



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET



***IN VITRO* ISPITIVANJE ULOGE ENZIMA
CIKLOOKSIGENAZE-2 U ETIOPATOGENEZI I TERAPIJI
ADENOKARCINOMA PLUĆA I ADENOKARCINOMA KOLONA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Karmen Stankov

Prof. dr Branislav Perin

Kandidat:

Vanesa Sekeruš

Novi Sad, 2023. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

| | |
|---|---|
| Врста рада: | Докторска дисертација |
| Име и презиме аутора: | Ванеса Секеруш |
| Ментор (титула, име, презиме, звање, институција) | Проф. др Кармен Станков, редовни професор, Катедра за биохемију, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду Проф. др Бранислав Перин, редовни професор, Катедра за интерну медицину, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду |
| Наслов рада: | <i>In vitro</i> испитивање улоге ензима циклооксигеназе-2 у етиопатогенези и терапији аденокарцинома плућа и аденокарцинома колона |
| Језик публикације (писмо): | Српски (латиница) |
| Физички опис рада: | Унети број: Страница: 310 Поглавља: 7 Референци: 368 Табела: 139 Слика: 15 Графикона: 138 Прилога: 1 |
| Научна област: | Медицина |
| Ужа научна област (научна дисциплина): | Биохемија |
| Кључне речи / предметна одредница: | циклооксигеназа-2; неоплазме плућа; неоплазме колона; карциногенеза; епигеномика; целекоксиб; децитабин; силибинин; жучне киселине и соли; <i>in vitro</i> методе |
| Резиме на језику рада: | Увод: Циклооксигеназа-2 (<i>COX-2</i>) представља индуцибилан <i>COX</i> изоензим, чија је експресија у већини ткива веома ниска, али се повећава у стањима акутне и хроничне инфламације, под дејством бројних физичких, хемијских и биолошких фактора, укључујући и карциногене. Повећана експресија ензима <i>COX-2</i> и његовог најважнијег продукта простагландина Е2 (ПГЕ2) детектована је у малигним туморима. Сматра се да метилација ДНК, епигенетски догађај посредован ензимима ДНК метилтрансферазама (ДНМТ), има важну улогу у транскрипционом „утишавању” тумор-супресор гена који су повезани са <i>COX-2</i> сигналним путевима. Циљ: <i>In vitro</i> утврђивање цитотоксичне активности целекоксиба, селективног <i>COX-2</i> инхибитора, као и 5-аза-2'-деоксицитидина (децитабина), деметилационог агенса, на хуманим ћелијским линијама аденокарцинома плућа (A549), аденокарцинома колона (HT-29) и феталних плућних фибробласта (MRC-5). Циљ јесте и испитивање |

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

експресије гена, који су укључени у процес канцерогенезе, у *A549*, *HT-29* и *MRC-5* ћелијама које су третиране целекоксибом, односно децитабином, као и њиховим комбинацијама са природним супстанцама – силибинином и жучним киселинама (хенодеоксихолном (ХДХ) и урсодеоксихолном киселином (УДХ)).

Метод: Цитотоксичност испитиваних супстанци на *A549*, *HT-29* и *MRC-5* ћелијама евалуирана је *MTT* тестом. Квантификација генске експресије изведена је методом *qRT-PCR*, а анализирана је компаративном $\Delta\Delta Ct$ методом, уз *ACTB* као референтни ген. Статистичка обрада резултата је урађена једнофакторском анализом варијансе (АНОВА) са Такијевим *post-hoc* тестом.

Резултати: Целекоксиб и децитабин испољавају концентрацијски-зависну цитотоксичност, односно инхибицију вијабилности и пролиферације малигну и нормалних ћелија. У *A549* и *HT-29* ћелијама, у поређењу са резултатима добијеним у нетретираној, контролној групи ћелија, уочава се да је целекоксиб смањio експресију гена који су укључени у синтезу *COX-2* и ПГЕ2 (*PTGS2* и *PTGES*), а повећао експресију гена задуженог за катаболизам ПГЕ2 (*HPGD*), који кодира синтезу ензима 15-хидроксипростагландин дехидрогеназе (15-ПГДХ). Силибинин је показао синергистичко антиинфламаторно дејство са целекоксибом у погледу повећања експресије *HPGD* гена у *A549* и *HT-29*, али и смањења експресије *PTGS2* гена у *HT-29* ћелијама. УДХ је испољила потпуно синергистичко антиинфламаторно дејство са целекоксибом у *A549*, док се у *HT-29* ћелијама тај синергизам запажа у погледу смањења експресије *PTGS2* и повећања експресије *HPGD* гена. У обе малигне ћелијске линије целекоксиб је смањio ниво мРНК за проинфламаторни транскрипциони фактор *NFκB*, уз уочено адитивно дејство котретмана са силибинином. Испитиване жучне киселине су то синергистичко дејство испољиле само у *HT-29* ћелијама. Испитивање експресије тумор-супресор гена показало је да је целекоксиб повећао експресију *TP53* у *A549* ћелијама, а у *A549* и *HT-29* *PTEN* експресију. У обе ћелијске линије додаток силибинина и УДХ целекоксиду повећао је количине *TP53* и *PTEN*. У *A549* ћелијама и ХДХ је деловала синергистички са целекоксибом на повећање нивоа ових тумор-супресора. Целекоксиб је изазвао повећање количине мРНК за проапоптотски *BAX* ген, а смањio количине мРНК за антиапоптотски *BCL2* ген у *A549* и *HT-29* ћелијама. Силибинин и жучне киселине су различито деловали на гене укључене у регулацију процеса апоптозе, али је додаток ових природних супстанци целекоксиду неминовно усмеравао малигне ћелије ка апоптози, посматрајући однос мРНК *BAX/BCL2*. Резултати показују да је третман малигну ћелија целекоксибом повећао експресију *CDH1* гена, који кодира синтезу тумор-супресорског епителног протеина Е-кадхерина, а смањio ниво гена задужених за синтезу важних матриксних металопроотеиназа (*MMP2* и *MMP9*) које имају улогу у туморској инвазији и метастазирању. Силибинин и УДХ су показали повољна дејства на смањење метастатског потенцијала *A549* и *HT-29* ћелија, с обзиром на синергистички утицај са целекоксибом у погледу модулације експресије наведених гена. Децитабин је негативно деловао на количине мРНК за сва три ензима ДНМТ (*DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B*) у *A549* и *HT-29* ћелијама. Резултати показују да је третман *A549* ћелија децитабином, смањујући експресију транскрипционог репресора *ZEB1*, довео до активације транскрипције *CDH1* и *HPGