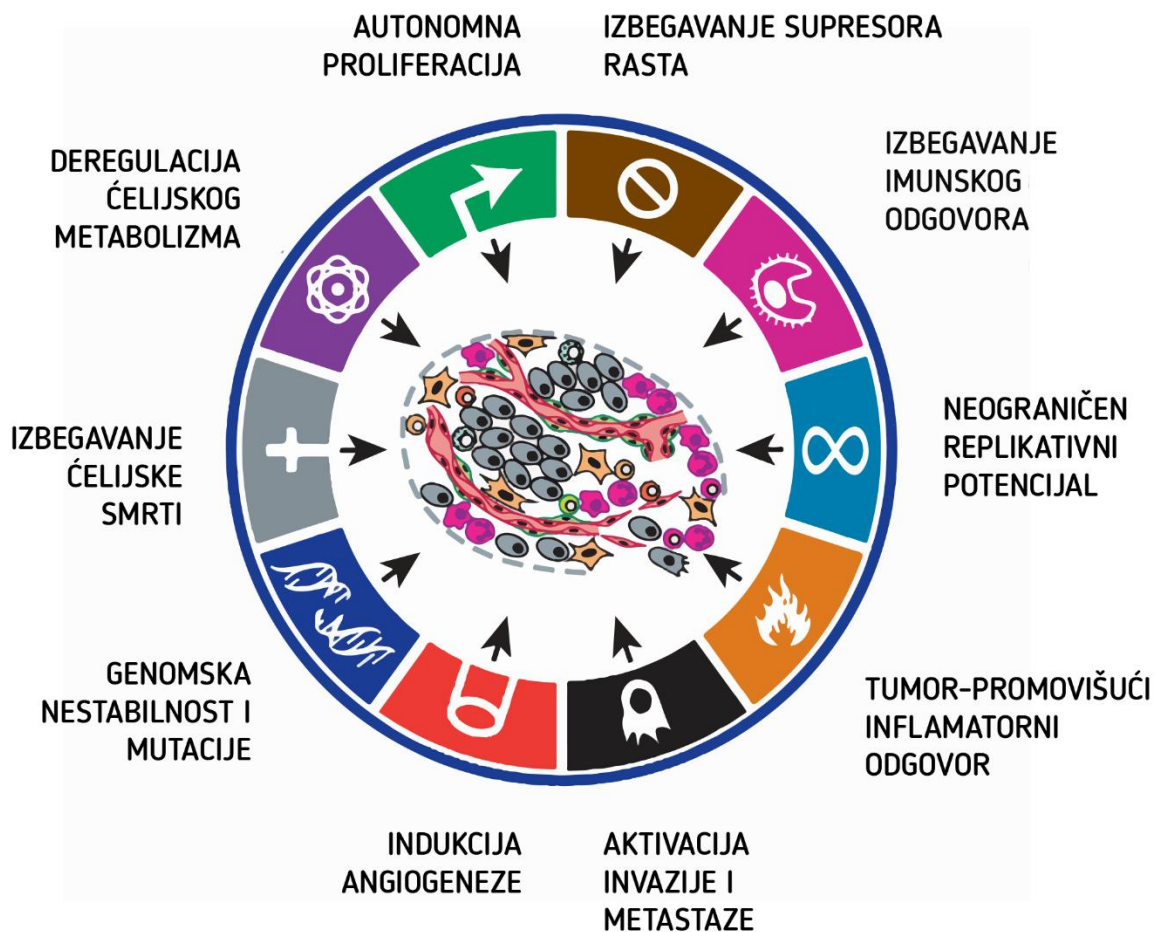
7) Genomska nestabilnost i mutacije – Tumorigeneza u velikoj meri zavisi od akumulacije mutacija u genomu ćelija tumora. Na taj način nastaje različit broj genotipova koji egzistiraju zajedno, a pojedini od njih dobijaju selektivnu prednost u određenim fazama razvoja tumora ili prilikom primene terapije.

8) Izbegavanje imunskog odgovora – U stanju homeostaze, imunski sistem konstantno vrši pregled organizma na prisustvo stranih organizama ili aberantnih ćelija, koje uklanja i sprečava patološka stanja. Međutim, ćelije tumora su razvile mehanizme kojima uspešno izbegavaju prepoznavanje od strane ćelija imunskog sistema ili čak koriste ćelije imunskog sistema za sopstveni rast i širenje.

9) Tumor-promovišući inflamatorni odgovor – Ćelije tumora koriste inflamatorni odgovor imunskog sistema za sopstveni rast, tako što se od imunskih ćelija snabdevaju faktorima rasta i preživljavanja, proangiogenim faktorima, enzimima koji omogućavaju razgradnju vanćelijskog matriksa i time olakšavaju angiogenezu, invaziju i metastaziranje, kao i signalima koji omogućavaju epitelijalno-mezenhimalni prelaz. Pored toga, ćelije tumora koriste reaktivne vrste kiseonika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) poreklom od imunskih ćelija kao signalne molekule, ali i za akumulaciju mutacija i ubrzavanje procesa tumorigeneze.

10) Deregulacija ćelijskog metabolizma – Kontinuirana proliferacija ćelija tumora zahteva prilagođavanje metaboličkih puteva, koji mogu da podrže energetske zahteve intezivno proliferišućih ćelija. Pavlova i Thompson [10] su opisali osnovne osobine metabolizma tumora, koje se pre svega odnose na povećano snabdevanje nutrijentima, korišćenje nutrijenata prvenstveno u metaboličkim putevima koji doprinose osobinama tumora, izmenjena diferencijacija ćelija tumora i izmenjena metabolička interakcija sa spoljašnjom sredinom. Aberantno aktivirani onkogeni i/ili gubitak funkcije tumor-supresora omogućavaju ćelijama tumora da se nezavisno od regulacije organizma snabdevaju glukozom, glutaminom i amino-kiselinama, što im omogućava nekontrolisanu proliferaciju. Za ćelije tumora je karakteristična „aerobna glikoliza“, proces u kome se tumorske ćelije oslanjaju na glikolizu za generisanje energije, čak i u uslovima dostupnog kiseonika – “Varburgov efekat” [11]. U prisustvu kiseonika se kod normalnih ćelija značajno više energije dobija oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijama. Prvobitno je smatrano da je aerobna glikoliza rezultat „gašenja“ oksidativne fosforilacije u

ćelijama tumora, i da ćelija koristi glikolizu kao izvor energije zbog oštećenja mitohondrija. Međutim, ispostavilo se da je aerobna glikoliza i sinteza laktata regulisan metabolički put, koji je energetski povoljan za potrebe povećane biosinteze. Visokoproliferišuće ćelije imaju tek neznatno povećanu potrebu za ATP-om, dok je potreba za molekulskim prekursorima i redukujućim ekvivalentima značajno veća, a katabolizam glukoze je efikasan izvor i prekursora i redoks potencijala. Prema Van der Hajdenovoj hipotezi [12], uloga aerobne glikolize je preusmeravanje intermedijera glikolize u različite biosintetske puteve, čime se omogućava ubrzana sinteza makromolekula neophodnih za nastanak novih ćelija. Mnoge biosintetske reakcije su pritom reduktivne prirode i zahtevaju visok redoks potencijal, koji primarno obezbeđuje nikotinadenin dinukleotid fosfat (NADPH).



Slika 1. Osnovne biološke osobine neoplastičnih ćelija. Slika modifikovana prema Hanahan i Weinberg 2011 [9].

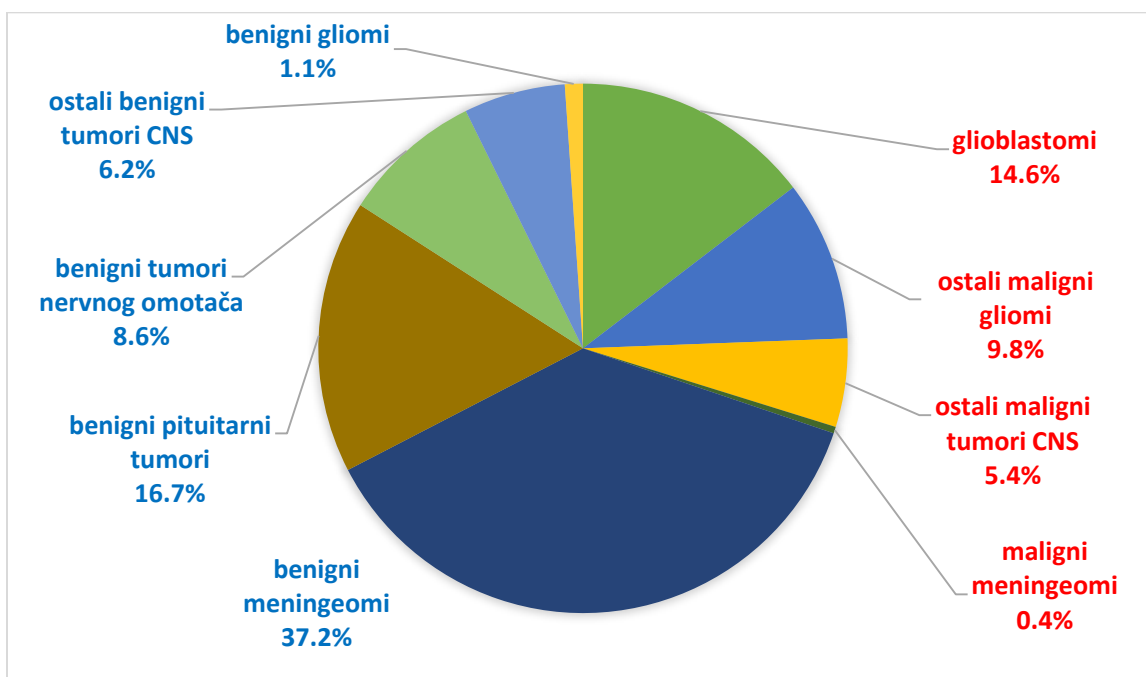
1.2. Tumori centralnog nervnog sistema

Tumori centralnog nervnog sistema (CNS) su, pored leukemija, najučestalije neoplazije kod pedijatrijskih pacijenata i adolescenata mlađih od 19 godina i među vodećim su uzrocima smrti od tumora u ovoj populaciji. Godišnje se zabeleži oko 20 000 slučajeva obolelih od primarnih,

malignih tumora CNS u SAD [13], pri čemu oni čine oko 1,4% malignih oboljenja [14]. Ipak, kada se u obzir uzmu i benigni tumori mozga, sa više od dva puta većom incidencom od malignih tumora mozga, kao i metastaze na mozgu, sa 200 000 do 300 000 zabeleženih slučajeva godišnje, neoplastična oboljenja CNS nisu toliko retka u populaciji.

Benigni tumori CNS-a formiraju lokalizovanu masu tumorskog tkiva, kojom vrše pritisak na okolne strukture. Maligne tumore CNS-a odlikuje ubrzani rast i širenje na okolna tkiva. Procenat benignih oblika tumora među obolelim of tumora CNS iznosi oko 70%, dok je procenat obolelih sa malignim oblicima tumora oko 30% (Slika 2) [15]. Primarni tumori CNS-a nastaju unutar mozga ili kičmene moždine, mogu da se prošire na druga tkiva unutar nervnog sistema, ali su metastaze na druge, udaljene organe veoma retke. Sekundarni tumori CNS-a nastaju na udaljenim mestima u telu i metastaziraju na mozgu. Najčešće metastaze na mozgu formiraju maligni tumori pluća, dojki, debelog creva, bubrega i melanomi, a metastaze na mozgu se javljaju kod 20% odraslih pacijenata sa malignitetom [14, 16]. Primarni tumori CNS-a su najčešće poreklom od glijskih i drugih pomoćnih ćelija nervnog sistema. Neuronalni i mešoviti neuronalno-glijski tumori su veoma retki, čine manje od 1% svih tumora mozga, najčešće nisu maligni i uklanjaju se hirurškom resekcijom [17].

Stopa preživljavanja obolelih od tumora CNS-a zavisi od tipa tumora, stadijuma, lokacije unutar CNS-a, kao i od godina starosti pacijenta, pri čemu je verovatnoća oporavka nešto veća kod mlađe populacije. Učestalost raznih tipova primarnih tumora zavisi od uzrasne grupe, te su pilocitični astroцитomi i embrionalni tumori (pogotovo meduloblastomi) najčešći kod dece, pituitarni tumori kod starijih adolescenata i mladih osoba (od 15 do 34 godine), dok su meningiomi i glioblastomi najčešći kod populacije starije od 35 godina [15].



Slika 2. Distribucija primarnih tumora CNS-a, prema ponašanju tumora. Uzorak od 405 740 pacijenata je prikupljen u periodu 2012 – 2016. godine, na teritoriji SAD. Ukupan broj pacijenata sa benignim tumorima CNS-a (plava slova) je iznosio 283 171, odnosno 69,8%, dok je ukupan broj pacijenata sa malignim tumorima CNS-a (crvena slova) iznosio 122 569, odnosno 30,2%. Slika modifikovana prema *Ostrom i sar., 2019 [15]*.

1.2.1. Gliomi

Gliomi pripadaju grupi neuroektodermalnih tumora CNS-a koji vode poreklo od glijskih ćelija ili njihovih prekursorskih ćelija. Na osnovu tipa glijskih ćelija od kojih vode poreklo gliomi se dele na astrocitome i oligodendrogliome.

Gliomi imaju nisku učestalost u populaciji, sa demografskim varijacijama od 0,59 do 3,69 dijagnoza na 100 000 stanovnika godišnje [18], čine oko 15% slučajeva tumora CNS-a i približno polovinu slučajeva malignih tumora CNS-a (Slika 2) [15]. Na osnovu prisustva markera mitotičke aktivnosti, nekroze i mikrovaskularne proliferacije, gliomi se prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (eng. *World Health Organisation*, WHO) klasifikuju prema malignitetu na graduse I-IV: pilocistični astrocitomi (gradus I), difuzni astrocitomi i oligodendrogliomi (gradus II), anaplastični astrocitomi i oligodendrogliomi (gradus III) i glioblastomi (gradus IV). Zajednička karakteristika svih difuznih glioma je prodorna infiltracija u parenhim CNS-a duž traktusa i krvnih sudova [19].

Infiltracija neoplastičnih ćelija u CNS-u pacijenata obolelih od glioblastoma (GBM) dovodi do neurološke disfunkcije i smrtnog ishoda pacijenata u roku od 1 godine nakon dijagnoze. GBM su najučestalija forma agresivnih tumora CNS-a kod odraslih pacijenata. Pokazuju visok stepen rezistencije na terapiju, zbog čega je lečenje ove bolesti veliki izazov i često bez rezultata. Prema prvobitnoj klasifikaciji, GBM se dele na primarne i sekundarne. Primarni ili *de novo* GBM čine oko 90% svih GBM i najčešće se dijagnostifikuju kod pacijenata starosti između 60 i 70 godina života. Sekundarni GBM nastaju progresijom niskogradusnih glioma, akumulacijom mutacija u tumor-supresorima i protoonkogenima; čine oko 10% svih GBM i najčešće se dijagnostifikuju kod mlađih pacijenata, oko 40 godina starosti [20].

Prema novoj klasifikaciji tumora CNS-a iz 2016, WHO je u morfološku klasifikaciju integrisala informacije o molekularnim faktorima tumora CNS-a [25], pa se prema toj klasifikaciji GBM dele u sledeće kategorije: 1) GBM IDH-“wild type”, koji odgovara prethodno klasifikovanom primarnom GBM; 2) GBM IDH-mutirani (oko 10% slučajeva), odgovara na osnovu prethodne klasifikacije sekundarnom GBM i 3) GBM NOS (eng. *not otherwise specified*). Izocitrat dehidrogenaze 1 i 2 (IDH) pripadaju enzimima reakcija Krebsovog ciklusa, koji konvertuju izocitrat u α -ketoglutarat. Mutirana IDH koristi α -ketoglutarat kao supstrat i konvertuje ga u onkometabolit 2-hidroksiglutarat, koji deluje kao inhibitor α -ketoglutarat zavisnih dioksigenaza [9]. U α -ketoglutarat zavisne dioksigenaze spadaju i histon demetilaze, tako da mutacija gena za IDH 1 i 2 za posledicu imaju hipermetilaciju CpG ostrvaca kod IDH-mutiranih glioblastoma i definiše se kao metilator fenotip (eng. *glioma CpG island methylator phenotype*, G-CIMP), a koreliše sa boljom kliničkom prognozom [18].

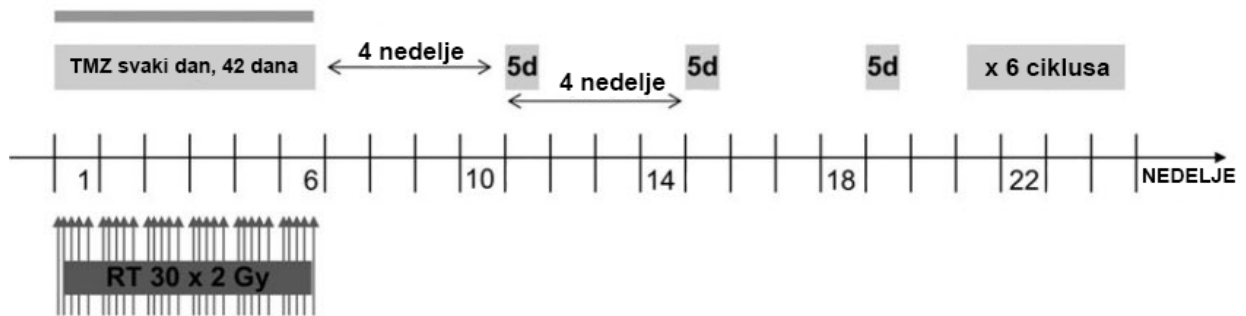
Najčešće genomske promene koje se javljaju kod GBM su mutacije u promotoru gena za reverznu transkriptazu telomeraze (eng. *telomerase reverse transcriptase*, TERT), mutacije u genu za p53 protein (TP53), mutacije u genu za transkripcioni regulator ATP-zavisnu helikazu ATRX, amplifikacije gena za receptor epidermalnog faktora rasta (eng. *epidermal growth factor receptor*, EGFR), mutacije gena za homolog fosfataze i tenzina (eng. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN) i mutacija gena za IDH 1 i 2 [21]. Genomske promene koje prate gliomagenezu za posledicu imaju promene u redoks ravnoteži tumorskog okruženja [22]. Naime, povećana ekspresija EGFR i ligacija sa EGF dovodi do povećane akumulacije vodonik-peroksida (H_2O_2) i drugih reaktivnih vrsta kiseonika i azota (eng. *reactive oxygen and nitrogen species*, RONS) unutar ćelijskih linija tumora; H_2O_2 kao signalni molekul utiče na povećanu sintezu DNK, dok akumulacija RONS dovodi do povećane stope mutagenoze [23]. H_2O_2 oksiduje tumor supresor PTEN, koji ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma, apoptoze, proliferacije i preživljavanja ćelije. Oksidacija PTEN dovodi do

promena u interakcijama sa drugim regulatornim proteinima [24]. Protein p53 je uključen u regulaciju energetskog metabolizma i ekspresije proteina koji učestvuju u redoks regulaciji, poput superoksid-dismutaze 2 (SOD2) i glutation-peroksidaze 1 (GPx1) [25].

1.2.2. Terapijske strategije u lečenju glioma

“Stupov protokol” [26] je opšte prihvaćena strategija za lečenje GBM, nazvana prema Švajcarskom onkologu, Rodžeru Stupu. Protokol se sastoji od sledećih koraka (Slika 3):

- 1) hirurške resekcije tumora, ukoliko je to moguće,
- 2) terapije zračenjem, 2 Gy dnevno, 5 dana u nedelji, u trajanju od 6 nedelja,
- 3) i terapije temozolomidom (TMZ), u toku trajanja radioterapije sa 75 mg/m² dnevno, 7 dana nedeljno, dok nakon završene radioterapije sledi 6 ciklusa sa 150 – 200 mg/m² dnevno, 5 dana u jednom ciklusu od 28 dana.



Slika 3. Šematski prikaz Stupovog protokola. Nakon hirurške resekcije, sledi fokalna radioterapija (RT), u ukupnoj dozi od 60 Gy (30 x 2 Gy) tokom 6 nedelja. Zajedno sa RT, primenjuje se hemioterapija temozolomidom (TMZ), u nižoj dozi, svaki dan, 42 dana. Nakon 4 nedelje pauze, sledi 6 ciklusa hemioterapije sa TMZ. Ciklusi se sastoje od 28 dana, visoke doze TMZ se primenjuju od 1. do 5. dana svakog ciklusa.

Potpuno hirurško uklanjanje GBM nije moguće. Agencija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA, USA) je do danas odobrila samo dva hemioterapeutika prve linije za lečenje glioblastoma, karmustin i TMZ. Karmustin (bis-hloroetilnitrozourea, BCNU) je lipofilni molekul koji dovodi do prekida u molekulu DNK; prolazi krvno-moždanu barijeru, ali mu je penetrabilnost u moždano tkivo intravenskom primenom niska. Zbog toga je razvijen biorazgradivi nosač Gliadel®, koji omogućava lokalnu primenu visoke koncentracije karmustina u samom tumorskom tkivu. Temozolomid je oralni hemioterapijski lek, prolazi krvno-moždanu barijeru i ima dobru penetrabilnost u moždano tkivo, te se koristi kao primarni hemioterapeutik u lečenju glioblastoma, i kao sekundarni hemioterapeutik u lečenju astrocitoma. Deluje kao monofunkcionalni metilujući agens, te zaustavlja ćelijski ciklus i uzrokuje apoptozu ćelija koje se dele [27]. Terapeutik se unosi u organizam oralno u vidu prodroge, nakon čega se u fiziološkim uslovima formira aktivna supstanca leka. Reaktivna supstanca vrši bazno-selektivnu metilaciju u DNK lancu, pri čemu su mete metilacije atomi N7 guanina, N3 adenina i O6 guanina. Ključnu ulogu u ispoljavanju toksičnog dejstva TMZ ima O6-metilguanin (O6-mG), koji se umesto sa citozinom sparuje sa timinom, tako da dolazi do pogrešnog sparivanja baznih parova. Posledično, aktivira se zaštitni mehanizam ćelije, reparacija pogrešno sparenih baznih parova (eng. mismatch repair, MMR). Ovim mehanizmom se iseca pogrešno spareni timin, ali kako O6-mG ostaje neizmenjen, ponovo se aktivira MMR. Repetitivne, uzaludne runde pokušaja ćelije da ispravi grešku u lancu

DNK dovodi do hroničnih dvolančanih prekida u lancu i ultimativno pokreće apoptozu tumorske ćelije [28, 29].

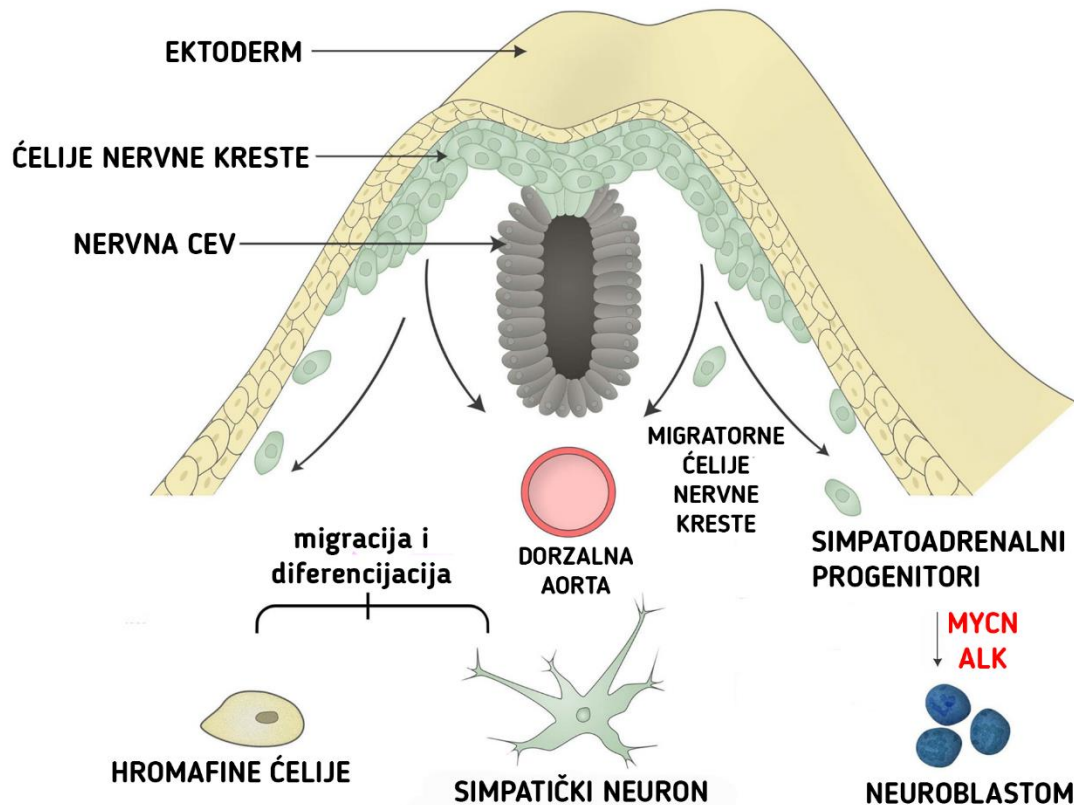
Hemioterapija usmerena na uništavanje mitotičkih neoplastičnih ćelija ili tumorskih klastera nema efekat na nemitotičke invazivne ćelije, koje mogu vremenom da formiraju sekundarne tumore na mestima udaljenim od primarnog tumorskog tkiva. U toku su istraživanja koja ispituju postoperativni efekat primene Gliadela® zajedno sa hemioterapijom TMZ, ali dosadašnji rezultati ne ukazuju na značajno produžavanje života kod ovih pacijenata [30].

Osnovne prepreke u razvoju novih terapijskih pristupa predstavljaju: značajna inter- i intratumorska heterogenost, rezistencija na terapiju zračenjem i hemioterapiju, pojava tumora na teško pristupačnim mestima za hiruršku intervenciju, ponovno javljanje bolesti i nakon maksimalne resekcije tumorskog tkiva (98%) i postojanje krvno-moždane barijere, koju terapeutici moraju da prođu da bi ostvarili dejstvo. Sa ekonomskog aspekta i isplativosti razvoja novih lekova od strane farmaceutske industrije, relevantna je i relativno niska incidenca bolesti, te je i tržište za razvoj lekova veoma ograničeno. Za razvoj novih terapeutika, neophodno je bolje razumevanje patologije GBM. Identifikacija molekularnih mehanizama ključnih za razvoj patologije, kao i bolje razumevanje biološke prirode tumora, se koriste za predlaganje novih meta terapeutika.

1.3. Neuroblastomi

Neuroblastomi pripadaju grupi razvojnih tumora. Najučestaliji su ekstrakranijalni solidni tumori kod dece, čine preko 7% malignih bolesti kod pacijenata mlađih od 15 godina i uzrokuju preko 15% pedijatrijskih onkoloških smrtnih ishoda [31, 32]. Najveća verovatnoća razvoja bolesti je u perinatalnom periodu života, a potom je verovatnoća sve manja do 10 godine života; kod starijih pacijenata – adolescenata, do razvoja bolesti dolazi retko, ali je bolest agresivnog oblika i najčešće ima letalan ishod. Klinički su izuzetno heterogena vrsta tumora: kod nekih dolazi do spontane regresije tumora ili se diferenciraju spontano u potpunosti i bez tretmana, dok se kod drugih obolelih razvijaju metastaze i dolazi do smrtnog ishoda uprkos agresivnim, multimodalnim terapijama [33]. Prema procenama istraživanja u Japanu, Americi i Evropi koja su bila usmerena na ranu dijagnostiku neuroblastoma, pretpostavlja se da oko polovine slučajeva neuroblastoma kod dece mlađe od 18 meseci nije ni otkrivena, usled spontane regresije tumora [32]. Takođe, pokazano je da rana dijagnostika bolesti ne doprinosi značajno pozitivnom ishodu – pretpostavka je da se tumori pri samom nastanku diferenciraju kao niskorizični ili visokorizični. Kod oko 50% obolelih, tumor se razvija kao lokalizovana masa, dok se kod druge polovine razvijaju metastaze, najčešće na kostima i jetri. Velika većina tumora se razvija u abdomenu i daleko najčešći su neuroblastomi adrenalne žlezde.

U toku normalnog razvića nervnog sistema čoveka, primordijalne neuroepitelne ćelije nervne kreste migriraju od dorzalne nervne cevi i diferenciraju se u melanocite, senzorne, enteričke ili simpatičke neurone. Većina ovih neurona odumire programiranom ćelijskom smrti, uglavnom u završnim fazama diferencijacije [32], a preživeli neuroni završavaju proces diferencijacije do funkcionalnih, zrelih neurona. Neuroblastomi nastaju isključivo od prekursora simpatoadrenalne linije (Slika 4), što govori da tumor nastaje nakon migracije ćelija od nervne kreste i sa inicijalnom diferencijacijom u simpatičku liniju prekursora [34].



Slika 4. Razviće neuroblastoma od nervne kreste. Ćelije nervne kreste migriraju do mesta diferencijacije, formirajući ćelije simpatoadrenalne linije. Simpatoadrenalni progenitori se diferenciraju u hromafine ćelije, neuroendokrine ćelije srži nadbubrežne žlezde i neurone simpatičke ganglije. Migratorne ćelije nervne kreste u velikoj meri odumiru apoptozom. Deregulacija ekspresije MYCN je najpotentniji onkogeni pokretač nastanka neuroblastoma, indukuje proliferaciju i inhibira apoptozu ćelija simpatoadrenalne linije, što dovodi do razvoja neuroblastoma. Mutacije ALK dovode do razvića familijalnih neuroblastoma. Slika modifikovana prema *Johnsen, Dyberg i Wickstrom, 2019* [35].

Prema kliničkim i biološkim dijagnostičkim parametrima, neuroblastomi se klasifikuju kao niskorizični, tumori srednjeg rizika i visokorizični. Preživljavanje pacijenata sa niskorizičnim neuroblastomom i tumorom srednjeg rizika je preko 90%, dok je stopa preživljavanja dece sa visokorizičnim neuroblastomom manja od 40% [36, 37]. Ipak, kod pacijenata mlađih od godinu dana gotovo uvek dolazi do potpunog oporavka, čak i kada dođe do razvoja metastaza. Među parametrima koji se koriste u proceni rizika su starosno doba u trenutku uspostavljanja dijagnoze, stadijum tumora, histopatološke karakteristike po sistemu Međunarodne patološke klasifikacije neuroblastoma (eng. *International Neuroblastoma Pathology Classification, INPC*) [38], stepen ploidije i prisustvo amplifikacije MYCN gena.

Osnovne genomske promene kod neuroblastoma podrazumevaju amplifikaciju MYCN [39], mutacije kinaze anaplastičnog limfoma (eng. *anaplastic lymphoma kinase, ALK*) [40] (Slika 4) i promene u broju ponovaka hromozoma [41].

Karakteristike agresivnih tumora su amplifikacija MYCN, gubitak distalnih delova 1p hromozoma, višak 17q hromozoma i gubitak 11q hromozoma [41]. Ekspresija N-Myc proteina je

ograničena na nervni sistem i mezenhim tokom tačno određenih faza razvića, za razliku od ekspresije c-Myc proteina iz iste familije protoonkogeni. U adultnom tkivu je ekspresija N-Myc minimalna. N-Myc učestvuje u regulaciji NGF/TrkA signalnog puta koji je od ključnog značaja za procese ćelijskog rasta, proliferacije, metabolizma, apoptoze i diferencijacije ćelija nervnog sistema [41]. Supresija ovog signalnog puta amplifikovanim N-Myc ima ključnu ulogu u onkogenezi visokorizičnih neuroblastoma. Pored MYCN, važnu ulogu u patogenezi neuroblastoma ima i *cys-antisense* transkript istog gena, NCYM. Između transkripcije MYCN i NCYM postoji odnos pozitivne povratne sprege: N-CYM protein stabilizuje N-Myc, a N-Myc indukuje transkripciju N-CYM proteina [32].

ALK je receptor tirozin kinaze, koji se u normalnim uslovima eksprimira samo u embrionalnom i neonatalnom mozgu. Kao posledica hromozomskih translokacija dolazi do konstitutivne ekspresije fuzionisanih ALK proteina i, posledično, razvoja maligniteta. Ekspresija ALK je identifikovana kao jedan od glavnih uzroka razvoja familijarnih neuroblastoma [40], koji su veoma retki i čine tek 1 – 2% slučajeva. Pored toga, gen za ALK se nalazi u blizini MYCN gena i amplifikuje se zajedno sa njim, a pokazano je i da je ALK direktna transkripciona meta N-Myc [42].

Kariotip ćelija neuroblastoma može biti nepotpuni diploidni ili hiperploidni (najčešće tri- i tetraploidni). Manje agresivni neuroblastomi u osnovi pokazuju greške asociirane sa procesom mitoze, koje utiču na celokupno gubljenje ili dobijanje hromozoma, te hiperploidni tumori obično impliciraju povoljniju kliničku prognozu. Više agresivni neuroblastomi u osnovi pokazuju genomsku nestabilnost, sa preuređenjem hromozoma, neuravnoteženim translokacijama i održavanjem DNK sadržaja u stanju nepotpunog diploida [43].

1.3.1. Terapijske strategije u lečenju neuroblastoma

Terapijske strategije u lečenju neuroblastoma se razlikuju u zavisnosti od vrste tumora. Gotovo 50% dijagnostifikovanih pacijenata čine osobe sa niskorizičnim i tumorima srednjeg rizika, kao i pacijenti mlađi od godinu dana sa metastazama. Tumori u ovim slučajevima su bez MYCN amplifikacije i najčešće lokalizovani. Klinička slika i prognoza ove grupe pacijenata je gotovo uvek odlična, stopa preživljavanja pacijenata je preko 90%, pri čemu se terapija svodi na posmatranje, hirurško uklanjanje mase tumora ili u retkim slučajevima, umerene doze hemioterapije i hirurško uklanjanje [33]. Hemioterapija se primenjuje kod neuroblastoma srednjeg rizika, kako bi se sprečilo ponovno javljanje tumora.

Drugu polovinu pacijenata čine osobe sa visokorizičnim neuroblastomima. Uprkos ispitivanjima efekta različitih terapijskih pristupa tokom godina, prognoza pacijenata sa ovim tipom tumora je veoma loša, sa stopom preživljavanja oko 40%. Standardni tretman se sastoji od indukcione hemioterapije, lokalne kontrole širenja tumora, terapije konsolidacije i lečenja od rezidualnih tumora. Kod oko 20% pacijenata, nakon faze konsolidacije dolazi do ponovnog javljanja tumora. Takođe, odgovor na terapiju je niži kod adolescenata i odraslih, kod kojih se često javlja rezistencija na terapiju [44]. U terapiji neuroblastoma primenjuju se sledeći hemioterapeutici: alkilujućim agensi, jedinjenja platine, inhibitori topoizomeraze II i antraciklini. Pacijenti kod kojih hemioterapija ne ispolji značajan efekat imaju stopu preživljavanja manju od 20%. Faza lokalizacije tumora podrazumeva hirurško uklanjanje tumora, ukoliko je moguće, kao i terapiju zračenjem. Ipak, obzirom na činjenicu da su pacijenti uglavnom deca, kod kojih je i dalje prisutno tkivo u razvoju, toksičnost terapije zračenjem je jako visoka i pokazuje dalekosežne efekte. Problem je delimično rešen zračenjem protonskim zrakom, kako bi se smanjila doza zračenja normalnog tkiva [45]. Faza konsolidacije podrazumeva mijeloablativnu hemioterapiju sa autolognom transplatacijom matičnih ćelija. Neuroblastomi su jedni od retkih tumora kod kojih

mijeloablativna konsolidacija sprečava ponovno formiranje tumora. Lečenje minimalnih, rezidualnih klonova neuroblastoma podrazumeva primenu bioloških agensa, poput sintetičkih retinoida, anti-GD2 monoklonskih antitela (GD2 su markeri tumorskih ćelija neuroblastoma, gangliozidi koji se eksprimiraju na površini ćelija), imunocitokina ili difluorometilornitina, inhibitora ornitin dekarboksilaze.

Dodatni izazov u lečenju neuroblastoma predstavljaju pacijenti sa rekurentnim tumorima, kod kojih se najčešće formiraju metastatski tumori sa rezistentnim ćelijama, koji se značajno razlikuju od primarnih tumora. U tim slučajevima, najčešće se koriste hemioterapeutici sa mehanizmima dejstva različitim od prvobitno korišćenih hemioterapeutika. Za lečenje rekurentnih neuroblastoma, koriste se inhibitori topoizomerase II topotekan i irinotekan, kombinacija izofosfamida, karboplatine i etoposida, kao i ciljana terapija radioizotopima.

Istraživanja novih terapijskih modaliteta u lečenju visokorizičnih i rekurentnih neuroblastoma u prethodnoj deceniji daju pozitivne rezultate i vode ka poboljšanju kliničke prognoze pacijenata. Kako bi se povećala verovatnoća preživljavanja pacijenata sa visokorizičnim neuroblastomima, neophodno je dodatno istražiti i razjasniti patogenezu bolesti, kako bi se stvorile mogućnosti za razvoj novih pristupa lečenju. Važno je istaći da je istraživanje novih terapijskih pristupa u lečenju visokorizičnih neuroblastoma od ogromnog značaja i kako bi se smanjili štetni efekti agresivnih terapijskih pristupa, koji dovode do sistemskih oštećenja srca, bubrega, gubitka sluha i sekundarnih maligniteta.

1.4. Rezistencija na hemioterapiju

Primena hemioterapije je jedan od osnovnih pristupa u lečenju tumora. Efikasnost hemioterapeutika je ograničena rezistencijom, koja se može opisati kao izostanak značajnog odgovora na terapiju, ili nastavak rasta tumora nakon inicijalnog odgovora na terapiju. Rezistencija na terapiju može biti urođena ili stečena. Urođena rezistencija znači da je ćelija tumora pre početka primene leka imala razvijene efikasne mehanizme za suzbijanje dejstva leka. Stečena rezistencija je prouzrokovana samim lekom – ćelija tumora, „napadnuta“ toksičnim agensom, razvija mehanizme odbrane kako bi preživela [46, 47]. Ćelije tumora, aktivacijom signalnih puteva i mehanizama rezistencije na jedan lek, često postaju rezistentne i na druge lekove, pri čemu nastaje višestruka rezistencija na lekove (eng. *multi-drug resistance*, MDR). Ćelije koje prežive citotoksično dejstvo hemioterapije, umnožavaju se i formiraju kolonije rezistentnih ćelija [48], često postaju agresivnije i predstavljaju veći izazov za dalji tretman. Kod glioblastoma, rezistencija na terapiju se pripisuje subpopulaciji gliomskih stem ćelija (GSC), koje se uspešno adaptiraju na delovanje hemioterapeutika, a u stanju su da obnove rast tumora i da daju heterogene tipove ćelija sa različitim adaptivnim sposobnostima [49].

Klasični mehanizam MDR-a je prekomerna ekspresija ATP-vezujućih (eng. *ATP-binding cassette*, ABC) transportera na membranama ćelija tumora [46, 50]. Transporteri koji se najčešće dovode u vezu sa razvojem rezistencije su: ABCB1/P-glikoprotein (P-gp), ABCG2/BCRP (eng. *breast cancer resistance protein*) i ABCC1/MRP1 (eng. *multidrug resistance protein 1*). Osnovna uloga ovih transportera je izbacivanje ksenobiotika, uključujući i veliki broj hemioterapeutika, iz ćelije, što dovodi do njihove smanjene akumulacije u tumorskoj ćeliji. P-gp, MRP1 i BCRP su konstitutivno eksprimirani na membranama ćelija koje formiraju krvno-moždanu barijeru, kako bi sprečili prodor toksičnih agensa u mozak [51]. Jedna od osnovnih karakteristika P-gp je široka supstratna specifičnost, a među njegove supstrate spadaju i brojni citostatici, kao što su antraciklini (doksorubicin, daunorubicin), takseni (paklitaksel), inhibitori topoizomeraza (irinotekan, topotekan, etoposid), alkaloidi vinke (vinblastin, vinkristin), inhibitori tirozin kinaza

(dasatinib, gefitinib) i drugi. Zbog značaja koji imaju u razvoju rezistencije na lekove, P-gp je postao privlačna meta za razvoj novih lekova [52-54].

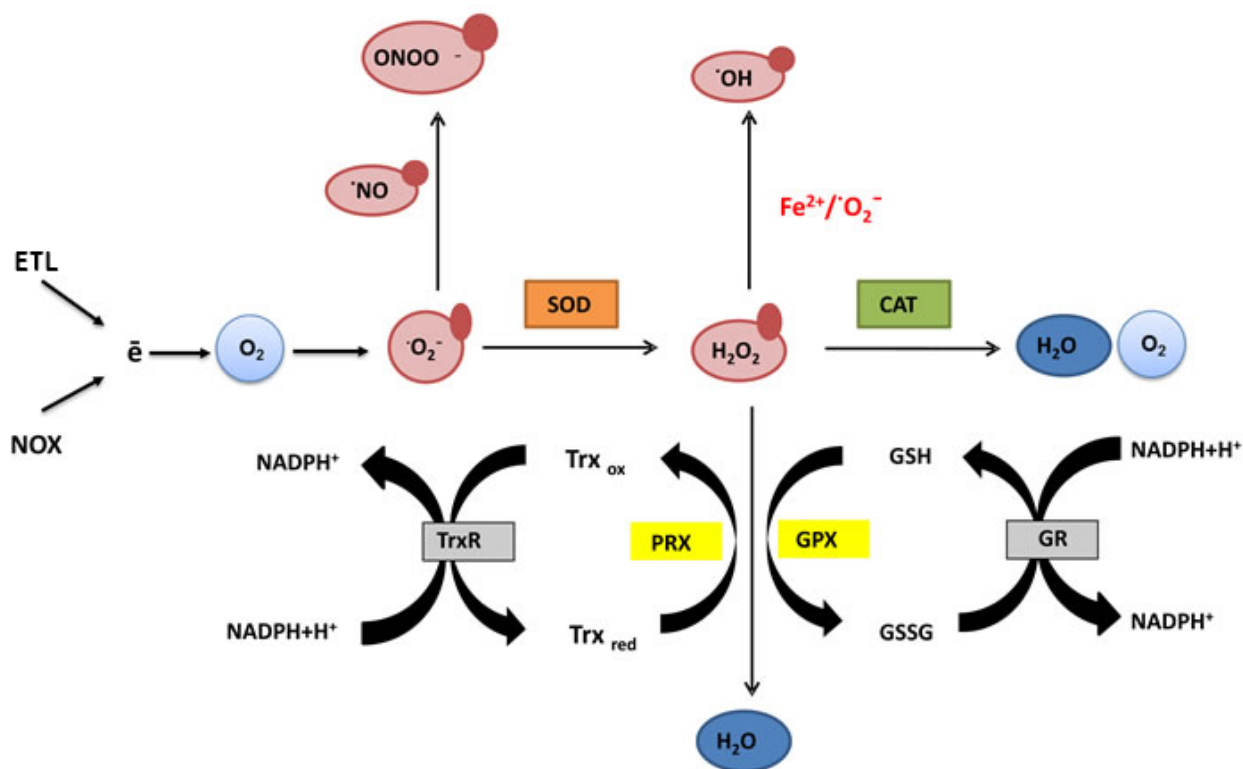
Osnovni mehanizam rezistencije na alkilujuće agense (jedinjenja platine, BCNU i TMZ), koji oštećuju DNK, je prekomerna aktivacija reparacije DNK. Kod DNK oštećenja izazvanih jedinjenjima platine (cisplatin, oksaliplatin) aktivira se reparacija ekscizijom nukleotida (eng. *nucleotide excision repair*, NER) [55]. Prekomerna ekspresija enzima metilguanin metiltransferaza (MGMT) se dovodi u vezu sa rezistencijom na dejstvo BCNU i TMZ. BCNU uvodi letalna unakrsna sparivanja lanaca DNK, dok TMZ metiluje baze u molekulu DNK, i posledično indukuje dvolančane prekide u lancu DNK. Čelije tumora reaguju na dejstvo citostatika povećanom ekspresijom MGMT enzima, koji efikasno demetiluju izmenjene baze i sprečavaju dalja oštećenja molekula DNK. U razvoju rezistencije na TMZ važnu ulogu ima i povećana ekspresija enzima koji učestvuju u reparaciji ekscizije baznih parova (eng. *base pare excision repair*, BER), među kojima ključnu ulogu ima poli(ADP-riboza) polimeraza – PARP-1. Enzim se aktivira pojavom prekida lanaca DNK i ubikvitno je visoko ekspresiran. Sticanje rezistencije na alkilujuće agense, poput TMZ, je obično praćeno povećanom produkcijom RONS u mitohondrijama [56, 57].

Konačni cilj hemioterapeutika je indukcija ćelijske smrti tumorskih ćelija. Apoptoza, kao vid programirane ćelijske smrti, je regulisana ćelijskim signalima unutar i van ćelije. Signali za apoptozu se pojačavaju sekundarnim glasnicima i aktiviraju kaspaze, kao proteinske efektore apoptoze. Unutarćelijska aktivacija kaspaza se vrši preko Bcl-2 familije proteina, a vanćelijska aktivacija preko familije receptora faktora nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*, TNF). Aktivirane inicijatorske kaspaze 2, 8, 9 i 10 dalje pokreću efektorske kaspaze, od kojih su najbitnije 3 i 7, a one dalje aktiviraju mehanizme apoptoze – kondenzaciju hromatina, fragmentaciju jedra, pupljenje membrane i skupljanje ćelije. Bcl-2 familija se sastoji od proapoptotskih (Bax, Bak, Bad) i antiapoptotskih (Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-2) proteina. Proapoptotski Bcl-2 proteini dovode do oslobađanja citohroma c iz mitohondrija, koji potom aktivira inicijatorske kaspaze. Proteini antiapoptotske familije se suprotstavljaju pokretanju apoptoze, tako što se vezuju za proapoptotske proteine i sprečavaju njihovu funkciju. Prekomerna ekspresija antiapoptotskih Bcl-2 proteina sprečava ćelijsku smrt prouzrokovanu hemioterapijom kod ćelijskih linija tumora dojke [58], dok prekomerna ekspresija proapoptotskog Bax proteina povećava osetljivost tumora dojke na terapiju cisplatinom, etoposidom i jonizujuće zračenje [59, 60]. Utišavanje ekspresije Bcl-2 i Bcl-XL takođe povećava osetljivost tumorskih ćelija na dejstvo citotoksičnih agensa, dok gubitak ekspresije Bax smanjuje osetljivost na terapiju [61]. Tumor-suspresor p53 ima ključnu ulogu u detekciji oštećenja DNK i regulaciji signalnih puteva koji dovode do apoptoze. *Wilde-type* p53 utišava ekspresiju antiapoptotskog Bcl-2 [62]. Do inaktivacije p53 dolazi kod više od 50% pacijenata sa primarnim GBM. Nedostatak funkcije p53 dovodi do povišene ekspresije Bcl-2 i/ili EGFR [63, 64], što je u korelaciji sa rezistencijom na lekove [65, 66]. Pokazano je da inaktivacija *wilde-type* p53 ili ekspresija dominantno negativnog mutiranog p53 dovodi do rezistencije na TMZ [66], dok agensi koji stabilizuju konformaciju *wilde-type* p53 povećavaju osetljivost ćelija GBM na TMZ [67].

1.5. Reaktivne kiseonične vrste i antioksidativni sistemi

Redoks biologija, kao grana nauke koja proučava aspekte životnih procesa posredovane ili pod uticajem redoks reakcija, je u velikoj meri usmerena na proučavanje uloge i značaj održavanja homeostaze RONS, kao i uloge poremećaja redoks ravnoteže u patološkim stanjima. Pored RONS, za metabolizam i signalizaciju su bitni i redoks parovi koenzima, jona metala i prostetičnih grupa; neki od njih su NAD⁺/NADH, NADP⁺/NADPH, GSSG/GSH, CoQ/CoQH, FMN/FMNH₂ i FAD/FADH₂.

RONS imaju važnu fiziološku ulogu u živim sistemima i predstavljaju deo regulisane redoks homeostaze. Kod zdravih i funkcionalnih ćelija, RONS u niskim koncentracijama imaju ulogu signalnih molekula, aktiviraju proliferaciju i promovišu preživljavanje ćelije [68-71]. Koncentracija RONS se održava delovanjem antioksidativnih enzima i molekula, koji uklanjaju slobodne radikale (Slika 5). Oksidativni stres predstavlja stanje neravnoteže između stope produkcije slobodnih radikala i aktivnosti antioksidativnih sistema ćelije, pri čemu je stopa produkcije slobodnih radikala veća od kapaciteta sistema za njihovo uklanjanje. Umereno povišen nivo RONS dovodi do oštećenja ćelija na tri osnovna načina: lipidnom peroksidacijom membranskih sistema, oksidacijom proteina i oštećenjem molekula DNK [72, 73]. Oštećenje molekula DNK povećava stopu mutagenoze i potencijalno dovodi do maligne transformacije ćelije. Visoke koncentracije RONS uvode ćeliju u stanje mirovanja ili dovode do ćelijske smrti [74-76].



Slika 5. Šematski prikaz unutarćelijskih RONS i antioksidativnih sistema. Elektron-transportni lanac (ETL) i NADPH oksidaze (NOX) su glavni izvori endogenih RONS. Oslobođeni elektroni, kuplovani sa molekularnim kiseonikom, daju superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$). U reakciji $O_2^{\cdot-}$ sa azot-monoksidom ($\cdot NO$), dobija se peroksinitritni radikal ($ONOO^{\cdot-}$). SOD prevodi $O_2^{\cdot-}$ u vodonik-peroksid (H_2O_2), koji dalje može da se transformiše na nekoliko načina. U prisustvu jona prelaznih metala, poput Fe^{2+} (Fentonova reakcija) ili sa $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 daje hidroksilni radikal ($\cdot OH$). Katalaza (CAT) peroksizoma, glutation-peroksidaza (GPx) i peroksiredoksini (Prx) neutrališu H_2O_2 . Proteini tioredoksinskog sistema, tioredoksin (Trx) i tioredoksin-reduktaza (TrxR), održavaju Prx u redukovanom stanju. Glutation-reduktaza (GR) redukuje oksidovani glutation (GSSG). GPx na račun oksidacije redukovanog glutationa (GSH) uklanja H_2O_2 . NADPH je donor elektrona za redukciju TrxR i GR. Slika preuzeta od *Sznarkowska i sar., 2017* [77].

Kiseonik (O_2) je jedan od najčešćih oksidujućih agenasa i njegova redukcija je esencijalna za aerobne organizme, jer se proizvodnja energije u mitohondrijama respiracijom dobija upravo na račun redukcije kiseonika. Kiseonik je ujedno i glavni izvor RONS. Na unutrašnjoj membrani

mitohondrija nalazi se elektrontransportni lanac (ETL), sistem kompleksa kojima se, kroz niz oksidoreduktivnih reakcija, elektroni prenose sa donora na akceptore. Transfer elektrona sa citohroma c (kompleks III) na O_2 preko citohrom c oksidaze (kompleks IV) dovodi do stvaranja molekula vode i protonskog gradijenta, neophodnog za dobijanje energetskog molekula – adenzin trifosfata (ATP). Kao intermedijer u ovoj reakciji, direktnom redukcijom O_2 jednim elektronom, nastaje superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$). Superoksidni anjon je visokoreaktivni molekul, kratkog poluživota (10^{-6} s) [78], koji u brzim reakcijama doprinosi stvaranju različitih RONS, koji dalje ispoljavaju signalne ili toksične efekte (Slika 5). S obzirom na visoku reaktivnost, njegovo mesto delovanja je najčešće samo mesto sinteze. Osim ETL, izvor $O_2^{\cdot-}$ su i NADPH oksidaze (NOX), familija mebranskih enzima koji katalizuju kontrolisano stvaranje $O_2^{\cdot-}$ kuplovanjem elektrona NADPH sa kiseonikom (Slika 5). Aktivnost NOX se povećava u stanju neuroinflamacije i sa starenjem, a smatra se i da NOX doprinosi procesu neurodegeneracije [79]. Postoje i drugi izvori $O_2^{\cdot-}$ - enzimi koji prebacuju elektrone na molekul O_2 , poput monoamino oksidaze, ciklooksigenaze, lipooksigenaze i komponenti sistema citohroma P450 u endoplazmatičnom retikulumu (ER) [80].

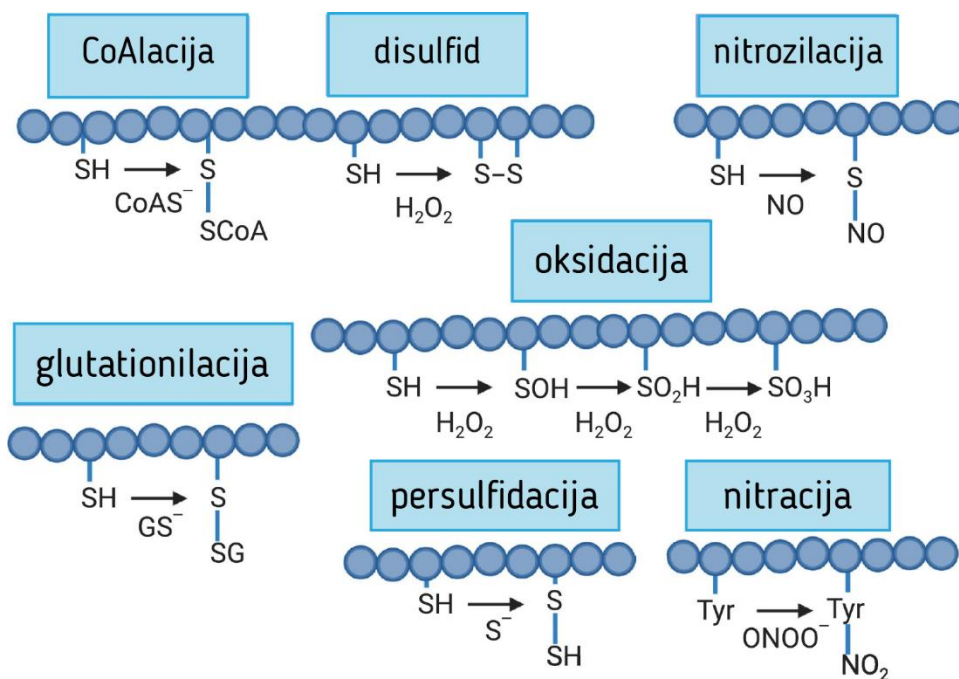
Superoksidni anjon, kao veoma nestabilan, spontano ili posredstvom superoksidne-dismutaze (SOD), prelazi u H_2O_2 (Slika 5). Kod sisara, u citoplazmi i vanćelijskom prostoru je prisutna Cu/ZnSOD (SOD1 i 3), a u mitohondrijalnom matriksu MnSOD (SOD2). SOD enzimi ubrzavaju spontanu dismutaciju $O_2^{\cdot-}$ više od 1000 puta.

Vodonik-peroksid je manje reaktivan od $O_2^{\cdot-}$, manje toksičan i ima duži poluživot (oko 10^{-3} s) [78]. Nije naelektrisan i može da difunduje kroz membrane. Može da ima ulogu signalnog molekula – interaguje sa cisteinskim (Cys) ostacima redoks-osetljivih proteina i dovodi do brzog formiranja disulfidnih mostova između cisteina ili sa glutationom (GSH), u procesu S-glutationilacije proteina (Slika 6) [81]. Energetski metabolizam i funkcija mitohondrija su regulisani citosolnom i vanćelijskom redoks signalizacijom. Sa malim porastom u koncentraciji H_2O_2 , formira se disulfidna veza između Cys u gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazi (GA3PD), te dolazi do brze aktivacije glukozo-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) i metabolizam glukoze se prebacuje sa glikolize na put pentozo-fosfata. U putu pentozo-fosfata se generiše NADPH za redoks reakcije [82]. U ćeliji, H_2O_2 uklanjaju antioksidantni enzimi peroksiredoksini (Prx), glutation-peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT) (Slika 5). Glutation-peroksidaza katalizuje reakciju redukcije H_2O_2 do vode, uz GSH kao akceptor elektrona, pri čemu nastaje oksidovani glutation (GSSG). Katalaza redukuje dva molekula H_2O_2 do dva molekula vode i kiseonika u peroksizomima. Peroksiredoksini su klasa redoks enzima koji redukuju H_2O_2 do vode u citoplazmi i mitohondrijalnom matriksu, kao i GPx.

Ako se prethodno ne redukuje ili ukloni, H_2O_2 može u prisustvu redoks-aktivnog gvožđa ili bakra da se homolitički подели i formira dva molekula hidroksilnog radikala ($\cdot OH$) u Fentonovoj reakciji (Slika 5). Hidroksilni radikali su toksični i imaju kratak poluživot (oko 10^{-9} s), kao i $O_2^{\cdot-}$ i u većini slučajeva, nisu pogodni kao signalni molekuli.

Azot-monoksid (NO) je slobodnoradikalski molekul, nastaje posredstvom azot-oksida sintetaze (NOS) i dovodi do tiol S-nitrozilacije Cys. S-nitrozilacija je reverzibilna i brza promena i ima ulogu signalnog mehanizma (Slika 6). U stanju oksidativnog stresa, NO reaguje sa $O_2^{\cdot-}$ i nastaje visokoreaktivna, toksična azotna vrsta – peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) (Slika 5). Peroksinitrite u ćeliji uklanjaju GSH i drugi tioli, kao i porfirini mangana i gvožđa.

Peroksinitriti, superoksidi i hidroksilni radikali dovode do ireverzibilnih oštećenja DNK, lipida i proteina. Stoga je neophodno da se njihovo dejstvo ograniči ili neutrališe, kako bi se održao funkcionalni integritet ćelije.



Slika 6. Oksidativna modifikacija proteina. Oksidativna modifikacija proteina je od velikog značaja za ćelijsku signalizaciju i funkciju proteina. U oksidativne modifikacije spadaju reverzibilne promene, poput CoAlacije, formiranja disulfidnih mostova, nitrozilacije, glutationilacije i persulfidacije. U CoAlaciji, tiolna grupa koenzima A (CoA) reaguje sa tiolnom grupom Cys proteina. Glutationilacija podrazumeva reakciju između GSH i Cys proteina. Nitrozilacija je modifikacija tiola Cys azot-monoksidom (NO). Oksidacijom tiola nastaju reverzibilne promene (formiranje sulfenične (SOH) i sulfenične (SO₂H) kiseline, a mogu biti i ireverzibilne, kada se kao produkt oksidacije dobija sulfonična (SO₃H) kiselina). Nitracija Tyr proteina peroksintritima (ONOO⁻) takođe dovodi do ireverzibilne promene. Ireverzibilna oksidativna modifikacija proteina dovodi do terminalnog oksidativnog stanja i gubitka funkcije proteina. Slika modifikovana prema *Harris i DeNicola, 2020* [83].

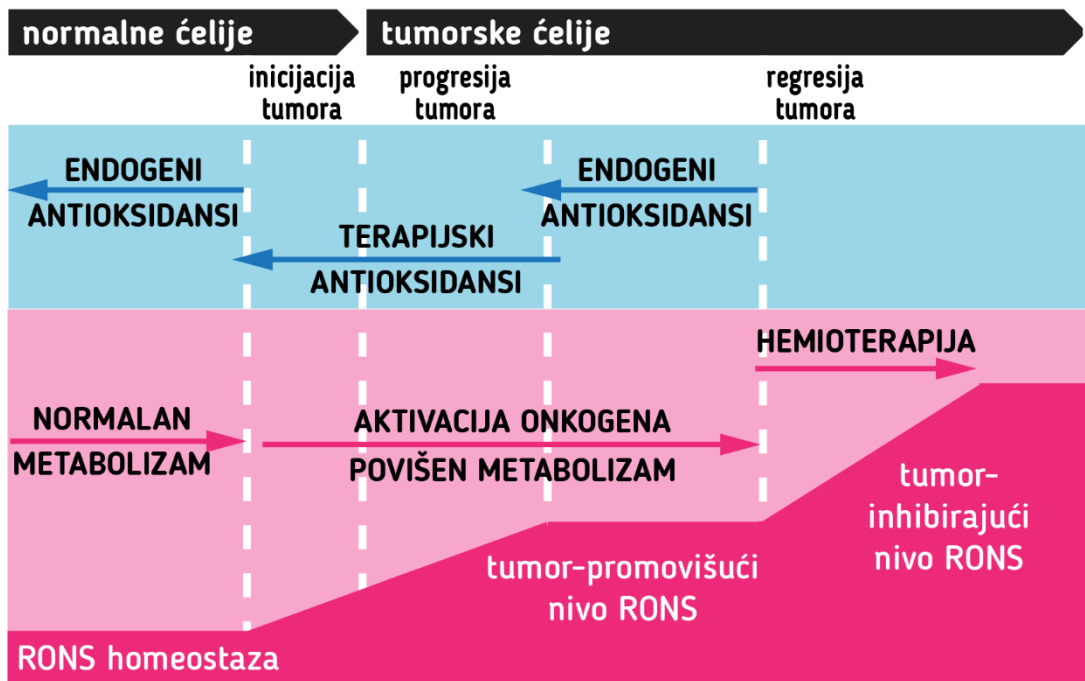
Na ROS oštećenja posebno je osetljiva mitohondrijalna DNK, s obzirom da su mitohondrije primarni izvor oksidanata. Kod proliferišućih, mlađih ćelija, mehanizmi reparacije DNK uspešno otklanjaju oštećenja; kod starijih ćelija, ovi mehanizmi nisu podjednako efikasni, što dalje dovodi do mutageneze i, posledično, kancerogeneze. Tokom starenja, ROS dovodi do povećane karbonilacije proteina. Oksidovani proteini se obično degraduju u proteazomima. Međutim, sa starenjem ćelija aktivnost proteazoma se drastično smanjuje, što dovodi do akumulacije oksidovanih proteina. Lipidi su takođe osetljivi na oksidaciju, posebno fosfolipidi. RONS deluju na ugljenične veze u lancu masnih kiselina i kao proizvod nastaju hidroperoksidi, koji se često koriste kao indikatori oksidativnog stresa u različitim tkivima. Oksidujućim radikalima time mogu da nanesu štetu membranskim sistemima i narušavaju integritet ćelije. Na ćelijskom nivou, oksidativni stres dovodi do različitih i povezanih ćelijskih procesa – apoptoze, nekroze, autofagije i senescencije, koji dalje utiču na strukturu i funkciju tkiva [84].

Antioksidativni sistemi, u vidu enzimskih sistema i malih molekula, kontrolišu i regulišu koncentraciju RONS unutar ćelije. Ključni signalni putevi koji su pod uticajem promena u redoks stanju su ASK1/JNK i ASK1/p38 MAP signalna kaskada [85]. Ekspresija većine antioksidantnih enzima je regulisana Nrf2 proteinom. U normalnim redoks uslovima, Nrf2 ima poluživot od oko 20

min i kontinuirano se degraduje u ćeliji ubikvitinacijom; protein koji obeležava Nrf2 za degradaciju je Keap1 (eng. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). U uslovima oksidativnog stresa, Keap1 Cys ostaci se oksiduju i Nrf2 degradacija se prekida; Nrf2 se translocira u jedro, dimerizuje sa Maf proteinima i vezuje se za ARE (eng. *antioxidant response element*) sekvence.

1.5.1. Uloga oksidativnog stresa u razvoju i progresiji tumora

Oksidativni stres kod čoveka može biti posledica nepravilne ishrane i načina života, sredinskih faktora, kao i posledica infekcije patogenim virusima i bakterijama. Inflamacija je deo imunskog odgovora organizma na prisustvo patogena. Ćelije imunskog sistema u okolini inficiranog tkiva proizvode veće količine RONS, kako bi indukovale ćelijsku smrt inficiranih ćelija i ograničile nanetu štetu organizmu. Kao kratkotrajna reakcija imunskog sistema, inflamacija ima protektivnu ulogu. Hronično stanje inflamacije i oksidativnog stresa može da dovede do patoloških promena, nastanka i progresije različitih bolesti, uključujući i nastanak tumora. Oštećenja molekula DNK oksidacijom slobodnim radikalima za posledicu imaju delecije i insercije, kao i dvolančane prekide, jedan od najtežih oblika oštećenja molekula DNK [86]. Akumulacija genomske promene uzrokovana RONS može da dovede do transformacije normalne ćelije, što dovodi do nastanka tumora (Slika 7).



Slika 7. Šematski prikaz odnosa između ćelijskog ili terapijom-indukovanog oksidativnog stresa i ćelijske ili terapijske antioksidativne zaštite u različitim stadijumima razvoja tumora. U normalnim ćelijama su stopa proizvodnje RONS i aktivnost antioksidanasa uravnoteženi. Povišen nivo RONS je jedna od osnovnih osobina tumorske ćelije, i doprinosi genomskoj nestabilnosti, proliferaciji i preživljavanju. Na ovom stadijumu, smanjenje nivoa RONS terapijskim antioksidansima može zaustaviti progresiju tumora. Primenom hemioterapije, dolazi do prekomernog povećanja nivoa RONS što može dovesti do regresije tumora, indukcijom ireverzibilnih oštećenja ćelija i ćelijske smrti. Slika modifikovana prema *Storz, 2013* [87].

RONS imaju specifične uloge u različitim fazama nastanka i progresije tumora [87, 88]. U fazi inicijacije, akumuliraju se genetičke promene, dovoljne da omoguće autonomni rast ćelija, usled genotoksičnog efekta RONS. Faza promocije tumora podrazumeva mobilizaciju H_2O_2 kao signalnog molekula koji promovise proliferaciju. U fazi progresije, dolazi do lokalne invazije tumorskih ćelija u zdravo tkivo i rasta nezavisnog od interakcije sa okolnim tkivom. U ovoj fazi, ćelije tumora koriste H_2O_2 za transformaciju stromalnih ćelija, dok ćelije imunskog sistema „napadaju“ tumorske ćelije sa O_2^- i $ONOO^-$. U fazi metastaze i sistemskog širenja tumorskih ćelija do udaljenih mesta u organizmu, ćelije se susreću sa značajnim oksidativnim stresom u krvotoku, usled visoke koncentracije O_2 , što dovodi do ćelijske smrti značajnog broja metastatskih ćelija. Metastaza je veoma zahtevan i neefikasan proces, jer veoma mali broj ćelija tumora uspe da preživi, a još manji da proliferise u mikrometastaze. Oksidativni stres ubija metastatske ćelije u različitim fazama. Za preživljavanje metastatskih ćelija, od ogromnog značaja je aktivacija transkripcionih faktora, koji regulišu transkripciju antioksidantnih enzima [89].

RONS pospešuju preživljavanje i proliferaciju tumora, dovode do oštećenja molekula DNK i posledično, genomske nestabilnosti (Slika 7) [87, 88, 90]. Izmenjen metabolizam i poremećena redoks ravnoteža tumorskih ćelija za posledicu ima umereno povišen nivo RONS. RONS pak imaju dvojak efekat na ćelije tumora – umereno povišena količina promovise tumorigenezu, dok prekomerno povišena količina ima citotoksični efekat i dovodi do ćelijske smrti. Tumorske ćelije se adaptiraju na povišenu količinu RONS povećanom ekspresijom enzima antioksidativne zaštite [91, 92], inaktivacijom enzima koji uklanjaju H_2O_2 [93], i povećanom sintezom malih antioksidantnih molekula, poput GSH [94].

U ćelijama tumora, kao posledica povećanja količine RONS, dolazi do aktivacije transkripcionog faktora Nrf2, koji regulise transkripciju antioksidantnih enzima i ima važnu ulogu u održavanju redoks ravnoteže. Oksidacijom cisteinskih ostataka Keap1, veza Keap1 sa Nrf2 slabi, što dovodi do stabilizacije transkripcionog faktora i njegove translokacije u jedro. Mutacije Keap1 gena, koje dovode do destabilizacije Nrf2/Keap1 interakcije, kao i prekomerna aktivacija Nrf2, su povezane sa nastankom karcinoma pluća, dojke, debelog creva, želuca i jetre [95, 96].

Tumorske ćelije se u procesu prilagođavanja okruženja optimalnim uslovima za rast i progresiju tumora oslanjaju i na komunikaciju putem RONS sa ćelijama mikrookruženja, tumor-asociranim fibroblastima, makrofagima i T ćelijama. Pokazano je da uslovi hroničnog stresa dovode do diferencijacije fibroblasta strome u miofibroblaste, koji potom svojim sekretomom promovise proliferaciju, angiogenezu i tumorigenezu kod adenokarcinoma dojke [97] i karcinoma prostate [98]. Vodonik-peroksid koji ćelije tumora oslobađaju u okruženje dovodi do metaboličkih promena u tumor-asociranim fibroblastima, tako što dolazi do povećanog influksa glukoze, smanjene aktivnosti mitohondrija i povećane produkcije RONS, dok fibroblasti zauzvrat dovode do smanjenog preuzimanja glukoze i povećane aktivnosti mitohondrija u ćelijama tumora [99]. Dodavanjem katalaze, enzima koji neutralise H_2O_2 , efekat stimulacije fibroblasta se obustavlja, što dodatno potvrđuje da je upravo H_2O_2 posrednik u komunikaciji. Tumor-asocirani makrofagi oslobađanjem RONS stimulišu MAPK/ERK signalni put i povećavaju invazivni kapacitet ćelija melanoma [100] i suprimiraju funkciju T ćelija [101].

Mehanizmi adaptacije na oksidativni stres i rezistencije na lekove se međusobno preklapaju [102, 103]. Tumorske ćelije imaju povećanu produkciju RONS, što indukuje antioksidativni adaptivni odgovor i dovodi do stanja izmenjene regulacije redoks signalizacije i aktivacije mehanizama za preživljavanje. Pokazano je da je kod karcinoma dojke, rezistentnog na terapiju docetakselom, povišena ekspresija gena za Trx i Prx, koji su važni regulatori redoks stanja

[104]. Povišena ekspresija MnSOD pozitivno koreliše sa stepenom maligniteta tumora [105-108], a pokazano je da i umereno povišena ekspresija MnSOD značajno povećava verovatnoću preživljavanja i razvoj rezistencije na antitumorske agense [108]. Takođe, povišena ekspresija proteina Trx, GSH i drugih antioksidativnih sistema je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom rezistencije na hemioterapeutike, poput doksorubicina, cisplatina, docetaksela i tamoksifena [109].

Mehanizmi za preživljavanje i izbegavanje ćelijske smrti indukovani akumuliranim RONS takođe omogućavaju veću toleranciju citotoksičnog stresa jonizujućeg zračenja i hemioterapije. Antitumorska terapija indukuje oksidativni stres, ili kao direktni efekat, što je slučaj sa jonizujućim zračenjem, ili kao indirektnu posledicu izlaganja, što je slučaj sa mnogim hemioterapeuticima [110]. Proteini i molekuli koji su uključeni u adaptivni odgovor na akumulaciju RONS takođe su od ogromnog značaja za detoksifikaciju i zaštitu ćelije od štetnog dejstva toksičnih agenasa [102, 103]. Proteini redoks sistema su samim tim privlačne molekularne mete za razvoj novih lekova, koji mogu doprineti suzbijanju efekta višestruke rezistencije.

1.5.2. Manipulacija oksidativnog stresa u terapijskom pristupu lečenja tumora

Manipulacija redoks sistemima u ćelijama tumora predstavlja jedan od načina za razvoj novih terapijskih strategija. Terapije koje modifikuju aktivnost redoks sistema mogu podrazumevati dve suprotne strategije. Jedna strategija podrazumeva povećanje aktivnosti redoks sistema, tako da se smanji količina tumor-promovišućih RONS. Druga strategija podrazumeva inhibiciju redoks sistema, kako bi se pokrenuo apoptotski odgovor ćelija tumora u uslovima prekomernog oksidativnog stresa (Slika 7). S jedne strane, povećana detoksifikacija RONS u tumorskim ćelijama za rezultat može imati smanjenje rasta tumora; s druge, posledica neutralizacije RONS može biti ubrzan rast tumora, usled inhibirane ćelijske smrti posredovane oksidativnim stresom. Ćelije tumora uspešno odolevaju štetnom efektu RONS povećanom ekspresijom antioksidantnih i redoks enzima; inhibicijom ovih enzima, ćelije ostaju bez sistema zaštite i podležu oštećenjima koja vode u ćelijsku smrt. Redoks sistemi imaju važnu ulogu u odbrani ćelije tumora od različitih hemioterapeutika, koji za posledicu imaju i povećanje oksidativnog stresa. Istovremena inhibicija redoks sistema, sa primenjenom hemioterapijom, povećava uspešnost terapije, smanjuje mogućnost razvoja rezistencije i relapsa, što je i dokazano u kliničkim istraživanjima [111]. Istovremena inhibicija dva osnovna redoks sistema unutar ćelije, GSH i Trx sistema, sinergistički dovodi do smrti tumorskih ćelija [112]. Kako su ćelije tumora više osetljive na oksidativni stres od normalnih ćelija [113], razvoj agenasa koji se zasnivaju na inhibiciji redoks sistema predstavljaju perspektivnu novu generaciju lekova, sa većom selektivnosti ka ćelijama tumora.

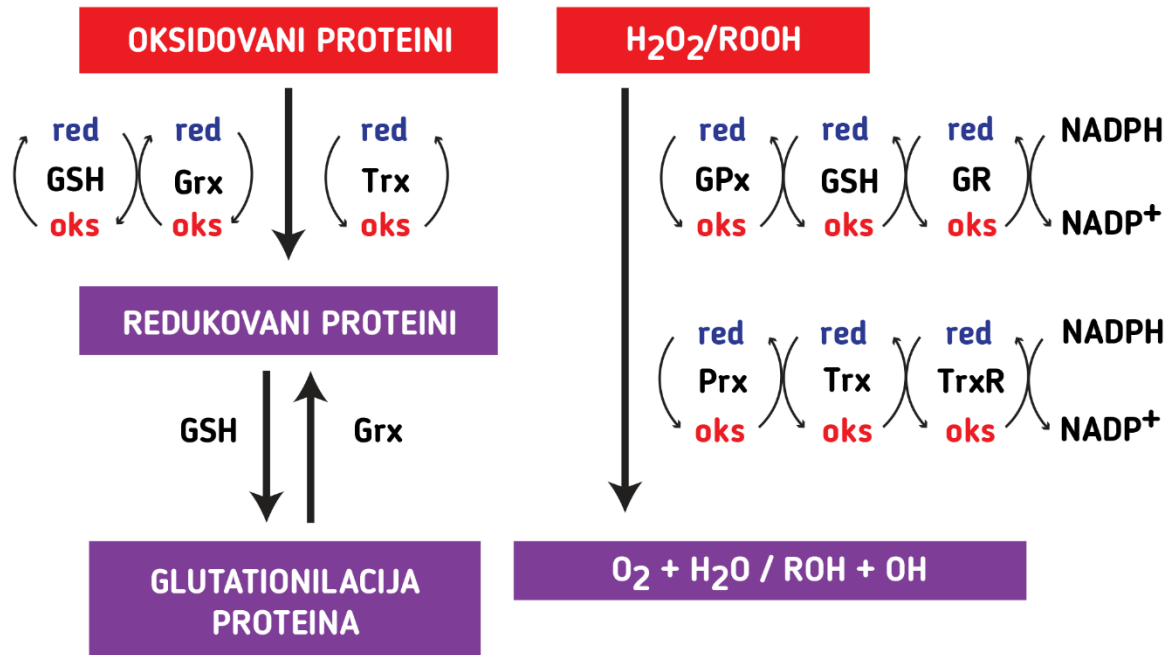
Manipulacija oksidativnim stresom i komponentama redoks sistema, kao strategije za lečenje tumora glioblastoma i neuroblastoma, nisu dovoljno istražene. Do sada, u kliničkoj praksi za lečenje tumora nije u upotrebi lek ili adjuvans kome su komponente redoks sistema primarne mete delovanja, iako oksidativni stres i redoks status igraju važnu ulogu u tumorigenezi i progresiji brojnih tumora među kojima su I glioblastomi i neuroblastomi [22, 114-116].

1.6. Tiol redoks sistemi

Regulacija tiol redoks ravnoteže je od kritičnog značaja za metaboličke, signalne i transkripcione procese u sisarskoj ćeliji. Tiolne grupe, kao deo proteina ili malih molekula, pružaju proteinima mogućnost da brzo stupe u reverzibilne reakcije, kojima se reguliše njihova aktivnost. Tiolna grupa Cys je blago kisela, u zavisnosti od strukture proteina i lokalnog okruženja Cys ostatka. Reaktivnost Cys je veća u deprotonovanoj tiol anjonskoj formi (RS⁻). U proteinima,

oksidacija tiola dovodi do modifikacija (Slika 6) koje, u zavisnosti od lokacije, mogu da utiču na strukturu, katalitičku aktivnost i sposobnost ostvarivanja interakcija sa drugim proteinima.

Osnovna funkcija tiolnog redoks puferskog sistema je regulacija redoks stanja tiolnih grupa. Ključne komponente ovog puferskog sistema su Cys/Cys i GSH/GSSG redoks parovi i tioredoksin (Trx), glutaredoksin (Grx) i peroksiredoksin (Prx) sistemi (Slika 8).



Slika 8. GSH i Trx sistemi regulišu redoks homeostazu unutar ćelije. Glutation-peroksidaza (GPx) i peroksiredoksin (Prx) prevode H_2O_2 i hidroperoksidi (ROOH) do vode, odnosno alkohola (ROH). Glutation (GSH) redukuje glutaredoksin (Grx), dok oksidovani tioredoksin (Trx) redukuje tioredoksin-reduktaza (TrxR). Oksidovani glutation se redukuje do GSH radom glutation-reduktaze (GR). Trx i Grx redukuju disulfide proteina. Grx katalizuje i deglutationilaciju proteina. Slika modifikovana prema *Aoyama i Nakaki, 2015* [117].

1.6.1. Glutationski sistem

Glutation, mali tripeptidni molekul, je najzastupljeniji antioksidans u ćeliji, sa osnovnom funkcijom u održavanju redoks homeostaze. GSH takođe održava nivo cisteina i učestvuje u detoksifikaciji ksenobiotika. Nalazi se u svim odeljcima ćelije, a procena je da se oko 10% GSH nalazi unutar mitohondrija, gde neutrališe RONS poreklom od ETL.

GSH u redukovanom stanju prima elektrone i oksiduje se u GSSG. Familija enzima glutathion-S-transferaza (GST) vrši detoksifikaciju ćelije i neutrališe ksenobiotike, tako što ih konjuguje sa GSH. Kao što je ranije navedeno, GPx neutrališe H_2O_2 na račun GSH, pri čemu su proizvodi te reakcije molekul vode i oksidovani GSSG. Glutaredoksini (Grx) su klasa malih redoks enzima koji, pomoću GSH, neutrališu RONS, učestvuju u redoks signalizaciji unutar ćelije i regulaciji metaboličkih puteva [118]. Pored toga, GSH redukuje proteine i održava visok redoks status, pogodan za proliferaciju ćelije. Glutation-reduktaza (GR) na račun NADPH kao donora elektrona regeneriše GSH od GSSG. Količina dostupnog GSH u ćelijama i jednostavna modifikacija proteina glutationom (Slika 6), ukazuje na važnost reverzibilne S-glutationilacije u redoks signalnoj transdukciji i regulaciji aktivnosti redoks senzitivnih tiolnih proteina [85].

U ćelijama tumora količina GSH je često povišena zbog odgovora na oksidativni stres, a povišena je i ekspresija i aktivnost enzima koji učestvuju u sintezi GSH, poput γ -glutamilcistein ligaze (GCL) i γ -glutamil-transpeptidaze (GGT), kao i enzima koji učestvuju u sintezi GR i Grx [94, 119-121]. Povećana količina GSH doprinosi progresiji tumora, povećava preživljavanje tumorskih ćelija i utiče na sticanje rezistencije na terapiju.

GSH sistem ima ulogu i u inaktivaciji ksenobiotika, kao i u neutralizaciji citostatika poput cisplatina, karboplatina i oksaliplatina [122]. Lekovi sa platinom se kovalentno vezuju za GSH, a potom se izbacuju iz ćelije radom MRP1 transportera. Proces konjugacije GSH za ksenobiotike je posredovan proteinima iz GST familije enzima, a pokazano je da visoka ekspresija GST π pozitivno koreliše sa rezistencijom na hemioterapiju [123-125].

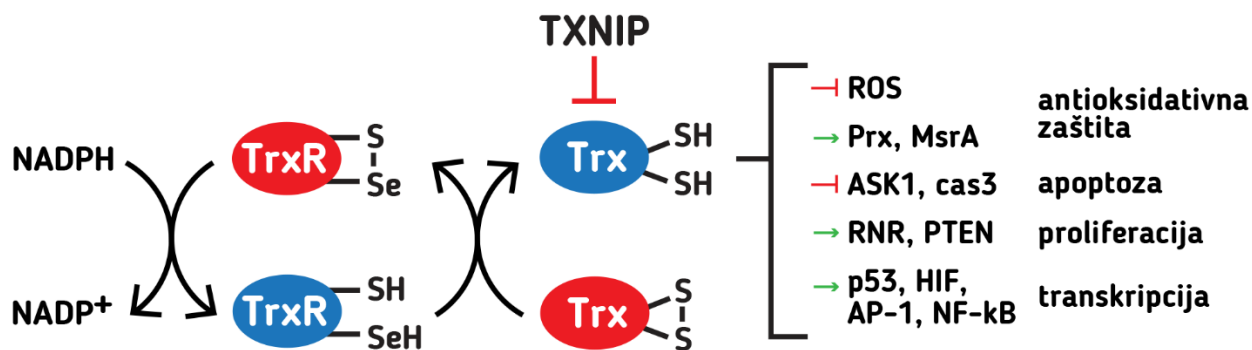
1.6.2. Tioredoksinški sistem

Tioredoksinški sistem se sastoji od tioredoksina (Trx), tioredoksin-reduktaze (TrxR) i NADPH, kao donora elektrona (Slika 9). Posredno, deo Trx sistema je i tioredoksin inhibicioni protein (TXNIP), koji reguliše aktivnost Trx. U citoplazmi se nalaze Trx1 i TrxR1, dok su u matriksu mitohondrija prisutni Trx2 i TrxR2. TrxR koristi NADPH za sopstvenu redukciju, a u redukovanom stanju može da redukuje Trx i druge supstrate. Trx je redukujući agens, koji svoje dejstvo može da ostvari kako unutar, tako i van ćelije.

Trx1 je mali, multifunkcionalni protein, sa nekoliko redoks-aktivnih Cys. Svoje dejstvo Trx1 ostvaruje u citoplazmi i u jedru. U jedru se direktno vezuje za različite transkripcione faktore, poput p53, HIF, NF- κ B i aktivator protein-1 (AP-1) i na taj način može da moduliše DNK-vezujuću aktivnost pojedinih transkripcionih faktora (Slika 9). Trx redukuje Prx, pri čemu se sam oksiduje, a povratnom spregom se reciklira na račun NADPH i TrxR (Slika 9). Trx1 redukuje i metionin sulfoxid reduktazu A (MsrA), peptid koji katalizuje redukciju metionin sulfoksida oksidovanih proteina do metionina [126]. Trx1 ima anti-apoptotsku ulogu, kroz interakcije sa regulatorima apoptoze – Trx inhibira ASK-1 i kaspazu 3 (eng. *caspase 3*, cas3), jednog od glavnih egzekutora apoptoze (Slika 9) [127-129]. Pored toga, redukovani Trx1 inhibira faktor indukcije apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*, AIF) i suprimira AIF-indukovano oštećenje molekula DNK [130]. Pokazano je da Trx1 inhibira tumor supresor - PTEN [131], promovišući rast i proliferaciju ćelije.

Nikotinamid nukleotid transhidrogenaza koristi mitohondrijalni protonski gradijent za stvaranje NADPH od NADH i NADP⁺, čime obezbeđuje vezu između energetskeg metabolizma i uklanjanja H₂O₂ preko Trx2/TrxR2 i Prx sistema u matriksu mitohondrija [132]. Organele poput mitohondrija zahtevaju prisustvo Trx sistema kako bi očuvale lokalno redoks okruženje i održale nisku koncentraciju ROS poreklom od ETL. Trx je donor elektrona za ribonukleotid reduktazu (RNR) [133], enzimski kompleks koji se sastoji od subjednica R1 i R2, u odnosu 1:1. RNR katalizuje sintezu deoksiribonukleotida od ribonukleotida i glavni je limitirajući enzim u sintezi DNK, te i u proliferaciji ćelije.

TrxR je enzim koji katalizuje redukciju disulfida u aktivnim mestima Trx [134]. TrxR može neposredno da redukuje i druge supstrate, poput peroksida (uključujući lipidne hidroperoksidge), H₂O₂ i disulfidne proteinske izomeraze, koje učestvuju u posttranslacionom savijanju i obradi proteina. TrxR takođe učestvuje i u regeneraciji antioksidantnih molekula (dehidroaskorbata, lipoične kiseline, ubikvina).



Slika 9. Šematski prikaz katalitičkog ciklusa i funkcije Trx sistema. Objašnjenje u tekstu. Slika modifikovana prema Zhang i sar., 2017 [135].

Trx i TrxR su ubikvitno eksprimirani u različitim tkivima i organima, ali nivo ekspresije varira u zavisnosti od funkcije koju imaju u tkivu/organu. Distribucija ovih proteina je tkivno i ćelijski specifična, što podrazumeva i moždano tkivo u kome su identifikovani Trx i TrxR. Značajno zapažanje je da se Trx više eksprimiraju u neuronima mozga, dok se TrxR više eksprimiraju u glijskim, mišjim i pacovskim, ćelijama *in vitro* – zahtevi za molekulima tioredoksinog sistema se razlikuju zavisno od ćelijskog tipa [136].

Ekspresija Trx može biti stimulirana faktorima stresa, poput infektivnih agensa, UV zračenja, O₂, kao i hormonima i netoksičnim agensima. Istraživanja CNS pokazuju blisku vezu između povećane ekspresije proteina Trx sistema i oksidativnog stresa ćelije. Regioni promotora za indukovanu ekspresiju Trx1 imaju mesta vezivanja za AP-1, AP-2, NF-kB i sadrže ARE sekvencu.

Aktivnost Trx i TrxR je povezana sa aktivacijom gena, ćelijskim ciklusom i posebno zaštitom i preživljavanjem ćelije (Slika 9). Razlike u ekspresiji između struktura ukazuju da različiti regioni mozga imaju različite potrebe za tioredoksinim sistemom u funkciji ćelije ili uklanjanju ROS oštećenja. Smanjena ekspresija proteina Trx, kao i drugih antioksidantnih sistema, čine tkiva podložnijim oštećenjima izazvanim oksidativnim stresom. Indukovana povišena ekspresija Trx sistema može imati protektivnu ulogu u uslovima stresa. U različitim patološkim stanjima, predloženo je da nivo ekspresije proteina Trx sistema zavisi i od stadijuma bolesti – dešava se da u ranim stadijumima ekspresija bude povišena, kao primarni odgovor na stres, ali u kontinuiranom stanju oksidativnog stresa dolazi do smanjenja ekspresije i posledično, ćelijske smrti.

Prema Hornsveldu i Dansenu [137], redoks regulacija se može dovesti u vezu sa svim osnovnim biološkim osobinama tumora, koje su Hanahan i Weinberg definisali [9]. Brojna istraživanja, kao i klinička ispitivanja, su pokazala da je Trx sistem u velikoj meri uključen u razvoj, progresiju i metastazu tumora [135, 138-141]. Srednja vrednost koncentracije TrxR u krvi obolelih od glioblastoma je i do 30% viša nego kod zdravih osoba, dok je u tkivu glioblastoma nivo TrxR 5 puta veći u poređenju sa normalnim tkivom mozga [142]. U prilog tome, pokazano je i da TXNIP ima ulogu tumor-supresora i da je često, genetičkim ili epigenetičkim promenama, utišan u ćelijama tumora [143-145]. U inicijalnim stadijumima razvoja tumora, Trx sistem ima protektivnu ulogu – antioksidativnom detoksikacijom, direktno i posredstvom Prx i MsrA, smanjuje oštećenja izazvana oksidativnim stresom i sprečava nastanak neoplastične transformacije ćelije. Ipak, kada

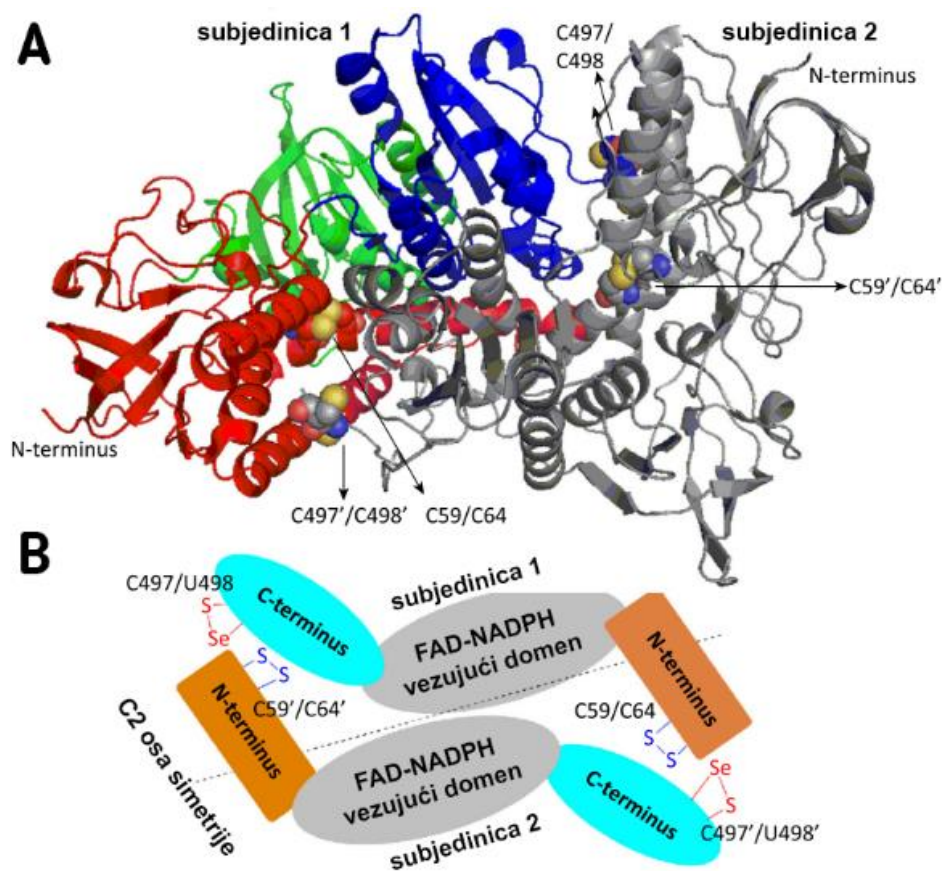
do transformacije dođe i ćelija zadobije tumorski fenotip, Trx sistem promoviše dalji razvoj tumora, promovisanjem rasta, deobe i angiogeneze, kao i inhibicijom apoptoze [146].

Takođe, povišena aktivnost Trx sistema, kao i njegovih supstrata, je uključena i u razvoj rezistencije na hemioterapiju. Tako je pokazano da je povećanje ekspresije TrxR1 u korelaciji sa rezistencijom gastrointestinalnih ćelija tumora na cisplatin [138], a povećana ekspresija Trx koreliše sa agresivnim tumorima, lošijom kliničkom prognozom i nižom stopom preživljavanja pacijenata [147, 148]. Dalja istraživanja su pokazala da inhibicija TrxR povećava osetljivost tumorskih ćelija na agense koji indukuju ćelijsku smrt [139]. Povišena ekspresija Trx u ćelijama tumora dovodi do razvoja rezistencije na cisplatin [149], tako što Trx neutrališe unutarćelijske toksične oksidanse koje proizvodi cisplatin. Do tumor-specifične prekomerne ekspresije Prx dolazi kod različitih primarnih tumora [150, 151], a pokazano je da Prx2 ima važnu ulogu u rezistenciji ćelija karcinoma dojke na jonizujuće zračenje i da utišavanje gena za Prx2 može imati važnu ulogu u povećanju osetljivosti na terapiju [152].

TrxR, kao deo Trx sistema, je od esencijalnog značaja za odbranu od oksidativnog stresa i održavanje redoks ravnoteže ćelija [153, 154]. TrxR je uključena i u regulaciju sinteze DNK, transkripcije, ćelijskog rasta i apoptoze (Slika 9) [153].

Opisana su dva tipa TrxR, pri čemu su oba homodimerni flavoenzimi, ali samo sa oko 20% identične sekvence, te se smatra da su evoluirali nezavisno. Karakterišu se kao TrxR visoke molekulske mase (oko 55 kDa, H-TrxR) i TrxR niske molekulske mase (oko 35 kDa, L-TrxR). H-TrxR je prisutan kod životinja i kod *Plasmodium falciparum*, dok je L-TrxR zastupljen kod Archaea, Bacteria i nekih Eukarya (gljiva, biljaka i intestinalnog parazita *Entamoeba*) [154]. H-TrxR pripada familiji enzima kojoj pripadaju i GR, tripanotion reduktaza, reduktaza jona žive i lipoamidna dehidrogenaza. Ključna razlika između H-TrxR i L-TrxR je u sekvenci i mehanizmu katalitički aktivnog centra proteina. U ćelijama sisara su prisutne 3 izoforme H-TrxR: TrxR1, ubikvitno ekspirmirana u citoplazmi, TrxR2 u mitohondrijama i TrxR3, koja se nalazi u specijalizovanim ćelijama nekih tkiva (poput Lajdigovih ćelija testisa) [155]. Smatra se da su TrxR1 i TrxR2 enzimi identični po funkciji, a da im je jedina strukturna razlika u kratkoj aminokiselinskoj sekvenci koja obeležava TrxR2 za transport u mitohondrije i u regulatornim sekvencama iRNK. TrxR3 predstavlja enzim sa dualnom funkcijom; na C-terminusu ima aktivnost TrxR, a na N-terminusu aktivnost enzima GR, te se naziva i tioredoksin-glutation-reduktaza [156].

TrxR se sastoji od dve identične subjedinice (Slika 10). Svaka subjedinica se sastoji od FAD domena, NADPH-vezujućeg domena i katalitički aktivnog selenocisteinskog (Sec) domena na C-terminusu. Subjedinice su pozicionirane tako da je N-kraj jedne naspram C-terminusa druge subjedinice. TrxR poseduje dva katalitički važna redoks mesta – jedno čine FAD i par Cys ostataka, koji primaju elektrone od NADPH, a drugo je Sec par C-terminusa koji prima elektrone sa FAD/Cys redoks mesta i prebacuje ih na tranzijentno povezani Trx [157]. Dve subjedinice enzima su upravo pozicionirane tako da se elektroni sa FAD/Cys domena jedne subjedinice prebacuju na Sec/Cys domen druge subjedinice (Slika 10). Put elektrona od NADPH do supstrata je precizno definisan i kreće se kroz proteinske domene i poddomene: sa FAD na Cys disulfidni par (unutar sekvence - **Cys**⁵⁹-Val-Asn-Val-Gly-**Cys**⁶⁴-), sa Cys para na Sec/Cys par (-**Cys**⁴⁹⁷-**Sec**⁴⁹⁸-) C-terminusa druge subjedinice i sa Sec/Cys para na supstrat. U slučaju da oksidujući supstrat nije povezan sa enzimom, TrxR se stabilizuje u tiolat-flavin stanju, tako da FAD domen predstavlja rezervoar elektrona iz koga aktivni C-terminus i druge subjedinice dobijaju redukujuće ekvivalente za redukciju supstrata.



Slika 10. Trodimenzionalna struktura TrxR sisara. **A** Struktura dimera enzima. Jedna subjednica je, kao primer, prikazana u boji: FAD domen je prikazan crveno, NADPH domen je prikazan zeleno, a vezujući domen je prikazan plavo. N-terminalni redoks par C59/C64 i C-terminalni redoks par C497/C498 su prikazani kao umetnute sfere. **B** Šematski prikaz “glava-rep” modela TrxR. Slika preuzeta i modifikovana od *Zhang i sar., 2017* [135].

Iako je mehanizam katalize H-TrxR sličan GR, kataliza putem Sec domena je specifična za TrxR i nije prisutna kod GR. Pokazano je da je Sec unutar katalitičkog domena sisarske TrxR esencijalan za redukciju Trx. Uklanjanjem Sec karboksipeptidaznom digestijom ili njegova modifikacija alkilacijom dovodi do inaktivacije enzima. Takođe, u eksperimentu u kom je Sec zamenjen Cys, afinitet katalitički aktivnog centra za Trx supstrat bio je 100 puta manji nego kada je Sec prisutan [158]. Sisarska TrxR pripada klasi selenoproteina, zajedno sa GPx. Selenoproteini sadrže aminokiselinu Sec, analog Cys, gde se na mestu sumpora nalazi selen. Supstitucija sumpora selenom kreira nukleofil značajno veće reaktivnosti od Cys. Selenoproteini koriste redoks i hemijska svojstva Sec, sa katalitičkim Sec ostatkom u aktivnom mestu. Sec se kotranslaciono insertuje na poziciji UGA kodona (inače STOP kodon) translacionom mašinerijom, koja podrazumeva Sec-opredeljenu tRNK i Sec-specifični elongacioni faktor. Ovi elementi interaguju sa domen-specifičnim strukturama iRNK selenoproteina i identifikuju UGA kodon kao Sec-kodirajući, a ne kao translaciono terminacioni kodon [159]. Usled visoke reaktivnosti Sec, TrxR, osim što redukuje oksidovani Trx, može da redukuje i druge male molekule, poput ditionitrobenzoeve kiseline, lipoične kiseline, askorbinske kiseline, lipidnih hidroperoksida, H₂O₂ i selenita [109, 160].

TrxR1 je kodirana *TXNRD1* genom, koji se kod čoveka nalazi na hromozomu 12 (12q23–12q24.1) [160]. U okviru 3'-netranslatirajućeg regiona (3'-NTR) nalazi se SECIS element,

neophodan za inkorporaciju Sec. U 3'-NTR nalaze se i 6 ARE sekvenci (AUUUA motivi, eng. *AU-rich elements*), značajne za regulaciju stabilnosti iRNK. ARE sekvence se tipično nalaze u genima za citokine, protoonkogene, transkripcione faktore i druge iRNK koje zahtevaju brzu posttranskripcionu regulaciju u odgovoru na specifične signale, pri čemu se delecija ARE sekvenci dovodi u vezu sa onkogenom transformacijom. Regulacija putem ARE sekvenci omogućava brzi ekspresioni odgovor, posredovan specifičnim ARE-interagujućim proteinima koji blokiraju degradaciju iRNK u odgovoru na unutarćelijsku signalizaciju [161]. TrxR2 ne poseduje ARE sekvence u 3'-NTR.

Za osnovni promotor se vezuju transkripcioni faktori Oct1, Sp1 i Sp3, s tim što transkripti mogu biti poreklom i sa drugih početnih mesta transkripcije. I pored toga, postoji nekoliko splajs varijanti iRNK TrxR1 sa osnovnog promotora. Pored standardnih nivoa regulacije ekspresije, koji važe za proteine, selen može imati značajnu ulogu u regulaciji ekspresije TrxR1. Promotor gena za TrxR1, kao i kod mnogih drugih antioksidantnih enzima (Trx, Prx, GR, GST, SOD, katalaza, GPx itd.), sadrži sekvencu pojačivača koji odgovara na oksidativni stres, ARE sekvencu [160]. Dakle, oksidativni stres indukuje ekspresiju enzima antioksidantne zaštite, među kojima je i TrxR1. Pored toga, redukovani Trx stabilizuje transkripcioni faktor Nrf2, koji se vezuje za ARE. Samim tim, povećanjem ekspresije Trx, u ćeliji se aktiviraju transkripcioni faktori koji dovode do povećane ekspresije kako Trx, tako i drugih antioksidantnih enzima.

Jedan od načina regulacije aktivnosti enzima TrxR je dejstvom inhibitora. Inhibitori TrxR mogu da se vezuju za NADPH vezujuće mesto, za Cys ili Sec redoks mesta enzima ili za druga mesta na enzimu, poput spojeva monomera u homodimeru. Neki od potentnih TrxR inhibitora su supstrati-kamikaze koji alkiluju ili na dugi način kovalentno modifikuju reaktivne Cys (ili Sec) ostatke redoks mesta enzima. Drugi TrxR inhibitori su supstance koje sadrže metale i koje mogu metalni jon da prebace na katalitičke Cys/Sec ostatke [156].

1.7. Inhibitori TrxR u kliničkoj primeni i razvoju novih lekova

Inhibicija TrxR za rezultat ima oksidaciju Trx i izmenjenu funkciju celokupnog Trx sistema. Iako je Trx razmatran kao potencijalna meta delovanja, najčešće je TrxR u fokusu razvoja inhibitora Trx sistema [109]. TrxR se dovodi u vezu sa različitim patološkim stanjima, poput tumora, hroničnih upala i autoimunskih bolesti, kao i neurodegenerativnih bolesti [156], što ovaj enzim čini atraktivnom metom u razvoju terapijskih strategija. Među lekovima za koje je pokazano da deluju primarno kao inhibitori TrxR su supstance sa jonima zlata, poput auranofina koji se koristi u lečenju reumatoidnog artritisa i antimoni kalijum tartrat, koji se koristi kao emetik [156]. Osim toga, pokazano je da auranofin ima potencijal i kao antimalarik [162], a ispituje se i mogućnost njegove upotrebe kao suplementa terapiji citostaticima [163, 164]. Inhibitori TrxR se takođe ispituju za antibiotsku primenu, u suzbijanju bakterijskih infekcija [165, 166]. Za citostatike, poput karmustina, cisplatina i arsenik trioksida, je pokazano da deluju i kao inhibitori TrxR i da se terapijsko dejstvo može delimično pripisati inhibiciji ovog enzima [167]. Do sada poznati inhibitori, sa potencijalnom primenom u antitumorskoj terapiji, se strukturno mogu svrstati u nekoliko grupa: inhibitori sa jonima metala, supstance koje sadrže selen, sumpor ili telur i prirodni proizvodi sa analogima [167].

Plemeniti metali imaju visok afinitet prema atomima sumpora, zbog čega mnogi inhibitori TrxR upravo potiču iz ove grupe. Veoma su potentni, i efikasni uglavnom u nanomolarnom opsegu. U supstance sa Au(I) kompleksom, pored auranofina, spadaju i aurotioglukoza, aurotiomalat [168], kao i relativno nove supstance „poput auranofina“ [169]. Kompleksi Au(III)-ditiokarbamata su se pokazali kao potentni inhibitori TrxR1 i TrxR2 [170]. Ovi kompleksi Au(III) dovode do

povećanja koncentracije slobodnih radikala, povećane fosforilacije ERK1/2 i ćelijske smrti. Od jedinjenja koje sadrže platinu, cisplatin je veoma potentan elektrofil i lako reaguje sa nukleofilima, poput Cys/Sec katalitičkog centra TrxR, te nije iznenađujuće da inhibira aktivnost TrxR. Karboplatin i oksaliplatin su takođe inhibitori TrxR [171]. Dalje je pokazano je da su Pt(II) terpiridin kompleksi potentni ireverzibilni inhibitori TrxR, sa veoma niskim IC₅₀ vrednostima (>10 nM) i da inhibitori TrxR koji sadrže platinu u manjoj meri inhibiraju i GR [172].

Ebselen i drugi sintetički molekuli organoselena inhibiraju aktivnost TrxR, kao supstrati konkurentni Trx [173, 174]. Pored supstratne inhibicije TrxR, ebselen takođe deluje i kao oksidant Trx, ima funkciju GPx, uklanja H₂O₂ i peroksinitrite i redukuje male antioksidantne molekule [175]. U sisarskim ćelijama ebselen ima antioksidantno dejstvo, a oksidovani ebselen se redukuje na račun aktivnosti TrxR. Inhibitor TrxR, etaselen, je trenutno u Fazi I kliničkog ispitivanja za lečenje nesitnoćelijskog karcinoma pluća u Hunanu, Kini [176]. Sumporna jedinjenja, poput 2-imidazol disulfida, su uglavnom kompetitivni inhibitori ili supstrati TrxR, inhibiraju rast ćelija tumora *in vitro* i ispoljavaju antitumorsko dejstvo *in vivo* [177, 178].

Problem lekova koji su odobreni za upotrebu, a deluju i kao inhibitori TrxR, je što u većini slučajeva primarno deluju kao prooksidansi, u velikoj meri su toksični i dovode do neželjenih efekata. Alternativni pristup inhibiciji TrxR je upotreba prirodnih proizvoda, poput antioksidansa koji se u telu tolerišu u značajno većim dozama. Primeri prirodnih supstanci koje deluju i kao inhibitori TrxR su kurkumin, piperlongumin, piperin, kao i ekstrakti zelenog i crnog čaja, za koje je pokazano da ujedno imaju i antitumorsko dejstvo [109, 167].

Mehanizmi antitumorskog efekta poznatih inhibitora TrxR nisu u dovoljnoj meri istraženi, kao ni kakav je efekat inhibicije TrxR na različite tipove tumora. Odlučujući faktor u selektivnosti inhibitora TrxR ka određenim tipovima tumora ima redoks fenotip samih tumorskih ćelija, koji se u grubom smislu može poistovetiti sa stepenom ekspresije proteina Trx sistema. Na ekspresiju proteina utiče i stanje oksigenacije tumora, tako da je ciklično smenjivanje hipoksije i oksidativnog stresa takođe bitan faktor u osetljivosti tumorskih ćelija na određeni terapeutik.

Uprkos potencijalu koje su inhibitori TrxR pokazali u medicini do danas, tek nekoliko farmaceutskih kompanija je uključeno u razvoj novih klasa inhibitora. Selektivnost inhibitora je jedan od glavnih problema u potrazi za uspešnim lekom. Većina poznatih inhibitora ciljano deluje na Sec-Cys unutar C-terminalnog aktivnog mesta. Ipak, Cys tioli imaju važnu ulogu kod velikog broja enzima, tako da je specifična inhibicija TrxR, bez dejstva na druge enzime od ključnog značaja da bi supstanca bila razmatrana kao lek. Većina današnjih citostatika deluju neselektivno na sve proliferativne ćelije u organizmu, što za posledicu ima brojne neželjene efekte. TrxR ima važnu ulogu u svim proliferativnim ćelijama u organizmu, ali dok u normalnim ćelijama uloga TrxR može biti kompenzovana drugim antioksidantnim enzimima, u ćelijama tumora je značaj ovog enzima veći. Ova osobina može biti upotrebljena za razvoj nove klase inhibitora TrxR, specifičnih i selektivnih ka tumorskim ćelijama, čime bi se smanjila neželjena dejstva hemioterapije i povećao kvalitet života pacijenata.

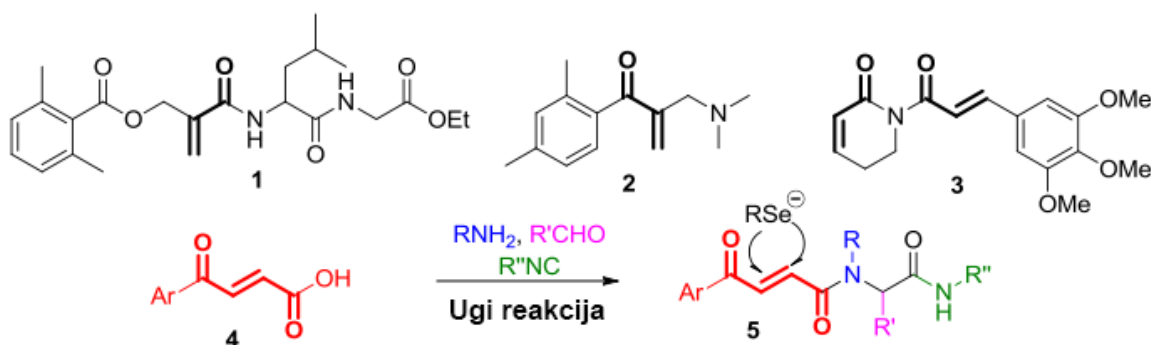
1.7.1. Ugi-tip Majklovih akceptora (UMA)

α , β -Nezasićena karbonilna jedinjenja, kao i olefini sa elektrofilnom grupom, poznati kao Majklovi akceptori, su prethodnih decenija u žiži interesovanja istraživača novih inhibitora TrxR. Smatra se da Majklovi akceptori inhibiraju TrxR kovalentnom interakcijom sa aktivnim mestom enzima [179]. U periodu od 2017. godine do sada, više takvih jedinjenja je patentirano, sa potencijalnom primenom kao antitumorskih supstanci [180-186].

Supstance, nazvane Ugi-tip Majklovih akceptora (UMA), su mali elektrofilni molekuli, dizajnirani tako da ciljano inhibiraju nukleofilnu Sec katalitičku jedinicu TrxR1 [187]. Pojednostavljena šema sinteze ovih supstanci prikazana je na Slici 11. Multikomponenta Ugi reakcija [188] je upotrebljena u sintezi inhibitora TrxR1 zbog mogućnosti nezavisnog variranja četiri elementa oko peptidomimetičke diamidne okosnice. Kao produkt sinteze dobijeni su mali elektrofilni molekuli – Majklovi akceptori.

Peptidomimetici su mali molekuli čiji funkcionalni deo oponaša strukturo peptide ili proteine u 3D prostoru, tako da su u stanju da interaguju sa biološkim metama. Osnovna prednost peptidomimetika u poređenju sa peptidima je njihova otpornost na proteolitičku degradaciju i efikasnija biodistribucija u tkivu. Definisanjem aktivnog mesta peptida (poput katalitičkog domena), kreiraju se supstance sa odgovarajućim aktivnim mestom u 3D, sa pojednostavljenim skeletom molekula, odnosno „nosačem“ aktivnog mesta. Samim tim, redukuje se složenost aktivnog molekula, sa održanim biološkim efektom.

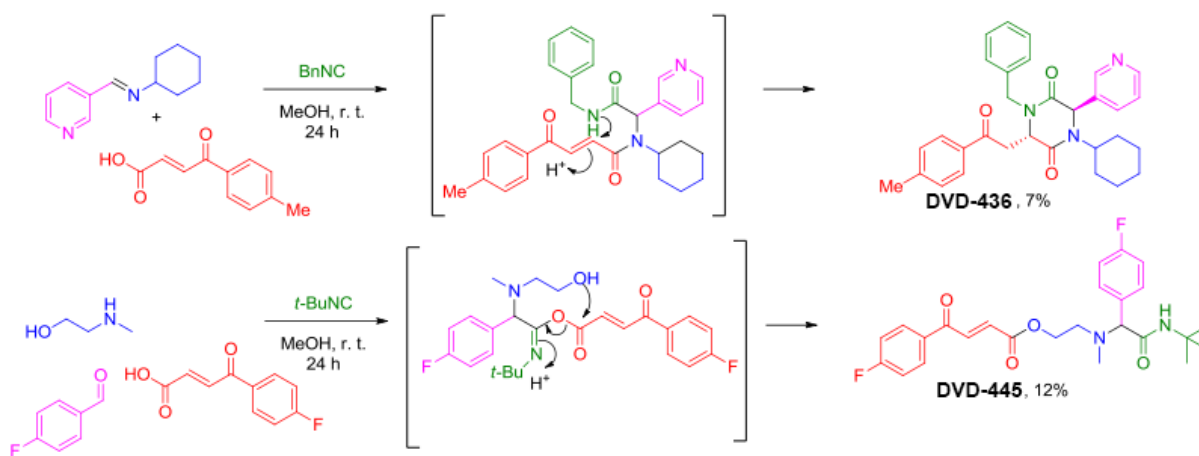
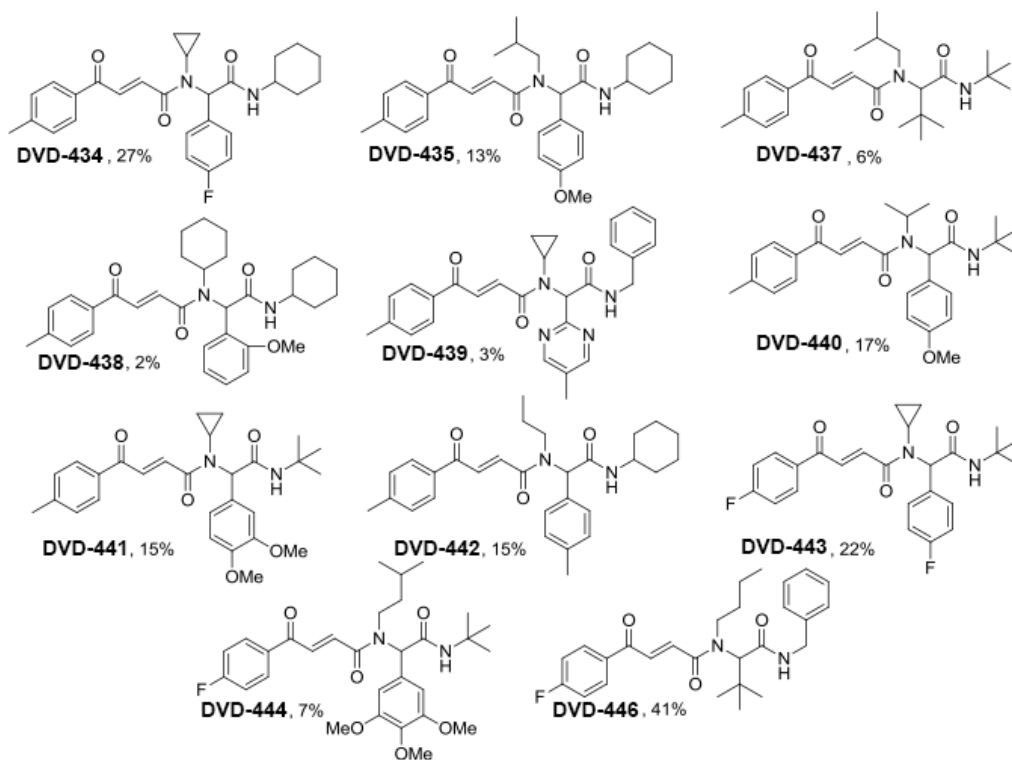
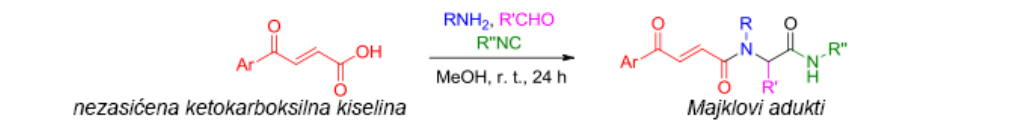
Ugi reakcija je hemijska reakcija u kojoj se sintetišu bis-amidi od ketona ili aldehida, amina, izocijanida i karboksilne kiseline. Reakcija je nazvana po Ivaru Karlu Ugiju, nemačkom hemičaru estonskog porekla, koji je prvi opisao reakciju 1959. godine. U Majklovoj reakciji adicije dolazi do konjugacije ugljeničnih nukleofila (Majklovih donora) sa β -ugljenikom elektrofila (Majklovih akceptora), pri čemu se kao produkt reakcije dobija Majklov adukt. Reakciju je prvi opisao američki organohemičar, Artur Majkl (Arthur Michael), krajem 19. veka.



Slika 11. Sinteza peptidomimetičkih inhibitora TrxR1, Majklovih akceptora, ispitanih u ovom radu. Označeni su relevantni elektrofilni motivi molekula.

Na Slici 12 su prikazane strukture inicijalne serije UMA supstanci čiji je efekat na inhibiciju TrxR1 ispitivan. UMA supstancama su dati nazivi sa početnim slovima “DVD”, prema inicijalima hemičara koji je radio na njihovom dizajnu i sintezi, Dmitriju V. Darinu, iz istraživačke grupe Mihaila Krasavina, Laboratorije za hemijsku farmakologiju Hemijskog instituta, Univerziteta u Sankt Peterburgu. Strukture i sinteza inicijalne serije supstanci su publikovani u Jovanović i sar. (2019) [187].

Supstanca DVD-445 je dobijena Ugi reakcijom izvedenom sa N-metil 2-aminoetanolom, zajedno da 2-metoksietilaminom (Slika 12). DVD-445 je poslužila kao osnova za razvoj serije supstanci analognih struktura, čiji potencijal inhibicije TrxR1 i biološki efekat je takođe ispitan. Struktura i sinteza DVD-445 analoga su publikovani u radu Jovanović i sar. (2020) [189].



Slika 12. Sinteza prve serije UMA adukta, kandidata za inhibitore TrxR1. Objašnjenje u tekstu.

2. CILJEVI

Pregledom literature ustanovljeno je da ograničen izbor terapijske strategije u lečenju glioblastoma, kao i visoko-rizičnih i rekurentnih neuroblastoma predstavlja aktuelan problem. Ciljevi ove doktorske disertacije su definisani tako da, uz odgovarajuću primenjenu metodologiju, disertacija odgovori na pitanje da li UMA, kao inhibitori TrxR1, poseduju zadovoljavajuća antitumorska svojstva koja bi ih kvalifikovala kao novu strategiju u lečenju glioblastoma i neuroblastoma.

- 1) Okarakterisati UMA supstance kao inhibitore TrxR1 i Trx sistema.
- 2) Okarakterisati ćelijske modele za ispitivanje antitumorskih efekata UMA - ispitati ekspresiju TrxR1 i Trx na nivou iRNK, kao i nivo TrxR1 proteina u ćelijama glioblastoma (U87), neuroblastoma (SH-SY5Y), kao i normalnim humanim ćelijama (HaCaT).
- 3) Ispitati antitumorska svojstva UMA na modelima glioblastoma i neuroblastoma:
 - a) Uporediti citotoksični efekat UMA na ćelijskim modelima humanih glioblastoma (U87), neuroblastoma (SH-SY5Y) i normalnih ćelija (HaCaT i PBMC);
 - b) Ispitati uticaj UMA na produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i azota, kao i indukciju ćelijske smrti.
- 4) Ispitati mehanizam antitumorskog dejstva najpotentnijih UMA na senzitivnim i višestruko rezistentnim ćelijama glioma pacova (C6 i RC6) i ćelijama humanog glioblastoma (U87 i U87-TxR):
 - a) Ispitati efekat UMA na inhibiciju ćelijskog rasta;
 - b) Utvrditi uticaj UMA na oksidativni stres i ekspresiju antioksidativnih enzima;
 - c) Ispitati efekat UMA na membranski potencijal mitohondrija, ćelijsku smrt i proliferaciju ćelija;
 - d) Ispitati efikasnost UMA u povećanju osetljivosti na antigliomski hemioterapeutik, TMZ;
 - e) Utvrditi vrstu interakcije UMA sa P-gp;
 - f) Ispitati uticaj UMA na ćelijsku invaziju i migraciju
- 5) Ispitati da li novosintetisani analozi vodeće UMA iz prve serije supstanci imaju poboljšana inhibitorna i antitumorska svojstva.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Supstance

U ovoj studiji korišćene su novosintetisane supstance, UMA (inicijalna serija supstanci: DVD-434, DVD-435, DVD-436, DVD-437, DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-441, DVD-442, DVD-443, DVD-444, DVD-445 i DVD-446, kao i analozi supstance DVD-445: 1, 3, 4, 7, 9, 20, 34), dobijene od prof. dr Mikhaila Krasavina sa Instituta za hemiju, Univerziteta u Sankt Peterburgu, u okviru saradnje sa istraživačkom grupom dr Milice Pešić sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na projektu THIOREDIN – eng. *Development of thioredoxin reductase inhibitors towards new anti-cancer agents*. UMA su rastvoreni u dimetilsulfoksidu (DMSO) u 10 mM koncentraciji i čuvani na – 20 °C do daljeg korišćenja. Pre tretmana, supstance su rastvarane u sterilnoj vodi.

Komercijalno dostupni lekovi korišćeni u ovom radu su temozolomid (TMZ, Sigma-Aldrich, Nemačka) i paklitaksel (PTX, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). TMZ je rastvoren u apsolutnom etanolu u 100 mM koncentraciji, a alikvoti su do korišćenja čuvani na – 20 °C. PTX, rastvoren u apsolutnom etanolu u 1 mM koncentraciji je alikvotiran i čuvan na –20 °C. Tarikvidar (TQ) je dobijen od dr Sven Rottenberga sa Instituta za tumore u Amsterdamu, Holandija i 10 µM alikvoti su čuvani na –20 °C. Pre tretmana supstance su rastvarane u sterilnoj vodi.

3.2. Hemikalije i reagensi

U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće hemikalije i reagensi: natrijum-aurotiomalat hidrat (ATM), Elmanov reagens (5,5-ditio-bis-2 nitrobenzoeva kiselina, DTNB), albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA), Histopaque®-1077, rodamin 123 (Rho123), Hoechst 33342, DMSO, DMEM/F12 medijum, dihidrorodamin (DHR), luminol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), dihidroetidijum (DHE, life Technologies, SAD), NADPH tetranatrijum so (Acros Organics, Nemačka), rekombinantna TrxR1 pacova, insulinski test paket (IMCO, Švedska), insulin NovoRapid® (Novo Nordisk, Danska), minimalni esencijalni medijum (MEM), fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum*, FBS) (Capricorn Scientific, Nemačka), RPMI 1640 medijum, Dulbekov modifikovani minimalni esencijalni medijum (DMEM), tripsin/etilen-diamino-tetrasirćetna kiselina (engl. *ethylene-diamine-tetra acetic acid*, EDTA) (Biological Industries, SAD), L-glutamin, smeša penicilin-streptomycin (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD), smeša antibiotika i antimikotika: penicilin, streptomycin, amfotericin B (Biowest, SAD), aneksin-V-FITC (AV)/propidijum jodid (eng. *propidium iodide*, PI) paket (Abcam, UK) i karboksifluorescein sukimidil estar (eng. *carboxyfluoresceinsuccinimidyl ester*, CFSE) (Molecular Probes®, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD), JC-1 esej paket (BD Biosciences, San Diego, USA), GSH esej paket (Abcam, UK), RNKaza A i TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, SAD), etidijum bromid (Merck, Nemačka), agaroz (Applichem GmbH, Nemačka), matrigel (Corning®, SAD).

3.3. Čelijske linije

SH-SY5Y čelijska linija humanog neuroblastoma, C6 čelijska linija pacovskog glioma, U87 čelijska linija humanog glioblastoma i MRC-5 čelijska linija fibroblasta poreklom iz pluća su nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD). HaCaT čelijska linija normalnih humanih keratinocita, nabavljena od Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Germany) je poklon prof. dr Andrae Jorga, Odeljenje za biofiziku, Istraživačkog centra Borstel, Lajbnic centra za medicinu i biološke nauke, Borstel, Nemačka. U87-TxR rezistentna čelijska linija humanog glioblastoma je dobijena sukcesivnim izlaganjem U87 čelija rastućim koncentracijama PTX (100-300 nM) [190].

RC6 rezistentna čelijska linija pacovskog glioma je dobijena nakon izlaganja C6 čelija postepeno rastućim koncentracijama BCNU (10-300 µM)[191].

SH-SY5Y ćelijska linija je gajena u DMEM/F12 medijumu, sa dodatkom 10% FBS, 4 mM L-glutamina i smeše antibiotika penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 mg/mL). Ćelijske linije C6, RC6, HaCaT i MRC-5 su gajene u DMEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 mg/mL). U87 i U87-TxR ćelijske linije su gajene u MEM medijumu, sa dodatkom 10% FBS, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika penicilina (50 U/mL) i streptomicina (50 mg/mL).

Sve ćelijske linije su gajene u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Pasaža ćelija je vršena nakon dostizanja 80 – 90% konfluentnosti u flaskovima 25 i 75 cm² (Sarstedt, Nemačka). Nakon tripsinizacije, ćelije su brojane uz pomoć Burkera-Turk hemocitometra na invertnom mikroskopu (Olympus, Nemačka), nakon čega su zasejavane u odgovarajućoj gustini za dalji eksperiment ili za dalje održavanje u kulturi. Ukoliko nije drugačije naznačeno, ćelije su centrifugirane pri brzini od 2 000 x g, 3 min, na sobnoj temperaturi.

3.4. Izolacija perifernih mononuklearnih ćelija krvi

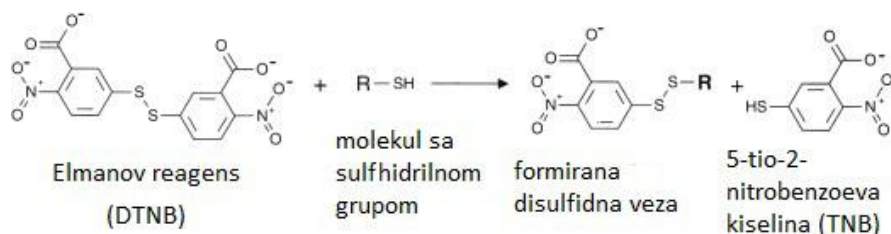
Periferne mononuklearne ćelije krvi (eng. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) su korišćene kao kontrolne, normalne ćelije, za utvrđivanje faktora selektivnosti UMA ka ćelijama tumora. PBMCs su heterogena populacija ćelija krvi (makrofagi, dendritične ćelije, monociti i limfociti), sa jednim, okruglim jedrom.

Krv je uzorkovana venepunkcijom od zdravih donora, u sterilne tube obložene heparinom. Izolacija mononuklearnih ćelija je izvršena centrifugiranjem na gustinskom gradijentu, prema preporukama proizvođača komercijalnog gradijenta za izolaciju ćelija krvi, Histopaque-1077. Tokom centrifugiranja krvi, eritrociti formiraju agregate sa polisaharozom i sedimentiraju. Granulociti u rastvoru postaju blago hipertonični, zbog čega se talože na dnu tube za centrifugiranje. Mononuklearne ćelije se zadržavaju, u vidu mutnog prstena, na spoju slojeva Histopaque rastvora i krvne plazme. Smatra se da je ovom procedurom kontaminacija eritrocitima zanemarljiva, dok se većina krvnih pločica uklanja u procesu ispiranja ćelija.

Nakon uzorkovanja, krv je ostavljena na sobnoj temperaturi 30-45 min. Histopaque-1077 je alikvotiran u polistirenske tube od 50 mL, u zapremini od 15 mL po tubi, i ostavljen na sobnoj temperaturi minimum 15 min pre korišćenja. Na sloj gradijenta za izolaciju naneta je krv u odnosu 1:1. Krv je centrifugirana na gradijentu pri brzini od 400 x g, 30 min. Kako pri zaustavljanju centrifuge ne bi došlo do mešanja slojeva ćelija krvi, odabrano je podešavanje za sporo zaustavljanje rotora centrifuge. Nakon centrifugiranja, gornji sloj sa visokim sadržajem krvnih pločica je uklonjen, a sloj mononuklearnih ćelija je pažljivo prenet Pasterovom pipetom u nove, polistirenske tube od 15 mL sa koničnim dnom. Ćelijama je potom dodato 10 mL sterilnog fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer solution*, PBS) i centrifugirane su na 250 x g. Supernatant je odbačen, a talog ćelija je dva puta ispran sa 5 mL PBS-a. Po ispiranju, ćelije su resuspendovane u 0,5 mL RPMI 1640 medijuma, sa dodatkom 10% FBS, 2 mM L-glutamina i rastvorom antibiotika i antimikotika (10 000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina, 25 mg/mL amfotericina B). Ćelije su potom prebrojane na hemocitometru i zasejane u RPMI 1640 medijumu na ploču sa 96 bunarića (100 000 ćelija po bunariću), nakon čega su korišćene u eksperimentu određivanja metaboličke aktivnosti ćelija MTT (eng. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) testom.

3.5. Kolorimetrijski testovi aktivnosti TrxR

Elmanov reagens (DTNB) reaguje sa sulfhidrilnim grupama, pri čemu kao proizvod daje obojenu supstancu 2-nitro-5-tiobenzoevu kiselinu (TNB) (Slika 14). Molarni ekstinkcioni koeficijent TNB je $14\ 150\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pri talasnoj dužini od 412 nm i ostaje stabilan u opsegu pH 7,6 – 8,6. Kolorimetrijski eseji za detekciju aktivnosti enzima TrxR su zasnovani na sposobnosti TrxR da redukuje supstrat DTNB do TNB u prisustvu NADPH. U prisustvu NADPH, kao donora elektrona, reaktivne sulfhidrilne grupe enzima TrxR postaju dostupne za reakciju sa DTNB supstratom. Apsorbanca reakcione smeše izmerena pri talasnoj dužini od 412 nm se smatra ekvivalentnom sa aktivnosti enzima TrxR.



Slika 13. Hemijska reakcija DTNB i molekula sa sulfhidrilnom grupom.

Kao rezultat u kinetičkom tipu testa, dobija se kriva zavisnosti apsorbance od vremena. U kvantifikaciji kinetičkih testova, u obzir je uzimana promena apsorbance linearnog dela krive, u trajanju od najmanje 10 min. Na primer, $(A_{16\text{min}} - A_{5\text{min}})/10$, pri čemu „10“ označava ukupno trajanje linearne promene apsorbance koje je uzeta u obzir; u datom primeru je 10 min, između 5 i 16 min. U obzir se uzima linearna promena apsorbance, jer se smatra da u takvom tipu reakcije, promena apsorbance jeste rezultat aktivnosti TrxR, dok u reakcijama koje imaju nelinearnu promenu, različiti faktori utiču na tok reakcije (poput oksidacije TNB u DTNB, te se i odnos enzim-supstrat u reakciji menja).

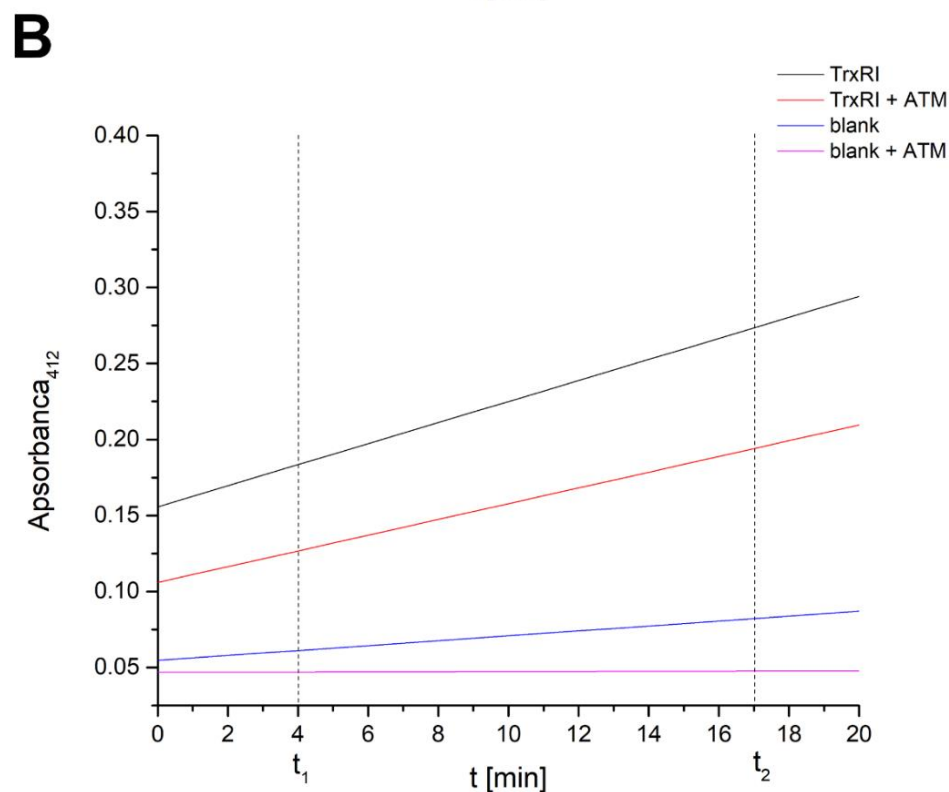
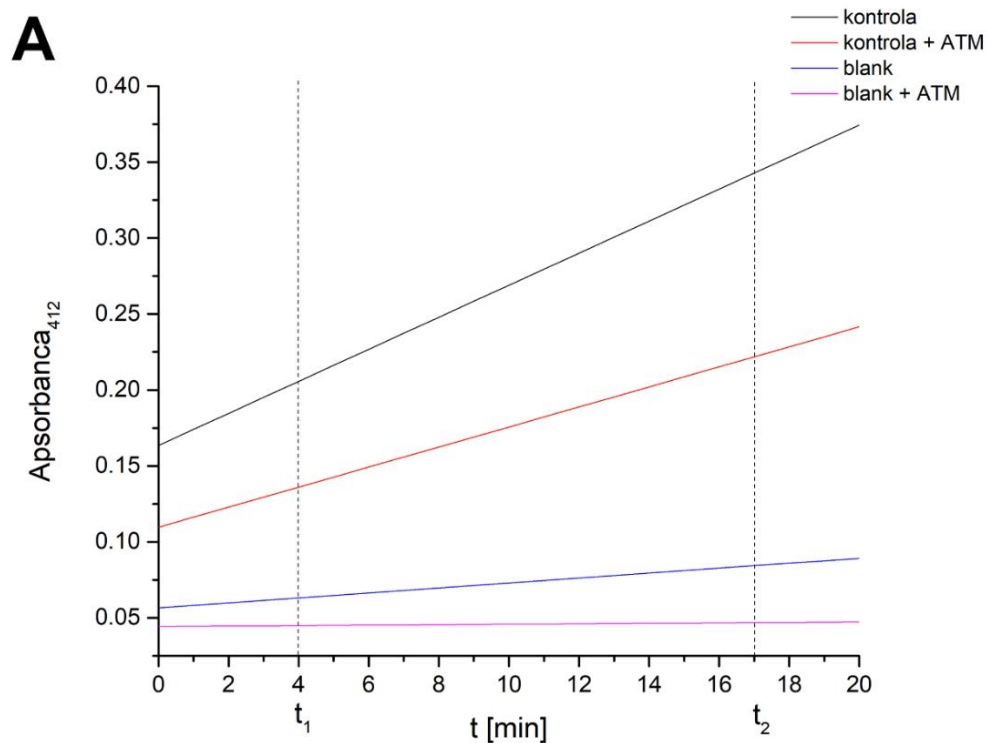
3.5.1. Izolacija proteina za određivanje aktivnosti TrxR

Adherentne ćelije SH-SY5Y su dva puta isprane PBS-om i potom sastrugane sa dna flaska za gajenje. Ćelije su na ledu homogenizovane pomoću homogenizatora Ultra-Turrax T25 (Ikawerk, Janke and Kunkel Inc., Nemačka) u hladnom 50 mM kalijum-fosfatnom puferu pH 7,4, sa dodatim 1 mM EDTA. Homogenati su centrifugirani brzinom $10\ 000 \times g$, 15 min na $+ 4\ ^\circ\text{C}$. Koncentracija proteina supernatanta je određena paketom za određivanje koncentracije proteina (Bio-Rad Laboratories, SAD). Uzorci proteina su alikvotirani do daljeg korišćenja i čuvani na $- 80\ ^\circ\text{C}$.

3.5.2. Test za određivanje aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu

Aktivnost TrxR u ćelijskom lizatu je određena metodom redukcije supstrata DTNB do žuto obojenog TNB produkta. Reakcije su se odvijale na ploči od 96 bunarića, u ukupnoj zapremini od 100 μL , u smeši koja je sadržala 50 mM kalijum-fosfatni pufer (pH 7,0), 50 μg proteina ćelijskog lizata, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0,2 mg/mL BSA i 0,25 mM NADPH. EDTA i BSA u reakcionoj smeši sprečavaju adsorpciju redukovanih proteina za plastičnu površinu reakcionih posuda i nastavaka za pipete. Reakcije testiranih supstanci, čija su inhibitorna svojstva prema TrxR praćena u koncentracionom opsegu 1 – 200 μM , su upoređene sa kontrolnim reakcijama bez prisustva ispitivanih supstanci. Reakciona smeša zapremine 90 μL je inkubirana 15 min na šejkeru ploča (PST-60HL-4, bioSan, Riga, Latvija) na sobnoj temperaturi, pri čemu je oksidacija reakcione smeše sprečena plastičnom lepljivom folijom. Nakon inkubacije, reakcionoj smeši je dodato 10 μL DTNB u finalnoj koncentraciji od 0,5 mM. Kinetika enzima je izmerena na TECAN Infinite M1000 PRO spektrofotometru, merenjem porasta apsorbance na 412 nm u period od 20 min (Slika 14), sa

očitavanjem apsorbance u intervalima od 2 min i mešanjem ploče pre svakog očitavanja. Drugi enzimi, prisutni u ukupnom proteinskom sadržaju ćelijskog lizata, poput GR i GPx, takođe mogu da redukuju DTNB. Kako bi se izmerila aktivnost TrxR koristi se specifični inhibitor TrxR, ATM, u zasebnim reakcionim smešama kako za kontrolne reakcije, tako i za reakcije koje sadrže testirane supstance. Oduzimanjem apsorbance reakcija sa testiranim supstancama od apsorbance kontrolnih reakcija sa ukupno redukovanim DTNB, dobija se specifična aktivnost TrxR u reakciji. Od svake vrednosti apsorbance kontrolnih reakcija, kao i reakcija sa testiranim supstancama oduzeta je vrednost apsorbance reakcija u prisustvu 20 μ M ATM. Od svake grupe reakcija, oduzete su vrednosti apsorbance bez prisustva proteina ćelijskog lizata (blank). Primer preračunavanja procenta inhibicije TrxR supstancom određene koncentracije čije inhibitorno svojstvo se ispituje je navedeno u Tabeli 1.



Slika 14. Krive promene apsorbance DTNB, izmerene pri talasnoj dužini od 412 nm u trajanju od 20 minuta. Od signala promene apsorbance u vremenu, izračunava se brzina reakcije, prema jednačini opisanoj u tekstu. Brzina reakcije sa ATM-om se oduzima od odgovarajućih reakcija bez ATM-a, kako bi se dobila brzina reakcije specifična za enzim TrxR. U izračunavanju konačnih vrednosti za brzine reakcije, oduzima se blank, kao pozadinski signal nespecifične

promene apsorbance, koja nije rezultat enzimske aktivnosti proteina ćelijskog lizata. **(A)** Zapisi promene apsorbance DTNB u vremenu u kontrolnim uslovima. Na grafiku su predstavljene 4 reakcije koje se odigravaju istovremeno u zasebnim reakcionim smešama (kontrola, kontrola+ATM, blank, blank+ATM). Izračunata vrednost za brzinu reakcije TrxR kontrole predstavlja referentnu vrednost, odnosno 100% aktivnosti TrxR u lizatu. **(B)** Zapisi promene apsorbance u prisustvu inhibitora TrxR (TrxRI) određene koncentracije. Na grafiku su predstavljene četiri reakcije koje se odigravaju istovremeno; TrxRI je prisutan u sve četiri reakcije u istoj količini. Kao i u kontrolnim reakcijama, specifični inhibitor TrxR ATM, se koristi za dobijanje vrednosti brzina reakcija specifičnih za TrxR.

Tabela 1. Primer izračunavanja procenta inhibicije TrxR u kolorimetrijskom testu aktivnosti TrxR iz lizata ćelija.

	reakcija sa lizatom, bez ATM (A)	reakcija sa lizatom, sa ATM (B)	reakcija bez lizata, bez ATM (C)	reakcija bez lizata, sa ATM (D)	brzina reakcije (Δ)	%A	%I
Kontrola	0,00209	0,00088	0,00003	0,00009	0,00128	100	0
TrxRI 1 μ M	0,00202	0,00090	0,00004	0,00013	0,00120	93,45	6,55
TrxRI 5 μ M	0,00188	0,00102	0,00008	0,00018	0,00096	75,25	24,75
TrxRI 10 μ M	0,00173	0,00088	0,00006	0,00008	0,00086	67,45	32,55
TrxRI 25 μ M	0,00112	0,00065	0,00001	0,00008	0,00023	17,71	82,28
TrxRI 50 μ M	0,00063	0,00073	0,00004	0,00013	0,00007	5,45	94,55

Vrednosti u tabeli za A, B, C i D su dobijene prema formuli $(A_{17min} - A_{4min})/13$, uzimajući u obzir vrednosti apsorbanci za odgovarajuće reakcije u 4. i 17. min testa. Reakcije se odigravaju u triplikatima – u tabelu su unete srednje vrednosti od tri reakcije za A, B, C i D. Brzina reakcije je izračunata prema formuli: $\Delta = (A-C)-(B-D)$. “%A” predstavlja procenat aktivnosti TrxR, pri čemu se kao 100% aktivnosti uzima brzina reakcije u kontrolnoj reakciji. “%I” predstavlja procenat inhibicije TrxR, odnosno za koliko je umanjena aktivnost TrxR u reakcijama sa ispitivanim inhibitorima određene koncentracije u odnosu na brzinu kontrolne reakcije. “kontrola” je referentna reakcija. “TrxRI” je supstanca čija se inhibitorna svojstva prema TrxR ispituju, sa navedenom koncentracijom.

3.5.3. Test za određivanje aktivnosti rekombinantnog enzima TrxR1 pacova

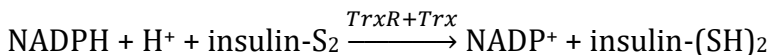
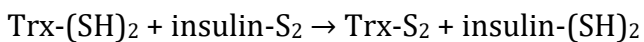
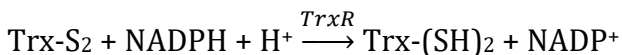
Aktivnost prečišćenog enzima TrxR1 određena je metodom redukcije DTNB supstrata. Reakcije na ploči sa 96 bunarića su se odvijale u finalnoj zapremini od 100 μ L, u reakcionoj smeši sa 100 mM kalijum-fosfatom pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 mg/ml BSA, 5 nM TrxR1, 2 mM NADPH i testiranim supstancama (0,25 – 25 μ M). Reakciona smeša je inkubirana 15 min na šejkeru ploča, na sobnoj temperaturi, sa plastičnom folijom zalepljenom na ploču, nakon čega je dodat DTNB u finalnoj koncentraciji od 5 mM. Kinetika enzima je merena na TECAN Infinite M1000 PRO spektrofotometru, na 412 nm 20 min, sa očitavanjem apsorbance u intervalima od 1 min i mešanjem ploče pre svakog očitavanja. U kvantifikaciji kinetičkog esaja, u obzir je uziman nagib linearnog dela krive zavisnosti apsorbance od vremena, u trajanju od najmanje 10 min. Koeficijenti reakcija su, kao što je opisano i u odeljku 3.5.2. *Test za određivanje aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu*, izračunati kao količnik razlike signala apsorbance krajnje vremenske tačke i apsorbance početne vremenske tačke i vremena trajanja reakcije, prema formuli $(A_{t_2}-A_{t_1})/10$ (A_{t_2} – apsorbance u vremenskoj tački t_2 , A_{t_1} – apsorbance u vremenskoj tački t_1 , 10 – vreme od 10 min trajanja reakcije). Od izračunate brzine reakcije koja se odigravala u prisustvu enzima, oduzet je pozadinski signal reakcije, sa svim komponentama sa izuzetkom samog enzima (blank). Poput kvantifikacije signala opisane u Tabeli 1, konačni signal brzine reakcije je dobijen kao razlika koeficijenta reakcije sa enzimom i blanka (ekvivalentno $\Delta = (A-C)$, Tabela 1). Reakcije sa testiranim supstancama su upoređene sa kontrolnim reakcijama, bez prisustva supstanci. Procenat inhibicije TrxR je dobijen kao što je opisano u Tabeli 1.

3.5.4. Insulinski test za određivanje aktivnosti Trx sistema

Insulinski test je test krajnje tačke za određivanje aktivnosti TrxR1, koji se zasniva na brzini reakciji između redukovanog Trx i disulfida proteina. U slučaju insulina, koji ima 3 disulfida, stopa reakcije je $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. TrxR1, u prisustvu NADPH, redukuje Trx, koji potom redukuje insulin.

Posledično, NADPH redukuje disulfide insulina kombinovanom reakcijom tioredoksinog sistema, pri čemu se dobijaju NADP⁺ i redukovani insulin. Reakcija se prekida dodavanjem guanidin-hidroklorida (GuHCl), koji denaturiše i inaktivira Trx i TrxR1, i čini dostupnim sve SH-grupe u smeši. Dodavanjem DTNB, SH-grupe kao proizvod daju TNB. Test se zasniva na neto povećanju slobodnih sulfhidrilnih grupa u reakciji.

Šema reakcije insulinskog testa:



Insulinski test paket je korišćen za određivanje aktivnosti Trx sistema, prema preporukama proizvođača. Reakcija se odigravala u ukupnoj zapremini od 50 µL, u 50 mM TRIS-HCl, 20 mM EDTA (TE pufer) pH 7,6, sa 5 nM TrxR1 pacova, 10 µM Trx pacova, 240 µM insulinom i 0,8 mM NADPH. Koncentracioni opseg testiranih supstanci je bio 0,25 – 25 µM. Reakciona smeša je inkubirana na šejkeru ploča 30 min na 37 °C. Nakon inkubacije je dodat 7,2 M GuHCl u 0,18 M TRIS-HCl pH 8,0 za degradaciju proteina, zajedno sa 1 mM DTNB za detekciju SH-grupa. Apsorpcija TNB proizvoda je izmerena na TECAN Infinite M1000 PRO spektrofotometru, na 412 nm.

3.6. Određivanje broja ćelija

Brojanje ćelija pod mikroskopom je vršeno uz pomoć Burker Turkovog hemocitometra. Po 10 µL ćelijske suspenzije je ubrizgano u dve izbrazdane komore hemocitometra. Ćelije su brojane u obe komore, u po 4 polja (kvadrata). Ukupan broj ćelija je određen po sledećem principu: *broj ćelija/ml = prosečan broj ćelija po kvadratu komore x razblaženje ćelija x 10⁴*, pri čemu je 10⁴ faktor komore.

3.7. MTT test metaboličke aktivnosti ćelija

Za procenu efekta supstanci na vijabilnost ćelija upotrebljen je MTT test [192]. Test se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli (MTT) do formazana pomoću mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze koja pripada kompleksu II respiratornog lanca mitohondrija. Aktivnost sukcinat dehidrogenaze, odnosno mitohondrijalna respiracija, se uzima kao pokazatelj metaboličke aktivnosti ćelije, a metabolička aktivnost kao parametar koji indirektno ukazuje na vijabilnost ćelije. MTT-formazan je proizvod ljubičaste boje, čija apsorbanca se očitava na talasnoj dužini od oko 570 nm. Nakon perioda predviđenog za tretman ćelija, u svaki bunarić dodato je 0,2 mg/ml MTT u odgovarajućem medijumu za gajenje ćelija. Nakon 3 h inkubacije na 37 °C, sa 5% CO₂, medijum je uklonjen i u svaki bunarić je dodato po 200 µL DMSO za rastvaranje formazana. Apsorbanca uzoraka je izmerena na 570 nm Multiskan Sky Microplate spektrofotometru (ThermoFisher Scientific, SAD).

3.7.1. Pojedinačni tretmani ćelija

Za ispitivanje pojedinačnih tretmana i istovremenih kombinacija, ćelije su zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) u gustini od 2 000 ćelija po bunariću za C6, RC6 i HaCaT, 3 000 ćelija po bunariću za MRC-5, 4 000 ćelija po bunariću za U87, 5 000 ćelija po

bunariću za U87-TxR, 12 000 ćelija po bunariću za SH-SY5Y i 100 000 ćelija po bunariću za PBMC u 100 µL medijuma. Istovremeno zasejane netretirane ćelije su korišćene kao kontrola. Nakon 24 h, ćelije su tretirane u opsegu koncentracija prikazanim u Tabeli 2.

Tabela 2. Opseg koncentracija tretmana u testu metaboličke aktivnosti ćelija.

	SH-SY5Y	C6	RC6	U87	U87-TxR	HaCaT	PBMC
DVD-438	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM
DVD-439	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM
DVD-440	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM
DVD-443	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM
DVD-444	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	0,25 – 5 µM	0,25 – 5 µM
DVD-445	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM	1 – 50 µM
PLN	1 – 50 µM	NU	NU	1 – 50 µM	NU	1 – 50 µM	1 – 50 µM

“PLN”: piperlongumin, “NU”: nije urađeno.

Piperlongumin, alkaloid biljke *Piper longum* L., po svojoj hemijskoj prirodi pripada grupi Majklovih akceptora i poznati je inhibitor TrxR, te je upotrebljen kao pozitivna kontrola u testu, u opsegu koncentracija na odgovarajućim ćelijskim linijama navedenim u Tabeli 2.

Analozi supstance DVD-445 (1, 3, 4, 7, 9, 20 i 34) su ispitivani u koncentracionom opsegu 1 – 25 µM na ćelijskim linijama humanih glioblastoma i MRC-5 ćelijama.

Pojedinačni tretmani su trajali 72 h.

3.7.2. Kombinovani tretmani ćelija

Pored pojedinačnih tretmana UMA, ispitane su i istovremene kombinacije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ na ćelijskim linijama pacovskih i humanih glioma. Takođe, ispitan je efekat istovremenih tretmana DVD-444 ili DVD-445 sa PTX kod rezistentnih humanih glioblastoma. Tri koncentracije DVD-444 i DVD-445 su kombinovane sa tri koncentracije TMZ kod U87, U87-TxR, C6 i RC6 (Tabela 3). Tri koncentracije DVD-444 ili DVD-445 su kombinovane sa pet rastućih koncentracije PTX (0,1, 0,25, 0,5, 1 i 2,5 µM) kod U87-TxR ćelijske linije (Tabela 4). Istovremeni, kombinovani tretmani su trajali 72 h.

Tabela 3. Koncentracije kombinovanih tretmana TMZ sa DVD-444 ili DVD-445 u testu metaboličke aktivnosti ćelija U87, U87-TxR, C6 i RC6.

		U87, U87-TxR, C6				RC6	
		DVD-444 [µM]	DVD-445 [µM]			DVD-444 [µM]	DVD-445 [µM]
TMZ [µM]	10	0,5	1	TMZ [µM]	100	0,5	1
	25	1	2,5		250	1	2,5
	50	1,5	5		500	1,5	5

Tabela 4. Koncentracije kombinovanih tretmana PTX sa DVD-444 ili DVD-445 u testu metaboličke aktivnosti U87-TxR ćelija.

		U87-TxR	
		DVD-444 [μM]	DVD-445 [μM]
PTX [μM]	0,1 - 2,5	0,25	1
		0,5	2,5
		1	5

3.7.3. Analiza efekta kombinovanih tretmana

Za određivanje prirode međudejstva (sinergističkog, antagonističkog ili aditivnog) korišćen je kompjuterski softver CalcuSyn, zasnovan na metodi kombinacionog indeksa, odnosno jednačini srednjeg efekta više supstanci [193]. Metod uzima u obzir koncentraciju supstanci, pojedinačni efekat svake supstance, kao i dve supstance u kombinaciji. Analiza zahteva vrednosti inhibicije za najmanje tri koncentracije po svakoj supstanci da bi se analizirao zajednički efekat. Vrednosti indeksa kombinacije (eng. *combination index*, CI) opisuju prirodu međudejstva: CI < 0,9 ukazuje na sinergizam, CI > 1,1 na antagonizam, a CI = 0,9 – 1,1 na aditivni efekat [194].

3.8. Analiza oksidativnog stresa prouzrokovanog tretmanom

Za detekciju RONS unutar ćelija korišćene su dve boje, dihidroetidijum (DHE) i dihidrorodamin (DHR), koje emituju fluorescencu u reakciji sa specifičnim RONS. DHE fluorescira plavo, što je nedetektibilni fluorescentni signal na protočnom citofluorimetru CyFlow Space, ali u reakciji sa superoksidnim anjonom daje etidijum, supstancu koja emituje fluorescencu u crvenom delu spektra [195]. DHR u nativnom stanju ne fluorescira, ali se oksiduje u kontaktu sa vodonik-peroksidom i peroksinitritom, nakon čega emituje fluorescencu u zelenom delu spektra [196]. Intenzitet fluorescence, proporcionalan koncentraciji RONS unutar ćelija, je očitana na protočnom citofluorimetru CyFlow Space (Partec, Nemačka).

Ćelije su zasejane na ploče sa 6 bunarića i inkubirane 24 h pre tretmana (300 000 ćelija po bunariću za SH-SY5Y, 100 000 ćelija po bunariću za U87, U87-TxR, C6 i RC6 i 50 000 ćelija po bunariću za HaCaT). Ćelije su tretirane koncentracijama UMA približnim IC₅₀ vrednostima testa metaboličke aktivnosti ćelija: SH-SY5Y i HaCaT su tretirane sa 1,5 μM DVD-438, 5 μM DVD-439, 0,9 μM DVD-440, 0,6 μM DVD-443, 1 μM DVD-444 i 11 μM DVD-445; C6 i RC6 su tretirane sa 1,5 μM DVD-438, 5 μM DVD-439, 0,5 μM DVD-440, 0,8 μM DVD-443, 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445; U87 i U87-TxR su tretirane sa 2 μM DVD-438, 15 μM DVD-439, 0,5 μM DVD-440, 0,6 μM DVD-443, 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Koncentracija analoga DVD-445, upotrebljena za tretman ćelija U87 i U87-TxR, je bila 10 μM , sa 1 mM H₂O₂ kao pozitivnom kontrolom. Tretmani su trajali 24 h, nakon čega su adherentne ćelije tripsinizovane i inkubirane sa 5 μM DHE ili DHR na 37 °C, u mraku, 30 min. Ćelije su potom isprane dva puta hladnim PBS-om. Fluorescenca u uzorcima je izmerena na protočnom citofluorimetru CyFlow Space. Zelena fluorescenca oksidovane DHR boje je detektovana na kanalu FL1, dok je crvena fluorescenca etidijuma, poreklom od DHE, detektovana na kanalu FL2. Citofluorimetrom je očitano minimum 10 000 događaja po uzorku. Rezultati su analizirani softverskim paketom Summit (Cytomation Inc., SAD).

3.9. Analiza ekspresije gena

3.9.1. Izolacija i provera kvaliteta RNK

Po 300 000 C6 i RC6 ćelija i po 500 000 U87 i RU87 ćelija je zasejano u flaskove površine 25 cm². Ćelije su ostavljene da se adaptiraju preko noći, a potom su tretirane sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Nakon 24 h tretmana, ćelije su tripsinizirane i isprane sa PBS-om. Nakon centrifugiranja u PBS-u, na talog ćelija je dodat 1 mL TRI Reagent® za liziranje ćelija. Ovako lizirane ćelije su ostavljene na sobnoj temperaturi 30 min, a potom na - 20 °C preko noći. Narednog dana homogenizovani uzorci su otapani na sobnoj temperaturi kako bi se obezbedila potpuna disocijacija nukleoproteinskih kompleksa. Za razdvajanje faza, u tube sa uzorcima je dodato po 200 μL hloroforma, tube su energično promešane i centrifugirane (Centrifuge 5427R, Eppendorf, Nemačka) na 12 000 x g, + 4 °C, 15 min. Nakon centrifugiranja došlo je do razdvajanja faza na crvenkastu, donju fazu, koja sadrži lipide i membrane rastvorene u fenol-hloroformskoj smeši i gornju, vodenu fazu sa RNK i proteinima. Na spoju ove dve faze nalazi se beli prsten, koji čine molekuli DNK. Vodena faza je prebačena u nove tube, zapremine 1,5 mL sa konusnim dnom. Pipetiranje vodene faze je izvršeno pažljivo, kako bi se izbegla kontaminacija molekulima DNK. Uzorcima je dodato po 500 μL izopropanola, za precipitaciju molekula RNK. Tube su nežno rotirane rukom za 180 °C po vertikalnoj osi i centrifugirane brzinom 12 000 x g, + 4 °C, 10 min. Centrifugiranjem, RNK precipitira u vidu beličastog taloga na dnu konusne tube. Izopropanol je odliven i uzorcima je dodato po 1 mL 75% etanola rastvorenog u DEPC vodi za ispiranje RNK. Uzorci su ostavljeni u etanolu preko noći na - 20 °C za što bolje ispiranje RNK, nakon čega su centrifugirani na 7 500 x g, + 4 °C, 5 min. Nakon centrifugiranja, etanol je odliven, a uzorci su ostavljeni sa otvorenim poklopcem na sobnoj temperaturi, kako bi ostaci etanola isparili. Uzorci su rastvoreni u minimalnoj zapremini 0,1% DEPC vode (20 - 40 μL, u zavisnosti od količine taloga). DEPC se dodaje vodi za rastvaranje molekula RNK, kao potentni inhibitor RNKaze.

Koncentracija RNK (μg/μL) je izmerena spektrofotometrijski na 260 nm (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka) u plastičnim, jednokratnim UV kivetama (Uvette, Eppendorf, Nemačka). Koncentracija je izmerena u 2 razblaženja. Ukoliko je vrednost apsorbance u oba razblaženja bila približno jednaka, prosek obe vrednosti je uziman kao vrednost koncentracije uzorka. Ukoliko vrednosti apsorbance nisu bile jednake za isti uzorak, postupak rastvaranja RNK i merenja koncentracije je ponovljen. Faktor kontaminacije dvolančanom DNK je određen odnosom apsorbanci $A_{260/280}$, dok je kontaminacija solima, proteinima, polifenolima i drugim kontaminantima koji apsorbuju na nižim talasnim dužinama UV spektra, određena merenjem odnosa apsorbanci $A_{260/230}$. Vrednosti odnosa $A_{260/A280}$ i $A_{260/A230} > 1,8$ su smatrani „čistim“ uzorcima, bez značajne kontaminacije.

Kvalitet RNK je proveren elektroforezom na 1,3% agaroznom gelu, sa 0,4 μg/mL etidijum-bromida, u Tris/borat/EDTA (TBE) puferu. Uzorci RNK su, pre nanošenja na gel, pomešani u odnosu zapremina 1:1 sa 0,4% rastvorom bromfenol plavog u 50% glicerolu. Elektroforeza je puštana na 100 V oko 30 min, odnosno dok plavi front boje ne pređe 2/3 gela. Gel je nakon foreze postavljen na sistem za vizuelizaciju gela (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S traka proveren je kvalitet RNK uzoraka.

3.9.2. DNKazni tretman i reakcija reverzne transkripcije

Tretman DNKazom I je primenjen radi uklanjanja tragova genomske DNK u uzorcima. DNKaza I je DNK specifična endonukleaza, koja razgrađuje jednolančane i dvolančane molekule DNK do kratkih oligonukleotida sa 5'-fosfatnim i 3'-OH krajem. Aktivnost enzima je zavisna od Ca²⁺ i aktivira se isključivo u prisustvu Mg²⁺ jona. RNK uzoraka (po 2 μg), u smeši sa MgCl₂-

puferom, DNKazom I (1x finalno) i DEPC vodom, zapremine do 9 μL , je inkubirana na 37 °C, 30 min. Reakcija je prekinuta dodavanjem 1 μL EDTA, nakon čega je smeša inkubirana na 65 °C, 10 min. EDTA se dodaje kao helator dvovalentnih jona – vezivanjem jona Mg^{2+} prekida se aktivnost DNAKaze I. Inkubacija na temperaturi od 65 °C dovodi do degradacije proteina u uzorcima. Nakon završene inkubacije, uzorci su držani na ledu 5 min, pre ulaska u reakciju reverzne transkripcije.

Nakon hlađenja na ledu, reakcionoj smeši je dodato po 10 μl smeše za reakciju reverzne transkripcije (High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, SAD) prema preporukama proizvođača. Smeša za reakciju je sadržala pufer, nasumične prajmere, deoksinukleozidtrifosfate u jednakim koncentracijama (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), RNKazni inhibitor i reverznu transkriptazu (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, ThermoFisher Scientific, SAD). Reakcija reverzne transkripcije je trajala 2 h na 37 °C. Potom su uzorci inkubirani na 85 °C, nakon čega je usledilo hlađenje uzoraka na ledu. Dobijena jednolančana komplementarna DNK (kDNK) koncentracije 100 ng/ μL je čuvana na – 20 °C i iskorišćena za kvantitativnu polimeraznu lančanu reakciju (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) u realnom vremenu.

3.9.3. Analiza ekspresije gena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu

qPCR je primenjena za analizu ekspresije iRNK gena *TRX1* i *TRXR1* u netretiranim ćelijskim linijama U87, SH-SY5Y i HaCaT, kao i *TRX1*, *TRXR1*, *GPX1*, *GPX4*, *GR*, *GST π* , *MnSOD* i *CAT* u ćelijskim linijama U87, U87-TxR, C6 i RC6, nakon tretmana supstancama 2 μM DVD444 i 8 μM DVD445. Kao kontrolni gen (endogena kontrola) korišćen je konstitutivno ekspimiran gen *ACTB*, koji kodira β -aktin.

Uzorci kDNK, dobijeni u prethodno opisanom procesu reverzne transkripcije, su korišćeni u qPCR reakciji. Reakcije su izvođene na aparatu ABI PRISM 7 000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) u zapremini od 20 μL . Uslovi reakcije su bili sledeći: početni korak 50 °C, 5 min, korak denaturacije 95 °C, 10 min, 40 ciklusa amplifikacije od 95 °C, 15 s i 60 °C, 60 s. Za amplifikaciju kDNK uzoraka korišćen je Maxima SYBR green/ROX qPCR Taster Mix-a (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema preporukama proizvođača, sa 100 ng kDNK i odgovarajućim prajmerima za svaki gen (Tabela 5). Prajmeri za gen *GST π* su bili poklon dr Sabere Ruždijić. SYBR Green je interkalirajuća boja koja se nespecifično vezuje za dvolančani DNK molekul. Kada se veže za DNK molekul, SYBR Green daje fluorescentni signal. U toku reakcije, u svakom ciklusu (u realnom vremenu) se detektuje signal poreklom od fluorescentne probe, a čiji intenzitet odgovara količini PCR produkta u tom ciklusu. U početnim ciklusima, signal poreklom od probe daje bazalni nivo fluorescence. Ciklus u kome se fluorescentni signal značajno poveća u odnosu na bazalni nivo čini Ct vrednost (eng. *cycle threshold*). Nakon završenog qPCR, rezultati su analizirani u softverskom paketu 7 000 System Software (Applied Biosystems, SAD). Svaki uzorak je analiziran u triplikatu, korišćenjem $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ metode [197]. Ova analiza izražava ekspresiju pojedinačnog gena kao razliku Ct vrednosti tog gena i endogene kontrole (ΔCt vrednost).

Tabela 5. Setovi sekvenci prajmera.

gen	sekvence prajmera humanih gena	sekvence prajmera pacovskih gena
<i>TRX1</i>	F 5'-TGTTGGCATGCATTTGACTT-3' R 5'-CTGCTTTTCAGGAAGCCTTG-3' [198]	F 5'-AGCATGATTAGGCAAACCTCCGTAA-3' R 5'-CCGCAACAGCCAAAATGGTGAAGC-3' [199]
<i>TRXR1</i>	F 5'-GGTGATGGTCCTGGACTTTGTC-3' R 5'-CATTCACACATGTTCCCTCCGAGA-3' [200]	F 5'-GGACTTAGCGGTCACCTTGA-3' R 5'-GGTGAACACATGGAAGAGCA-3' [201]
<i>GPX1</i>	F 5'-GTCAGGCTCGATGTCAATGGTCTG-3'	F 5'-TATAGAAGCCCTGCTGTCCA-3'

	R 5'-AAGGTA C TACTTATCGAGAATGTG-3' ^[202]	R 5'-CAAGCC CAGATACCAGGAA-3' ^[203]
<i>GPX4</i>	F 5'-TGGGAAATGCCATCAAGTGG-3' R 5'-GGTCCTTCTCTATCACCAGGGG-3' ^[204]	F 5'-CCGGCTACAATGTCAGGTTT-3' R 5'-ACGCAGCCGTTCTTATCAAT-3' ^[205]
<i>GR</i>	F 5'-ATGATCAGCACCAACTGCAC-3' R 5'-CCCTTGTCATCGGTTTGAAT-3' ^[206]	F 5'-ACGAGGAAGACGAAATGCGTGATG-3' R 5'-AGGATGAATGGCGACGCTATTGTC-3' ^[203]
<i>GSTπ</i>	F 5'-ATGCTGCTGGCAGATCAG-3' R 5'-GTAGATGAGGGAGATGTATTTGCA-3' ^[207]	F 5'-ATGCTGCTGGCAGATCAG-3' R 5'-GTAGATGAGGGAGATGTATTTGCA-3' ^[207]
<i>MnSOD</i>	F 5'-AAGTACCAGGAGGCGTTGG-3' R 5'-TGAAC T T CAGTGCAGGCTGA-3' ^[208]	F 5'-GGTGGAGAACCCAAAGGAGA-3' R 5'-AGCAGTGAATAAGGCCTGT-3' ^[203]
<i>CAT</i>	F 5'-TCATCAGGGATCCCATATTGTT-3' R 5'-CCTTCAGATGTGTCTGAGGATTT-3' ^[209]	F 5'-CCAGCGACCAGATGAAGCA-3' R 5'-TG GTCAGGACATCGGGTTTC-3' ^[203]

"F" – eng. *forward*, "R" – eng. *reverse*.

3.10. Analiza ekspresija proteina metodom imunoblota

3.10.1. Izolacija proteina iz ćelija i određivanje koncentracije proteina u izolatu

Za izolaciju proteina, 1 X 10⁶ SH-SY5Y, HaCaT i U87 ćelija je homogenizovano na ledu u puferu radioimunoprecipitacionog eseja (RIPA pufer) za izolaciju proteina, sastava 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8,0, 1 mM EGTA pH 7,2, sa dodatim proteaznim i fosfataznim inhibitorima (cOmplete i PhosSTOP, Roche, Švajcarska). Homogenati su centrifugirani brzinom od 14 000 x g, 15 min na + 4 °C. Supernatant sa proteinima je prebačen u nove tube od 0,5 mL i čuvan na – 80 °C do daljeg korišćenja.

Koncentracija proteina u uzorcima je izmerena primenom Micro BCA™ test paketa (ThermoFisher Scientific, SAD), prema preporukama proizvođača, uz korišćenje razblaženja BSA poznatih koncentracija kao standarda za formiranje koncentracione krive. Micro BCA™ test paket se zasniva na Pirsovoj metodi određivanja ukupnih proteina u rastvoru. Proteini redukuju kupri (Cu²⁺) jon u kupro (Cu⁺) jon u baznoj sredini (biuretska reakcija) i kao rezultat, daju ljubičasto obojeni rastvor bicinhoninske kiseline (eng. *bicinchonic acid*, BCA). Po 25 µL razblaženja BSA za standardnu krivu (25 – 2 000 µg/mL), uzorci (razblaženi 10 x), kao i blank kontrole (voda u slučaju BSA razblaženja i 10x u vodi razblažen RIPA pufer za uzorke) su naneti na mikrotitarsku ploču sa 96 bunarića. Boja za detekciju proteina je napravljena direktno pred korišćenje, mešanjem komponenti A i B Micro BCA™ test paketa, u odnosu A:B = 50:1 i 200 µL boje je naneto po bunariću. Ploča je obmotana aluminijumskom folijom i inkubirana na 37 °C, 30 min. Ploča je potom ohlađena na sobnoj temperaturi 10 min i očitana je apsorbance na Multiskan Sky Microplate spektrofotometru (ThermoFisher Scientific, USA), pri talasnoj dužini od 562 nm. Od vrednosti apsorbance standarda i uzoraka, oduzete su odgovarajuće vrednosti blank kontrola. Standardi i uzorci su analizirani u triplikatima. Uz pomoć vrednosti apsorbance za poznate koncentracije BSA, formirana je linearna kriva, sa koeficijentom determinacije (R² vrednost) većim od 0,99. Uz pomoć jednačine linearne krive, određena je koncentracija proteina u uzorcima sa uračunatim faktorom razblaženja.

3.10.2. Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Razdvajanje proteina prema veličini, odnosno molekularnoj masi (Mw), izvršeno je elektroforezom na natrijum-dodecilsulfat (SDS) denaturišućem poliakrilamidnom (PAGE) gelu. PAGE gel nastaje polimerizacijom akrilamida, koji u prisustvu N,N'-metilen bisakrilamida formira pore određenih dimenzija. Akrilamid:bisakrilamid smeša korišćena u radu je bila u razmeri 29:1. Pore u gelu omogućavaju da se proteini različitih veličina kreću različitom brzinom u kreiranom električnom polju sistema za elektroforezu. Reakcija polimerizacije je inicirana dodavanjem amonijum-persulfata (APS), pri čemu je kao katalizator reakcije korišćen TEMED (N,N,N,N'-

tetrametiletilendiamin). Gel za razdvajanje proteina je sadržao: 10% akrilamid:bisakrilamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,0016% TEMED. Gel za koncentrovanje proteina je bio sledećeg sastava: 5% akrilamid:bisakrilamid, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,0016% TEMED. Smeše gelova su sukcesivno nalivane u sistem za razdvajanje (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD) i inkubirane na sobnoj temperaturi po 30 – 40 min.

Uzorci proteina su pripremljeni za nalivanje na gel sa 2x koncentrovanim Laemmli puferom za liziranje (20% glicerol, 125 mM TRIS pH 6,8, 4% SDS, 0,02% bromfenol plavo), kome je neposredno pred korišćenje dodat β -merkaptoetanol, finalno u puferu 10%. Uzorci proteina u Laemmli puferu su denaturisani na temperaturi od 95 °C, 5 min. Jednake količine proteina (15 μ g) su nalivene na gel, kao i standard za molekulsku masu proteina (eng. *Prestained marker* širokog opsega, 10 – 250 kDa, Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je vršena u puferu sastava 192 mM glicina, 25 mM TRIS pH 8,3, 0,1% SDS, pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi.

3.10.3. Prenos proteina sa gela na polivinildifluoridnu membranu (PVDF)

Prenos (transfer) proteina sa PAGE gela na PVDF membranu je vršen sistemom za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je ekvilibrisan u hladnom puferu za transfer (20% metanol, 192 mM glicin, 25 mM Tris pH 8,3) 15 min. PVDF membrane (Immobilon-PSQ, Millipore/Merck, SAD) su aktivirane u apsolutnom metanolu 20 s, a zatim isprane u destilovanoj vodi. Pomoćne komponente (Whatman papir, sunđer) su pripremljene unapred potapanjem preko noći u pufer za transfer na + 4 °C. Elektrotransfer proteina je vršen preko noći, pod konstantnim naponom od 30 V, na temperaturi + 8 °C. Po završenom transferu, membrane su isprane dejonizovanom vodom i potapane u Ponceau S boju (1% Ponceau S boja, 5% glacijalna sirćetna kiselina, destilovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi. Do imunološkog bojenja proteina, membrane su osušene i čuvane na + 4 °C.

3.10.4. Imunološka detekcija proteina hemiluminiscencijom

Za ispiranje membrana, blokiranje, inkubaciju sa primarnim i sekundarnim antitelima kao osnovni pufer korišćen je TRIS pufer sa dodatkom Tween-20 deterdženta (20 mM TRIS-HCl pH 7,6, 137 mM natrijum hlorid, 0,05% Tween-20) (eng. *TRIS buffer solution-Tween-20*, TBS-T). Membrane sa proteinima su pre koraka blokiranja u odgovarajućem puferu aktivirane 20 s u apsolutnom metanolu. Za blokiranje korišćeni su ili 5% BSA u TBS-T ili 5% mleko (eng. *non-fat milk*, NFM) u TBS-T. Blokiranje membrane je trajalo minimum 60 min na sobnoj temperaturi, sa ciljem smanjivanja intenziteta nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja, membrane su inkubirane u TBS-T sa primarnim antitelom preko noći na + 8 °C. Korišćena su sledeća primarna antitela: zečja poliklonska antitela za TrxR1 (ab124954, Abcam, UK, razblaženo 1:20 000) i GAPDH (G9545, Sigma-Aldrich, Nemačka, razblaženo 1:45 000). Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 6 puta po 5 min u TBS-T puferu (da bi se uklonila primarna antitela koja se nisu specifično vezala), i potom inkubirane 60 min na sobnoj temperaturi sa sekundarnim poliklonskim anti-zečijim antitelom IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, SAD, razblaženja 1:5 000). Sekundarno antitelo ima vezan enzim peroksidazu rena (HRP) koji katalizuje oksidaciju luminola. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 6 puta po 5 min u TBS-T puferu, a zatim izložene dejstvu luminola 2 min i u mraku izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology,

SAD) u trajanju od 1 do 5 min. Filmovi su razvijeni odmah po završetku ekspozicije membrane, fiksirani, osušeni i skenirani radi dalje analize.

3.10.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet signala dobijenih na autoradiografskom filmu je kvantifikovan denzitometrijski, korišćenjem softverskog paketa ImageQuant 5.0 (Molecular Dynamics, Inc., Izrael). Vrednosti dobijene za ciljani protein u uzorku su normalizovane u odnosu na GAPDH, endogene kontrole količine proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

3.11. Kolorimetrijska detekcija glutationa

GSH test paket (ab239709, Abcam, UK) je korišćen za detekciju redukovanog glutationa u uzorcima ćelijskih lizata, prema preporukama proizvođača. U analizi su korišćeni lizati U87, U87-TxR, C6 i RC6 nakon 24 h tretmana sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445, kao i kontrolni, netretirani uzorci. Esej se zasniva na redukciji DTNB sa GSH, pri čemu se kao proizvodi dobijaju žuto obojeni TNB i GSSG. Koncentracija GSH se određuje merenjem apsorbance na 412 nm. Izolatu se dodaje 5-sulfosalicilna kiselina (SSA), kako bi se drugi proteini, koji mogu da redukuju DTNB, uklonili iz reakcije i kako bi se GSH zaštitio od oksidovanja.

Ćelije su zasejane u flaskove za gajenje površine 75 cm², ostavljene da se adaptiraju preko noći, nakon čega su tretirane supstancama DVD-444 i DVD-445. Nakon tretmana od 24 h, ćelije su tripsinizirane i prebrojane, nakon čega je nastavljena priprema lizata iz istog broja ćelija u kontrolama i tretmanima (3 x 10⁶ za C6 i RC6, 2,5 x 10⁶ za U87 i U87-TxR). Ćelije su centrifugirane u tubama od 15 mL, a potom je talog ćelija resuspendovan u 0,5 mL hladnog PBS-a, i suspenzija premeštena u tube od 1,5 mL sa konusnim dnom. Potom su ćelije centrifugirane pri brzini od 700 x g, + 4 °C, 5 min. Postupak ispiranja hladnim PBS-om je ponovljen još jednom. Pelat ćelija je liziran u 80 μL hladnog glutationskog pufera 10 min na ledu. Uzorcima je dodato po 20 μL 5% SSA, dobro su promešani i centrifugirani pri brzini od 8 000 x g, + 4 °C, 10 min. Supernatant je premešten u nove tube od 0,5 mL i čuvan na - 80 °C do korišćenja u analizi koncentracije GSH. Standardna kriva linearne regresije poznatih koncentracija GSH je korišćena za određivanje nepoznate koncentracije u uzorcima. Opseg koncentracija za standardnu krivu bio je 0,5 - 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, GSH je razblažen u 1% SSA. Za krivu je upotrebljeno 5 koncentracionih tačaka i blank proba (1% SSA, bez prisustva GSH).

Za detekciju redukovanog glutationa 160 μL GSH pufera je razliveno u bunariće, a potom je dodato 20 μL standarda ili uzorka. Reakciona smeša je ostavljena na sobnoj temperaturi 10 min. U reakcione smeše je potom dodato po 20 μL pufera sa DTNB i nakon 10 min apsorbance je očitana na 412 nm na Multiskan Sky Microplate spektrofotometru. Koncentracija GSH ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) u uzorcima je određena na osnovu jednačine standardne krive, sa koeficijentom determinacije (R^2 vrednost) većim od 0,99. Koncentracije redukovanog glutationa u tretiranim uzorcima su upoređene sa koncentracijama u netretiranim, kontrolnim grupama.

3.12. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom

3.12.1. Merenje količine proteina RNR, ASK1 i TrxR1

Nivo proteina RNR, ASK1 i TrxR1 u ćelijama humanih i pacovskih glioma određen je metodom protočne citofluorimetrije. Ćelije su zasejavane u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića 24 h pre tretmana da bi se adaptirale, nakon čega su tretirane sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Nakon 24 h tretmana, ćelije su tripsinizirane, ispirane u PBS-u i fiksirane u 4% paraformaldehidu (PFA), na + 4 °C, 10 min. Ćelijama fiksiranim u PFA je dodat hladan (prethodno

čuvan na - 20 °C) apsolutni metanol, do finalne koncentracije 90%, radi permeabilizacije membrana ćelija. Uzorci su ostavljeni u metanolu preko noći na - 20 °C. Ćelije su centrifugirane i isprane u PBS-u, a potom inkubirane 1 h u 0,5% BSA, rastvorenom u PBS-u (BSA/PBS). Nakon koraka blokiranja, uzorci su inkubirani sa primarnim antitelima, rastvorenim u 0,5% BSA/PBS, preko noći, na + 4 °C. Primarna zečija poliklonska antitela su korišćena u razblaženjima 1:50 za RRM1 (ab137114, Abcam, UK), 1:200 za ASK1 (ab45178, Abcam, UK) i 1:500 za TrxR1 (ab124954, Abcam, UK). Nakon ispiranja u 0,5% BSA/PBS, ćelije su inkubirane 30 min na sobnoj temperaturi u sekundarnom antitelu Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG(H+L) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), razblaženom 1:1 000 u 0,5% BSA/PBS. Ćelije su potom isprane dva puta u hladnom PBS-u i finalno resuspendovane u 1 ml hladnog PBS-a, pre očitavanja fluorescence na protočnom citofluorimetru. Intenzitet fluorescence, proporcionalan količini analiziranih proteina, je meren na FL1 kanalu citofluorimetra CyFlow Space (Partec, Nemačka). Citofluorimetrom je očitano minimum 10 000 događaja po uzorku. Rezultati su analizirani softverskim paketom Summit (Cytomation Inc., SAD).

3.12.2. Analiza mitohondrijalnog membranskog potencijala

Promena mitohondrijalnog membranskog potencijala, prouzrokovana supstancama DVD-444 i DVD-445 kod humanih i pacovskih ćelija glioma, je analizirana JC-1 test paketom (BD Biosciences, San Diego, USA). JC-1 je katjonska, lipofilna boja, koja se u zavisnosti od membranskog potencijala, odnosno koncentracije H⁺ jona, akumulira u mitohondrijama. Kod neoštećenih, funkcionalnih mitohondrija, boja se nakuplja unutar mitohondrija i fluorescira crveno (FL2 kanal citofluorimetra), dok u citoplazmi boja ostaje kao monomer i fluorescira zeleno (FL1 kanal citofluorimetra). Prilikom depolarizacije mitohondrija, boja izlazi iz mitohondrija i povećava se udeo zelene fluorescence u očitavanju odnosa signala FL1/FL2.

Ćelije su zasejane na adherentne mikrotitar ploče sa 6 bunarića i ostavljene 24 h pre tretmana da se adaptiraju. Tretman ćelija sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445 je trajao 24 h, nakon čega su ćelije tripsinizovane i isprane u PBS-u. Ćelije su resuspendovane u JC-1 reagensu iz test paketa. Pozitivna kontrola je tretirana sa 10 μM dekuplujuće jonofore karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazona (eng. *carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*, CCCP) 30 min pre dodavanja JC-1 boje, na 37 °C, u inkubatoru za gajenje ćelija. Potom je svim uzorcima dodata JC-1 boja, i ćelije su inkubirane 15 min, na 37 °C, u inkubatoru za gajenje ćelija. Nakon inkubacije, ćelije su isprane puferom iz test paketa i resuspendovane u 1 mL PBS-a. Tako pripremljenim uzorcima je očitana fluorescenca na FL1 i FL2 kanalu citofluorimetra CyFlow Space. Minimum 10 000 događaja je analizirano po uzorku. U analizi promene mitohondrijalnog membranskog potencijala, kao referentni signal korišćena je fluorescenca ćelija pozitivne kontrole, tretiranih sa CCCP, za definisanje graničnika depolarizovanih, JC-1 zelenih ćelija. Uzorci kontrola i tretmana su analizirani u odnosu na graničnik pozitivne kontrole. Za analizu rezultata, korišćen je softverski paket Summit.

3.12.3. Analiza ćelijske smrti

Ćelijska smrt je analizirana na protočnom citofluorimetru fluorescentnim obeležavanjem aneksinom V (AV) i propidijum jodidom (PI). Tokom apoptoze, fosfatidilserin se translocira sa citoplazmatske površine plazma membrane na površinu ćelije. AV ima snažan, Ca²⁺ zavisni afinitet za fosfatidilserin i s toga može da se koristi za detekciju apoptoze. PI je fluorescentna boja, koja se vezuje za molekule DNK; boja ne prolazi intaktnu membranu, tako da fluorescentni signal boje u uzorku ukazuje na narušen sistem membrana i ćelijsku smrt po tipu nekroze. U analizi ćelijske smrti, uzrokovane tretmanom sa DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-443, DVD-444 i DVD-445 kod

ćelija SH-SY5Y i HaCaT, kao i sa DVD-444 i DVD-445 kod ćelija humanih i pacovskih glioma, korišćen je AV/PI paket (Abcam, UK). Istovremenim bojenjem sa AV/PI, razlikuju se žive ćelije (AV-PI-), ćelije u ranoj apoptozi (AV+PI-), kasnoj apoptozi (AV+PI+) i nekrotične ćelije (AV-PI+). Ćelije su zasejane na adherentne ploče sa 6 bunarića (300 000 ćelija po bunariću SH-SY5Y, 50 000 ćelija po bunariću HaCaT, 200 000 ćelija po bunariću C6, RC6, U87, U87-TxR) u 1 mL odgovarajućeg medijuma i ostavljene 24 h da se adaptiraju. Ćelije SH-SY5Y i HaCaT su tretirane 48 h sa 0,7 μM DVD-438, 2,1 μM DVD-439, 0,4 μM DVD-440, 0,2 μM DVD-443, 1,3 μM DVD-444 i 4 μM DVD-445. Ćelije C6, RC6, U87 i U87-TxR su tretirane 72 h sa 2 μM DVD-444 i 10 μM DVD-445. Nakon tretmana, medijum u kome su ćelije gajene (a koji sadrži neadherentne i mrtve ćelije), zajedno sa tripsiniziranim adherentnim ćelijama je centrifugiran. Na talog je sipano 100 μL pufera iz test paketa, sa AV i PI u odnosu zapremina 1:1 (2 μL AV i 2 μL PI). Nakon inkubacije 10 min na sobnoj temperaturi u mraku, dodato je još 400 μL pufera i AV/PI fluorescenca je analizirana u roku od 1 h nakon bojenja. Intenzitet fluorescence je meren na zelenom FL1 i crvenom FL2 kanalu CyFlow Space citofluorimetra. Analizirano je minimum 20 000 događaja po uzorku. Kao referentni sistem odnosa živih, ranih apoptotskih, kasnih apoptotskih i nekrotičnih ćelija, korišćene su netretirane ćelije sa preko 90% živih ćelija (AV-PI-). Za analizu rezultata, korišćen je softverski paket Summit.

3.12.4. Analiza proliferacije ćelija

Proliferacija U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana sa DVD-444 i DVD-445 je analizirana citofluorimetrijski upotrebom CFSE boje [210]. Intenzitet fluorescence CFSE postepeno opada sa svakom ćelijском deobom, te je moguće proceniti stepen proliferacije kod tretiranih ćelija u poređenju sa netretiranim ćelijama [211]. Nakon tripsinizacije, ćelije su prebrojane i po 600 000 ćelija je isprano u PBS-u, a potom resuspendovano u 5 μM CFSE u PBS-u i inkubirano na 37 °C, 15 min. Nakon inkubacije, ćelije su isprane tri puta u PBS-u, resuspendovane u 5 mL medijuma i podeljene u 5 bunarića na adherentnoj mikrotitar ploči sa 6 bunarića. Ćelije su tretirane istog dana sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445 2 h nakon sejanja. Nakon 72 h, ćelije su tripsinizirane, isprane dva puta u PBS-u i resuspendovane u 1 mL PBS. Fluorescenca je merena na FL1 kanalu citofluorimetra CyFlow Space. Analizirano je minimum 20 000 događaja po uzorku. Rezultati su analizirani softverskim paketom Summit.

3.12.5. Akumulacije rodamina 123

Fluorescentna boja rodamin 123 (Rho123) je supstrat za efluksnu pumpu P-gp i koristi se za ispitivanje aktivnosti P-gp na membrani ćelija [212]. Intenzitet fluorescence Rho123 u ćelijama [213] je obrnuto proporcionalan aktivnosti P-gp. Akumulacija Rho 123 je analizirana u U87-TxR ćelijama, u akutnom tretmanu (30 min) sa supstancama DVD-444 i DVD-445. Takođe, test akumulacije Rho123 je korišćen za ispitivanje interakcije analoga DVD-445 (1, 3, 4, 7, 9, 20, 34) sa P-gp u uslovima akutnog (30 min) i produženog (72 h) tretmana. Kao pozitivna kontrola inhibicije aktivnosti P-gp, korišćen je tarikvidar (TQ), poznati inhibitor P-gp pumpe. Akumulacija Rho 123 u U87 ćelijama je korišćena za poređenje sa akumulacijom Rho 123 u U87-TxR ćelijama.

U testu akutnog tretmana (30 min), ćelije su tripsinizirane i prebrojane, a potom je 200 000 ćelija po grupi razdeljeno u tube za protočni citofluorimetar i resuspendovano u 1 mL medijuma za gajenje. Ćelije su tretirane odgovarajućim koncentracijama supstanci: 1 μM za DVD-444 i 2,5, 5 i 10 μM za DVD-445 i njegove analoge 1, 3, 4, 7, 9, 20, 34. Ćelije tretirane sa 50 nM TQ su upotrebljene kao pozitivna kontrola. Odmah nakon tretmana, uzorcima je dodato 5 μM Rho123, i oni su inkubirani na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, 30 min. U testu produženog tretmana (72 h), ćelije su tripsinizirane i zasejane na adherentnu mikrotitar ploču sa 6 bunarića (200 000

ćelija po bunariću), nakon čega su ostavljene 24 h da se adaptiraju. Potom su tretirane sa DVD-445 i njegovim analogima 1, 3, 4, 7, 9, 20, 34 (2,5 μM), u trajanju od 72 h. Ćelije su nakon završenog tretmana tripsinizirane, isprane jednom u PBS-u i resuspendovane u 1 mL medijuma koji je sadržao 5 μM Rho123. Potom su uzorci inkubirani na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 , 30 min. Nakon perioda akumulacije u oba eksperimentalna testa, uzorci su centrifugirani, isprani dva puta u PBS-u i finalno resuspendovani u 1 mL PBS-a. Fluorescenca uzoraka je očitana na FL1 kanalu citofluorimetra i rezultati su analizirani softverskim paketom Summit.

3.13. Test degradacije želatina

Važna osobina invazivnih ćelija je sposobnost degradacije vanćelijskog matriksa, usled povišene ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP). Invazivna sposobnost tumorskih ćelija se procenjuje merenjem stepena degradacije želatina, kao mere aktivnosti MMP. Želatin je, naime, supstrat za MMP2 i MMP9. U analizi invazivnih sposobnosti humanih i pacovskih glioma, nakon tretmana supstancama DVD-444 i DVD-445, korišćen je želatin poreklom od svinjske kože, konjugovan sa fluorescentnom zelenom bojom (eng. *Gelatin From Pig Skin, Oregon green 488 conjugate*, ThermoFisher Scientific, SAD).

Mikroskopska pokrovna stakla su pripremljena za eksperiment dan pre korišćenja, tako što su obrisana 70% etanolom i ostavljena pod UV svetlom. Želatin je zagrejan 10 min na 37 °C i rastvoren u PBS puferu, u razmeri 1:8. Na dno bunarića mikrotitar ploče sa 6 bunarića razliveno je po 50 μL želatina (0,625 mg/ μL finalno). Potom je želatinu dodato 30 μL 0,25% glutaraldehida (0,09% finalno), koji katalizuje umrežavanje želatina. Preko želatina u bunarićima mikrotitar ploča su stavljena pokrovna stakla i inkubirana su minimalno 15 min na + 4 °C. Nakon perioda inkubacije, želatin je u vidu ravnomernog sloja formirao prevlaku na pokrovnom staklu. Pokrovna stakla sa želatinom su prebačena u nove mikrotitar ploče sa 6 bunarića, tako da je želatin sa gornje strane pokrovnog stakla. Ćelije (50 000 ćelija po grupi za sve ćelijske linije) koje su prvobitno resuspendovane u 150 μL medijuma, razliveno su na pokrovna stakla, tako da formiraju kompaktnu kap na površini želatina i tako ostavljene u inkubatoru za gajenje ćelija nekoliko sati, da adheriraju za želatinsku površinu. Potom je dodato medijuma do 1 mL zapremine bunarića i ćelije su tretirane 24 h sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Nakon završenog tretmana, medijum iz bunarića je uklonjen i preko pokrovnih stakala je sipano 300 μL 4% PFA, za fiksaciju ćelija, 10 min na sobnoj temperaturi u mraku. PFA je uklonjen i na ćelije je nanet rastvor 0,1% tritona X u PBS-u, radi permeabilizacije membrana ćelija, 10 min na sobnoj temperaturi u mraku. Pokrovna stakla su pažljivo isprana jednom u PBS-u, nakon čega je na stakla naneto po 100 μL smeše ActinRed™ 555 (ThermoFisher Scientific, SAD) prema protokolu proizvođača (1 kap/mL) i Hoechst 33342 (1:500) u PBS-u. ActinRed™ 555 služi za vizuelizaciju aktina, a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara. Pokrovna stakla su pažljivo isprana dva puta u PBS-u, nakon čega su, uz pomoć glicerola u rastvoru (Mowiol® 4-88, Sigma-Aldrich, Nemačka) fiksirana na mikroskopske pločice. Pločice su slikane na 20x uvećanju na Axiowert fluorescentnom mikroskopu (Zeiss, Švajcarska), korišćenjem softvera AxioVision 4.8. Rezultati su analizirani u softverskom paketu ImageJ. Merenje je broj ćelija koje su degradirale želatin, kao i površina degradirane oblasti u želatinu. Računat je odnos površine degradirane oblasti u odnosu na broj ćelija, što predstavlja stepen degradacije želatina od strane pojedinačne ćelije. Analizirano je najmanje 100 ćelija po eksperimentu.

3.14. Test invazije i migracije ćelija

Pored invazivnih sposobnosti enzimske razgradnje proteina vanćelijskog matriksa ili bazalne membrane, metastatske tumorske ćelije se odlikuju i migratornim sposobnostima, odnosno mogu da se kreću ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa. Sposobnost invazije i

migracije ćelija humanih i pacovskih glioma nakon tretmana supstancama DVD-444 i DVD-445 je analizirana proučavanjem kretanja ćelija kroz poroznu membranu, obloženu matrigelom. U ispitivanju je korišćen komercijalno dostupan Matrigel® sačinjen od smeše vanćelijskih proteina koje sekretuju Engelbret-Holm-Svarm (EHS) ćelije mišjeg sarkoma i komorice sa poroznim membranama, prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 µm (BD Labware, Bedford, MA, SAD).

Komore su stavljane u adherentne mikrotitar ploče sa 24 bunarića. Gornja površina membrana je obložena tankim slojem matrigela rastvorenim u MEM medijumu bez FBS seruma u odnosu zapremine 1:10. U komorice je razliveno po 50 µL smeše, a potom je usledila inkubacija preko noći na 37 °C, kako bi smeša polimerisala. Nakon inkubacije, u bunariće ispod komorica je dodat medijum, i to medijum sa 10% FBS za pozitivne netretirane kontrole i tretmane, a medijum bez FBS za negativne netretirane kontrole. FBS služi kao hemijski atraktant za migraciju ćelija kroz pore membrane. U komorice sa polimerisanim matrigelom nanete su ćelije, resuspendovane u 200 µl medijuma bez FBS (70 000 ćelija za C6 i RC6, a 150 000 ćelija za U87 i U87-TxR). Ćelije su tretirane 24 h sa 2 µM DVD-444 i 8 µM DVD-445 ubrzo nakon sejanja u komore. Po završenom tretmanu, komore sa membranama su premeštene u nove bunariće mikrotitar ploče i uronjene u 0,5 mL 4% PFA na sobnoj temperaturi 10 min, kako bi se ćelije, koje su migrirale na donju stranu membrane, fiksirale. Potom su ćelije sa gornje strane komore, koje nisu migrirale u toku tretmana, sastrugane higijenskim štapićem sa sanitetskom vaticom i tupom metalnom špatulom. Tako pripremljene komore su uronjene u bunariće mikrotitar ploče sa po 500 µL Hoechst 33342 u PBS-u (1:1 000) na sobnoj temperaturi 15 min kako bi se izvršila vizuelizacija jedara ćelija. Membrane su isprane tri puta u PBS-u, nakon čega su isečene hirurškim nožićem i fiksirane na mikroskopsku pločicu u rastvoru glicerola (Mowiol® 4-88, Sigma-Aldrich, Nemačka). Membrane su slikane na 10x uveličanju na Axiovert fluorescentnom mikroskopu korišćenjem softvera AxioVision 4.8. Minimum 10 različitih delova membrane je slikano po uzorku. Slike dobijene na fluorescentnom mikroskopu su analizirane u softverskom paketu ImageJ. Broj ćelija u tretiranim grupama se normalizuje u odnosu na broj ćelija u pozitivnoj kontroli, što ukazuje na stepen invazije ćelija. Eksperiment se smatra uspešnim ukoliko u negativnoj kontroli ima manje od 20% migriranih ćelija u odnosu na 100% migriranih ćelija u pozitivnoj kontroli.

3.15. Statistička analiza rezultata

Statistička analiza rezultata je izvršena uz pomoć softverskog paketa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Normalna raspodela podataka je ispitana D'Agostino i Pearson omnibus testom. Podaci dobijeni u MTT testu, qPCR, analizom ekspresije proteina imunoblotom i pri citofluorimetrijskom imunoboju su statistički obrađeni dvofaktorskim ANOVA testom. Podaci dobijeni u kolorimetrijskom testu određivanja relativne količine GSH su analizirani jednofaktorskim ANOVA testom. Rezultati dobijeni u testovima degradacije gela, migracije i invazije nisu imali normalnu distribuciju, te su analizirani Kruskal-Wallis testom, sa Dunn-Bonferroni *post hoc* testom. Razlika između eksperimentalnih grupa je smatrana značajnom ukoliko je $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Inhibitorna svojstva UMA

Potencijal novosintetisanih UMA da inhibiraju TrxR1 je ispitan korišćenjem tri komplementarna metodološka pristupa – na ukupnom sadržaju proteina ćelijskog lizata, na izolovanom enzimu TrxR1 pacova, kao i na celokupnom Trx redoks sistemu. Kinetički kolorimetrijski eseji za praćenje aktivnosti TrxR su uključivali ispitivanja na ćelijskim lizatima i na samom enzimu, dok je aktivnost Trx sistema procenjena insulinskim testom u krajnjoj tački ispitivanja. Piperlongumin je, kao poznati inhibitor TrxR, korišćen kao kontrolna supstanca.

Tabela 6. Potencijal UMA i piperlongumina da inhibiraju aktivnost TrxR1.

Supstance	IC ₅₀ , μM SH-SY5Y ćelijski lizat	IC ₅₀ , μM TrxR1 pacova	Insulinski test IC ₅₀ , μM
DVD-434	29,30±9,98	NO	NO
DVD-435	>200	NO	NO
DVD-436	>200	NO	NO
DVD-437	>200	NO	NO
DVD-438	51,24±5,85	3,12±0,83	5,28±0,32
DVD-439	31,84±5,04	4,20±0,34	6,61±0,26
DVD-440	16,01±1,98	1,74±0,07	0,76±0,03
DVD-441	76,62±55,58	NO	NO
DVD-442	81,63±48,78	NO	NO
DVD-443	17,44±0,91	0,93±0,20	0,82±0,04
DVD-444	8,58±2,11	1,25±0,22	2,51±0,42
DVD-445	7,26±0,36	0,60±0,09	0,96±0,06
DVD-446	30,54±25,20	NO	NO
piperlongumin	45,88±6,55	NO	NO

Inhibitorna svojstva supstanci su testirana na ćelijskom lizatu SH-SY5Y, enzimu TrxR1 pacova i insulinskim testom. Vrednosti su predstavljene kao IC₅₀ ± SE u μM. "NO": nije određeno.

4.1.1. UMA inhibiraju aktivnost TrxR u ćelijskom lizatu

Ukupni sadržaj proteina ćelija SH-SY5Y je korišćen u testovima aktivnosti TrxR za inicijalnu selekciju supstanci. Prvobitnu seriju sintetisanih UMA je činilo 13 supstanci (DVD-434 – DVD-446). Ispitivanje aktivnosti TrxR kolorimetrijskim testom se zasniva na redukciji DTNB supstrata. Uticaj supstanci na aktivnost TrxR je prvo ispitan pri visokoj koncentraciji od 200 μM. U ovoj fazi testiranja, supstance DVD-435, DVD-436 i DVD-437 su pokazale inhibiciju enzima nižu od 50% u odnosu na kontrolu, te nisu uzimane u obzir u daljem testiranju. Za ostale supstance, određena je IC₅₀ vrednost inhibicije aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu, u koncentracionom opsegu 1 – 200 μM (Tabela 6). Određena je i IC₅₀ vrednost i za piperlongumin. Supstance DVD-434, DVD-441, DVD-442 i DVD-446 su, nakon određivanja IC₅₀ vrednosti eliminisane iz daljeg ispitivanja, ili zbog visokih vrednosti za IC₅₀ ili zbog velikih varijacija u dobijenim vrednostima za IC₅₀ pri ponavljanju

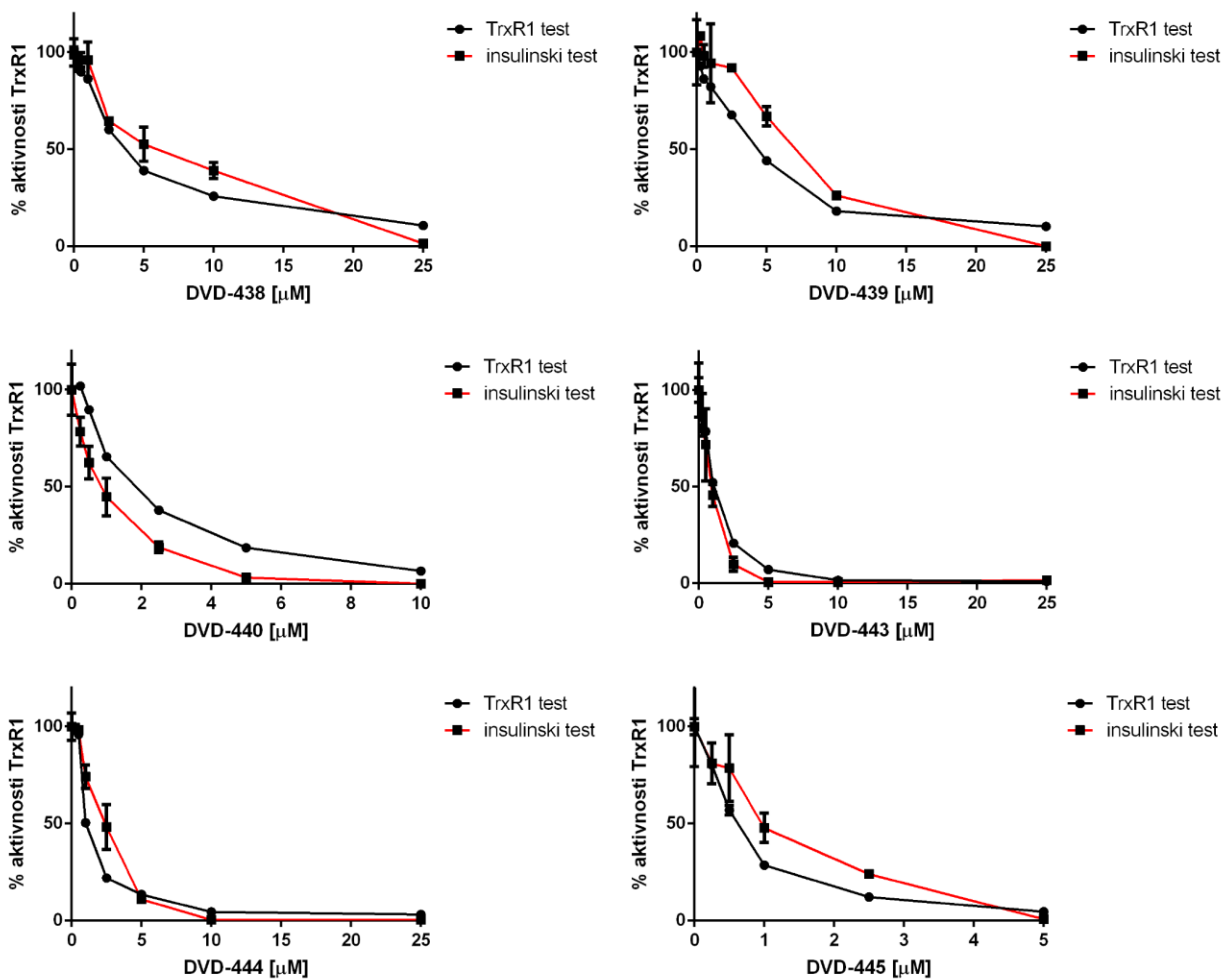
eksperimenata (Tabela 6). Supstance DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-443, DVD-444 i DVD-445 su pokazale visoku reproducibilnost i relativno niske IC_{50} vrednosti u testu inhibicije aktivnosti TrxR, pri čemu su sve supstance, osim DVD-438, imale niže IC_{50} vrednosti od pozitivne kontrole, piperlongumina.

4.1.2. UMA specifično inhibiraju TrxR1

Supstance DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-443, DVD-444 i DVD-445 su dalje testirane za određivanje tipa interakcije sa enzimom TrxR1. U testu je korišćena komercijalno dostupna rekombinantna TrxR1 pacova, koja sadrži Sec katalitički domen. Pri inicijalnom testiranju, svih 6 testiranih supstanci je ispoljilo inhibitorna svojstva na enzimu pri koncentraciji od 25 μ M, te je u daljem testiranju korišćen koncentracioni opseg od 0,25 do 25 μ M (Tabela 6). IC_{50} vrednosti svih 6 supstanci su bile ispod 5 μ M. Najniža IC_{50} vrednost dobijena je za supstancu DVD-445 (0,60 \pm 0,09).

4.1.3. UMA inhibiraju celokupan tioredoksinski sistem

Uticaj inhibitora TrxR1 na celokupan Trx sistem je ispitan u insulinskom testu. Test se zasniva na indirektnom merenju aktivnosti Trx sistema, putem detekcije količine redukovanih proteina (u ovom slučaju insulina) od strane Trx, pri čemu se Trx redukuje na račun TrxR1 i NADPH (opisano u odeljku 3.5.4. Insulinski test za određivanje aktivnosti Trx sistema). Svih 6 UMA su pokazali inhibitorna svojstva na Trx sistemu, koja blisko odgovaraju rezultatima dobijenim u testu sa TrxR1 (Slika 15). Pirsonovim korelacionim testom, inhibicija izolovane TrxR1 i Trx sistema ispitivanim supstancama je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju ($r = 0.96 - 0.98$) (Tabela 7).



Slika 15. Odnos inhibicije aktivnosti TrxR1 i Trx sistema. Ispitan je uticaj UMA inhibitora na aktivnost izolovanog enzima TrxR1 i sistema koji, pored TrxR1 sadrži i Trx. Inhibicija izolovanog enzima je ispitana u kinetičkom testu redukcije DTNB od strane TrxR1. Aktivnost Trx sistema je ispitana u insulinskom testu u krajnjoj tački, u kome je mera aktivnosti sistema količina redukovanoeg proteina (insulina) od strane Trx. Na graficima je predstavljena zavisnost % aktivnosti TrxR1 od koncentracije testirane supstance u μM .

Tabela 7. Pirsonov korelacioni test inhibicije TrxR1 i Trx sistema.

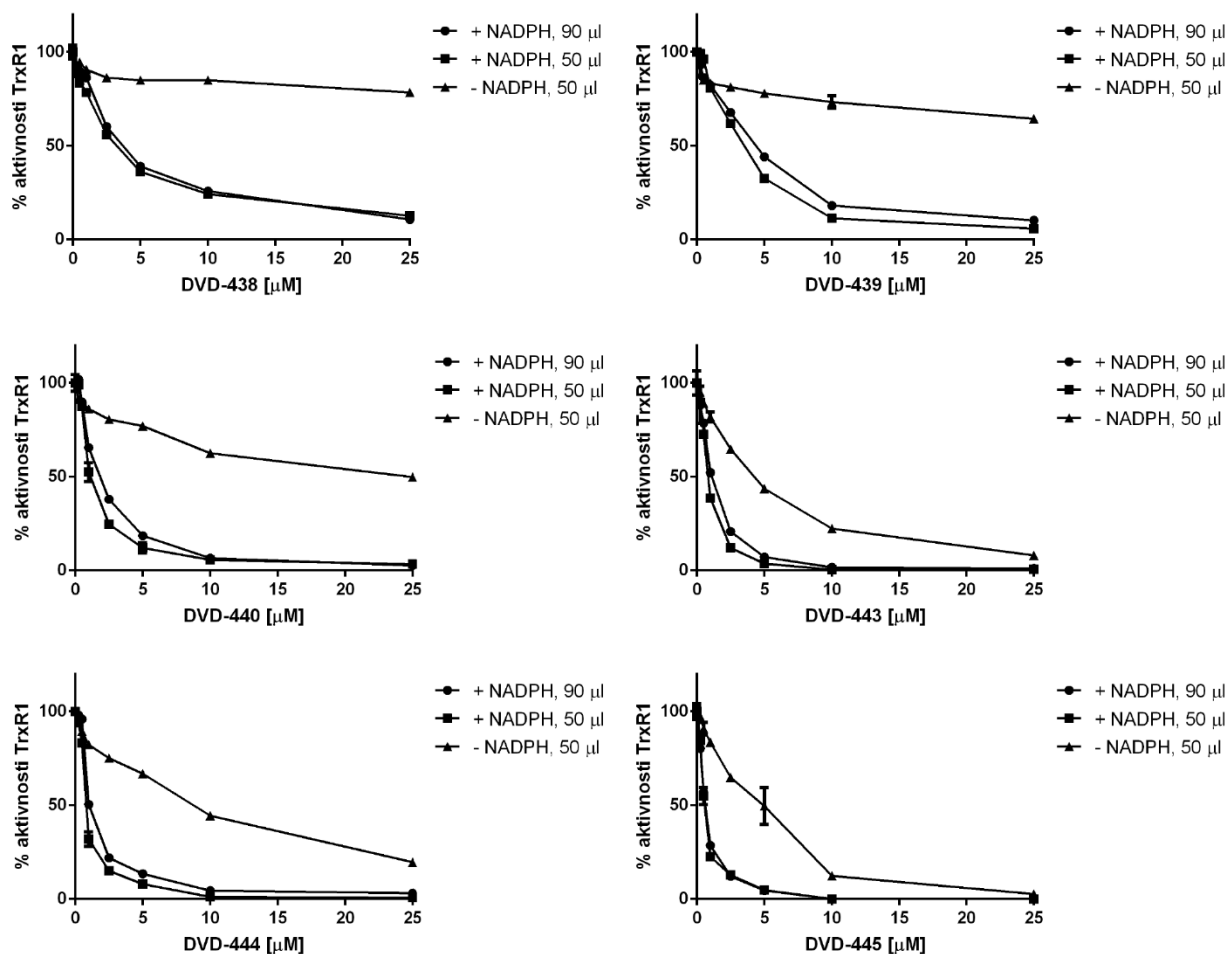
Šifre	r	P	Značajnost
DVD-438	0,98	<0,0001	****
DVD-439	0,96	0,0002	***
DVD-440	0,97	0,0001	***
DVD-443	0,98	<0,0001	****
DVD-444	0,98	<0,0001	****
DVD-445	0,98	<0,0001	****

Isti opseg koncentracija je upotrebljen u oba testa ispitivanja aktivnosti TrxR1. Faktor r ukazuje na visok stepen korelacije između inhibicije aktivnosti TrxR1 pacova u kinetičkom testu redukcije DTNB supstrata i insulinskom eseju.

4.1.4. Određivanje tipa inhibicije TrxR1 od strane UMA

Kolorimetrijski test redukcije DTNB sa rekombinantnom TrxR1 je dalje korišćen za ispitivanje tipa inhibicije enzima TrxR1. Da bi se utvrdilo da li je tip inhibicije TrxR1 reverzibilan ili ireverzibilan proces, izvršene su varijacije zapremine inkubacione smeše u prisustvu NADPH (90 ili 50 μL) u koje je dodata ista zapremina inhibitora određene koncentracije, te je koncentracija inhibitora tokom inkubacije u zapremini od 50 μL gotovo duplo veća nego u zapremini od 90 μL . Nakon inkubacije, u reakcione smeše obe zapremine je dodat DTNB do finalne zapremine od 100 μL . Rezultati ovih eksperimenata su prikazani na Slici 16. Inkubacija inhibitora sa enzimom u zapremini od 50 μL jeste dovela do trenda snažnije inhibicije u odnosu na zapreminu 90 μL , što ukazuje na ireverzibilnu inhibiciju enzima, iako opažene promene nisu značajne.

Pored toga, test redukcije DTNB sa rekombinantnom TrxR1 je upotrebljen kako bi se utvrdilo da li inhibitori deluju na oksidovanu ili redukovanu formu enzima (Slika 16). Pretpostavka je da UMA inhibitori interaguju sa Sec katalitičkim domenom redukovanog TrxR1 enzima. U eksperimentalnoj postavci su inhibitori inkubirani u istim zapreminama reakcione smeše (50 μL), sa ili bez NADPH, koja bi generisala redukovanu formu TrxR1. Pokazano je da je efekat inhibicije značajno niži ukoliko je testirana supstanca inkubirana sa oksidovanom formom enzima, bez prisustva NADPH (Slika 16), što je potvrdilo polaznu pretpostavku o interakciji UMA sa redukovanom TrxR1.

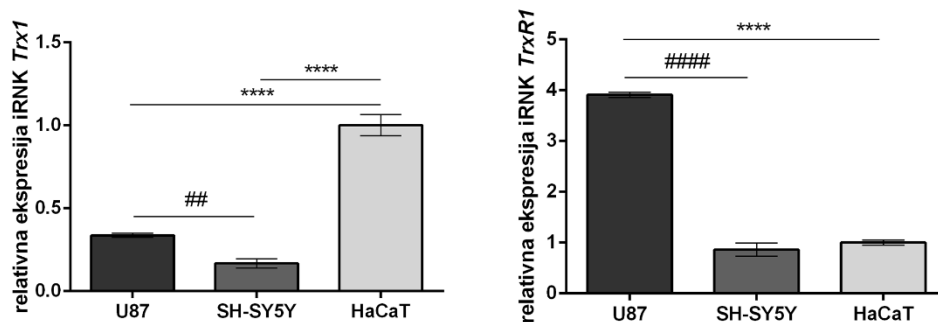


Slika 16. Određivanje tipa inhibicije TrxR1. U testu aktivnosti TrxR1 pacova, enzim je, pre dodavanja supstrata, inkubiran sa istom količinom inhibitora, u različitim zapreminama inkubacione smeše (90 i 50 μl), u prisustvu NADPH. U slučaju zapremine inkubacione smeše od 50 μL , testirana je inhibicija i bez prisustva NADPH. Nakon perioda inkubacije u različitim zapreminama, kao i sa i bez NADPH, finalni volumen reakcionih smeša svih komponenti bio je identičan po dodavanju DTNB supstrata. Na graficima je predstavljena zavisnost % aktivnosti TrxR1 od koncentracije testirane supstance u μM .

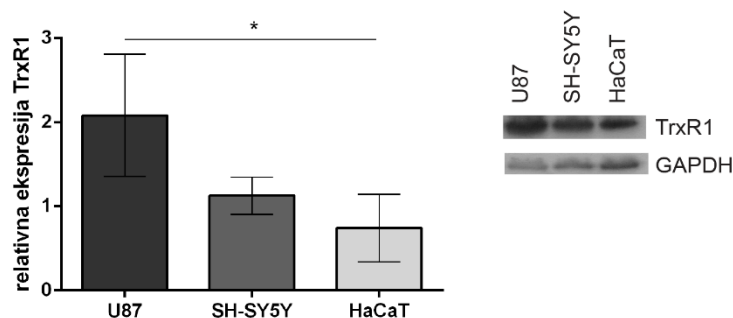
4.2. Ispitivanje selektivnosti UMA ka tumorskim ćelijama

4.2.1. Ekspresija komponenti Trx sistema u ćelijskim linijama

Analiza ekspresije iRNK *Trx1* i *TrxR1* (Slika 17) i TrxR1 proteina (Slika 18) kod humanih ćelijskih linija neuroblastoma (SH-SY5Y), glioblastoma (U87) i normalnih ćelija - keratinocita (HaCaT), poslužila je za upoređivanje Trx sistema u navedenim ćelijskim linijama.



Slika 17. Uporedna ekspresija *Trx1* i *TrxR1* iRNK u ćelijskim linijama U87, SH-SY5Y i HaCaT. Relativna ekspresija *Trx1* i *TrxR1* iRNK je normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu β -aktin. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). $p < 0,0001$ (****) ukazuje na značajnost razlike u odnosu na HaCaT ćelije. $p < 0,01$ (##) i $p < 0,0001$ (####) ukazuje na statističku značajnost između U87 i SH-SY5Y ćelija.



Slika 18. Uporedna analiza ekspresije *TrxR1* proteina u ćelijskim linijama U87, SH-SY5Y i HaCaT. Ekspresija *TrxR1* je normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu GAPDH. Reprezentativne slike imunoblotova su priložene uz grafik. Prosečna vrednost \pm SD su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost je utvrđena između ekspresije *TrxR1* kod U87 i HaCaT, $p < 0,05$ (*).

Ekspresija *Trx1* iRNK je značajno viša kod HaCaT ćelija, u poređenju sa U87 ($p < 0,0001$) i SH-SY5Y ($p < 0,01$) ćelijama (Slika 17), dok je ekspresija *TrxR1* iRNK oko 4 puta viša kod U87 ćelija u odnosu na SH-SY5Y ($p < 0,0001$) i HaCaT ($p < 0,0001$) ćelije (Slika 17). Odnos ekspresije proteina *TrxR1* među različitim ćelijskim linijama je u saglasnosti sa odnosom ekspresija na nivou iRNK i potvrđuje da U87 ćelije sadrže oko 2 puta više *TrxR1* nego SH-SY5Y i HaCaT ćelije ($p < 0,05$) (Slika 18).

4.2.2. Upoređivanje efekta UMA na rast tumorskih i normalnih ćelija

Efekat 6 UMA na metaboličku aktivnost i ćelijski rast je utvrđen MTT testom, izlaganjem SH-SY5Y, U87 i HaCaT ćelija, kao i ćelija krvi (PBMC) dejstvu supstanci, u trajanju od 72 h. Kao kontrolna supstanca upotrebljen je piperlongumin, poznati inhibitor *TrxR1*. Svih 6 UMA supstanci i piperlongumin su doveli do inhibicije ćelijskog rasta sve tri ćelijske linije i ćelija krvi. Za upoređivanje efekta korišćene su IC_{50} vrednosti inhibicije ćelijskog rasta prikazane u Tabeli 8.

Tabela 8. Efekat inhibitora TrxR1 na ćelijski rast U87, SH-SY5Y, HaCaT i PBMC.

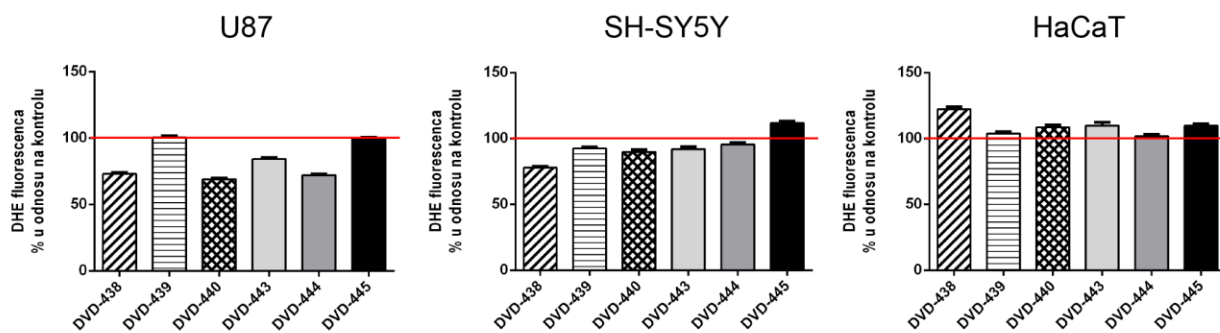
Supstance	IC ₅₀ , μM				RFS ^a
	U87	SH-SY5Y	HaCaT	PBMC	
DVD-438	1,41±0,13	1,77±0,11	1,56±0,19	1,62±0,5	1,0
DVD-439	15,19±1,8	4,94±0,45	5,45±0,23	15,34±3,8	1,8
DVD-440	0,46±0,06	0,90±0,02	0,83±0,03	2,10±0,83	2,9
DVD-443	0,80±0,08	0,56±0,03	1,06±0,04	5,60±0,80	6,9
DVD-444	2,92±0,34	2,96±0,31	1,05±0,07	7,29±2,59	3,2
DVD-445	9,70±0,39	10,99±0,8	8,30±0,44	55,71±5,1	5,8
piperlongumin	7,18±0,24	5,94±0,33	3,03±0,38	NO	NO

Vrednosti su predstavljene kao IC₅₀ ± SE u μM. ^aRelativan faktor selektivnosti (RFS) je predstavljen kao odnos IC₅₀ vrednosti PBMC i prosečne IC₅₀ vrednosti u ćelijskim linijama ($RFS = IC_{50} [PBMC] / [(IC_{50} [U87] + IC_{50} [SH-SY5Y] + IC_{50} [HaCaT]) / 3]$). „NO“: nije određeno.

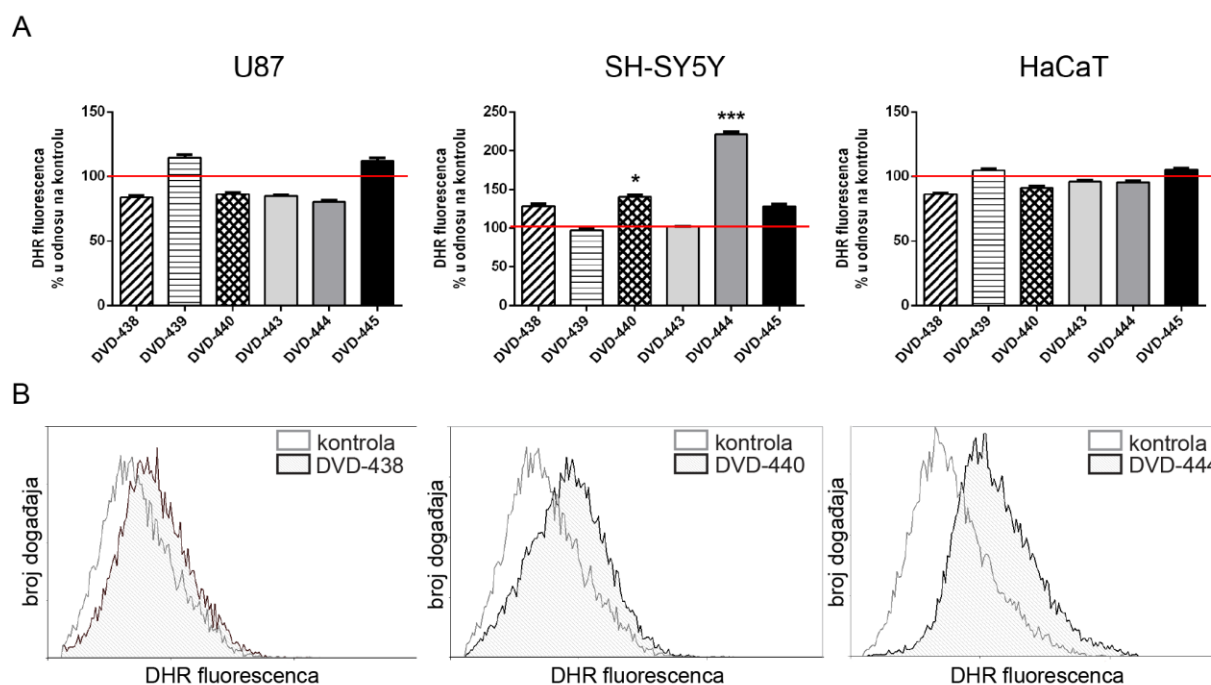
MTT testom je utvrđeno da, sa izuzetkom DVD-438 i DVD-439, ostala 4 inhibitora TrxR1 imaju više izražen efekat na rast komercijalnih ćelijskih linija (bilo tumorskih, bilo normalnih) u odnosu na neproliferišuće ćelije krvi (PBMC). Najbolju selektivnost ka proliferišućim ćelijama (U87, SH-SY5Y i HaCaT) pokazale su supstance DVD-443 i DVD-445 čije IC₅₀ vrednosti na komercijalnim ćelijskim linijama su do sedam i šest puta, redom, niže od IC₅₀ vrednosti dobijenih na PBMC (Tabela 8).

4.2.3. Indukcija oksidativnog stresa pod dejstvom UMA

Kako bi se utvrdilo da li tretman sa UMA izaziva oksidativni stres usled inhibicije TrxR1, analiziran je sastav RONS u tumorskim (U87 i SH-SY5Y) i normalnim (HaCaT) ćelijama, nakon 24 h tretmana koncentracijama približnim IC₅₀ vrednostima dobijenim u testu metaboličke aktivnosti (opisan u odeljku 3.8 *Analiza oksidativnog stresa prouzrokovanog tretmanom*). Citofluorimetrijskim obeležavanjem ćelija fluorescentnom bojom DHE određeno je prisustvo superoksidnog anjona (Slika 19). Pošto tretman sa UMA nije doveo do značajnih razlika u intenzitetu fluorescence DHE obeleženih ćelija, promene u koncentraciji superoksidnog anjona nisu mogle biti uočene nakon 24 h tretmana (Slika 19). Promena koncentracije peroksinitrata i vodonik-peroksida (RONS) analizirana je obeležavanjem ćelija sa DHR (Slika 20). Rezultati citofluorimetrijske analize nakon DHR obeležavanja ćelija prikazani su na Slici 20. Analiza intenziteta fluorescence proizvoda DHR boje je pokazala da tretman supstancama DVD-438, DVD-440, DVD-444 i DVD-445 indukuje porast količine slobodnih radikala kod SH-SY5Y ćelija nakon 24 h. Najveći porast u nivou RONS je zabeležen nakon tretmana supstancom DVD-444 kod SH-SY5Y ćelija (Slika 20).



Slika 19. Određivanje superoksidnog anjona DHE obeležavanjem U87, SH-SY5Y i HaCaT ćelija. Ćelije su obeležene DHE bojom nakon 24 h tretmana sa 6 UMA. Na grafiku je predstavljen procenat intenziteta fluorescence u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$).



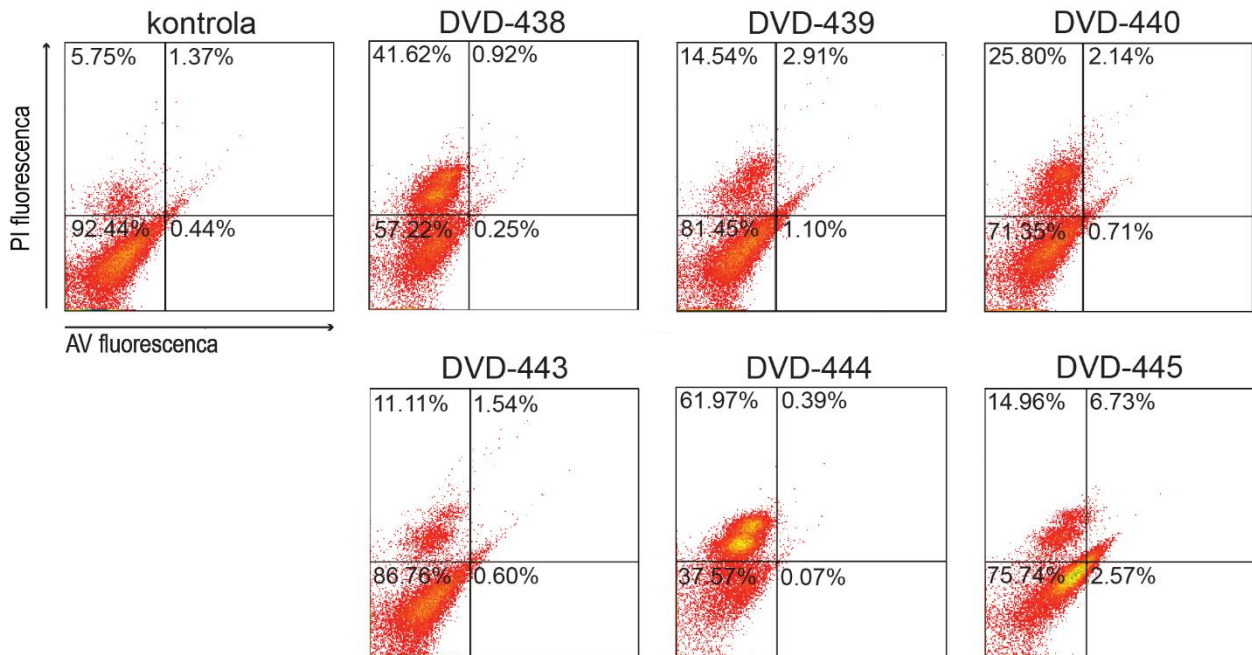
Slika 20. Određivanje RONS DHR obeležavanjem U87, SH-SY5Y i HaCaT ćelija. Ćelije su obeležene DHR bojom nakon 24 h tretmana sa 6 UMA supstanci. (A) Na grafiku je predstavljen procenat intenziteta fluorescence u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). (B) Reprezentativni citofluorimetrijski profili intenziteta fluorescence u SH-SY5Y ćelijama, dobijen nakon 24 h izlaganja supstancama DVD-438, DVD-440 i DVD-444. Statistički značajne razlike u odnosu na netretiranu kontrolu SH-SY5Y su uvrđene za tretmane sa DVD-440 ($p < 0,05$ (*)) i za DVD-444 ($p < 0,001$ (***)).

4.2.4. Selektivnost UMA ka tumorskim ćelijama na nivou indukcije ćelijske smrti

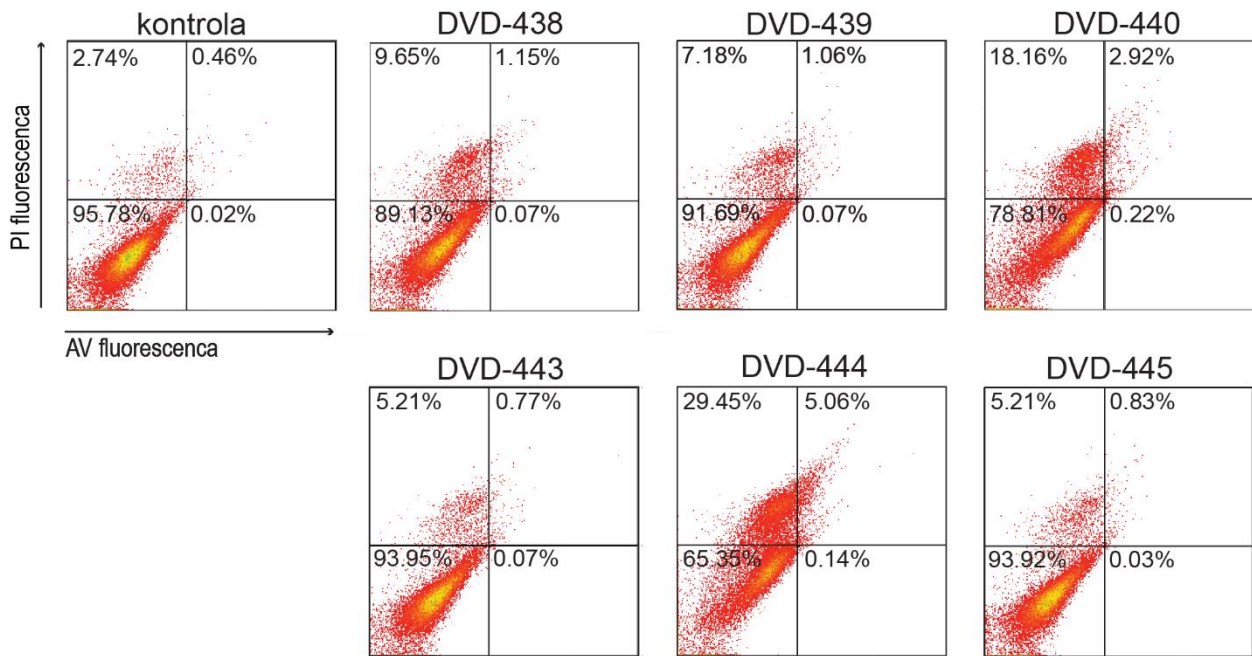
Dvojno obeležavanje ćelija sa AV/PI je korišćeno za utvrđivanje tipa ćelijske smrti i postojanja selektivne indukcije ćelijske smrti pod dejstvom UMA kod tumorskih SH-SY5Y ćelija u odnosu na normalne HaCaT ćelije. Pokazano je da svih 6 UMA supstanci indukuju nekrozu kod

ispitivanih ćelijskih linija (Slika 21). Važno je istaći da ispitivane supstance u znatno većoj meri indukuju nekrozu kod ćelija neuroblastoma, u poređenju sa normalnim keratinocitama, što potvrđuje selektivnost UMA ka tumorskim ćelijama. Supstance DVD-438 i DVD-444 u najvećoj meri povećavaju procenat nekrotičnih ćelija, što je u skladu sa njihovim uticajem na povećanje RONS u SH-SY5Y ćelijama. Tako, DVD-438 i DVD-444 indukuju nekrozu kod 41,62% i 61,97% SH-SY5Y ćelija, redom, a svega 9,65% i 29,45% kod HaCaT ćelija, redom (Slika 21).

A



B



Slika 21. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom UMA. Ćelijska smrt kod (A) SH-SY5Y i (B) HaCaT je analizirana AV/PI fluorescentnim obeležavanjem ćelija nakon 48 h tretmana. X-osa kvadranta predstavlja signal fluorescence AV, Y-osa predstavlja signal fluorescence PI. Citofluorimetrijskom analizom se razlikuju žive ćelije (donji levi kvadrant, AV-PI-), rana apoptoza (donji desni kvadrant, AV+PI-), kasna apoptoza (gornji desni kvadrant, AV+PI+) i nekroza (gornji levi kvadrant, AV-PI+). U kvadrantima je upisan udeo ćelija u datom kvadrantu od ukupnog broja

ćelija (procentualne vrednosti). Na slici su prikazani reprezentativni citofluorimetrijski profili iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta.

4.3. Mehanizam dejstva UMA u modelima senzitivnih i višestruko rezistentnih ćelija glioma

Antitumorski potencijal novih TrxR1 inhibitora DVD-444 i DVD-445 ispitivan je u dva para senzitivnih i višestruko rezistentnih ćelijskih linija glioma, sa različitim antioksidativnim kapacitetima: C6 i RC6 ćelije glioma pacova, i U87 i U87-TxR ćelije humanog glioblastoma. RC6 ćelije, u okviru rezistentnog fenotipa ispoljavaju rezistenciju na karmustin, kojim je rezistencija indukovana, ali i na cisplatin, i na TMZ. Osnovni mehanizam rezistencije RC6 je adaptacija na oksidativni stres, sa povišenom produkcijom RONS i visokom ekspresijom antioksidantnih enzima (GPx1, MnSOD, iNOS) [191]. Višestruko rezistentne U87-TxR ćelije su dobijene od U87 ćelijske linije humanog glioblastoma nakon kontinuiranog izlaganja PTX. Osnovna osobina U87-TxR je prekomerna ekspresija P-gp, kao i niža produkcija RONS, praćena nižim sadržajem GSH i GST π [190, 214]. Polazna osnova za korišćenje ova dva modela rezistentnih ćelijskih linija glioma je bila da razlike u antioksidativnim kapacitetima mogu uticati na njihov odgovor na oksidativni stres indukovani TrxR1 inhibitorima.

4.3.1. Efekat UMA na rast senzitivnih i višestruko rezistentnih ćelija glioma

Dejstvo UMA na metaboličku aktivnost i ćelijski rast glioma pacova, C6 i RC6, kao i humanih glioblastoma, U87 i U87-TxR, je ispitano MTT testom nakon 72 h tretmana. IC₅₀ vrednosti MTT testa, kao i stepen rezistencije su prikazani u Tabeli 9. Svih 6 supstanci je ispoljilo značajan inhibitorski efekat na ćelijski rast u sve četiri ćelijske linije, sa IC₅₀ < 30 μ M. Veći stepen rezistencije (>2) je uočen samo na DVD-438 kod U87-TxR ćelijske linije.

Tabela 9. Efekat UMA na ćelijski rast glioma.

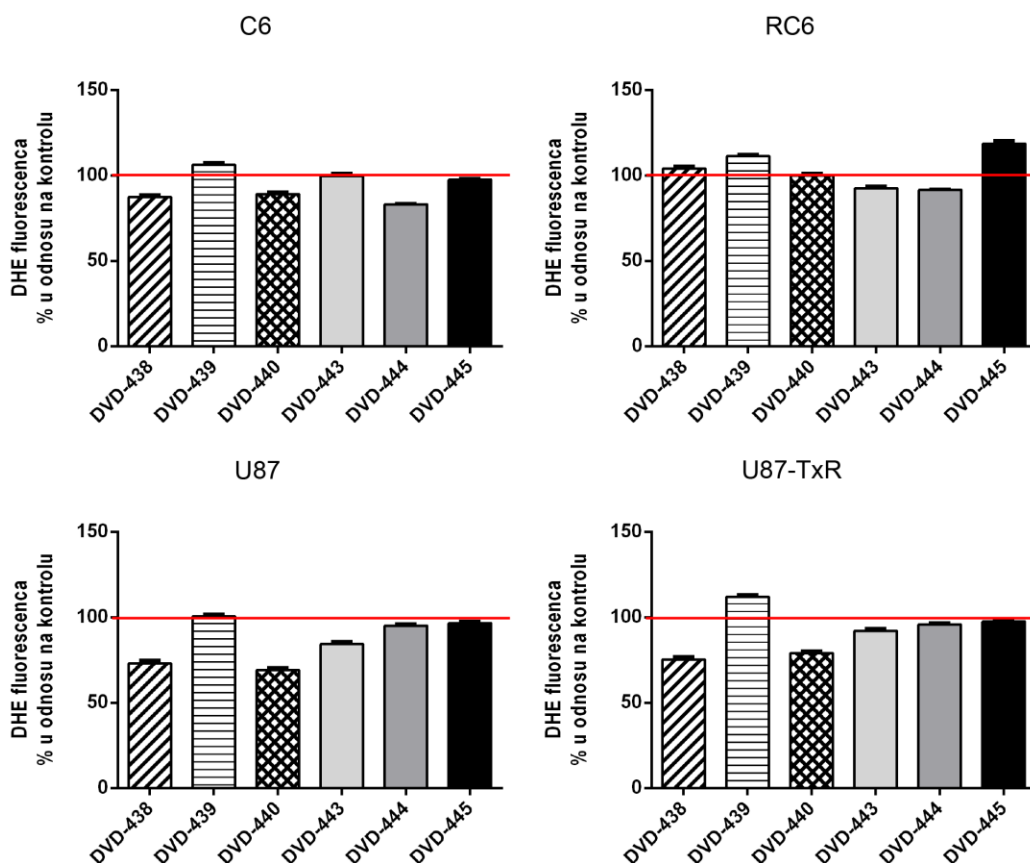
Supstance	IC ₅₀ , μ M		^a RFR	IC ₅₀ , μ M		^b RFR
	C6	RC6		U87	U87-TxR	
DVD-438	1,25±0,34	1,73±0,25	1,4	1,41±0,13	3,78±0,78	2,7
DVD-439	6,43±0,81	5,64±1,45	0,9	15,19±1,81	24,16±10,81	1,6
DVD-440	0,46±0,15	0,86±0,1	1,9	0,46±0,06	0,67±0,04	1,5
DVD-443	0,82±0,07	1,32±0,71	1,6	0,80±0,08	0,61±0,10	0,8
DVD-444	1,68±0,27	2,19±0,57	1,3	2,92±0,34	2,57±0,35	0,9
DVD-445	10,81±2,83	8,15±1,08	0,7	9,70±0,39	9,31±0,32	1,0

Vrednosti su predstavljene kao IC₅₀ \pm SEM u μ M. Relativan faktor rezistencije (RFR) je predstavljen kao odnos IC₅₀ vrednosti rezistentne senzitivne ćelijske linije (^aRFR = IC₅₀ [RC6] / IC₅₀ [C6], ^bRFR = IC₅₀ [U87-TxR] / IC₅₀ [U87]).

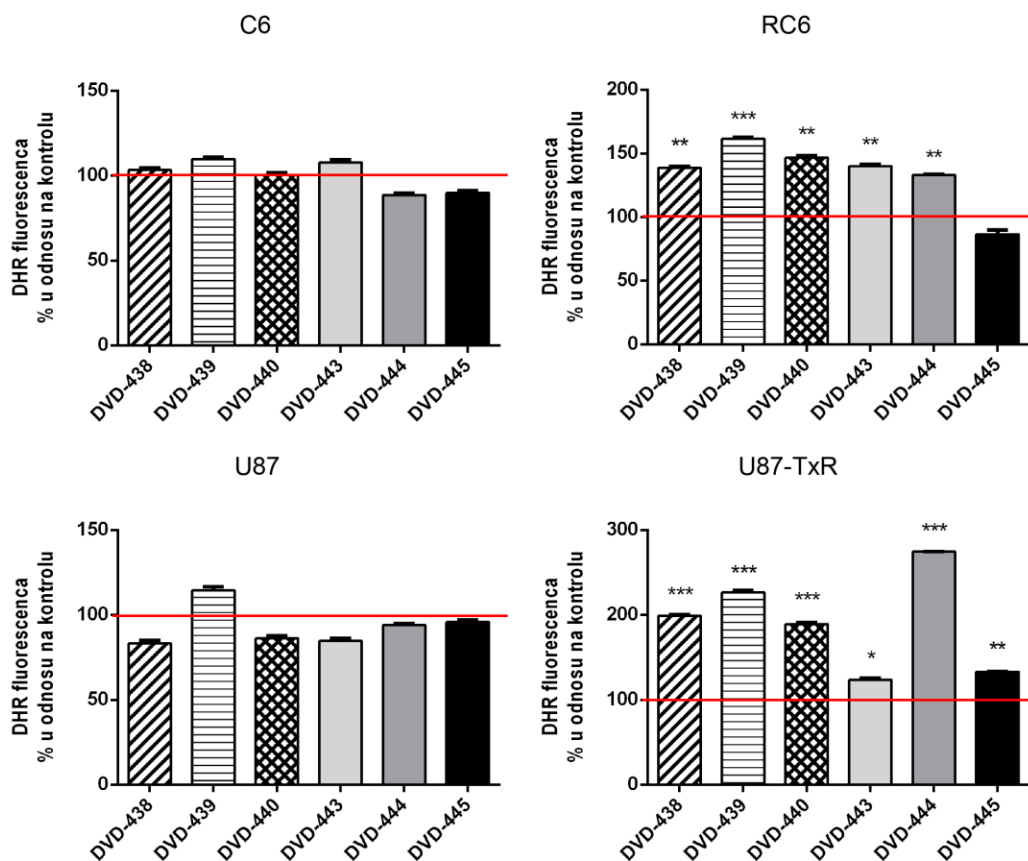
4.3.2. UMA prouzrokuju oksidativni stres kod ćelija glioma

Potencijal 6 inhibitora TrxR1 da indukuju oksidativni stres u ćelijama glioma određen je citofluorimetrijskom analizom intenziteta fluorescence nakon interakcije DHE sa superoksidnim anjonom (Slika 22) i nakon interakcije DHR sa peroksinitritom i vodonik-peroksidom (Slika 23). Tretman supstancama u trajanju od 24 h nije doveo do značajnog porasta u količini superoksidnog anjona u ćelijama glioma (Slika 22). S druge strane, tretman 24 h sa UMA je doveo do značajnih promena u nivou RONS kod obe ćelijske linije rezistentnih glioma, RC6 i U87-TxR (Slika 23).

Najveći porast u koncentraciji RONS je zabeležen nakon tretmana sa DVD-444 kod ćelijske linije U87-TxR (Slika 23).



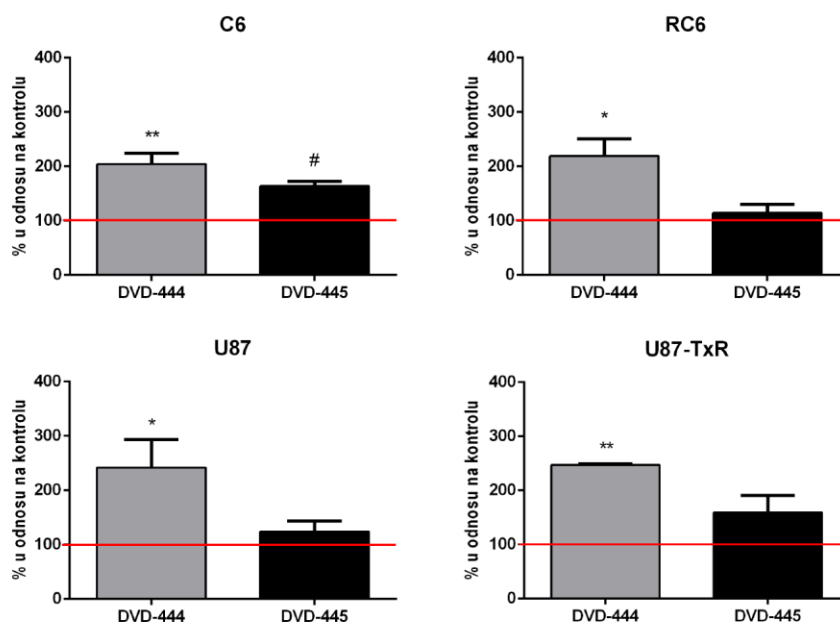
Slika 22. Detekcija superoksidnog anjona nakon tretmana ćelija glioma inhibitorima TrxR1. Ćelije C6, RC6, U87 i U87-TxR su obeležene DHE bojom 24 h nakon tretmana. Na grafiku je predstavljen procenat intenziteta fluorescence u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta (n = 3).



Slika 23. Detekcija RONS nakon tretmana ćelija glioma inhibitorima TrxR1. Ćelije C6, RC6, U87 i U87-TxR su obeležene DHR bojom 24 h nakon tretmana. Na grafiku je predstavljen procenat intenziteta fluorescencije u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescencije iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost tretmana u odnosu na netretiranu kontrolu je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4.3.3. DVD-444 i DVD-445 povećavaju koncentraciju GSH kod ćelija glioma

Kako bi se utvrdilo da li tretman ovim supstancama utiče na koncentraciju GSH, kolorimetrijskim testom je analizirana promena relativne količine GSH nakon 24 h tretmana sa DVD-444 i DVD-445 (Slika 25). Tretman DVD-444 je doveo do povećanja koncentracije redukovano glutationa u svim ćelijskim linijama glioma, dok je tretman DVD-445 pokazao trend povećanja GSH kod svih ćelijskih linija s tim da je značajna razlika uočena samo kod C6 ćelija.

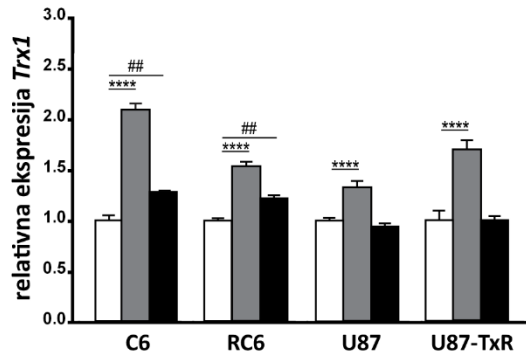
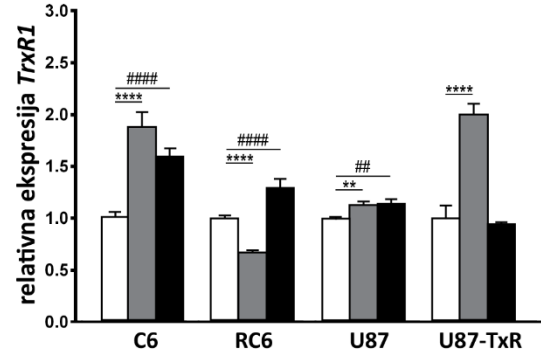
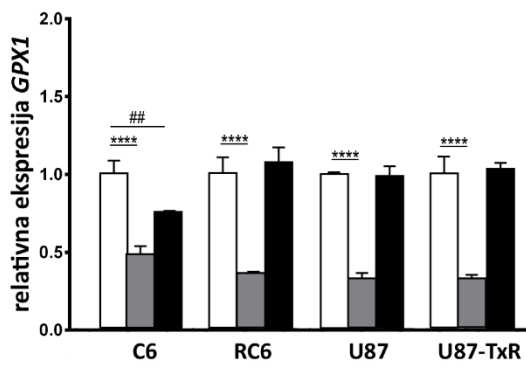
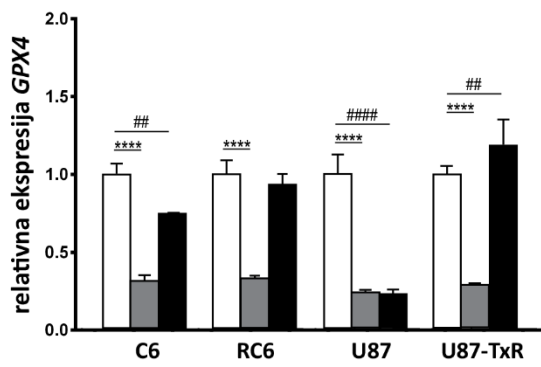
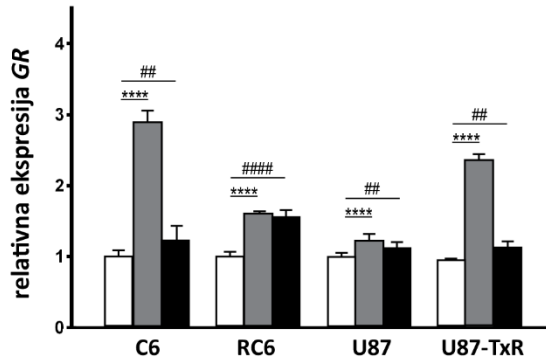
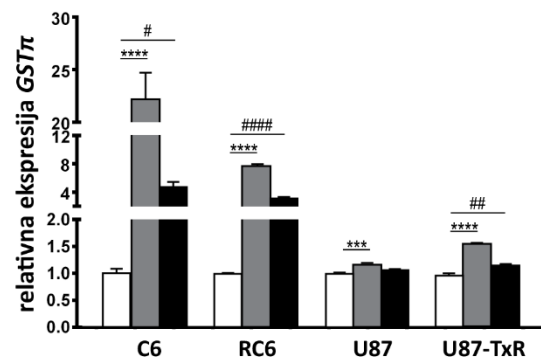
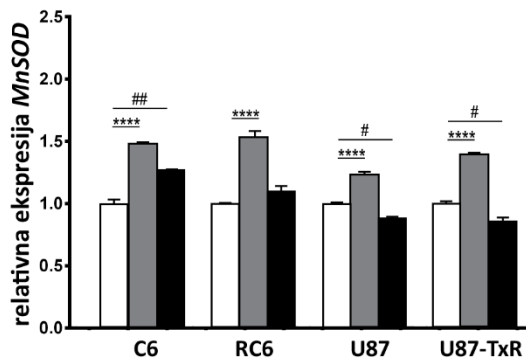
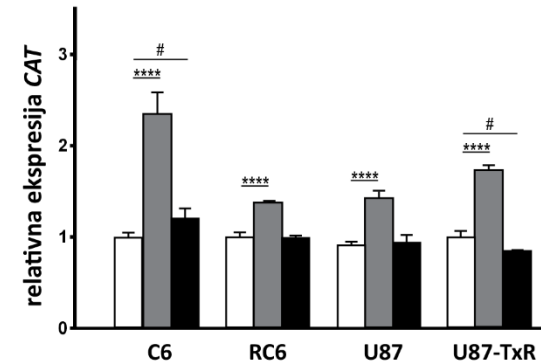


Slika 24 Koncentracija GSH u ćelijama C6, RC6, U87 i U87-TxR nakon tretmana sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Relativna količina GSH je prikazana u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Statistička značajnost tretmana DVD-444 u odnosu na netretiranu kontrolu je označen prikazana na sledeći način kao: $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**), za DVD-445: $p < 0,05$ (#).

4.3.4. DVD-444 i DVD-445 menjaju ekspresiju antioksidativnih enzima

Očekivana posledica inhibicije TrxR1 je povećana ekspresija enzima Trx sistema, čime ćelija pokušava da kompenzuje smanjenu aktivnost Trx sistema. Pored toga, u odgovoru na oksidativni stres povećava se aktivnost odbrambenih sistema, između ostalog i ekspresija enzima antioksidativne zaštite. Kako bi se ispitalo da li 24 h tretman sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445 utiče na ekspresiju enzima oksidativne zaštite u ćelijama C6, RC6, U87 i U87-TxR, analizirana je ekspresija gena tioredoksinskog sistema (*TRX1* i *TRXR1*), GSH sistema (*GPX1*, *GPX4*, *GST π* i *GR*) i antioksidativnih enzima *MnSOD* i *CAT*, qPCR metodom (Slika 25).

Oba inhibitora TrxR1 dovode do povećane ekspresije iRNK *TRX1* (Slika 25A) i *TRXR1* (Slika 24B). Ipak, tretman supstancom DVD-445 nije doveo do promene ekspresije enzima Trx sistema kod U87-TxR (Slika 25A). Tretman DVD-444 je značajno smanjio ekspresiju iRNK *GPX1* i *GPX4* u sve 4 ćelijske linije glioma, dok je efekat DVD-445 bio promenljiv u zavisnosti od ćelijske linije (Slika 25C i 25D). Kod sve 4 ćelijske linije nakon tretmana sa oba TrxR1 inhibitora došlo je do povećanja ekspresije iRNK *GR* (Slika 25E). Najveći porast u ekspresiji iRNK *GST π* je zabeležen nakon tretmana sa DVD-444 kod ćelija C6 i RC6 (23 puta, odnosno 7,7 puta u odnosu na netretiranu kontrolu), pri čemu je tretman sa DVD-445 takođe doveo do značajnog povećanja u ekspresiji iRNK *GST π* u ovim ćelijskim linijama (4,5, odnosno 3 puta) (Slika 25F). Oba inhibitora TrxR1 su dovela do povećane ekspresije *GST π* i u ćelijskim linijama humanih glioblastoma, ali u manjoj meri (Slika 25F). Najviše izražen efekat povećanja je zabeležen kod C6 i U87-TxR ćelija nakon tretmana sa DVD-444 (3, odnosno 2,3 puta) (Slika 25F). DVD-444 je doveo do povećanja ekspresije iRNK antioksidativnih enzima *MnSOD* (Slika 25G) i *CAT* (Slika 25H), kod senzitivnih, kao i kod rezistentnih ćelijskih linija glioma, dok DVD-445 nije imala značajan efekat na ekspresiju iRNK *MnSOD* i *CAT* (Slika 25G i 25H).

A**B****C****D****E****F****G****H**

Slika 25 Relativna ekspresija antioksidativnih enzima u ćelijama glioma pacova i humanih glioblastoma nakon tretmana sa DVD-444 i DVD-445. Ekspresija iRNK je analizirana qPCR metodom, nakon 24 h tretmana sa 2 μ M DVD-444 (sivi stubići) i 8 μ M DVD-445 (crni stubići). Tretmani sa supstancama su prikazani u odnosu na odgovarajuću netretiranu kontrolu (beli stubići). Ekspresija iRNK (A) *TRX1*, (B) *TRXR1*, (C) *GPX1*, (D) *GPX4*, (E) *GR*, (F) *GST π* , (G) *MnSOD* i (H) *CAT* je normalizovana u odnosu na endogenu kontrolu β -aktin (*ACTB*). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD, dobijeni u tri nezavisna eksperimenta (n = 3). Statistički značajne razlike u odnosu na netretiranu kontrolu za DVD-444 su prikazane na sledeći način: p < 0,01 (**), p < 0,001 (***) i p < 0,0001 (****), za DVD-445: p < 0,05 (#), p < 0,01 (##) i p < 0,0001 (####).

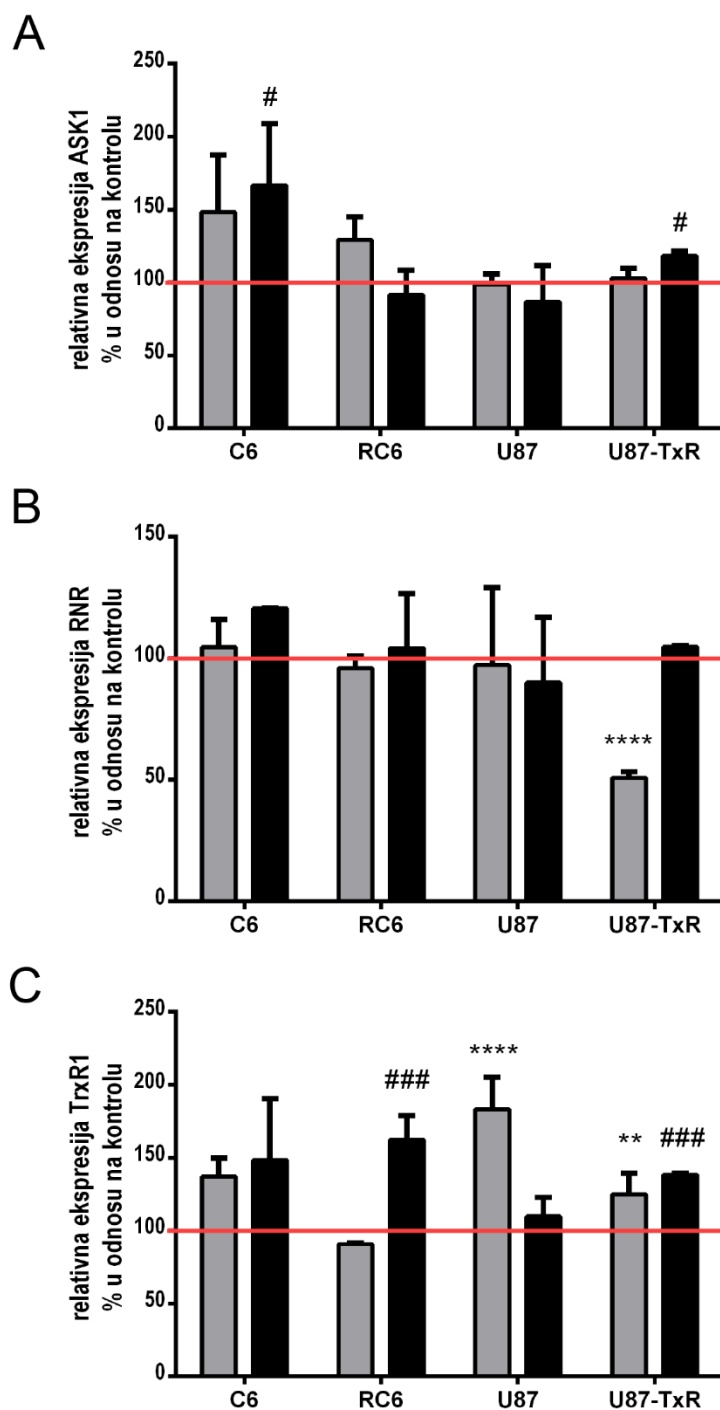
4.3.5. DVD-444 i DVD-445 menjaju ekspresiju proteina ASK1, RNR i TrxR1

Promena u nivou ekspresije TrxR1 proteina, kao i proteina čija je funkcija regulisana Trx sistemom je analizirana imunoobeležavanjem C6, RC6, U87 i U87-TxR ćelija antitelima specifičnim za TrxR1, ASK1 i RNR. Nakon 24 h tretmana sa 2 μ M DVD-444 i 8 μ M DVD-445, uzorci ćelija, obeleženi specifičnim antitelima, su analizirani citofluorimetrijski (Slika 26).

Tretman DVD-444 je doveo do povećanja nivoa ekspresije TrxR1 proteina kod C6 ćelija, bez statističke značajnosti, dok je nivo ekspresije kod RC6 ćelija ostao relativno nepromenjen. Nivo ekspresije TrxR1 je bio značajno povećan kod U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana sa DVD-444. Tretman sa DVD-445 je doveo do značajnog povećanja nivoa ekspresije TrxR1 samo kod rezistentnih ćelijskih linija (Slika 26A).

Tretman DVD-444 je doveo do značajnog smanjenja nivoa ekspresije RNR samo kod U87-TxR ćelija, dok DVD-445 nije imao uticaja na nivo ekspresije RNR kod ispitivane 4 ćelijske linije (Slika 26B).

Citofluorimetrijskom analizom je pokazano da ispitivane supstance nemaju isti efekat na nivo ekspresije ASK1 proteina u različitim ćelijskim linijama (Slika 26 C). Tako tretman i sa DVD-444 i DVD-445 povećava ekspresiju ASK1 u C6 ćelijama. S druge strane, nivo ekspresije ASK1 u ćelijama RC6 je bio povećan samo nakon tretmana sa DVD-444, dok je nivo ekspresije ASK1 kod U87-TxR ćelija u manjoj meri povećan nakon tretmana sa DVD-445. Nivo ekspresije ASK1 je bio bez promena kod ćelija U87 nakon tretmana sa oba inhibitora TrxR1.

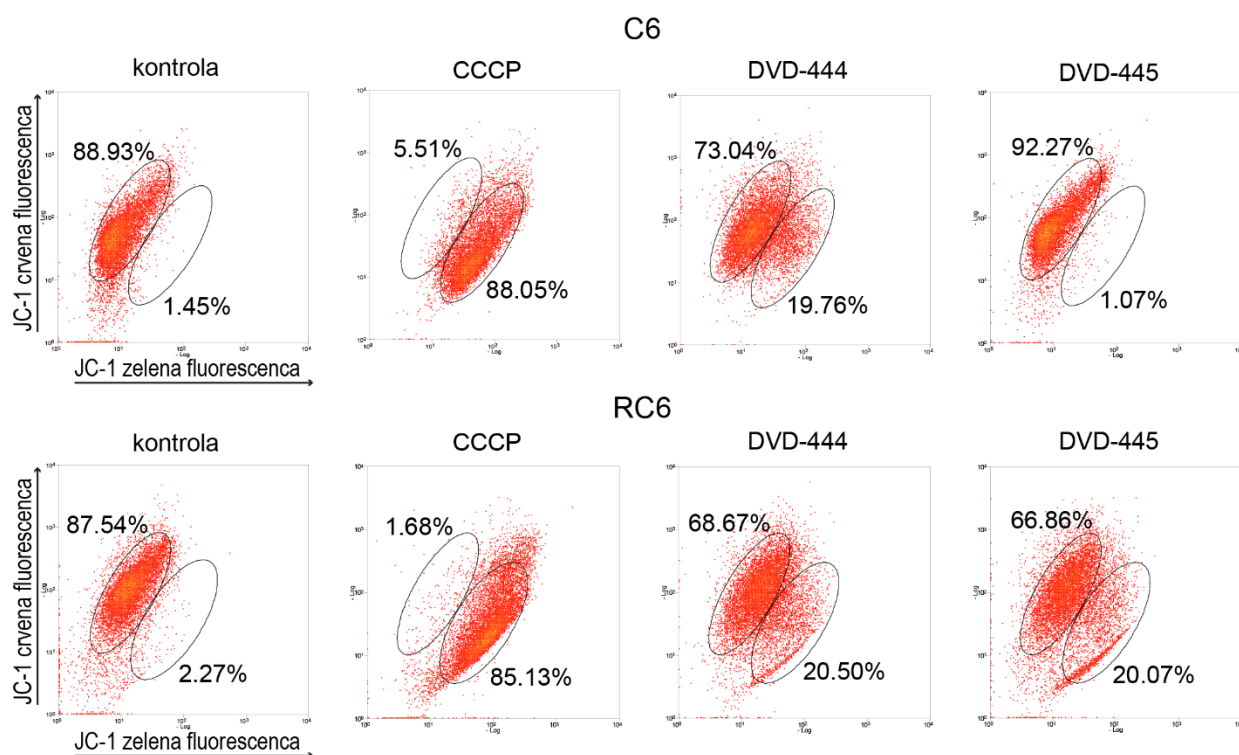


Slika 26. Ekspresija proteina ASK1, RNR i TrxR1 u ćelijama glioma nakon tretmana inhibitorima TrxR1. Ćelije su obeležene specifičnim antitelima za proteine nakon 24 h tretmana sa 2 μM DVD-444 (sivi stubići) i 8 μM DVD-444 (crni stubići). Relativna promena ekspresije proteina (A) ASK1, (B) RNR i (C) TrxR1 u ćelijama tretiranim ispitivanim supstancama je izražena u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ±SD, dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n = 3). Statistička značajnost tretmana DVD-444 u

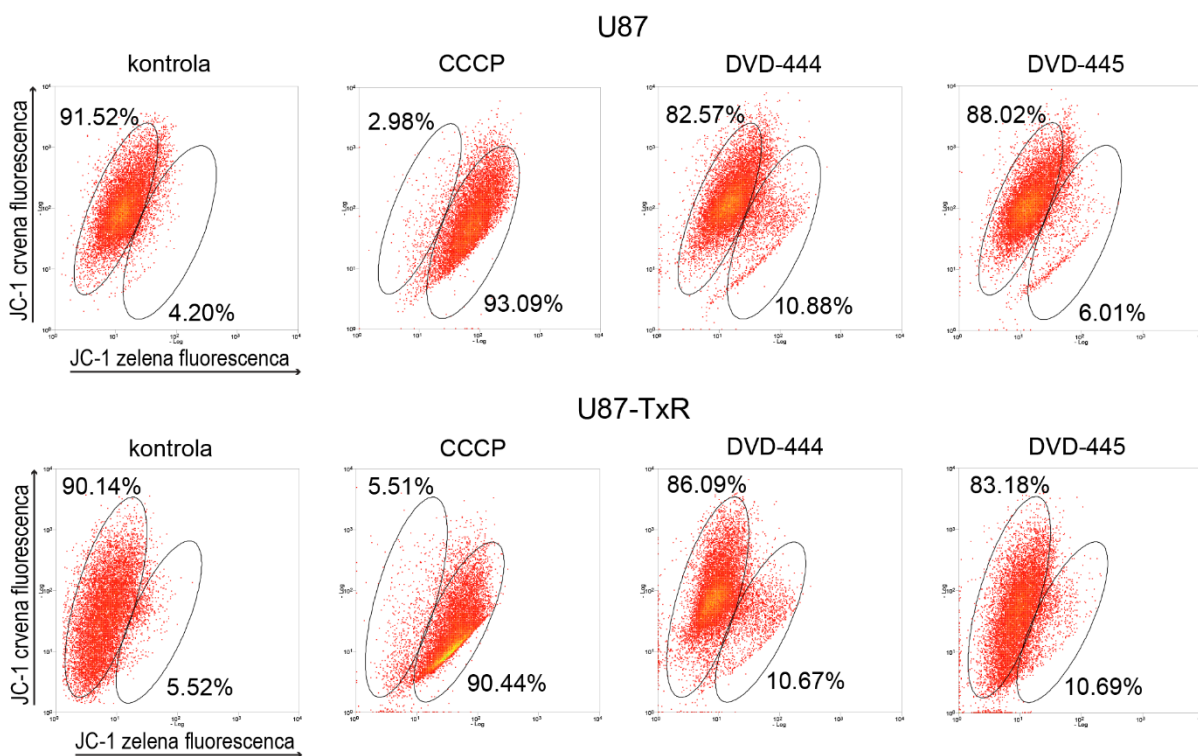
odnosu na netretiranu kontrolu je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,0001$ (****), za DVD-445: $p < 0,05$ (#) i $p < 0,001$ (###).

4.3.6. Depolarizacija mitohondrija pod dejstvom DVD-444 i DVD-445

Da bi se utvrdilo da li tretman supstancama DVD-444 i DVD-445 utiče na funkciju mitohondrija, analizirana je promena u membranskom mitohondrijalnom potencijalu nakon 24 h tretmana. Čelije glioma pacova (Slika 27) i humanih glioblastoma (Slika 28) su obeležene fluorescentnom bojom JC-1. Čelije tretirane CCCP dekuplujućom jonoforom su upotrebljene za definisanje referentnog signala maksimalne depolarizacije mitohondrija (intenzitet fluorescence JC-1 u zelenom kanalu, koji ukazuje na smanjenje potencijala membrane mitohondrija je veći nego u kontrolnom uzorku kod više od 85% ćelija tretiranih sa CCCP). DVD-444 dovodi do promene u mitohondrijalnom membranskom potencijalu kod obe ćelijske linije glioma pacova sa oko 20% ćelija depolarizovanih mitohondrija (Slika 27), dok je DVD-445 u najvećoj meri dovela do smanjenja membranskog potencijala kod ćelija RC6 (20,07% u odnosu na netretiranu kontrolu 2,27%) (Slika 27). Efekat i DVD-444 i DVD-445 na humane ćelije glioma je sličan, sa oko 10% ćelija depolarizovanih mitohondrija, i kod U87 i U87-TrxR (Slika 28).



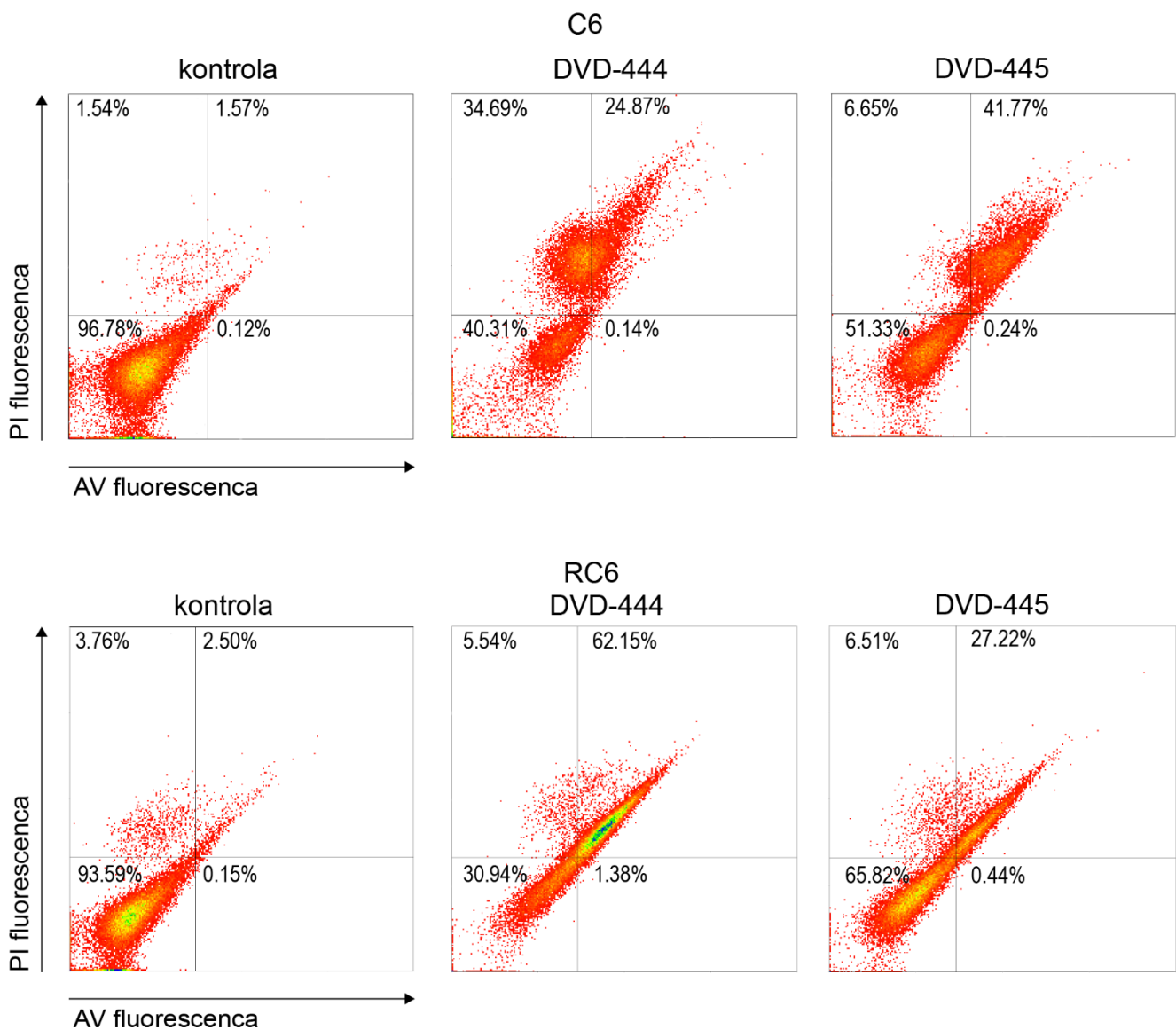
Slika 27. Analiza mitohondrijalnog membranskog potencijala C6 i RC6 ćelija nakon tretmana sa 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. Tretman ćelija sa CCCP je upotrebljen za definisanje populacije ćelija sa depolarizovanim mitohondrijalnim potencijalom (JC-1 zelena fluorescencija). Reprezentativni citofluorimetrijski profili ćelija iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta ($n = 3$) su predstavljeni kao intenzitet fluorescence JC-1 boje na crvenom (y-osa) i zelenom (x-osa) kanalu.



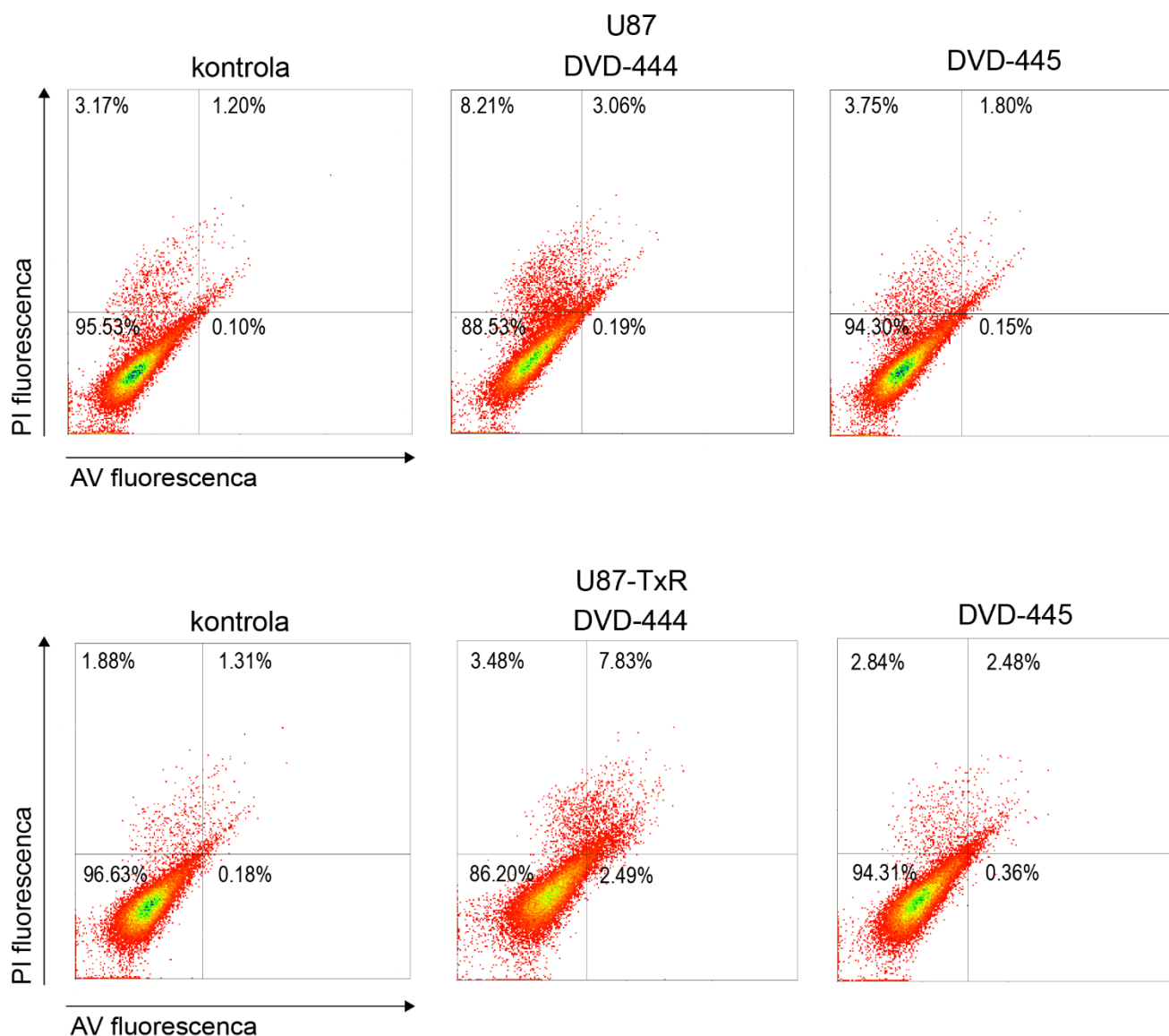
Slika 28. Analiza mitohondrijalnog membranskog potencijala U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana sa 2 μ M DVD-444 i 8 μ M DVD-445. Tretman ćelija sa CCCP je upotrebljen za definisanje populacije ćelija sa depolarizovanim mitohondrijama (JC-1 zelena fluorescencija). Reprezentativni citofluorimetrijski profili ćelija iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta (n = 3) su predstavljeni kao intenzitet fluorescence JC-1 boje na crvenom (y-osa) i zelenom (x-osa) kanalu.

4.3.7. Analiza indukcije ćelijske smrti pod dejstvom DVD-444 i DVD-445

Da bi se utvrdio profil ćelijske smrti nakon tretmana supstancama DVD-444 i DVD-445, senzitivne i rezistentne ćelije glioma pacova, kao i humanih glioblastoma su obeležene sa AV/PI nakon 72 h tretmana. Citofluorimetrijska analiza AV/PI obeleženih ćelija je pokazala da DVD-444 povećava udeo kasno apoptotskih i nekrotičnih ćelija, ali ne i rano apoptotskih C6 ćelija (Slika 29). Procenat kasno apoptotskih i nekrotičnih C6 ćelija se povećao sa 3,11% (suma udela AV+PI+ i AV-PI+) u netretiranim kontrolnim uzorcima, do 59,56% u uzorcima tretiranim sa DVD-444. S druge strane, tretman C6 ćelija sa DVD-445 je povećao procenat samo kasno apoptotskih ćelija (sa 1,57% u netretiranoj kontroli na 41,77% tretiranih ćelija). Tretman sa DVD-444 i DVD-445 je u velikoj meri povećao udeo kasno apoptotskih RC6 ćelija, sa 2,50% u netretiranoj kontroli na 62,15%, odnosno 27,22% kod tretiranih ćelija (Slika 29). Kod U87 i U87-TxR tretman analiziranim supstancama nije u značajnijoj meri povećao procenat ćelija u nekrozi i apoptozi (Slika 30).



Slika 29. Indukcija ćelijske smrti kod C6 i RC6 nakon tretmana sa 2 μ M DVD-444 i 8 μ M DVD-445. Ćelijska smrt je analizirana citofluorimetrijski AV/PI obeležavanjem ćelija C6 i RC6 72 h nakon tretmana sa susptancama DVD-444 i DVD-445. X-osa kvadranta predstavlja signal fluorescencije AV, dok Y-osa predstavlja signal fluorescencije PI. Citofluorimetrijskim testom razlikuju se žive ćelije (donji levi kvadrant, AV-PI-), rano apoptotske (donji desni kvadrant, AV+PI-), kasno apoptotske (gornji desni kvadrant, AV+PI+) i nekrotične ćelije (gornji levi kvadrant, AV-PI+). U kvadrantima je upisan udeo ćelija u datom kvadrantu od ukupnog broja ćelija (procentualne vrednosti). Na slici su predstavljeni reprezentativni citofluorimetrijski profili iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta (n = 3).

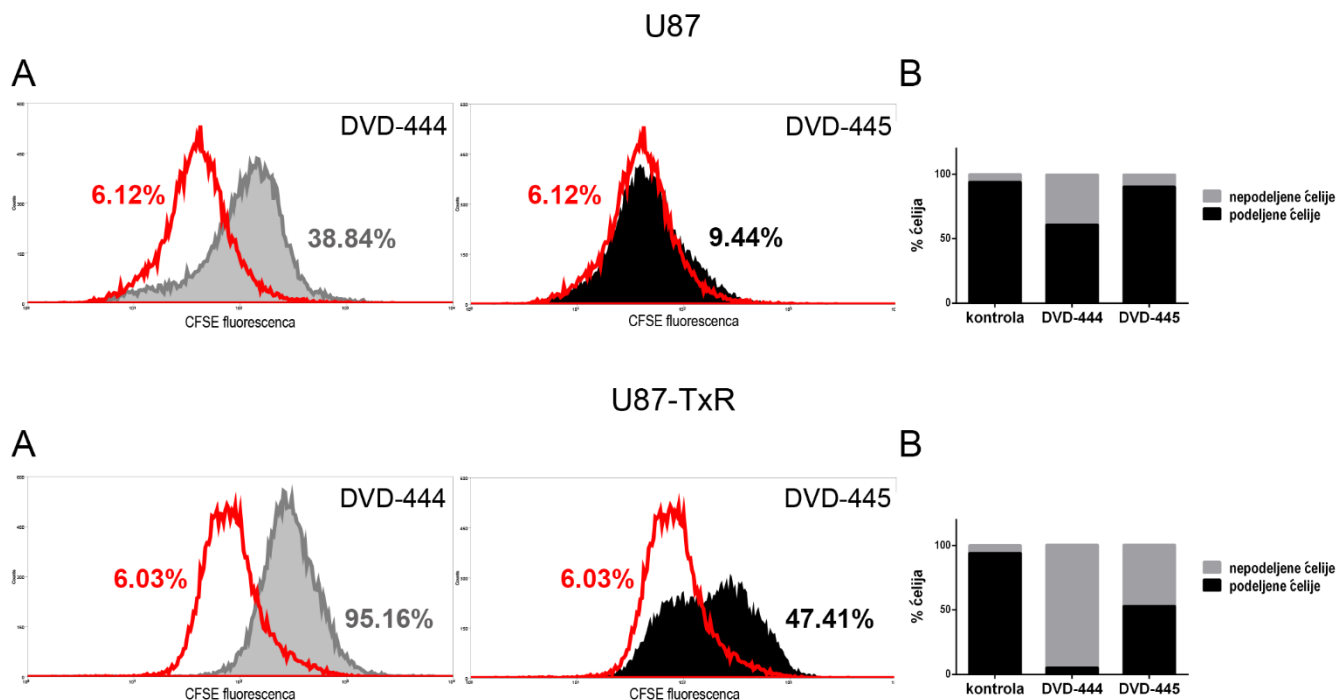


Slika 30. Indukcija ćelijske smrti kod U87 i U87-TxR nakon tretmana sa 2 μ M DVD-444 i 8 μ M DVD-445. Ćelijska smrt je analizirana citofluorimetrijski AV/PI obeležavanjem ćelija U87 i U87-TxR 72 h nakon tretmana sa susptancama DVD-444 i DVD-445. X-osa kvadranta predstavlja signal fluorescence AV, dok Y-osa predstavlja signal fluorescence PI. Citofluorimetrijskim testom razlikuju se žive ćelije (donji levi kvadrant, AV-PI-), rano apoptotske (donji desni kvadrant, AV+PI-), kasno apoptotske (gornji desni kvadrant, AV+PI+) i nekrotične ćelije (gornji levi kvadrant, AV-PI+). U kvadrantima je upisan udeo ćelija u datom kvadrantu od ukupnog broja ćelija (procentualne vrednosti). Na slici su predstavljeni reprezentativni citofluorimetrijski proili iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta (n = 3).

4.3.8. Antiproliferativni efekat DVD-444 i DVD-445 na ćelije humanih glioblastoma

Efekat DVD-444 i DVD-445 na proliferaciju ćelija U87 i U87-TxR je analiziran upoređivanjem intenziteta fluorescence kod CFSE obeleženih tretiranih i netretiranih ćelija nakon 72 h tretmana. Intenzitet CFSE fluorescentnog signala opada nakon svake podele ćelija, te se na osnovu intenziteta fluorescence može izvršiti procena stope ćelijske proliferacije. Nakon tretmana

DVD-444, ćelije U87 i U87-TxR su pokazale očigledno povećanje udela nepodeljenih ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu (38,84% i 95,16%, redom), dok je tretman sa DVD-445 doveo do značajnog povećanja udela nepodeljenih U87-TxR ćelija (47,41%) (Slika 31).

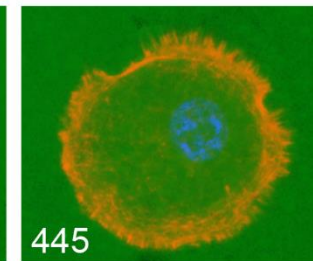
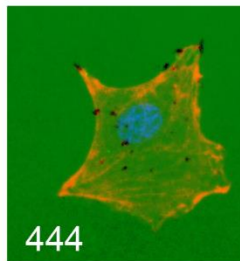
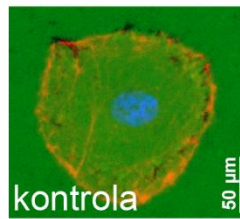
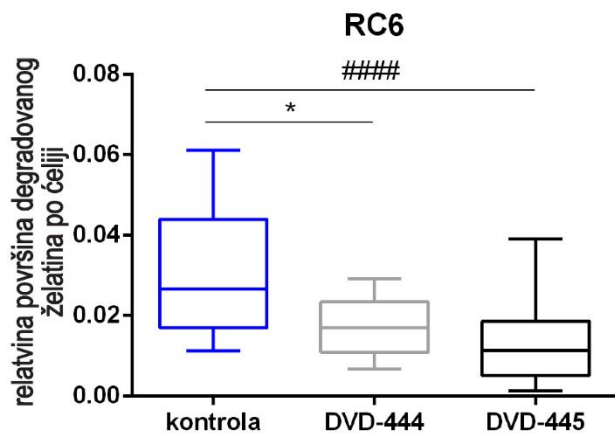
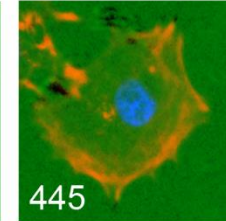
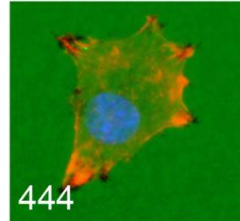
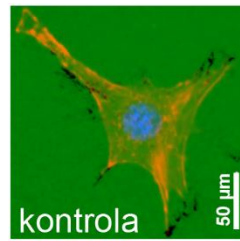
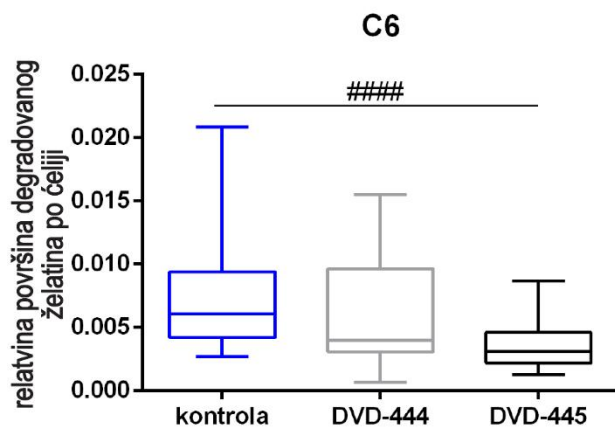


Slika 31. Antiproliferativni efekat DVD-444 i DVD-445. (A) Na slici su prikazani reprezentativni citofluorimetrijski profili iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta ($n = 3$). CFSE obeležene U87 i U87-TxR ćelije su analizirane nakon 72 h tretmana sa $2 \mu\text{M}$ DVD-444 i $8 \mu\text{M}$ DVD-445. Crvene linije na citofluorimetrijskim profilima označavaju netretirane kontrole, sa odgovarajućim procentom nepodeljenih ćelija, a sive i crne oblasti uzorke tretirane sa DVD-444 i DVD-445, sa odgovarajućim procentima nepodeljenih ćelija u istoj boji, redom. (B) Procentualni udeo podeljenih i nepodeljenih ćelija u uzorku na osnovu postavljenog graničnika na citofluorimetrijskim profilima.

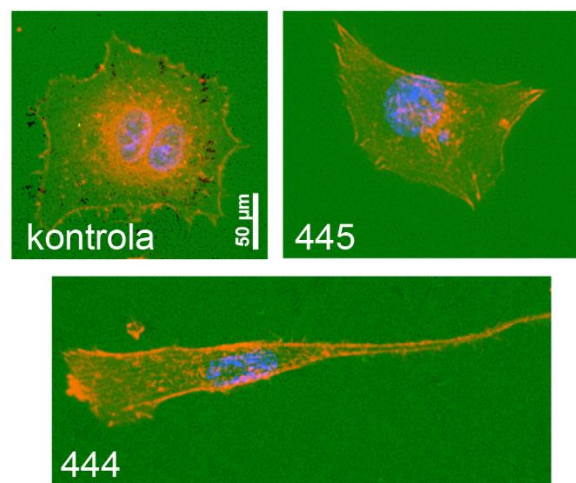
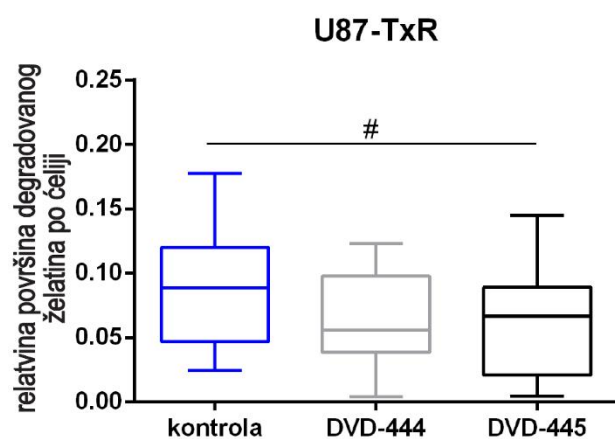
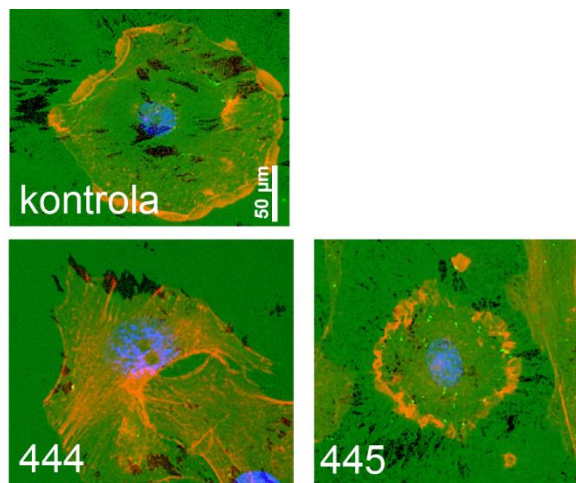
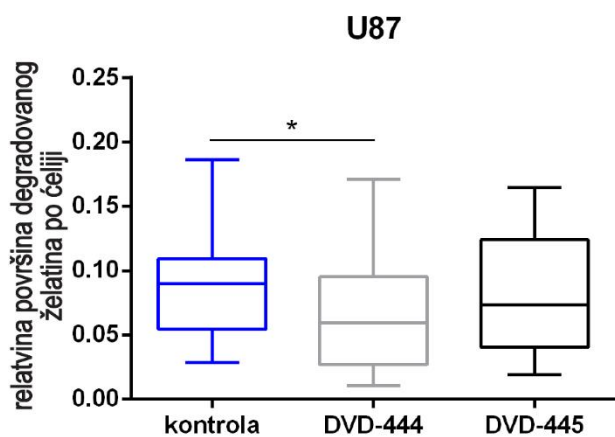
4.3.9. Efekat DVD-444 i DVD-445 na invaziju i migraciju ćelija glioma

Uticao DVD-444 i DVD-445 na invazivni i migratorni potencijal glioma analiziran je testom degradacije želatina (Slike 32, 33) i testom invazije kroz matrigel i transmembranske migracije (Slike 34, 35). Sposobnost ćelija tumora da razgrađuju vanćelijski matriks se podudara sa sposobnošću za degradaciju (razlaganje) želatina. Rezultati testa degradacije želatina, dobijeni nakon 24 h tretmana ćelija glioma sa $2 \mu\text{M}$ DVD-444 i $8 \mu\text{M}$ DVD-445, su predstavljeni na Slikama 33 i 34.

DVD-445 je značajno smanjila potencijal degradacije želatina kod C6 i RC6 (2 i 2,3 puta, redom, $p < 0,0001$, Slika 32), kao i U87-TxR ćelija (1,3 puta, $p < 0,05$, Slika 33). DVD-444 je suprimirala degradaciju želatina u rezistentnim RC6 (1,6 puta smanjenje, $p < 0,05$, Slika 32) i senzitivnim U87 ćelijama (1,5 puta smanjenje, $p < 0,05$, Slika 33).



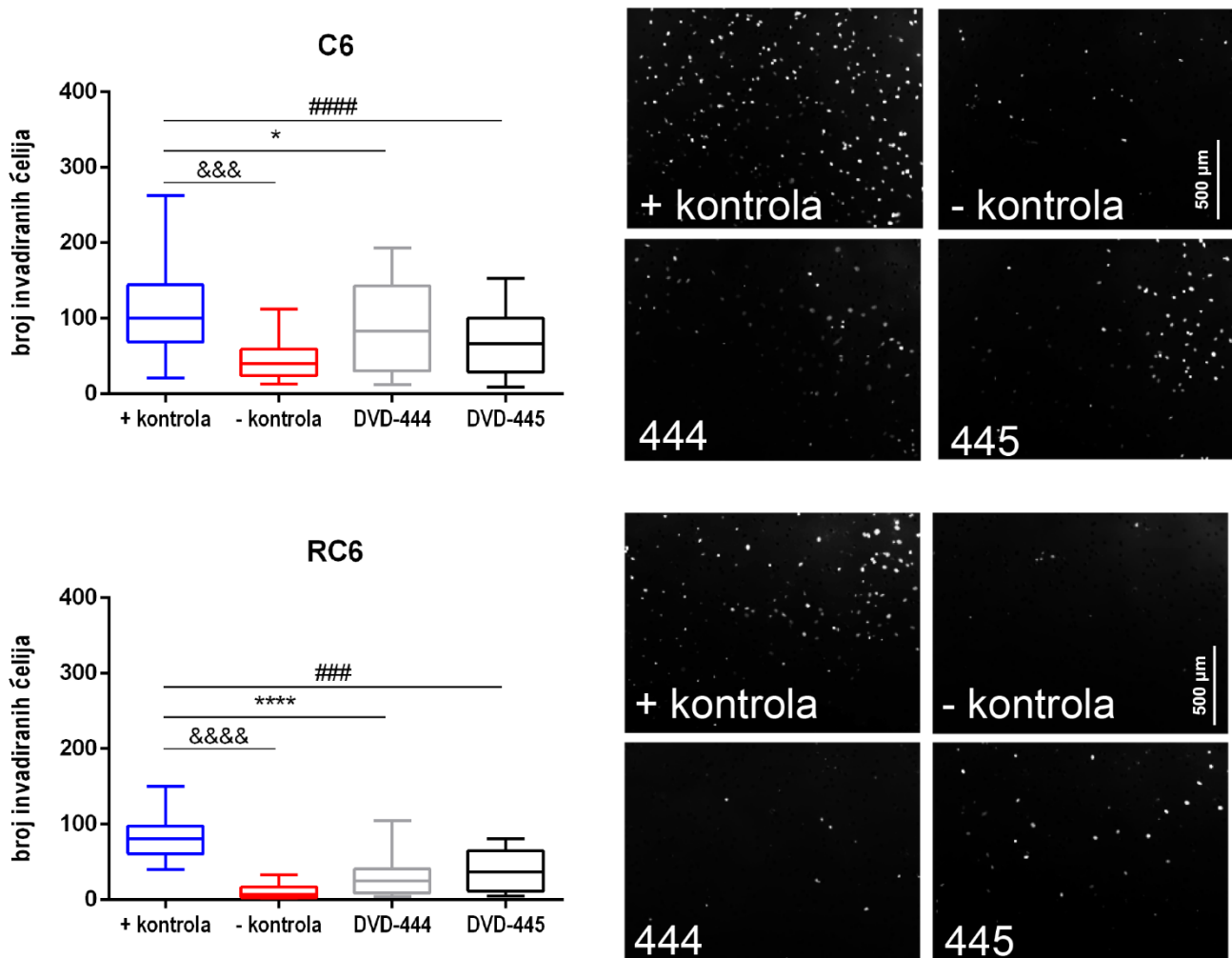
Slika 32. Degradacija želatina kod C6 i RC6 ćelija tretiranih sa DVD-444 i DVD-445. Reprezentativne slike degradacije želatina nakon 24 h tretmana se nalaze uz odgovarajuće boks dijagrame, koji predstavljaju kvantifikaciju odnosa razgrađene površine želatina prema ukupnom broju ćelija na analiziranoj površini. Prikazane su reprezentativne slike C6 i RC6 ćelija zasejanih na želatinu (zelena fluorescenca). ActinRed™ 555 služi za vizuelizaciju aktina (crvena fluorescenca), a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara (plava fluorescenca). Eksperimenti su ponovljeni tri puta (n = 3). Analizirano je minimum sto ćelija po grupi u svakom eksperimentu. Statistička značajnost razlike tretmana sa DVD-444 u odnosu na netretiranu kontrolu je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), a za DVD-445: $p < 0,0001$ (####). Skala = 50 µm.



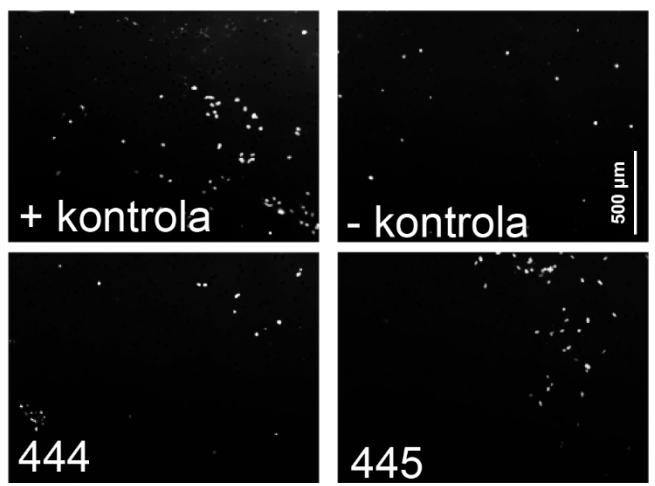
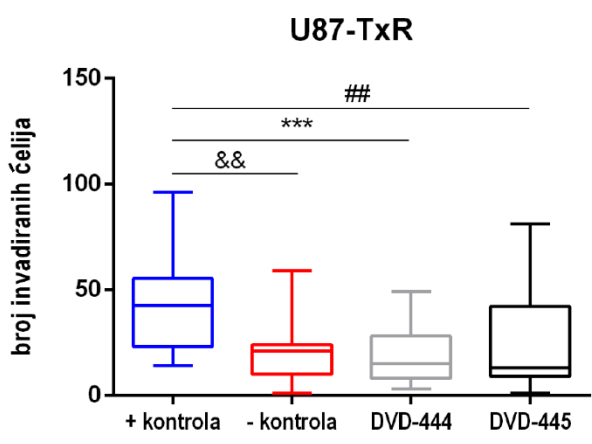
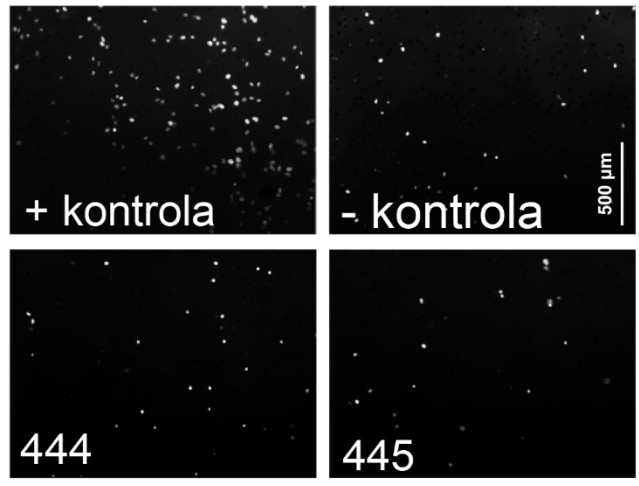
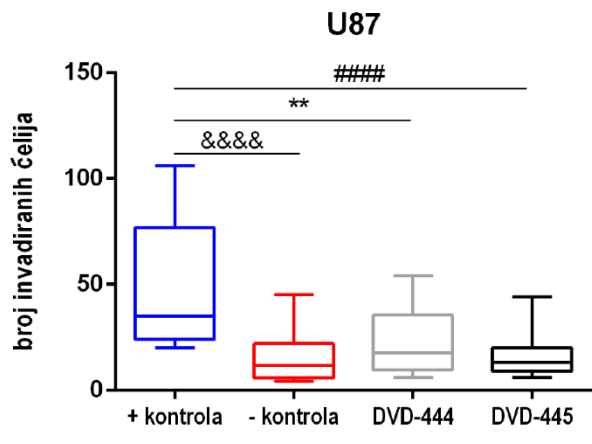
Slika 33. Degradacija želatina kod U87 i U87-TxR ćelija tretiranih sa DVD-444 i DVD-445. Reprezentativne slike degradacije želatina nakon 24 h tretmana se nalaze uz odgovarajuće boks dijagrame, koji predstavljaju kvantifikaciju odnosa razgrađene površine želatina prema ukupnom broju ćelija na analiziranoj površini. Prikazane su reprezentativne slike C6 i RC6 ćelija zasejanih na želatinu (zelena fluorescenca). ActinRed™ 555 služi za vizuelizaciju aktina (crvena fluorescenca), a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara (plava fluorescenca). Eksperimenti su ponovljeni tri puta ($n = 3$). Analizirano je minimum sto ćelija po grupi u svakom eksperimentu. Statistička značajnost razlike tretmana sa DVD-444 u odnosu na netretiranu kontrolu je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), a za DVD-445: $p < 0,05$ (#). Skala = 50 μm .

Dalje, testom invazije kroz matrigel i migracije kroz membranu je ispitan invazivni i migratorni potencijal ćelija glioma nakon 24 h tretmana sa DVD-444 i DVD-445. Obe supstance su značajno smanjile invazivni i migratorni potencijal ćelija glioma sve četiri ćelijske linije (Slike 34, 35). Najveće smanjenje uočeno je kod RC6 ćelija tretiranih sa DVD-444 (3,2 puta, Slika 34), i U87-TxR tretiranih sa DVD-445 (3,3 puta, Slika 35). Pored toga, tretman sa obe supstance je kod rezistentnih ćelija humanih glioblastoma doveo do maksimalnog efekta inhibicije invazije i migracije, s obzirom da su prikazani rezultati medijana za tretmane ovim supstancama približnih vrednosti kao negativna kontrola (Slika 35). Obe supstance su imale snažniji anti-invazivni i anti-

migratorni efekat kod obe rezistentne ćelijske linije u odnosu na njima odgovarajuće senzitivne ćelijske linije (Slike 34, 35).



Slika 34. Promene u invazivnom i migratornom potencijalu ćelija glioma pacova, tretiranih sa DVD-444 i DVD-445. Invazivni potencijal degradacije matrigela i migratorni potencijal kretanja kroz membranu C6 i RC6 ćelija je analiziran nakon 24 h tretmana. Boks dijagrami pokazuju broj ćelija, invadiranih kroz matrigel, do suprotne strane membrane. Pozitivna (+) kontrola sadrži FBS kao hemoatraktant u medijumu, dok je negativna (-) kontrola bez hemoatraktanta. Prikazane su reprezentativne slike migriranih C6 i RC6 ćelija. Rezultati su dobijeni iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta (n = 3). Statistička značajnost između ćelija tretiranih sa DVD-444 i netretirane pozitivne kontrole je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****), a sa DVD-445 kao DVD-445 kao $p < 0,001$ (###), $p < 0,0001$ (####). Razlika između pozitivne i negativne kontrole: $p < 0,001$ (&&&), $p < 0,0001$ (&&&&). Skala = 500 μm.



Slika 35. Promene u invazivnom i migratornom potencijalu humanih ćelija glioblastoma, tretiranih sa DVD-444 i DVD-445. Invazivni potencijal degradacije matrigela i migratorni potencijal kretanja kroz membranu U87 i U87-TxR ćelija je analiziran nakon 24 h tretmana. Boks dijagrami pokazuju broj ćelija, invadiranih kroz matrigel, do suprotne strane membrane. Pozitivna (+) kontrola sadrži FBS kao hemoatraktant u medijumu, dok je negativna (-) kontrola bez hemoatraktanta. Prikazane su reprezentativne slike migriranih U87 i U87-TxR ćelija. Rezultati su dobijeni iz tri nezavisno ponovljena eksperimenta (n = 3). Statistička značajnost između ćelija tretiranih sa DVD-444 i netretirane pozitivne kontrole je prikazana na sledeći način: $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), a sa DVD-445 kao $p < 0,01$ (##), $p < 0,0001$ (####). Razlika između pozitivne i negativne kontrole: $p < 0,01$ (&&), $p < 0,0001$ (&&&&). Skala = 500 µm.

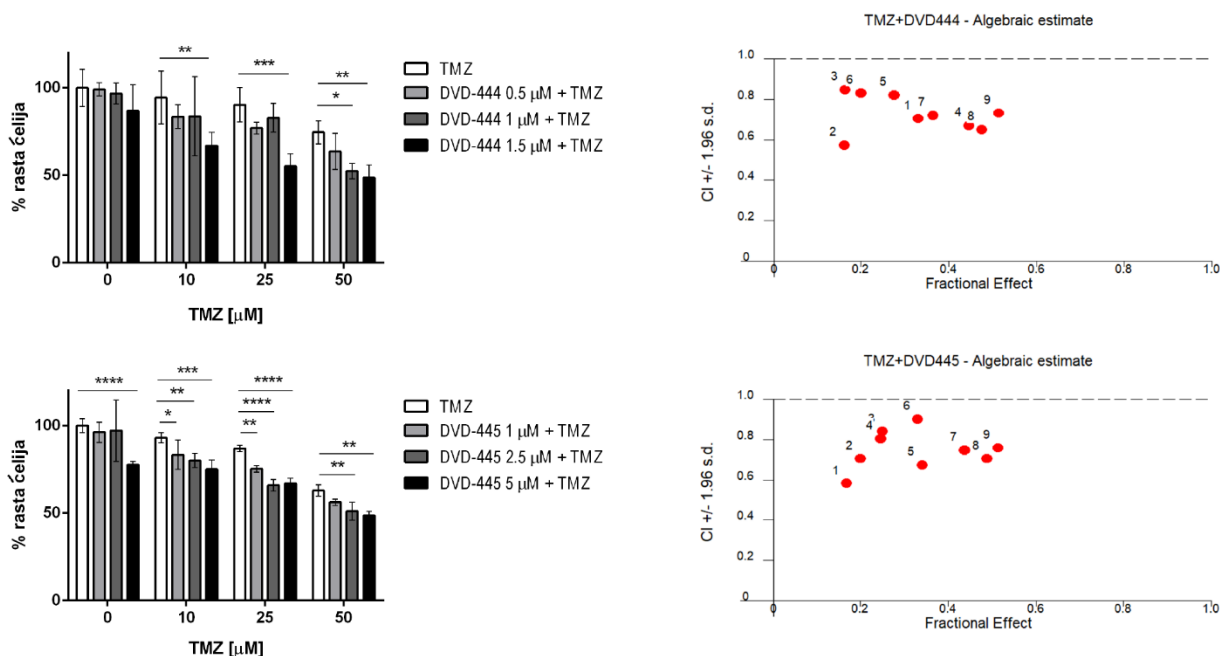
4.4. DVD-444 i DVD-445 u kombinaciji sa drugim antitumorskim supstancama

4.4.1. DVD-444 i DVD-445 povećavaju osetljivost ćelija glioma na TMZ

Interakcija dejstva DVD-444 i DVD-445 sa TMZ u istovremenim kombinovanim tretmanima na ćelijama glioma je analizirana MTT testom (Slike 36-39). Opaženo je značajno povećanje inhibicije ćelijskog rasta C6 ćelija sa povećanjem koncentracija DVD-444 i DVD-445, u kombinaciji sa 50 μM TMZ (Slika 36). Dozno-zavisno smanjenje ćelijskog rasta RC6 ćelija je zabeleženo u istovremenom tretmanu sa 100, 250 i 500 μM TMZ i rastućim koncentracijama DVD-445 (Slika 37), kao i ćelija U87 u kombinacijama 10, 25 i 50 μM TMZ sa rastućim koncentracijama DVD-444 (Slika 38).

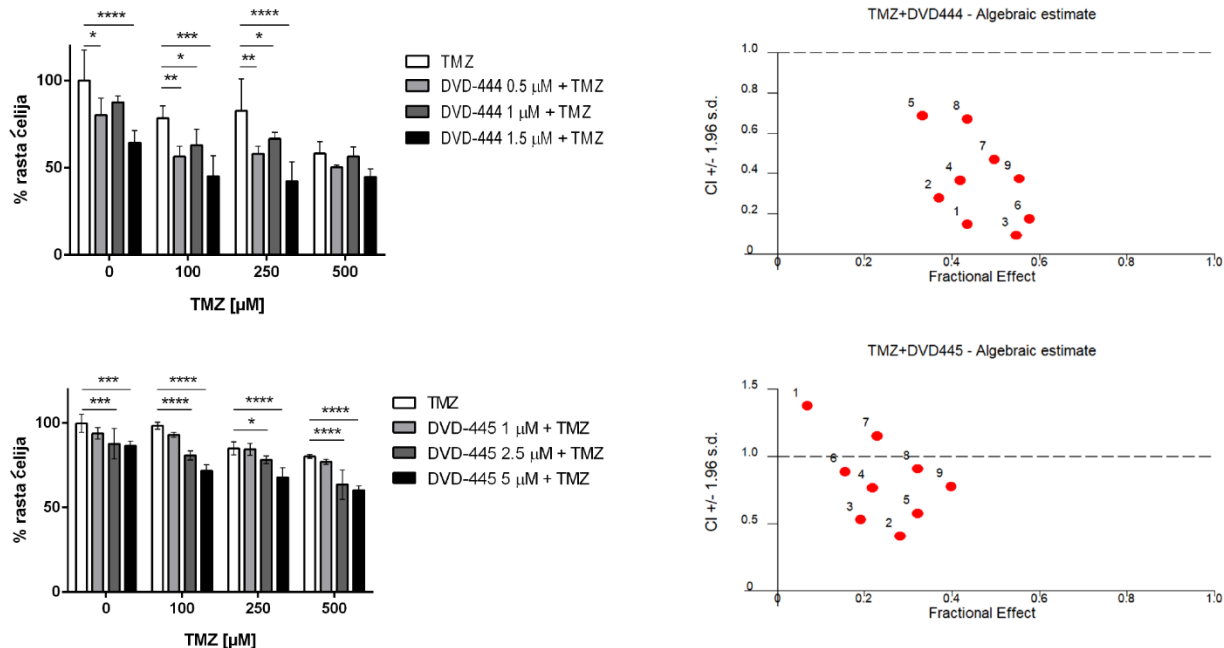
Priroda uzajamnog dejstva DVD-444 sa TMZ, kao i DVD-445 sa TMZ utvrđena je izračunavanjem kombinacionog indeksa (CI) kompjuterskim softverom „CalcuSyn“. Većina ispitanih kombinacija su pokazale aditivni (vrednost CI blizu 1) ili sinergistički (CI < 1) odnos između analiziranih supstanci. Značajno je da su i kod RC6 ćelija, koje su rezistentne na TMZ, DVD-444 i DVD-445 povećale osetljivost na TMZ (Slika 37). Kod U87-TxR, iako kombinovani tretmani TMZ i DVD-444 pokazuju snažnu inhibiciju ćelijskog rasta, sa oko 50% vijabilnih ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu pri najvećim koncentracijama 50 μM TMZ i 1,5 μM DVD-444, značajan udeo kombinacija tretmana TMZ sa DVD-444 su ispoljili antagonistički efekat (Slika 39). Na slici 39 prikazano je da niže koncentracije DVD-445 (1 i 2,5 μM) imaju snažniji efekat inhibicije u kombinaciji sa 10, 25 i 50 μM TMZ, u poređenju sa 5 μM DVD-445 i istim koncentracijama TMZ.

C6



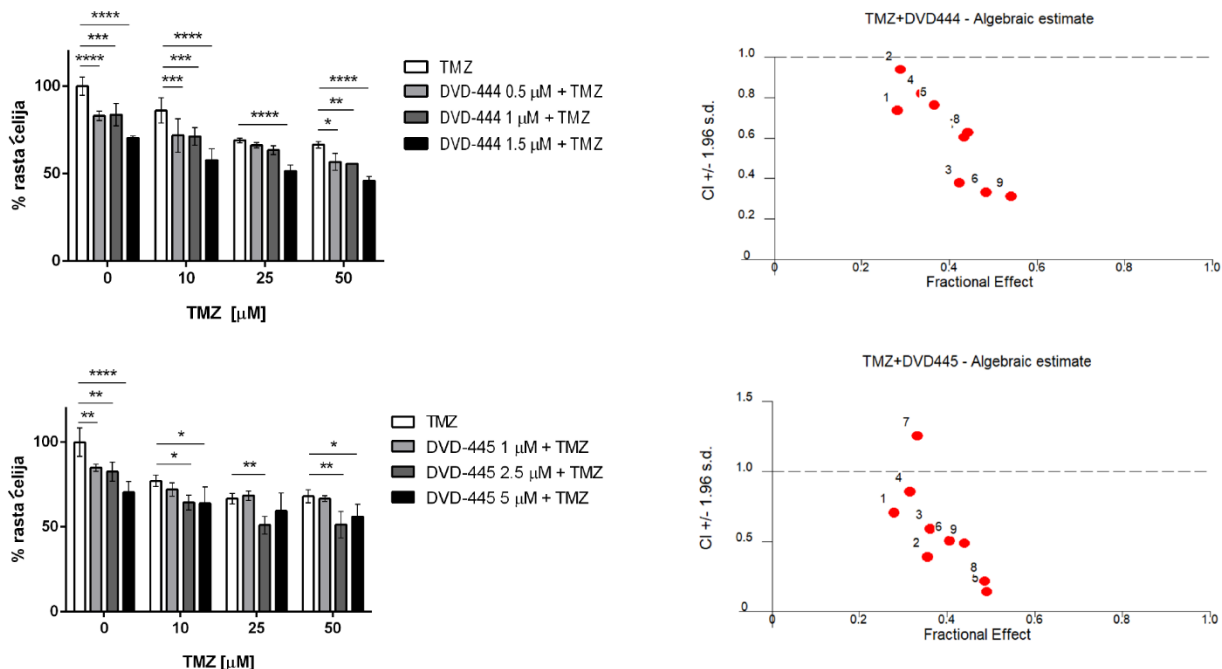
Slika 36. Efekat kombinacije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ na C6 ćelije. Efekat TMZ na inhibiciju ćelijskog rasta, pojedinačno i u kombinaciji sa supstancama DVD-444 i DVD-445, je određen MTT testom. Srednje vrednosti \pm SEM su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost u odnosu na pojedinačni tretman sa TMZ je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Interakcije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ su analizirane CalcuSyn softverom. „CI“ – eng. *confidence interval*. CI blizu 1 ukazuje na aditivni efekat, CI < 1 na sinergizam, a CI > 1 na antagonizam.

RC6



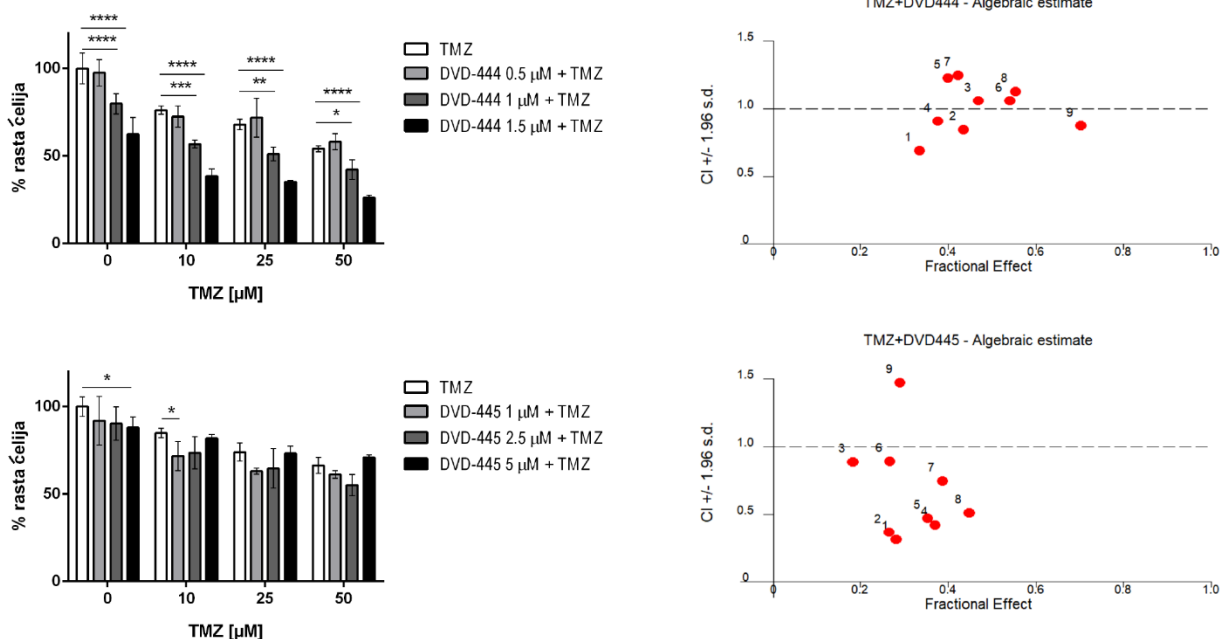
Slika 37. Efekat kombinacije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ na RC6 ćelije. Efekat TMZ na inhibiciju ćelijskog rasta, pojedinačno i u kombinaciji sa supstancama DVD-444 i DVD-445, je određen MTT testom. Srednje vrednosti \pm SEM su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost u odnosu na pojedinačni tretman sa TMZ je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Interakcije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ su analizirane CalcuSyn softverom. „CI“ – eng. *confidence interval*. CI blizu 1 ukazuje na aditivni efekat, CI < 1 na sinergizam, a CI > 1 na antagonizam.

U87



Slika 38. Efekat kombinacije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ na U87 ćelije. Efekat TMZ na inhibiciju ćelijskog rasta, pojedinačno i u kombinaciji sa supstancama DVD-444 i DVD-445, je određen MTT testom. Srednje vrednosti \pm SEM su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost u odnosu na pojedinačni tretman sa TMZ je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Interakcije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ su analizirane CalcuSyn softverom. „CI“ – eng. *confidence interval*. CI blizu 1 ukazuje na aditivni efekat, $CI < 1$ na sinergizam, a $CI > 1$ na antagonizam.

U87-TxR

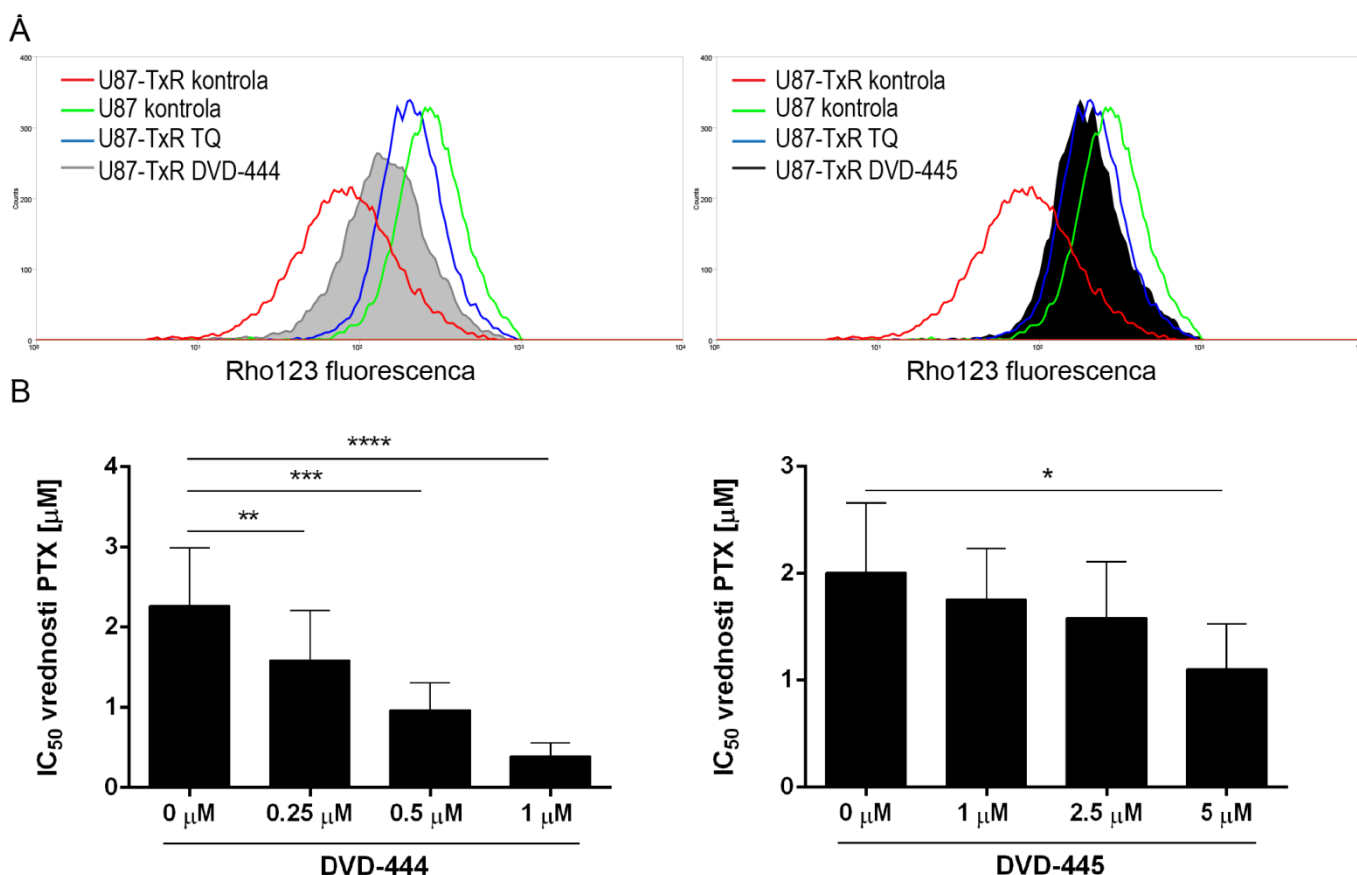


Slika 39. Efekat kombinacije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ na U87-TxR ćelije. Efekat TMZ na inhibiciju ćelijskog rasta, pojedinačno i u kombinaciji sa supstancama DVD-444 i DVD-445, je određen MTT testom. Srednje vrednosti \pm SEM su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost u odnosu na pojedinačni tretman sa TMZ je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****). Interakcije DVD-444 i DVD-445 sa TMZ su analizirane CalcuSyn softverom. „CI“ – eng. *confidence interval*. CI blizu 1 ukazuje na aditivni efekat, $CI < 1$ na sinergizam, a $CI > 1$ na antagonizam.

4.4.2. Supstance DVD-444 i DVD-445 utiču na aktivnost P-gp pumpe i povećavaju osetljivost rezistentnih humanih glioblastoma na PTX

Interakcija DVD-444 i DVD-445 sa membranskim pumpom P-gp je analizirana na osnovu unutarćelijske akumulacije P-gp supstrata Rho123 u U87-TxR ćelijama (Slika 40A). U87-TxR ćelije imaju povišenu ekspresiju P-gp. Akumulacija Rho123 u tretiranim ćelijama U87-TxR je upoređena sa netretiranom kontrolom i netretiranim kontrolnim uzorkom senzitivne ćelijske linije, U87. Kao pozitivna kontrola inhibicije P-gp upotrebljen je poznati, nekompetitivni inhibitor pumpe, TQ. Na Slici 40A predstavljeni su reprezentativni citofluorimetrijski profili akumulacije Rho123. Obe supstance su dovele do povećane akumulacije Rho123 u ćelijama U87-TxR, pri koncentracijama od 1 μ M za DVD-444 i 5 μ M za DVD-445.

Dalje je ispitan potencijal inhibitora TrxR1 da povećavaju osetljivost U87-TxR ćelija na PTX (Slika 40B). Efekat istovremenog kombinovanog tretmana DVD-444 (0,25, 0,5 i 1 μ M) i DVD-445 (1, 2,5 i 5 μ M), sa PTX je analiziran MTT testom nakon 72 h. Navedene koncentracije za obe supstance su niže od njihovih IC_{50} vrednosti, koje iznose približno 2 μ M za DVD-444 i 8 μ M za DVD-445. Obe supstance su dovele do povećanja osetljivosti U87-TxR ćelija na PTX. DVD-444 je na dozno-zavisan način doveo do smanjenja IC_{50} vrednosti za PTX, dok su sve primenjene koncentracije DVD-445 na sličan način smanjile IC_{50} vrednosti za PTX. Povećanje osetljivosti U87-TxR ćelija na PTX je bilo više izraženo nakon kombinovanog tretmana PTX sa DVD-444.



Slika 40. DVD-444 i DVD-445 inhibiraju funkciju P-gp i povećavaju osetljivost U87-TxR na PTX. (A) Citofluorimetrijski profili akumulacije Rho123 u netretiranim U87 i U87-TxR ćelijama, kao i U87-TxR ćelijama tretiranim sa 1 μM DVD-444, 5 μM DVD-445 i 50 nM TQ. Prikazani su reprezentativni citofluorimetrijski profili iz tri ponovljena eksperimenta (n = 3). (B) Relativna reverzija rezistencije U87-TxR na PTX u kombinaciji sa relativno niskim koncentracijama DVD-444 i DVD-445. Statistička značajnost između pojedinačnog tretmana sa PTX i kombinovanih tretmana PTX sa DVD-444 ili DVD-445 je prikazana na sledeći način: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***) i p < 0,0001 (****).

4.5. Analizi supstance DVD-445

Nakon ispitivanja inhibitornih i antitumorskih svojstava UMA, supstanca DVD-445 je izdvojena kao vodeća supstanca za dalji razvoj analoga sa većim prinosom u Ugi-Majklovoj reakciji sinteze i unapređenim osobinama inhibicije TrxR1. Tako je sintetisana nova serija od 34 analoga DVD-445 [189]. Supstance su prvobitno ispitane u testu sa proteinima ćelijskog lizata, pri koncentraciji od 5 μM. Kao pozitivna kontrola korišćen je ATM. Odabrano je 7 supstanci (1, 3, 4, 7, 9, 20, 34) sa najvećim procentom inhibicije TrxR pri datoj koncentraciji. Za svih 7 supstanci potvrđena je specifična inhibicija TrxR1 u testu sa rekombinantnom TrxR1 pacova. Od 7 analoga DVD-445, 3 supstance (1, 9 i 34) su imale IC₅₀ vrednosti inhibicije TrxR1 niže od IC₅₀ vrednosti dobijene za DVD-445 (Tabela 10). Supstanca 9 je inhibirala 85% aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu pri koncentraciji od 5 μM, dok je uspešnost inhibicije DVD-445 pri koncentraciji od 10 μM bila oko 58%. IC₅₀ za inhibiciju čistog enzima TrxR1 je bila u nanomolarnom opsegu, tačnije 190 nM, naspram 600 nM za DVD-445.

Tabela 10. Inhibitorna svojstva analoga DVD-445 i njihov uticaj na rast U87, U87-TxR i MRC-5 ćelija.

Supstance	% inhibicije aktivnosti TrxR pri 5 μM^a	IC ₅₀ , μM				RFS ^d
		TrxR1 pacova	U87 ^c	U87-TxR ^c	MRC-5 ^c	
1	82,7	0,59 ± 0,03	6,96±1,85	6,14±1,31	14,25±3,95	2,2
3	33,0	1,50 ± 0,08	7,89±0,91	8,41±0,91	13,34±3,93	1,6
4	50,2	3,37 ± 0,17	7,07±0,96	6,05±1,42	12,99±3,98	2,0
7	64,0	5,00 ± 0,25	8,34±2,05	6,14±1,31	14,76±4,18	2,0
9	84,6	0,19 ± 0,01	7,13±1,26	7,74±1,46	17,78±8,35	2,4
20	53,0	3,20 ± 0,16	7,02±0,78	7,77±0,86	14,06±6,05	1,9
34	68,8	0,37 ± 0,02	5,89±2,54	11,72±316	14,25±3,95	1,6
DVD-445	17,0 - 57,8 ^b	0,60 ± 0,09	8,90±1,12	8,54±0,92	11,85±2,11	1,4
ATM	87,5	0,36 ± 0,02	NO	NO	NO	NO

^aInhibicija aktivnosti TrxR1 ispitana na ćelijskom lizatu SH-SY5Y pri koncentracijama od 5 μM . ^bProcenat inhibicije aktivnosti TrxR u ćelijskom lizatu SH-SY5Y pri koncentraciji od 10 μM DVD-445 je iznosio 57,8%, a pri koncentraciji od 2 μM 17,0%. Efekat 5 μM DVD-445 nije ispitan. ^cMTT testom je određena IC₅₀ vrednost inhibicije ćelijskog rasta. ^dRelativan faktor selektivnosti (RFS) je predstavljen kao odnos IC₅₀ vrednosti normalne ćelijske linije i prosečne IC₅₀ vrednosti u ćelijskim linijama glioblastoma ($RFS = IC_{50} [MRC-5] / [(IC_{50} [U87] + IC_{50} [U87-TxR]) / 2]$). "NO" – nije određeno.

4.5.1. Ispitivanje selektivnosti analoga DVD-445 ka tumorskim ćelijama

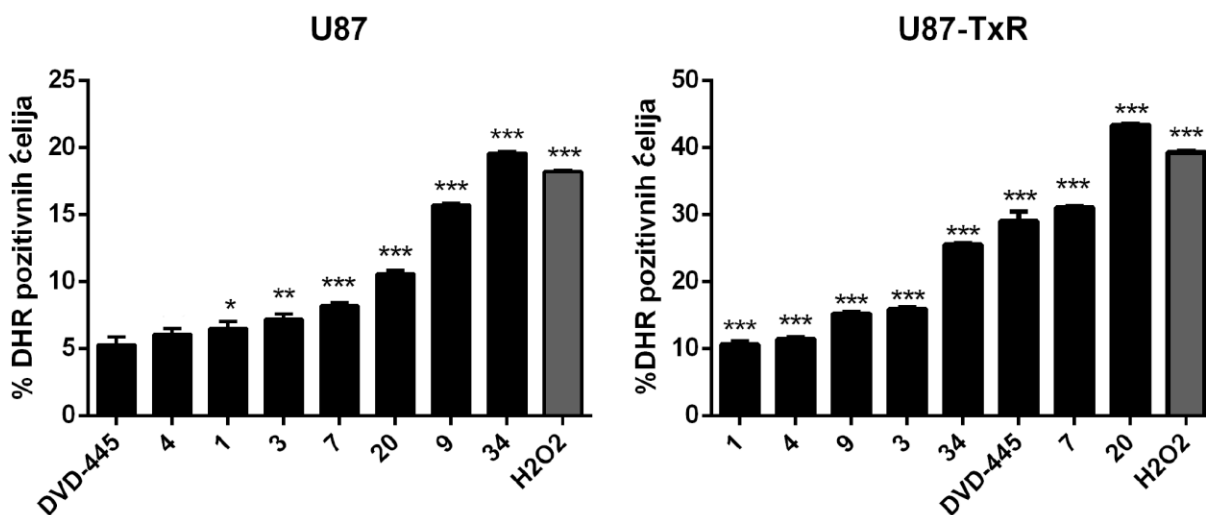
Efekat analoga DVD-445 (1, 3, 4, 7, 9, 20, 34) na inhibiciju ćelijskog rasta senzitivnih i rezistentnih humanih ćelija glioblastoma (U87 i U87-TxR), kao i normalnih, humanih embrionalnih ćelija fibroblasta pluća (MRC-5) je dalje analiziran MTT testom (Tabela 10).

Uporedna analiza inhibicije ćelijskog rasta humanih ćelija glioblastoma, pokazuje da supstance 1, 3, 4, 7, 9 i 20 imaju sličan efekat na senzitivnim U87 i rezistentnim U87-TxR ćelijama. Izvestan stepen rezistencije je pokazala supstanca 34 zbog dva puta veće IC₅₀ vrednosti kod U87-TxR, u odnosu na U87 ćelije (Tabela 10). Selektivnost ka tumorskim ćelijama 7 analoga DVD-445 je ispitana poređenjem inhibicije ćelijskog rasta kod ćelija glioblastoma i normalnih ćelija. Svih 7 ispitanih analoga su imali $1,4 < RFS < 2,4$ što ukazuje na umerenu selektivnost (Tabela 10). Najveći faktor selektivnosti ka tumorskim ćelijama je pokazala supstanca 9 (RFS = 2,4), koja je ujedno imala i najveći stepen inhibicije TrxR u ćelijskom lizatu pri koncentraciji od 5 μM (84,6 % inhibicije u odnosu na kontrolnu reakciju aktivnosti TrxR, Tabela 10). Takođe, ova supstanca je imala i najnižu IC₅₀ vrednost za specifičnu inhibiciju rekombinantnog TrxR1 enzima (Tabela 10).

4.5.2. Indukcija oksidativnog stresa

Potencijal analoga DVD-445 (1, 3, 4, 7, 9, 20 i 34) da indukuju akumulaciju RONS kod ćelija humanih glioblastoma je ispitan obeležavanjem ćelija DHR bojom nakon 24 h tretmana. Koncentracija tretmana iznosila je 10 μM za sve supstance. Kao pozitivna kontrola korišćen je 1 mM H_2O_2 .

Tretman analozima je doveo do povećanja koncentracije vodonik-peroksida i peroksinitrita, što je pokazano citofluorimetrijskim merenjem oksidovane DHR boje (Slika 41). Kod U87 ćelija povećanje koncentracije RONS je bilo u opsegu 5 – 20%, pri čemu je tretman ćelija 1 mM H_2O_2 u trajanju od 24 h takođe doveo do promene od oko 20%. Najizraženiji efekat u pogledu indukcije RONS kod U87 ćelijske linije pokazale su supstance 9 i 34. Kod U87-TxR ćelija, povećanje koncentracije RONS je bilo u opsegu od 10 - 40%, pri čemu je H_2O_2 doveo do povećanja od 39,3%. U ćelijskoj liniji U87-TxR najveći efekat povećanja RONS je pokazala supstanca 20 (43,3% povećanja u odnosu na kontrolu).

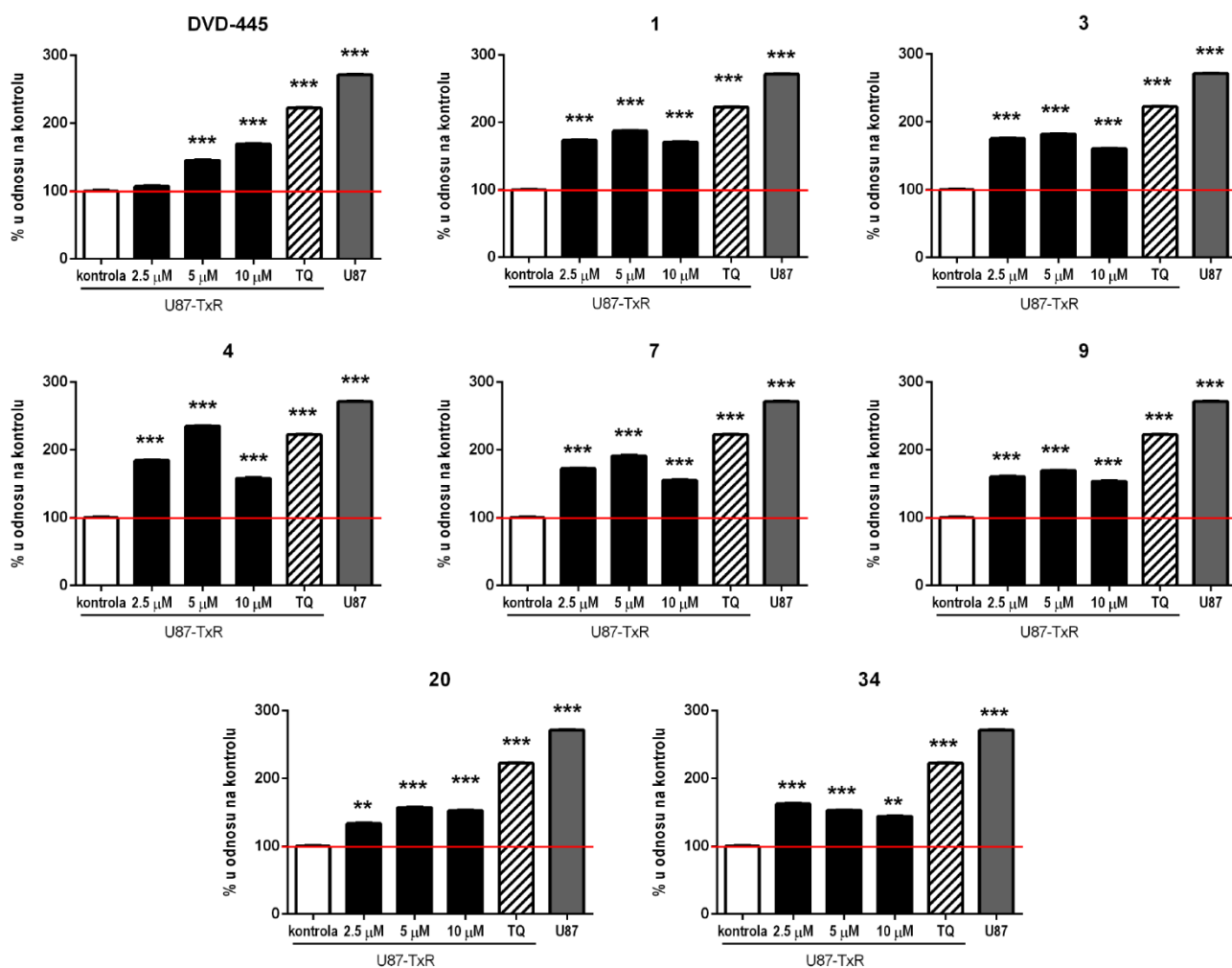


Slika 41. Detekcija RONS kod U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana DVD-445 i njegovim analozima. Ćelije humanih glioblastoma su obeležene DHR bojom nakon 24 h tretmana. Kao pozitivna kontrola indukcije oksidativnog stresa korišćen je 1 mM H_2O_2 . „% DHR pozitivnih ćelija“ – procenat ćelija u tretiranom uzorku sa signalom fluorescence većim od onog u netretiranim, kontrolnim ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost razlike između tretmana i netretirane kontrole je prikazana na sledeći način: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4.5.3. Interakcija analoga DVD-445 sa P-gp pumpom

Interakcija sedam DVD-445 analoga sa P-gp pumpom je ispitana citofluorimetrijski u testu akumulacije Rho123 u U87-TxR ćelijama (Slike 42, 43). Akumulacija Rho123 negativno je povezana sa funkcionalnošću P-gp: što je akumulacija Rho123 veća, to je aktivnost P-gp pumpe manja. Dva tipa tretmana su primenjena u testu – akutni tretman supstancama (30 min) sa istovremenim dodavanjem Rho123 fluorescentne boje i produženi tretman od 72 h, koji prethodi procesu fluorescentnog obeležavanja ćelija sa Rho123.

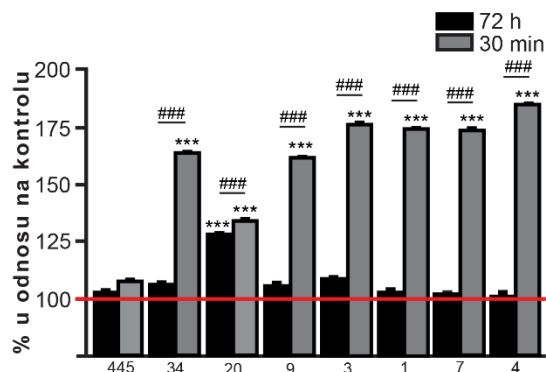
U akutnom tretmanu, ispitane su po tri koncentracije (2,5, 5 i 10 μM) DVD-445 i 7 analoga DVD-445, pri čemu je kao pozitivna kontrola u testu korišćen poznati inhibitor P-gp, TQ (Slika 42). Svih 8 supstanci su pokazale povećanje akumulacije Rho123, što ukazuje na značajni potencijal inhibicije aktivnosti P-gp. Samo je supstanca DVD-445 pokazala dozno-zavisnu inhibiciju u ispitanom opsegu koncentracija, dok je kod ostalih supstanci najveći stepen inhibicije P-gp postignut pri koncentraciji 5 μM . Svih 7 analoga supstance DVD-445 su imali veći potencijal inhibicije P-gp aktivnosti od originalne supstance, pri čemu je supstanca 4 (5 μM) pokazala sličnu efikasnost kao TQ (50 nM).



Slika 42. Efekat analoga DVD-445 u akutnom tretmanu na aktivnost P-gp u U87-TxR ćelijama. Ćelije U87-TxR su simultano tretirane sa Rho123 i sa po tri koncentracije DVD-445, 1, 3, 4, 7, 9, 20 i 34 (2,5, 5 i 10 μM). Kao kontrolni uzorci su upotrebljene U87-TxR ćelije tretirane TQ, kao i senzitivna ćelijska linija U87. Rezultati su predstavljeni kao reprezentativne vrednosti intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta ($n = 3$). Statistička značajnost razlike između tretmana i netretirane kontrole je prikazana na sledeći način: $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***).

Rezultati analize produženog tretmana (72 h) na aktivnost P-gp prikazani su na Slici 43. U produženom tretmanu upotrebljena je koncentracija supstanci koja dovodi do inhibicije P-gp u akutnom tretmanu, a istovremeno nema značajan citotoksični efekat na U87-TxR ćelije (2,5 μM).

Efekat inhibicije P-gp aktivnosti za supstance 1, 3, 4, 7, 9 i 34 je u potpunosti izostao u produženom tretmanu, dok je za supstancu 20 taj efekat ostao kvantitativno približno isti kao u akutnom tretmanu (približno 30% povećanja akumulacije Rho123).



Slika 43. Efekat analoga DVD-445 u produženom tretmanu na aktivnost P-gp u U87-TxR ćelijama. U87-TxR su tretirane sa 2,5 μ M DVD-445, 1, 3, 4, 7, 9, 20 i 34. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta (n = 3). Statistička značajnost razlike akutnog tretmana u odnosu na netretiranu kontrolu (crvena linija) je prikazana na sledeći način: p < 0,001 (***) , a razlike u akutnom i produženom tretmanu kao p < 0,001 (###).

5. DISKUSIJA

Razvoj novih terapijskih strategija za tumore koji nisu učestali u populaciji, poput glioblastoma ili neuroblastoma, predstavlja poseban izazov – često problem leži i u sprovođenju kliničkih ispitivanja na malom broju pacijenata. Opet, ista vrsta tumora može biti veoma heterogena kod različitih pacijenata, te i odgovor na terapiju može veoma da se razlikuje. Jedan od najvećih problema u lečenju tumora je razvijanje rezistencije na terapiju, pri čemu ćelije tumora, sticanjem rezistencije na jedan hemioterapeutik, postaju otporne na dejstvo više različitih hemioterapeutika. Ćelije otporne na antitumorske lekove formiraju rezistentnu populaciju i nakon prvobitnog odgovora na terapiju dovode do ponovnog rasta tumora. Zbog toga je od ogromnog značaja molekularna karakterizacija tumora i detaljno proučavanje patologije, kao i mehanizama koji leže u osnovi urođene i stečene rezistencije na terapiju. Istovremenim ciljanjem više molekulskih mehanizama, smanjuje se verovatnoća da ćelija tumora može da razvije rezistenciju. Pokazano je da povišen nivo RONS, kao posledica metaboličkih promena u tumorskim ćelijama, doprinosi malignitetu i progresiji tumora. Ćelije se prilagođavaju oksidativnom stresu povećanom ekspresijom i aktivnošću proteina antioksidativnih, redoks sistema. Utvrđeno je da postoji korelacija između adaptacije na oksidativni stres i povećane rezistencije na lekove, što molekule redoks sistema, poput TrxR1, čini privlačnim metama za razvoj novih terapeutika. Inhibitori TrxR1 do sada nisu proučavani kao vid terapije za lečenje glioblastoma i neuroblastoma.

Predmet ove doktorske disertacije bila je selekcija novosintetisanih UMA koje ispoljavaju inhibitorno dejstvo prema TrxR1, a potom proučavanje njihovih antitumorskih efekata na humanim ćelijama neuroblastoma i glioblastoma. Iz prve serije UMA inhibitora, prema ispoljenim poželjnim osobinama, kao što su potentna inhibicija TrxR1 i citotoksični efekti koji indukuju oksidativni stres u ćelijama tumora, odabrane su dve supstance, DVD-444 i DVD-445, za dalje proučavanje njihovog mehanizma delovanja na senzitivnim i rezistentnim ćelijama glioma pacova i čoveka. Oba TrxR1 inhibitora su pokazala potencijal da povećaju osetljivost ćelija glioma na dejstvo konvencionalnih hemioterapeutika. Potom je proučavano dejstvo analoga DVD-445 na senzitivnim i rezistentnim ćelijama humanih glioblastoma. Analozima su pokazali potentniju inhibiciju TrxR1, veću selektivnost ka tumorskim ćelijama i sposobnost interakcije sa P-gp pumpom.

5.1. Inhibicija aktivnosti TrxR1 u prisustvu UMA

TrxR1 redukuje Trx1 putem C-terminalnog aktivnog mesta, koje sadrži Sec [158, 215]. U ovom radu, za ispitivanje aktivnosti TrxR1 upotrebljeni su kolorimetrijski testovi, koji se zasnivaju na redukciji DTNB supstrata. Pokazali smo da 6 UMA (DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-443, DVD-444 i DVD-445) ispoljavaju direktan inhibitorni efekat na enzim TrxR1, i da, prema rezultatima dobijenim u insulinskom testu, inhibicija TrxR1 posledično inhibira celokupni Trx sistem. Samim tim, može se pretpostaviti da efekat UMA obuhvata katalitički aktivno Sec mesto enzima, od ključnog značaja za redukciju Trx1. TrxR1 sisara u oksidovanom stanju sadrži Cys-Sec selenil sulfidni most, a u redukovanom stanju tiol i selenolat [158]. S obzirom da je inhibitorni efekat Majklovih akceptora zasnovan na nukleofilnosti selenolata i da tiol/selenolat par lako interaguje sa elektrofilnim Majklovim akceptorima [216], inhibicija UMA supstancama je sa velikom verovatnoćom rezultat interakcije sa katalitički aktivnim centrom enzima.

Prethodno je pokazano da piperlongumin inhibira rast tumorskih ćelija, dovodi do povećanja RONS i izaziva ćelijsku smrt, ali sa relativno niskim citotoksičnim potencijalom [181], te je piperlongumin upotrebljen kao pozitivna kontrola citotoksičnog efekta Majklovog akceptora – TrxR inhibitora. U radu Zhenga i sar. (2020), vrednosti koncentracija IC₅₀ za inhibiciju rasta

humanih tumorskih ćelija su približne prikazanim u ovoj disertaciji, ~ 6 do 8 μM [181]., ali je piperlongumin u ovom radu pokazao dva puta veći efekat inhibicije ćelijskog rasta u normalnim, humanim HaCaT ćelijama, u poređenju sa tumorskim SH-SY5Y i U87.

Kovalentno vezivanje za tiol/selenolat zahteva da enzim bude u redukovanom stanju. U slučaju inhibicije kovalentnim vezivanjem Majklovih akceptora, tip vezivanja može biti reverzibilan i ireverzibilan [217]. U eksperimentalnom radu, postavljena je hipoteza da variranje zapremine inkubacione smeše može ukazati na prirodu kovalentne interakcije UMA sa TrxR1. Ukoliko je reakcija inhibicije ireverzibilna u predstavljenom sistemu testiranja, na to bi ukazao snažniji inhibitorni efekat u manjoj zapremini inkubacione smeše. Dobijeni rezultati jesu ukazali na trend snažnije inhibicije u manjoj zapremini inkubacije. Ipak, kolorimetrijski esej redukcije DTNB kao supstrata nije dovoljan dokaz za formiranje konačnog zaključka o prirodi kovalentne inhibicije TrxR1 Ugi-tipom Majklovih akceptora. Hemijska priroda i mehanizam inhibicije TrxR1 UMA supstancama zahteva dalja istraživanja.

Šest testiranih UMA su pokazali viši inhibitorni potencijal kada je NADPH bio prisutan u reakcionoj smeši tokom perioda inkubacije, što ukazuje da supstance u većoj meri interaguju sa redukovanom formom enzima. Kovalentna inhibicija i interakcija sa redukovanom formom enzima je relativno uobičajena za TrxR1 inhibitore [216].

Citosol proliferišućih ćelija odlikuju reduktivni uslovi [218] koji favorizuju redukovanu formu TrxR1. Zato smo pretpostavili da UMA mogu biti više citotoksične za proliferišuće ćelije, kao što su tumorske, u odnosu na slabo ili nimalo proliferišuće normalne ćelije.

5.2. Selektivnost UMA ka ćelijama neuroblastoma i glioblastoma

Povišene ekspresije Trx i TrxR su uobičajene osobine ćelija tumora [142, 219-222], a u korelaciji su sa progresijom tumora i lošijom prognozom [148]. Pokazano je da je ekspresija TrxR povišena u ćelijama glioblastoma i neuroblastoma, kao i da povišena ekspresija TrxR1 utiče na diferencijaciju i adheziju SH-SY5Y ćelija neuroblastoma [223].

U odgovoru na promenljivi oksidativni i hipoksični stres u tumorskom okruženju, usled promenljivog dotoka kiseonika, povećava se ekspresija proteina Trx sistema [109]. Redoks stanje unutar ćelije posttranskripciono reguliše ekspresiju TrxR1, što omogućava brzu reakciju prilagođavanja nivoa ekspresije u odgovoru na promene unutar ćelije [160]. Ipak, regulacija ekspresije dva proteina Trx sistema, TrxR1 i Trx1, nije međuzavisna – različite ćelije imaju visoku ekspresiju TrxR1, sa relativno niskom ekspresijom Trx1 i obrnuto [168]. Analiza ekspresije iRNK Trx1 i TrxR1 nije pokazala korelacionu zavisnost u normalnim ćelijama [224] i samo slabu pozitivnu korelaciju kod ćelijskih linija tumora [225]. Rezultati analize ekspresije iRNK *TRX1* i *TRXR1* u ćelijskim linijama U87, SH-SY5Y i HaCaT, prikazani u ovoj disertaciji, su u skladu sa prethodnim navodima, te je ekspresija *TRXR1* bila relativno niska kod HaCaT ćelijske linije, a ekspresija *TRX1* relativno visoka, dok je kod U87 situacija bila obrnuta, visoka ekspresija *TRXR1* i relativno niža ekspresija *TRX1*.

Oksidacijom glukoze i glutamina, ćelija tumora održava sastav dostupnih ugljeničnih intermedijera za sintezu makromolekula i obezbeđuje visok redoks potencijal u formi NADH i FADH_2 , neophodnih za sintezu ATP-a i NADPH, za transfer elektrona u biosintetskim reakcijama i održavanju redoks kapaciteta ćelije. Ćelije u cilju održavanja redoks regulacije antioksidativnih sistema i reduktivne sinteze održavaju visok odnos NADPH:NADP⁺ unutarćelijske sredine [218]. Redoks regulacija, kao i mnogi drugi fiziološki procesi, su u vezi sa Trx sistemom [109, 134, 168]. Visoko aktivan Trx sistem detoksifikuje povišeni nivo RONS unutar ćelija. Na taj način, Trx system

štiti i transformisane ćelije od RONS-indukovane ćelijske smrti [168]. S toga je bilo značajno ispitati da li nove UMA supstance utiču na nivo RONS ćelijskih linija neuroblastoma, glioblastoma i keratinocita. Nivo ROS nakon izlaganja ćelija UMA nije bio značajno promenjen nakon 24 h. Ovo se može objasniti visokom nestabilnošću superoksidnog anjona, koji se brzo transformiše u druge RONS vrste [226], pa je s time u vezi, u našim eksperimentalnim uslovima došlo do porasta drugih RONS (peroksinitrata i vodonik-peroksida) 24 h nakon tretmana sa UMA. Peroksinitrati su proizvod hemijske reakcije između nitrit oksida i superoksidnog anjona, dok SOD konvertuje superoksidni anjon do vodonik-peroksida. Prx su klasa enzima koji neutrališe štetne efekte vodonik-peroksida. Važno je istaći da su Prx supstrati za Trx1. Dalje, TrxR1 može i sama da redukuje vodonik-peroksid [227].

Najsnažniji efekat na nivo RONS nakon 24 h tretmana sa UMA je zabeležen u SH-SY5Y ćelijama. Snažniji efekat inhibitora u ovoj ćelijskoj liniji je verovatno posledica niže ekspresije TrxR1 i Trx1 u poređenju sa ćelijskim linijama U87 i HaCaT. Moguće je da viša ekspresija *TRXR1* u U87 i *TRX1* u HaCaT pružaju bolju zaštitu ovih ćelija od dejstva inhibitora Trx sistema. Međutim, testovi inhibicije ćelijskog rasta i metabolizma nisu ukazali na velike razlike u odgovoru proliferišućih ćelija na efekat UMA, sa izuzetkom DVD-439, koja kod U87 ima gotovo 3 puta veću vrednost IC_{50} u odnosu na SH-SY5Y i HaCaT. Samim tim, verovatnije je da se u ćelijama U87 i HaCaT RONS ispoljava putem drugih tipova slobodnih radikala, koji u ovim testovima nisu detektovani.

Prethodno je pokazano da elektrofilni inhibitori TrxR, čija meta je Sec C-terminalno aktivno mesto, dovode do povećanog oksidativnog stresa promocijom aktivnosti enzima TrxR1 koja funkcionalno postaje NAPDH oksidaza, što na kraju dovodi do apoptotične ili nekrotične ćelijske smrti [228]. Inhibicija TrxR1, praćena povećanjem RONS, dovodi do apoptoze, nekroze ili autofagije, u zavisnosti od model sistema i primenjenog inhibitora [155, 226]. U odgovoru na RONS, ćelije reaguju i ferroptozom, tipom programirane ćelijske smrti zavisne od gvožđa, kojoj prethodi akumulacija lipidnih peroksida [229, 230]. Pokazano je da TrxR1 štiti tumorske ćelije od ferroptoze [231]. Supstance DVD-438, DVD-440 i DVD-444 u značajnoj meri indukuju nekrotičnu ćelijsku smrt kod SH-SY5Y ćelija, verovatno zbog povećanja RONS. Supstance DVD-439 i DVD-443 nisu indukovale oksidativni stres, a ni ćelijsku smrt u značajnoj meri. Ipak, ove supstance ispoljavaju inhibitorni efekat na TrxR1 i inhibiraju ćelijski rast i metabolizam. Može se pretpostaviti da inhibicija ćelijskog rasta ovih supstanci ne zavisi isključivo od povećanja RONS, praćenog ćelijskom smrću. Takođe, moguće je da testovi gde se efekat supstance meri u jednoj vremenskoj tački nakon izlaganja ne mogu u potpunosti rasvetliti mehanizam dejstva TrxR inhibitora. U skladu sa ovim zapažanjima su i rezultati dobijeni sa supstancom DVD-445, koja nije dovela do promene u RONS nakon 24 h, ali jeste indukovala ćelijsku smrt 48 h nakon tretmana. U pogledu selektivnosti ka tumorskim ćelijama, rezultati analize ćelijske smrti ukazuju na veći citotoksični efekat UMA kod ćelija neuroblastoma (SH-SY5Y), nego kod normalnih keratinocita (HaCaT).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se nova serija UMA, sintetisanih kao peptidomimetički kovalentni inhibitori, može smatrati dobrim polaznim supstancama za razvoj TrxR1 inhibitora sa još izraženijim antitumorskim potencijalom.

Dva para senzitivnih i rezistentnih ćelijskih linija glioma su upotrebljena kako bismo utvrdili da li razlike u antioksidativnim kapacitetima ovih ćelija mogu uticati na njihov kapacitet da odgovore na oksidativni stres indukovani TrxR1 inhibitorima, kao i da li će višestruko rezistentne ćelije pokazati veću otpornost na UMA. Tretman UMA nije doveo do značajnih razlika u

odgovoru senzitivnih i rezistentnih ćelija na ćelijski rast, što ukazuje da fenotip višestruke rezistencije ne obezbeđuje u značajnoj meri preživljavanje rezistentnih ćelija glioma. Značajna promena RONS je detektovana u oba modela višestruko rezistentnih ćelijskih linija, uprkos razlikama u njihovom antioksidativnom potencijalu.

Supstance DVD-444 i DVD-445 imaju relativno niske IC₅₀ vrednosti za inhibiciju enzima TrxR1, kao i tioredoksinskog sistema, kao i izraženu citotoksičnu selektivnost ka proliferativnim ćelijama u odnosu na PBMcs, pri čemu na 4 ćelijske linije glioma imaju relativno ujednačene vrednosti. Pored toga, supstanca DVD-444 indukuje oksidativni stres kod ćelija glioma i neuroblastoma, pa je od šest testiranih UMA, supstanca DVD-444 odabrana za detaljno proučavanje molekularnih mehanizama dejstva. Molekularni mehanizami dejstva supstance DVD-445, kao najpotentnijeg inhibitora TrxR1 među sintetisanim UMA, su uporedo proučavani.

Kao najpotentniji i strukturno najzanimljiviji inhibitor u *in vitro* sistemu, supstanca DVD-445 je poslužila kao polazna osnova za dalju sintezu analognih supstanci, sa unapređenim svojstvima inhibicije TrxR1 i antitumorskim efektom.

5.3. Mehanizam delovanja DVD-444 i DVD-445 u senzitivnim i rezistentnim ćelijama glioma

Na osnovu detektovanih slobodnoradikalskih vrsta, ekspresije antioksidativnih enzima i perturbacije mitohondrijalnog membranskog potencijala, jasno je pokazano da novi inhibitori TrxR1 indukuju oksidativni stres kod oba modela višestruko rezistentnih ćelijskih linija.

Značajan porast u nivou RONS opažen je kod obe rezistentne ćelijske linije glioma. Kao što je očekivano, U87-TxR ćelije sa nižim antioksidativnim kapacitetom su bile u najvećoj meri podložne promenama u nivou RONS, dok je DVD-444 supstanca pokazala najviši kapacitet da indukuje porast nivoa RONS.

Porast količine reaktivnih vrsta u unutarćelijskoj sredini aktivira signalne puteve, koji utiču na povećanje ekspresije antioksidativnih enzima, pa je pokazatelj oksidativnog stresa unutar ćelije i promena u nivou ekspresije enzima koji održavaju redoks ravnotežu. Rezultati pokazuju da DVD-444 i DVD-445 indukuju značajne promene u ekspresiji antioksidativnih enzima u ispitivanim ćelijskim linijama.

Uočeno je povećanje ekspresije iRNK *TRX* i *TRXR1*, a povećanje ekspresije TrxR1 je dalje potvrđeno i imunoobeležavanjem tretiranih ćelija. Povećanje ekspresije proteina Trx sistema je u skladu sa smanjenom funkcijom, usled delovanja inhibitora TrxR1.

Trx i GSH sistem su dva osnovna redoks sistema unutar ćelije. Osim specifičnih uloga koje obavljaju unutar ćelije, ova dva sistema se u velikoj meri preklapaju u funkciji održavanja redoks statusa u ćeliji. Inhibicija jednog od sistema može za posledicu da ima povećanje aktivnosti drugog sistema. Stoga je, osim Trx sistema, ispitan i uticaj inhibitora TrxR1 na GSH sistem. Tretmani sa DVD-444 i DVD-445 su doveli do značajnih promena u ekspresiji *GPX1* i *GPX4* u sve četiri ćelijske linije glioma. GPx su antioksidativni enzimi, koji neutrališu perokside i eliminišu peroksinitrate, kako bi sprečili oksidativna oštećenja u ćeliji [232]. GPx1 je u najvećoj meri zastupljen u citosolu i smatra se jednim od glavnih enzima odgovornih za uklanjanje solubilnih peroksida, dok GPx4, lokalizovan u blizini membranskih sistema, štiti membrane ćelija od lipidne peroksidacije [233-235]. Smanjena ekspresija GPx1 u ćelijama tumora mozga dovodi do povećane osetljivosti na oksidativni stres [236], dok inhibicija GPx4 dovodi do akumulacije lipidnih hidroperoksida i ferroptoze [237, 238]. U uslovima ograničeno dostupnog selena, proteini zavisni od Sec su jedni drugima kompeticija za ovu aminokiselinu, a proteini od većeg značaja za preživljavanje ćelije se

favorizuju da prime Sec u proteinskoj sintezi [239]. Drugim rečima, TrxR je u kompeticiji sa GPx enzimima za Sec. Cai i sar. (2020) su pokazali da ćelije u kojima je TrxR1 utišana imaju povećanu sintezu GPx4, kao i da povećana sinteza GPx4 dovodi do izbegavanja ćelijske smrti feropozom [231]. Primena inhibitora TrxR1 je dovela do povišene sinteze *TRXR1*; moguće je da je sniženje ekspresije *GPX1* i *GPX4* posledica ograničenog Sec, koji je primarno usmeren ka sintezi TrxR1 u tumorskim ćelijama. Smanjenje ekspresije GPx enzima može značajno da doprinese opaženom citotoksičnom efektu testiranih supstanci. Pokazano je da dualna inhibicija aktivnosti enzima Trx i GSH sistema jeste efikasnija u indukciji ćelijske smrti, nego inhibicija pojedinačnih sistema [240, 241].

Tretmani sa DVD-444 i DVD-445 su indukovali i značajno povećanje ekspresije GST π . Poznato je da se ekspresija GST enzima povećava u prisustvu elektrofila (poput Majklovih akceptora), vezivanjem Nrf2 transkripcionog faktora za ARE sekvencu (koja se takođe naziva i element koji odgovara na elektrofile) u promotoru GST gena [242, 243]. Takođe je pokazano da GST enzimi doprinose antioksidativnoj odbrani katalizom redukcije organskih peroksida pomoću GSH [244]. U prilog tome idu i dobijeni rezultati koji su pokazali povišenu produkciju GSH pod dejstvom DVD-444 i DVD-445, kao i povišenu ekspresiju GR, koja GSSG redukuje nazad do GSH. Povišena produkcija GSH pokazana u ovoj studiji, verovatno je prouzrokovana povećanom akumulacijom peroksinitrata, jer je efikasno uklanjanje peroksinitrata jedna od njegovih važnih uloga u ćelijskoj odbrani od oksidativnog stresa [245].

Tretman sa DVD-444 je doveo do povećane ekspresije iRNK *MnSOD* i *CAT* u senzitivnim i rezistentnim ćelijskim linijama glioma. MnSOD konjuguje superoksidne anjone do vodonik-peroksida, dok CAT ima sličnu funkciju kao GPx i neutrališe vodonik-peroksid [246]. Moguće je da ćelije glioma oksidativni stres praćen smanjenjem GPx1, pri tretmanu sa DVD-444, pokušavaju da prevaziđu povećanom ekspresijom CAT. Međutim, Dokić i sar. [236] su pokazali da CAT ne može da kompenzuje u značajnoj meri smanjenje funkcije GPx1.

Promena u ekspresiji enzima antioksidativne zaštite u mitohondrijama ukazuje na promenu u mitohondrijalnom oksidativnom stresu [247]. Uočena depolarizacija mitohondrijalnog membranskog potencijala nakon tretmana sa DVD-444 odgovara povećanoj ekspresiji *MnSOD* kod RC6 ćelija. Promena u ekspresiji antioksidantnih enzima, zajedno sa depolarizovanim mitohondrijalnim membranskim potencijalom su snažan pokazatelj oksidativnog stresa unutar posmatranih ćelija.

Inhibicija TrxR, praćena oksidativnim stresom i depolarizovanim mitohondrijalnim membranskim potencijalom, za posledicu ima ćelijsku smrt [155, 226]. S tim u vezi, DVD-444 i DVD-445 su indukovale kasnu apoptozu i nekrozu u ćelijskim linijama glioma pacova. Inhibicija Trx sistema sa DVD-444 i DVD-445 je dovela do povećanja sadržaja ASK1 proteina u C6 i RC6 ćelijama, što je dalje dovelo do indukcije kasne apoptoze.

Kod humanih ćelijskih linija glioblastoma nije zapažena indukcija ćelijske smrti u značajnoj meri, uprkos smanjenju ćelijskog rasta nakon tretmana inhibitorima TrxR1. Ipak, proteinski sadržaj RNR je bio značajno smanjen nakon tretmana sa DVD-444 u U87-TxR ćelijama, što ima za posledicu smanjenje sinteze deoksiribonukleotida. S obzirom da je Trx donor protona za RNR i da omogućava ovom proteinu da vrši sintezu deoksiribonukleotida [248], ispitano je da li inhibitori TrxR1 imaju anti-proliferativno dejstvo na U87 i U87-TxR ćelije. Zaista, 2 μ M DVD-444 i 8 μ M DVD-445 supstance jesu smanjile proliferaciju obe ćelijske linije humanih glioblastoma, pri čemu je efekat bio više izražen u rezistentnim ćelijama sa supstancom DVD-444. Inhibicija TrxR i RNR izazvana hemioterapeutikom (moteksafin gadolinium) je takođe dovela do smanjenja proliferacije

tumorskih ćelija u radu Hashemy i sar. (2006) [249], dok je kod Hošikava i sar. (2010) [250] inhibicija Trx sistema posredovana povećanom ekspresijom TxNIP proteina imala slične efekte.

Nekroza je jedna od osnovnih osobina GBM, pri čemu je nekrotično tkivo tumora okruženo visoko invazivnim ćelijama. Kako bi preživele, ćelije GBM moraju da migriraju dalje od nekrotične oblasti. Difuzna infiltracija u okolno tkivo mozga je ograničavajući faktor hirurškog uklanjanja tumora i efikasan način za ćelije GBM da izbegnu radio- i hemioterapiju. Pored toga, ćelije GBM se, prema udaljenosti od krvnih sudova, razlikuju u količini kiseonika kojoj su izložene – ćelije blizu krvnog suda su izložene višim koncentracijama O₂, od hipoksičnih ćelija, udaljenih od krvnog suda. Hipoksične ćelije se oslanjaju na glukozu kao izvor energije i oslobađaju laktate kao metabolički višak, dok ćelije koje imaju veći dotok kiseonika koriste laktate kao primarni izvor energije. Tako, ove dve populacije formiraju simbiotski odnos, i pospešuju rast i progresiju tumora [251]. Akumulacija vanćelijskih laktata doprinosi acidifikaciji vanćelijske sredine, čime se stimuliše proteolitička aktivnost matriksnih metaloproteinaza, koje razgrađuju komponente vanćelijskog matriksa i doprinose invazivnosti ćelija. Oba redoks sistema, i GSH i Trx, imaju aktivnu ulogu u metastazi i progresiji tumora [112]. Trx1 povećava pokretljivost i invazivnost ćelija tumora [252], tako što promovise ekspresiju i aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMPs) -2 i -9 [253]. Ekspresija MMPs je često povišena kod različitih tipova tumora, a njihova funkcija je povezana sa sticanjem i održavanjem metastatskog fenotipa. Pokazano je da Trx1 remeti ravnotežu između MMPs i tkivnih inhibitora MMPs, što povećava metastatski potencijal tumorskih ćelija [254]. U ovom radu je pokazano da DVD-445 značajno inhibira degradaciju želatina od strane rezistentnih ćelija glioma (RC6 i U87-TxR), kao i senzitivnih C6 ćelija, dok DVD-444 suprimira degradaciju želatina od strane RC6 i U87 ćelija. Obe supstance su pokazale značajan potencijal inhibicije invazije glioma kroz Matrigel i ispoljile snažan anti-invazivni efekat na rezistentne ćelije glioma. Prikazani rezultati su u skladu sa prethodnim nalazima da specifični inhibitori TrxR1, etaselen i auranofin, suprimiraju migraciju i invaziju ćelija karcinoma dojke [252, 255].

5.4. DVD-444 i DVD-445 povećavaju osetljivost ćelija glioma na citostatike

Primarni hemioterapeutik koji se koristi u lečenju GBM je TMZ, alkilujući agens koji dovodi do oštećenja molekula DNK i ima dobru penetrabilnost kroz krvno-moždanu barijeru [256]. Kao odbrambeni mehanizam od dejstva TMZ, ćelije glioma aktiviraju antioksidantne sisteme i povećavaju sadržaj GSH i GR, a pokazano je i da supresija GSH povećava osetljivost ćelije na TMZ [257]. Različiti modulatori redoks stanja se istražuju u kombinovanom tretmanu sa TMZ, kako bi se poboljšao efekat hemioterapeutika [22]. Tako, pokazano je da inhibitori sinteze GSH povećavaju efekat TMZ [258]. Kvercetin, prirodni flavonoid, deluje i kao nespecifični inhibitor TrxR [259], a u kombinaciji sa TMZ indukuje apoptozu i suprimira rast ćelija GBM [260-262]. Piperlongumin ima sinergističko dejstvo sa cisplatinom i paklitakselom u tumorskim ćelijama jajnika [263], dovodi do reverzije rezistencije na doksorubicin 6,5 puta u humanim ćelijskim modelima leukemije [264], dok u koncentraciji od 10 µM vrši reverziju rezistencije na cisplatin i inhibira P-gp pumpu u ćelijama nesitnoćelijskog karcinoma pluća [265]. D-aloza, putem povećane ekspresije TXNIP i indukcije RONS, povećava citotoksični efekat docetaksela na tumorske ćelije i terapije zračenjem. Auranofin je predložen kao sastavni deo multimodalne terapije, zajedno sa TMZ, u lečenju rekurentnih GBM [266]. Pored toga, inhibicija Trx, primenom inhibitora PX-12 ili povećanom ekspresijom TXNIP, dovodi do redukcije rezistencije tumorskih ćelija na docetaksel i cisplatin, senzitivizuje tumorske ćelije na terapiju zračenjem [267, 268], a pored toga i senzitivizuje ćelije glioma na TMZ [269].

Kako bismo videli da li UMA TrxR inhibitori uvećavaju citotoksičnost TMZ u ćelijama glioma, ćelije smo istovremeno tretirali sa TMZ i DVD-444 ili DVD-445 u testu ćelijskog rasta. U

analizi mehanizma dejstva supstanci DVD-444 i DVD-445, korišćene su koncentracije bliske, odnosno 2 μM DVD-444 i 8 μM DVD-445. U kombinovanim tretmanima sa TMZ primenjene su niže koncentracije od IC_{50} vrednosti za inhibiciju ćelijskog rasta ($< 2 \mu\text{M}$ za DVD-444 i < 8 za DVD-445), odnosno 0,25, 0,5 i 1 μM DVD-444 i 1, 2,5 i 5 μM DVD-445. U skladu sa prethodnim istraživanjima [258-262, 266, 269], rezultati dobijeni kombinacijom TMZ sa supstancama DVD-444 i DVD-445 podržavaju hipotezu da inhibitori redoks sistema povećavaju citotoksični efekat TMZ i da su pogodni za kombinovane tretmane sa TMZ u ćelijama glioma. Pored toga, najbolji sinergistički efekti su pokazani pri nižim koncentracijama TMZ (10, odnosno 100 μM) u kombinaciji sa 1,5 μM DVD-444 i 5 μM DVD-445. Prethodno smo postavili hipotezu da su UMA inhibitori TrxR selektivni prema ćelijama tumora, te da je citotoksični efekat na normalne ćelije značajno manji. Prema Arneru (2021), inhibicija TrxR u normalnim ćelijama dovodi do paradoksalnog efekta povećane antioksidativne zaštite i povećava ćelijsku proliferaciju, dok u tumorskim ćelijama dovodi do značajnog povećanja koncentracije RONS, koje dovodi do ćelijske smrti i inhibirane proliferacije [270]. TMZ, kao i terapija zračenjem, imaju sistemsko dejstvo, te ostvaruje citotoksični efekat kako na ćelije tumora, tako i na normalne ćelije u organizmu. Primena inhibitora TrxR u kombinovanoj terapiji sa citostaticima i terapijom zračenjem može biti od ogromnog značaja, kako za veći antitumorski efekat terapije, tako i za veću zaštitu normalnih ćelija organizma od toksičnog dejstva terapije.

Prekomerna ekspresija P-gp je karakteristična za veliki broj različitih tumora i jedna od osnovnih osobina višestruko rezistentnog fenotipa [271], dok P-gp u krvno-moždanoj barijeri štiti moždani parenhim od prodora ksenobiotika [272]. Zato je bilo važno da se utvrdi da li inhibitori TrxR1 menjaju funkciju P-gp u U87-TxR ćelijama. Rezultati su pokazali da 1 μM DVD-444 i 5 μM DVD-445 povećavaju akumulaciju P-gp supstrata u U87-TxR ćelijama. S obzirom da prisustvo višestruko rezistentnog fenotipa nije uticalo na citotoksičnost DVD-444 i DVD-445, odnosno da se koncentracije koje inhibiraju ćelijski rast ne razlikuju između U87 i U87-TxR ćelija, može se reći da DVD-444 i DVD-445 nisu supstrati za P-gp. Verovatnije je da supstance deluju kao P-gp inhibitori i poseduju potencijal da modulišu rezistentan fenotip. To je i pokazano u istovremenim tretmanima 0,25, 0,5 i 1 μM DVD-444 ili 1, 2,5 i 5 μM DVD-445 sa PTX, gde su inhibitori TrxR1 povećali osetljivost U87-TxR ćelija na PTX. U skladu sa navedenim istraživanjima [259-269] su i rezultati analize efekta DVD-444 i DVD-445 na rad P-gp pumpe, koji zajedno ukazuju na potencijalnu primenu inhibitora TrxR u reverziji višestruko rezistentnog fenotipa i inhibiciji P-gp ekstruzione pumpe.

5.5. Inhibitorne i anti-tumorske osobine serije analoga DVD-445

U ovde prikazanoj studiji DVD-445 je izdvojena kao interesantan kandidat, na osnovu specifičnih hemijskih osobina (estarske veze u blizini elektrofilnog centra), a potom i rezultata dobijenih u testu *in vitro* inhibicije TrxR1, citotoksičnog efekta, kao i selektivnosti ka tumorskim ćelijama. Struktura i sinteza ove supstance je poslužila kao uzor za dalji razvoj analognih supstanci, koje bi imale unapređene antitumorske osobine. Dizajnirana je serija od 34 strukturna analoga, iz koje je izdvojeno 7 supstanci (1, 3, 4, 7, 9, 20, 34), sa zadovoljavajućom inhibicijom TrxR1, za dalje ispitivanje antitumorskih efekata.

Rezultati su pokazali da je supstanca 9 najsnažniji inhibitor TrxR1, potentniji od parentalne supstance, što je pokazano u testu inhibicije TrxR ćelijskog lizata, sa 85% inhibirane aktivnosti pri koncentraciji od 5 μM , kao i u testu inhibicije čistog enzima TrxR1, gde je supstanca 9 pokazala IC_{50} vrednost od 190 nM. Potencijal inhibicije TrxR1 enzima je samim tim veći od DVD-445, čiji je IC_{50} za inhibiciju enzima 600 nM. Dalje, supstanca 9 poseduje antitumorske karakteristike koje se ogledaju u citotoksičnosti u opsegu i same parentalne supstance (približno 8 μM), ali i u izuzetnoj

selektivnost ka tumorskim ćelijama, sa relativnim faktorom selektivnosti od 2,4 koja prevazilazi DVD-445. Supstanca 9 je samim tim ispunila cilj sinteze analoga DVD-445, sa poboljšanim osobinama inhibicije i antitumorskog efekta.

Analozi DVD-445 su pokazali trend povećanja RONS u odnosu na parentalnu supstancu, pri istoj koncentraciji tretmana za sve supstance – 10 μM , pri čemu je supstanca 34 pokazala potencijal indukcije oksidativnog stresa kod U87 ćelija na nivou H_2O_2 , kao pozitivne kontrole. Povećana osetljivost U87 na oksidativni stres je značajna i iz razloga što se ova ćelijska linija pokazala kao najotpornija na dejstvo supstanci DVD-444 i DVD-445. Pored toga, u ćelijama U87 i U87-TxR je u istoj meri oksidativni stres indukovala i supstanca 9, najpotentniji inhibitor TrxR1. Kod rezistentnih U87-TxR ćelija, samo dva analoga, 7 i 20, su ispoljila potencijal povećanja RONS na nivou ili u većoj meri nego DVD-445.

Analozi DVD-445 su suprimirali funkciju P-gp u akutnom tretmanu rezistentnih humanih glioblastoma, sa povećanom akumulacijom supstrata ekstruzione pumpe uglavnom preko 50%. Primećen je trend da se maksimalni efekat inhibicije ekstruzione pumpe postiže pri koncentraciji supstanci od 5 μM , ali bez statističke značajnosti u odnosu na druge dve ispitane koncentracije, 2,5 i 10 μM . Povećana akumulacija supstrata P-gp pumpe nije bila dozno zavisna kod analoga DVD-445, dok je kod same parentalne supstance primećena dozna zavisnost, gde se sa povećanjem koncentracije DVD-445 povećavala i akumulacija supstrata. Ovim želimo da istaknemo da i niže koncentracije (2,5 μM), sa niskim citotoksičnim efektom na ćelije tumora, dovode do akutnog efekta inhibicije P-gp ekstruzione pumpe. Takođe, supstanca 9, kao najpotentniji inhibitor u ovoj seriji, je u akutnom tretmanu ćelija U87-TxR efikasno inhibirala aktivnost P-gp pumpe. Efekat analoga DVD-445 na inhibiciju P-gp je bio veći u akutnom, nego u produženom tretmanu rezistentnih ćelija U87-TxR. U produženim tretmanima koncentracijom od 2,5 μM efekat inhibicije P-gp pumpe je primećen samo za supstancu 20, i to u meri sličnoj kao i u akutnom tretmanu, sa oko 30% promene u odnosu na netretiranu kontrolu. Pored potencijala analoga kao pojedinačnih antitumorskih agenasa, DVD-445 i njegovi unapređeni UMA analozi se mogu koristiti kao modulatori rezistencije na lekove u kombinaciji sa drugim hemioterapeuticima, koji su supstrati za P-gp, kako bi povećali akumulaciju hemioterapeutika unutar ćelije tumora i ujedno povećali i njihovo citotoksično dejstvo [273].

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu ostvarenih rezultata u skladu sa postavljenim ciljevima i postojećim literaturnim podacima, izvučeni su zaključci ove doktorske disertacije:

- 1) Novosintetisane supstance, imenovane kao „Ugi-tip Majklovih akceptora“ – UMA (DVD-438, DVD-439, DVD-440, DVD-443, DVD-444, DVD-445), su specifični inhibitori TrxR1, kao i Trx sistema, a među njima DVD-445 je najpotentniji inhibitor TrxR1. UMA snažnije inhibiraju redukovanu formu TrxR1, koja je više zastupljena u proliferativnim ćelijama.
- 2) UMA selektivno inhibiraju rast aktivno proliferišućih humanih ćelija (SH-SY5Y, U87 i HaCaT) u odnosu na neproliferišuće ćelije (PBMC) i snažno indukuju oksidativni stres u ćelijama humanog neuroblastoma (SH-SY5Y), što je praćeno selektivnom indukcijom nekroze SH-SY5Y ćelija u poređenju sa normalnim humanim keratinocitama (HaCaT).
- 3) Supstance DVD-444 i DVD-445 menjaju ekspresiju antioksidativnih enzima u ćelijama glioma pacova (C6 i RC6) i ćelijama humanog glioblastoma (U87 i U87-TxR), dovode do depolarizacije membranskog potencijala mitohondrija i posledično ćelijske smrti kod C6 i RC6, inhibiraju proliferaciju U87 i U87-TxR ćelija, i smanjuju sposobnost njihove migracije i invazije.
- 4) Istovremena kombinacija DVD-444 i DVD-445 sa antigliomskim hemioterapeutikom temozolomidom (TMZ) ima sinergistički efekat i povećava osetljivost ćelija glioma pacova i humanog glioblastoma na TMZ. Takođe, supstance DVD-444 i DVD-445 inhibiraju aktivnost P-gp i dovode do reverzije rezistencije na PTX kod U87-TxR ćelija.
- 5) Analozni DVD-445 snažnije inhibiraju aktivnost TrxR1, u većoj meri indukuju oksidativni stres, pokazuju veću selektivnost ka ćelijama humanog glioblastoma u odnosu na DVD-445 i imaju karakteristike modulatora P-gp aktivnosti.

Opšti zaključak:

Novosintetisani UMA, kao specifični inhibitori TrxR1, ostvaruju citotoksično dejstvo na ćelije humanog neuroblastoma i glioblastoma uz postojanje selektivnosti ka aktivno proliferišućim i tumorskim ćelijama. Ove supstance indukuju oksidativni stres, menjaju nivo antioksidanata unutar ćelije, uključujući i antioksidantne enzime, i značajno smanjuju metastatski potencijal ćelija glioma. Takođe, inhibitori TrxR1 pokazuju značajnu efikasnost kada se primene u kombinovanim tretmanima, jer povećavaju osetljivost ćelija glioma na klasične hemioterapeutike. Zbog svega navedenog, novosintetisani UMA predstavljaju perspektivne kandidate za razvoj novih terapijskih strategija za lečenje glioblastoma i neuroblastoma.

7. LITERATURA

1. Lawson, D.A., et al., *Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution*. Nat Cell Biol, 2018. **20**(12): p. 1349-1360.
2. Bertram, J.S., *The molecular biology of cancer*. Mol Aspects Med, 2000. **21**(6): p. 167-223.
3. Weinberg, R.A., *Tumor suppressor genes*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1138-46.
4. Bishop, J.M., *Oncogenes and proto-oncogenes*. J Cell Physiol Suppl, 1986. **4**: p. 1-5.
5. Pitot, H.C., *The molecular biology of carcinogenesis*. Cancer, 1993. **72**(3 Suppl): p. 962-70.
6. Thoms, K.M., C. Kuschal, and S. Emmert, *Lessons learned from DNA repair defective syndromes*. Exp Dermatol, 2007. **16**(6): p. 532-44.
7. Pierotti, M.A. and T.A. Dragani, *Genetics and cancer*. Curr Opin Oncol, 1992. **4**(1): p. 127-33.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
10. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 27-47.
11. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
12. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
13. Chien, L.N., et al., *Comparative Brain and Central Nervous System Tumor Incidence and Survival between the United States and Taiwan Based on Population-Based Registry*. Front Public Health, 2016. **4**: p. 151.
14. Vargo, M.M., *Brain Tumors and Metastases*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2017. **28**(1): p. 115-141.
15. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016*. Neuro Oncol, 2019. **21**(Suppl 5): p. v1-v100.
16. Achrol, A.S., et al., *Brain metastases*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 5.
17. Shin, J.H., et al., *Neuronal tumors of the central nervous system: radiologic findings and pathologic correlation*. Radiographics, 2002. **22**(5): p. 1177-89.
18. Tamimi, A.F. and M. Juweid, *Epidemiology and Outcome of Glioblastoma*, in *Glioblastoma*, S. De Vleeschouwer, Editor. 2017: Brisbane (AU).
19. Claes, A., A.J. Idema, and P. Wesseling, *Diffuse glioma growth: a guerilla war*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(5): p. 443-58.
20. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The definition of primary and secondary glioblastoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(4): p. 764-72.
21. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 829-48.
22. Salazar-Ramiro, A., et al., *Role of Redox Status in Development of Glioblastoma*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 156.
23. Bae, Y.S., et al., *Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 217-21.
24. Lee, S.R., et al., *Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20336-42.

25. Hussain, S.P., et al., *p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(7): p. 2350-6.
26. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-96.
27. Ramirez, Y.P., et al., *Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance*. Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(12): p. 1475-506.
28. Sarkaria, J.N., et al., *Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(10): p. 2900-8.
29. Liu, L. and S.L. Gerson, *Targeted modulation of MGMT: clinical implications*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(2): p. 328-31.
30. Ashby, L.S., K.A. Smith, and B. Stea, *Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review*. *World J Surg Oncol*, 2016. **14**(1): p. 225.
31. Heck, J.E., et al., *The epidemiology of neuroblastoma: a review*. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2009. **23**(2): p. 125-43.
32. Nakagawara, A., et al., *Neuroblastoma*. *Jpn J Clin Oncol*, 2018. **48**(3): p. 214-241.
33. Whittle, S.B., et al., *Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017. **17**(4): p. 369-386.
34. Cheung, N.K. and M.A. Dyer, *Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(6): p. 397-411.
35. Johnsen, J.I., C. Dyberg, and M. Wickstrom, *Neuroblastoma-A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy*. *Front Mol Neurosci*, 2019. **12**: p. 9.
36. De Bernardi, B., et al., *Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(8): p. 1592-601.
37. Matthay, K.K., et al., *Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid*. *Children's Cancer Group*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(16): p. 1165-73.
38. Navarro, S., et al., *Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(4): p. 695-9.
39. Nakagawara, A. and K. Ikeda, *N-myc oncogene amplification and catecholamine metabolism in children with neuroblastoma*. *Lancet*, 1987. **1**(8532): p. 559.
40. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
41. Tomioka, N., et al., *Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature*. *Oncogene*, 2008. **27**(4): p. 441-9.
42. Hasan, M.K., et al., *ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 3450.
43. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(3): p. 203-16.
44. Mosse, Y.P., et al., *Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project*. *Pediatr Blood Cancer*, 2014. **61**(4): p. 627-35.

45. Doyen, J., et al., *Proton beams in cancer treatments: Clinical outcomes and dosimetric comparisons with photon therapy*. *Cancer Treat Rev*, 2016. **43**: p. 104-12.
46. Longley, D.B. and P.G. Johnston, *Molecular mechanisms of drug resistance*. *J Pathol*, 2005. **205**(2): p. 275-92.
47. Holohan, C., et al., *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(10): p. 714-26.
48. Stavrovskaya, A.A., *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells*. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. **65**(1): p. 95-106.
49. Auffinger, B., et al., *The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence*. *Expert Rev Neurother*, 2015. **15**(7): p. 741-52.
50. Fletcher, J.I., et al., *ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology*. *Drug Resist Updat*, 2016. **26**: p. 1-9.
51. Loscher, W. and H. Potschka, *Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family*. *NeuroRx*, 2005. **2**(1): p. 86-98.
52. Goldman, B., *Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer?* *J Natl Cancer Inst*, 2003. **95**(4): p. 255-7.
53. Leopoldo, M., et al., *An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018)*. *Expert Opin Ther Pat*, 2019. **29**(6): p. 455-461.
54. Palmeira, A., et al., *Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds*. *Curr Med Chem*, 2012. **19**(13): p. 1946-2025.
55. Reardon, J.T., et al., *Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-acetaminine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts*. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3968-71.
56. Oliva, C.R., et al., *Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(51): p. 39759-67.
57. Oliva, C.R., et al., *Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24665.
58. Teixeira, C., J.C. Reed, and M.A. Pratt, *Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 1995. **55**(17): p. 3902-7.
59. Sakakura, C., et al., *Overexpression of bax enhances the radiation sensitivity in human breast cancer cells*. *Surg Today*, 1997. **27**(1): p. 90-3.
60. Sakakura, C., et al., *Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide*. *Surg Today*, 1997. **27**(7): p. 676-9.
61. Zhang, L., et al., *Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents*. *Science*, 2000. **290**(5493): p. 989-92.
62. Hall, P.A., D. Meek, and D.P. Lane, *p53--integrating the complexity*. *J Pathol*, 1996. **180**(1): p. 1-5.
63. Hayashi, Y., et al., *Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme*. *Brain Pathol*, 1997. **7**(3): p. 871-5.
64. Newcomb, E.W., et al., *bcl-2 protein expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 gene status*. *Acta Neuropathol*, 1997. **94**(4): p. 369-75.
65. Nagane, M., et al., *A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis*. *Cancer Res*, 1996. **56**(21): p. 5079-86.

66. Weller, M., et al., *Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2633-43.
67. Hermisson, M., et al., *O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells*. J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 766-76.
68. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
69. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
70. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
71. Trachootham, D., et al., *Redox regulation of cell survival*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(8): p. 1343-74.
72. Wiseman, H. and B. Halliwell, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*. Biochem J, 1996. **313** (Pt 1): p. 17-29.
73. Kudryavtseva, A.V., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(29): p. 44879-44905.
74. Ott, M., et al., *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 913-22.
75. Ryter, S.W., et al., *Mechanisms of cell death in oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(1): p. 49-89.
76. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang, *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(7): p. 579-91.
77. Sznarkowska, A., et al., *Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15996-16016.
78. Gadjev, I., J.M. Stone, and T.S. Gechev, *Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide*. Int Rev Cell Mol Biol, 2008. **270**: p. 87-144.
79. Chen, S.H., E.A. Oyarzabal, and J.S. Hong, *Critical role of the Mac1/NOX2 pathway in mediating reactive microgliosis-generated chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration*. Curr Opin Pharmacol, 2016. **26**: p. 54-60.
80. Tu, B.P. and J.S. Weissman, *The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 983-94.
81. Cai, Z. and L.J. Yan, *Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health*. J Biochem Pharmacol Res, 2013. **1**(1): p. 15-26.
82. Kumar, A., B. Yegla, and T.C. Foster, *Redox Signaling in Neurotransmission and Cognition During Aging*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(18): p. 1724-1745.
83. Harris, I.S. and G.M. DeNicola, *The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer*. Trends Cell Biol, 2020. **30**(6): p. 440-451.
84. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005. **7**(6): p. 505-12.
85. Mieyal, J.J., et al., *Molecular mechanisms and clinical implications of reversible protein S-glutathionylation*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(11): p. 1941-88.
86. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
87. Storz, P., *Oxidative Stress in Cancer*, in *Oxidative Stress and Redox Regulation*, U.R. Jakob, Dana, Editor. 2013, Springer: Dordrecht. p. pp 427-447.
88. Hayes, J.D., A.T. Dinkova-Kostova, and K.D. Tew, *Oxidative Stress in Cancer*. Cancer Cell, 2020. **38**(2): p. 167-197.

89. Gill, J.G., E. Piskounova, and S.J. Morrison, *Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2016. **81**: p. 163-175.
90. Moloney, J.N. and T.G. Cotter, *ROS signalling in the biology of cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **80**: p. 50-64.
91. Janssen, A.M., et al., *Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. **125**(6): p. 327-35.
92. Janssen, A.M., et al., *Superoxide dismutases in gastric and esophageal cancer and the prognostic impact in gastric cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3183-92.
93. Toledano, M.B., A.G. Planson, and A. Delaunay-Moisan, *Reining in H(2)O(2) for safe signaling*. Cell, 2010. **140**(4): p. 454-6.
94. Traverso, N., et al., *Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 972913.
95. Padmanabhan, B., et al., *Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer*. Mol Cell, 2006. **21**(5): p. 689-700.
96. Yoo, N.J., et al., *Somatic mutations of the KEAP1 gene in common solid cancers*. Histopathology, 2012. **60**(6): p. 943-52.
97. Toullec, A., et al., *Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(6): p. 211-30.
98. Sampson, N., et al., *ROS signaling by NOX4 drives fibroblast-to-myofibroblast differentiation in the diseased prostatic stroma*. Mol Endocrinol, 2011. **25**(3): p. 503-15.
99. Martinez-Outschoorn, U.E., et al., *Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors*. Cell Cycle, 2011. **10**(15): p. 2504-20.
100. Lin, X., et al., *Oxidative stress in malignant melanoma enhances tumor necrosis factor-alpha secretion of tumor-associated macrophages that promote cancer cell invasion*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(12): p. 1337-55.
101. Ghosh, S., et al., *Reactive oxygen species in the tumor niche triggers altered activation of macrophages and immunosuppression: Role of fluoxetine*. Cell Signal, 2015. **27**(7): p. 1398-412.
102. Pennington, J.D., et al., *Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy*. Drug Resist Updat, 2005. **8**(5): p. 322-30.
103. Landriscina, M., et al., *Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2701-16.
104. Iwao-Koizumi, K., et al., *Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 422-31.
105. Landriscina, M., et al., *The level of MnSOD is directly correlated with grade of brain tumours of neuroepithelial origin*. Br J Cancer, 1996. **74**(12): p. 1877-85.
106. Nozoe, T., et al., *Significance of immunohistochemical expression of manganese superoxide dismutase as a marker of malignant potential in colorectal carcinoma*. Oncol Rep, 2003. **10**(1): p. 39-43.
107. Ria, F., et al., *The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. Biological mechanisms and clinical implications*. Br J Cancer, 2001. **84**(4): p. 529-34.
108. Fu, A., et al., *High expression of MnSOD promotes survival of circulating breast cancer cells and increases their resistance to doxorubicin*. Oncotarget, 2016. **7**(31): p. 50239-50257.
109. Karlenius, T.C. and K.F. Tonissen, *Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation*. Cancers (Basel), 2010. **2**(2): p. 209-32.

110. Tiligada, E., *Chemotherapy: induction of stress responses*. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13 Suppl 1**: p. S115-24.
111. Acharya, A., et al., *Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential*. *Oxid Med Cell Longev*, 2010. **3**(1): p. 23-34.
112. Harris, I.S., et al., *Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(2): p. 211-22.
113. Raj, L., et al., *Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS*. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 231-4.
114. Schor, N.F., *Aiming at neuroblastoma and hitting other worthy targets*. *J Child Neurol*, 2013. **28**(6): p. 768-73.
115. Kim, S.H., C.H. Kwon, and I. Nakano, *Detoxification of oxidative stress in glioma stem cells: mechanism, clinical relevance, and therapeutic development*. *J Neurosci Res*, 2014. **92**(11): p. 1419-24.
116. Alshangiti, A.M., et al., *4-Hydroxychalcone Induces Cell Death via Oxidative Stress in MYCN-Amplified Human Neuroblastoma Cells*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 1670759.
117. Aoyama, K. and T. Nakaki, *Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1)*. *Molecules*, 2015. **20**(5): p. 8742-58.
118. Lillig, C.H., C. Berndt, and A. Holmgren, *Glutaredoxin systems*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(11): p. 1304-17.
119. Enoksson, M., et al., *Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **327**(3): p. 774-9.
120. Zhao, Y., et al., *Increase in thiol oxidative stress via glutathione reductase inhibition as a novel approach to enhance cancer sensitivity to X-ray irradiation*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(2): p. 176-83.
121. Desideri, E., F. Ciccarone, and M.R. Ciriolo, *Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy*. *Nutrients*, 2019. **11**(8).
122. Meijer, C., et al., *Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds*. *Cancer Res*, 1992. **52**(24): p. 6885-9.
123. Sakamoto, M., et al., *Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray*. *Hum Cell*, 2001. **14**(4): p. 305-15.
124. Cullen, K.J., et al., *Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(23): p. 8097-102.
125. Dong, S.C., et al., *Glutathione S-transferase pi: a potential role in antitumor therapy*. *Drug Des Devel Ther*, 2018. **12**: p. 3535-3547.
126. Gladyshev, V.N., *Thioredoxin and peptide methionine sulfoxide reductase: convergence of similar structure and function in distinct structural folds*. *Proteins*, 2002. **46**(2): p. 149-52.
127. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. *EMBO J*, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
128. Liu, Y. and W. Min, *Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner*. *Circ Res*, 2002. **90**(12): p. 1259-66.
129. Mitchell, D.A. and M.A. Marletta, *Thioredoxin catalyzes the S-nitrosation of the caspase-3 active site cysteine*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(3): p. 154-8.
130. Shelar, S.B., et al., *Thioredoxin-dependent regulation of AIF-mediated DNA damage*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **87**: p. 125-36.

131. Meuillet, E.J., et al., *Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity*. Arch Biochem Biophys, 2004. **429**(2): p. 123-33.
132. Lopert, P. and M. Patel, *Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) links the substrate requirement in brain mitochondria for hydrogen peroxide removal to the thioredoxin/peroxiredoxin (Trx/Prx) system*. J Biol Chem, 2014. **289**(22): p. 15611-20.
133. Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard, *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 3436-44.
134. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
135. Zhang, J., et al., *Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(9): p. 794-808.
136. Lippoldt, A., et al., *Localization of thioredoxin in the rat brain and functional implications*. J Neurosci, 1995. **15**(10): p. 6747-56.
137. Hornsveld, M. and T.B. Dansen, *The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective*. Antioxid Redox Signal, 2016. **25**(6): p. 300-25.
138. Arner, E.S. and A. Holmgren, *The thioredoxin system in cancer*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(6): p. 420-6.
139. Pennington, J.D., et al., *Thioredoxin and thioredoxin reductase as redox-sensitive molecular targets for cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(33): p. 3368-77.
140. Mohammadi, F., et al., *The thioredoxin system and cancer therapy: a review*. Cancer Chemother Pharmacol, 2019. **84**(5): p. 925-935.
141. Jia, J.J., et al., *The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy*. Cancer Chemother Pharmacol, 2019. **84**(3): p. 453-470.
142. Kemerdere, R., et al., *Tissue and plasma thioredoxin reductase expressions in patients with glioblastoma multiforme*. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2013. **74**(4): p. 234-8.
143. Zhang, P., et al., *A novel indication of thioredoxin-interacting protein as a tumor suppressor gene in malignant glioma*. Oncol Lett, 2017. **14**(2): p. 2053-2058.
144. Morrison, J.A., et al., *Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 62.
145. Noura, M., et al., *TXNIP induces growth arrest and enhances ABT263-induced apoptosis in mixed-lineage leukemia-rearranged acute myeloid leukemia cells*. FEBS Open Bio, 2020.
146. Schumacker, P.T., *Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword*. Cancer Cell, 2006. **10**(3): p. 175-6.
147. Kakolyris, S., et al., *Thioredoxin expression is associated with lymph node status and prognosis in early operable non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3087-91.
148. Raffel, J., et al., *Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival*. J Lab Clin Med, 2003. **142**(1): p. 46-51.
149. Sasada, T., et al., *Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP): protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity*. J Clin Invest, 1996. **97**(10): p. 2268-76.
150. Fourquet, S., et al., *The dual functions of thiol-based peroxidases in H2O2 scavenging and signaling*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(9): p. 1565-76.
151. Kim, Y. and H.H. Jang, *The Role of Peroxiredoxin Family in Cancer Signaling*. J Cancer Prev, 2019. **24**(2): p. 65-71.

152. Wang, T., A.J. Diaz, and Y. Yen, *The role of peroxiredoxin II in chemoresistance of breast cancer cells*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2014. **6**: p. 73-80.
153. Mustacich, D. and G. Powis, *Thioredoxin reductase*. Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 1-8.
154. Hirt, R.P., et al., *The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives*. Trends Parasitol, 2002. **18(7)**: p. 302-8.
155. Arner, E.S., *Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790(6)**: p. 495-526.
156. Saccoccia, F., et al., *Thioredoxin reductase and its inhibitors*. Curr Protein Pept Sci, 2014. **15(6)**: p. 621-46.
157. Williams, C.H., et al., *Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved*. Eur J Biochem, 2000. **267(20)**: p. 6110-7.
158. Zhong, L., E.S. Arner, and A. Holmgren, *Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97(11)**: p. 5854-9.
159. Johansson, L., G. Gafvelin, and E.S. Arner, *Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1726(1)**: p. 1-13.
160. Rundlof, A.K., M. Carlsten, and E.S. Arner, *The core promoter of human thioredoxin reductase 1: cloning, transcriptional activity, and Oct-1, Sp1, and Sp3 binding reveal a housekeeping-type promoter for the AU-rich element-regulated gene*. J Biol Chem, 2001. **276(32)**: p. 30542-51.
161. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20(11)**: p. 465-70.
162. Sannella, A.R., et al., *New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metalloidrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications*. FEBS Lett, 2008. **582(6)**: p. 844-7.
163. Parrales, A., et al., *Comparative oncology approach to drug repurposing in osteosarcoma*. PLoS One, 2018. **13(3)**: p. e0194224.
164. Li, H., et al., *Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7(3)**: p. 3548-58.
165. Lu, J., et al., *Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione*. FASEB J, 2013. **27(4)**: p. 1394-403.
166. Gustafsson, T.N., et al., *Ebselen and analogs as inhibitors of Bacillus anthracis thioredoxin reductase and bactericidal antibacterials targeting Bacillus species, Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1860(6)**: p. 1265-71.
167. Cai, W., et al., *Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase*. Free Radic Biol Med, 2012. **52(2)**: p. 257-65.
168. Gromer, S., S. Urig, and K. Becker, *The thioredoxin system--from science to clinic*. Med Res Rev, 2004. **24(1)**: p. 40-89.
169. Gandin, V., et al., *Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase*. Biochem Pharmacol, 2010. **79(2)**: p. 90-101.
170. Saggiaro, D., et al., *Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway*. Chem Biol, 2007. **14(10)**: p. 1128-39.
171. Witte, A.B., et al., *Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds*. Free Radic Biol Med, 2005. **39(5)**: p. 696-703.

172. Becker, K., et al., *Human thioredoxin reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2' '-terpyridine)platinum(II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy.* J Med Chem, 2001. **44**(17): p. 2784-92.
173. Zhao, R., H. Masayasu, and A. Holmgren, *Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8579-84.
174. Engman, L., et al., *Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents.* Anticancer Res, 1997. **17**(6D): p. 4599-605.
175. Ren, X., et al., *Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic.* Free Radic Biol Med, 2018. **127**: p. 238-247.
176. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02166242>.
177. Kirkpatrick, D.L., et al., *Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides.* Biochem Pharmacol, 1998. **55**(7): p. 987-94.
178. Oblong, J.E., et al., *Reversible inhibition of human thioredoxin reductase activity by cytotoxic alkyl 2-imidazolyl disulfide analogues.* Cancer Chemother Pharmacol, 1994. **34**(5): p. 434-8.
179. Gan, F.F., et al., *Identification of Michael acceptor-centric pharmacophores with substituents that yield strong thioredoxin reductase inhibitory character correlated to antiproliferative activity.* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(11): p. 1149-65.
180. Ling Y, Y.S., Zhang Y, Liu J., *Phenyl allylidene cyclohexanone derivatives and preparation method and use.* 2020.
181. Zhu, P., et al., *Piperlonguminine and Piperine Analogues as TrxR Inhibitors that Promote ROS and Autophagy and Regulate p38 and Akt/mTOR Signaling.* J Nat Prod, 2020. **83**(10): p. 3041-3049.
182. Miao LY, C.J., Li LX, Qian Y, Chi JM, Xudong X, Yirong HZ, *6-Benzylidene-2-aryl athynyl cyclohexenone derivaives and its preparation method and medical use.* 2020.
183. Qian, J., et al., *Design and synthesis of benzylidenecyclohexenones as TrxR inhibitors displaying high anticancer activity and inducing ROS, apoptosis, and autophagy.* Eur J Med Chem, 2020. **204**: p. 112610.
184. Yang J, W.Z., Pan Y, Mo X, Lin Q, Wu W, Li L, Mo, X., *Application of 2-(2,2,2-trifluoroethylene)-1,3-dione compound in preparing medicine for resisting lung cancer by promoting apoptosis.* 2020.
185. Arner ESJ, S.W., Coussens NP, Luci DK, Maloney DJ, Simeonov A, Jadhav A, Dexheimer TS, *Tricyclic compounds and their use in the treatment of cancer.* 2020.
186. Stafford WC, C.N., Luci DK, Maloney DJ, Simeonov A, Jadhav A, Dexheimer TS, *Pyridazinones and their use in the treatment of cancer.* 2017.
187. Jovanovic, M., et al., *Novel electrophilic amides amenable by the Ugi reaction perturb thioredoxin system via thioredoxin reductase 1 (TrxR1) inhibition: Identification of DVD-445 as a new lead compound for anticancer therapy.* Eur J Med Chem, 2019. **181**: p. 111580.
188. Bienayme, H., et al., *Maximizing synthetic efficiency: multi-component transformations lead the way.* Chemistry, 2000. **6**(18): p. 3321-9.
189. Jovanovic, M., et al., *Further exploration of DVD-445 as a lead thioredoxin reductase (TrxR) inhibitor for cancer therapy: Optimization of potency and evaluation of anticancer potential.* Eur J Med Chem, 2020. **191**: p. 112119.
190. Podolski-Renic, A., et al., *The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines.* Biomed Pharmacother, 2011. **65**(5): p. 345-53.

191. Stojkovic, S., et al., *Development of resistance to antiglioma agents in rat C6 cells caused collateral sensitivity to doxorubicin*. *Exp Cell Res*, 2015. **335**(2): p. 248-57.
192. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
193. Chou, T.C. and P. Talalay, *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. *Adv Enzyme Regul*, 1984. **22**: p. 27-55.
194. Peters, G.J., et al., *Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites*. *Pharmacol Ther*, 2000. **87**(2-3): p. 227-53.
195. Zhao, H., et al., *Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(11): p. 1359-68.
196. Jourd'heuil, D., et al., *Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 28799-805.
197. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
198. Cha, M.K., K.H. Suh, and I.H. Kim, *Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009. **28**: p. 93.
199. Mansur, K., et al., *Up-regulation of thioredoxin expression in motor neurons after nerve injury*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998. **62**(1): p. 86-91.
200. Yagublu, V., et al., *Expression of selenium-containing proteins in human colon carcinoma tissue*. *Anticancer Res*, 2011. **31**(9): p. 2693-8.
201. Vesentini, N., et al., *Selection of reference genes in different myocardial regions of an in vivo ischemia/reperfusion rat model for normalization of antioxidant gene expression*. *BMC Res Notes*, 2012. **5**: p. 124.
202. Paukert, T., et al., *Glutathione peroxidase isoenzymes in human tumor cell lines*. *Pharmazie*, 2011. **66**(11): p. 894-8.
203. Miler, M., et al., *Citrus flavanones naringenin and hesperetin improve antioxidant status and membrane lipid compositions in the liver of old-aged Wistar rats*. *Exp Gerontol*, 2016. **84**: p. 49-60.
204. Holley, A., et al., *Glutathione peroxidase activity and expression levels are significantly increased in acute coronary syndromes*. *J Investig Med*, 2017. **65**(5): p. 919-925.
205. Messaoudi, I., et al., *Involvement of selenoprotein P and GPx4 gene expression in cadmium-induced testicular pathophysiology in rat*. *Chem Biol Interact*, 2010. **188**(1): p. 94-101.
206. Kamerbeek, N.M., et al., *Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells*. *Blood*, 2007. **109**(8): p. 3560-6.
207. O'Driscoll, L., et al., *The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells*. *Cytotechnology*, 1993. **12**(1-3): p. 289-314.
208. Bricard, G., et al., *The cytosolic 5'-nucleotidase cN-II lowers the adaptability to glucose deprivation in human breast cancer cells*. *Oncotarget*, 2017. **8**(40): p. 67380-67393.
209. Hemshekhar, M., et al., *Buprenorphine Alters Inflammatory and Oxidative Stress Molecular Markers in Arthritis*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 2515408.
210. Kang, W., et al., *Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(6): p. 1129-37.

211. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
212. Jouan, E., et al., *Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay*. Pharmaceutics, 2016. **8**(2).
213. Zheng, L.S., et al., *Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5172.
214. Stankovic, T., et al., *Lower antioxidative capacity of multidrug-resistant cancer cells confers collateral sensitivity to protoflavone derivatives*. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(3): p. 555-65.
215. Fritz-Wolf, K., et al., *Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 383.
216. Zhang, B., et al., *Thioredoxin reductase inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2017. **27**(5): p. 547-556.
217. Johansson, M.H., *Reversible Michael additions: covalent inhibitors and prodrugs*. Mini Rev Med Chem, 2012. **12**(13): p. 1330-44.
218. Hosios, A.M. and M.G. Vander Heiden, *The redox requirements of proliferating mammalian cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(20): p. 7490-7498.
219. Soini, Y., et al., *Widespread expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in non-small cell lung carcinoma*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1750-7.
220. Gladyshev, V.N., et al., *Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(2): p. 488-93.
221. Haapasalo, H., et al., *Expression of antioxidant enzymes in astrocytic brain tumors*. Brain Pathol, 2003. **13**(2): p. 155-64.
222. Erdi, F., et al., *New Clues in the Malignant Progression of Glioblastoma: Can the Thioredoxin System Play a Role?* Turk Neurosurg, 2018. **28**(1): p. 7-12.
223. Nalvarte, I., et al., *The expression and activity of thioredoxin reductase 1 splice variants v1 and v2 regulate the expression of genes associated with differentiation and adhesion*. Biosci Rep, 2015. **35**(6).
224. Gasdaska, J.R., et al., *Human thioredoxin reductase gene localization to chromosomal position 12q23-q24.1 and mRNA distribution in human tissue*. Genomics, 1996. **37**(2): p. 257-9.
225. Berggren, M., et al., *Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia*. Anticancer Res, 1996. **16**(6B): p. 3459-66.
226. Galadari, S., et al., *Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?* Free Radic Biol Med, 2017. **104**: p. 144-164.
227. Lothrop, A.P., E.L. Ruggles, and R.J. Hondal, *No selenium required: reactions catalyzed by mammalian thioredoxin reductase that are independent of a selenocysteine residue*. Biochemistry, 2009. **48**(26): p. 6213-23.
228. Anest, K., et al., *Cell death by SecTRAPs: thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1846.
229. Li, J., et al., *Ferroptosis: past, present and future*. Cell Death Dis, 2020. **11**(2): p. 88.
230. Hirschhorn, T. and B.R. Stockwell, *The development of the concept of ferroptosis*. Free Radic Biol Med, 2019. **133**: p. 130-143.
231. Cai, L.L., et al., *Modulation of ferroptosis sensitivity by TXNRD1 in pancreatic cancer cells*. bioRxiv, 2020: p. 2020.06.25.165647.

232. Sies, H., et al., *Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase.* J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27812-7.
233. Brigelius-Flohe, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 951-65.
234. Weitzel, F., F. Ursini, and A. Wendel, *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion.* Biochim Biophys Acta, 1990. **1036**(2): p. 88-94.
235. Maiorino, M., C. Gregolin, and F. Ursini, *Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.* Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 448-57.
236. Dokic, I., et al., *Glutathione peroxidase 1 activity dictates the sensitivity of glioblastoma cells to oxidative stress.* Glia, 2012. **60**(11): p. 1785-800.
237. Seiler, A., et al., *Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death.* Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 237-48.
238. Yang, W.S., et al., *Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4.* Cell, 2014. **156**(1-2): p. 317-331.
239. Schomburg, L. and U. Schweizer, *Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(11): p. 1453-62.
240. Leone, A., et al., *Oxidative Stress Gene Expression Profile Correlates with Cancer Patient Poor Prognosis: Identification of Crucial Pathways Might Select Novel Therapeutic Approaches.* Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 2597581.
241. Wang, K., et al., *Targeting Metabolic-Redox Circuits for Cancer Therapy.* Trends Biochem Sci, 2019. **44**(5): p. 401-414.
242. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.
243. Raghunath, A., et al., *Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications.* Redox Biol, 2018. **17**: p. 297-314.
244. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis.* Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
245. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.* Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
246. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense.* World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
247. Kim, A., *Modulation of MnSOD in Cancer: Epidemiological and Experimental Evidence.* Toxicol Res, 2010. **26**(2): p. 83-93.
248. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system.* Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
249. Hashemy, S.I., et al., *Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase.* J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10691-7.
250. Hoshikawa, H., T. Mori, and N. Mori, *In vitro and in vivo effects of D-allose: up-regulation of thioredoxin-interacting protein in head and neck cancer cells.* Ann Otol Rhinol Laryngol, 2010. **119**(8): p. 567-71.
251. Kennedy, K.M. and M.W. Dewhirst, *Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation.* Future Oncol, 2010. **6**(1): p. 127-48.
252. Bhatia, M., et al., *The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration.* Redox Biol, 2016. **8**: p. 68-78.

253. Farina, A.R., et al., *Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion*. Eur J Biochem, 2001. **268**(2): p. 405-13.
254. Farina, A.R., et al., *Thioredoxin stimulates MMP-9 expression, de-regulates the MMP-9/TIMP-1 equilibrium and promotes MMP-9 dependent invasion in human MDA-MB-231 breast cancer cells*. FEBS Lett, 2011. **585**(20): p. 3328-36.
255. Zheng, X., et al., *The antimetastatic effect and underlying mechanisms of thioredoxin reductase inhibitor ethaselen*. Free Radic Biol Med, 2019. **131**: p. 7-17.
256. Ostermann, S., et al., *Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3728-36.
257. Zhu, Z., et al., *Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis*. J Neurochem, 2018. **144**(1): p. 93-104.
258. Kohsaka, S., et al., *Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma*. Cancer Lett, 2013. **331**(1): p. 68-75.
259. Lu, J., et al., *Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4410-8.
260. Jakubowicz-Gil, J., et al., *Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment*. Tumour Biol, 2013. **34**(4): p. 2367-78.
261. Jakubowicz-Gil, J., et al., *Quercetin and sorafenib as a novel and effective couple in programmed cell death induction in human gliomas*. Neurotox Res, 2014. **26**(1): p. 64-77.
262. Zhang, I., et al., *Inhibition of glioblastoma cell proliferation, invasion, and mechanism of action of a novel hydroxamic acid hybrid molecule*. Cell Death Discov, 2018. **4**: p. 41.
263. Gong, L.H., et al., *Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 906804.
264. Kang, Q. and S. Yan, *Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells*. Exp Ther Med, 2015. **9**(4): p. 1345-1350.
265. Zhang, C., et al., *Piperlongumine Inhibits Akt Phosphorylation to Reverse Resistance to Cisplatin in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells via ROS Regulation*. Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 1178.
266. Kast, R.E., et al., *A conceptually new treatment approach for relapsed glioblastoma: coordinated undermining of survival paths with nine repurposed drugs (CUSP9) by the International Initiative for Accelerated Improvement of Glioblastoma Care*. Oncotarget, 2013. **4**(4): p. 502-30.
267. Hoshikawa, H., et al., *Enhancement of the radiation effects by D-allose in head and neck cancer cells*. Cancer Lett, 2011. **306**(1): p. 60-6.
268. Indo, K., et al., *Effects of D-allose in combination with docetaxel in human head and neck cancer cells*. Int J Oncol, 2014. **45**(5): p. 2044-50.
269. Haas, B., et al., *Thioredoxin Confers Intrinsic Resistance to Cytostatic Drugs in Human Glioma Cells*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
270. Arner, E.S.J., *Effects of Mammalian Thioredoxin Reductase Inhibitors*. Handb Exp Pharmacol, 2021. **264**: p. 289-309.
271. Eckford, P.D. and F.J. Sharom, *ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs*. Chem Rev, 2009. **109**(7): p. 2989-3011.
272. Bartels, A.L., *Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(26): p. 2771-7.

273. Kondratov, R.V., et al., *Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14078-83.

BIOGRAFIJA

Mirna N. Jovanović rođena je 27. jula 1987. godine u Beogradu, gde je završila XII beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2011. godine, dok je master studije na istom fakultetu, na modulu Biofizika upisala 2014. godine. Master rad, urađen na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Marine Stanić i dr Miroslava Živića, pod naslovom „Efekat 9-antracenkARBOKSILNE kiseline na disanje gljive *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff, 1925 i isečka korena krastavca *Cucumis sativus* L.“, odbranila je 2015. godine. Doktorske studije na Univerzitetu u Beogradu, modul Biofizika, upisala je 2015. godine. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Biologija, podmodul Eksperimentalna neurobiologija, upisala je 2017. godine. Od 2016. zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2019. kao istraživač saradnik na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Od jula 2016. do novembra 2017. bila je angažovana na projektu „Plastičnost mozga tokom starenja: uticaj dijetalne restrikcije i anestezije“ (#173056), od novembra 2017. godine na projektu „Identifikacija molekularni markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ (#41031), a od 2018. do 2020.godine na projektu „THIOREDIN – Development of thioredoxin reductase inhibitors towards new anti-cancer agents“ (RUS_ST2017-309). Do danas je koautor 11 radova u časopisima od međunarodnog značaja i ima 15 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Мирна Н. Јовановић**

Број индекса **Б3032/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редуктазе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Мирна Јовановић**

Број индекса **Б3032/2017**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редуктазе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома**

Менторидр **Ана Подолски-Ренић** и др **Сања Дацић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Развој антитуморске стратегије применом инхибиције тиоредоксин-редукзе 1 у ћелијским моделима глиобластома и неуробластома

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
- 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____
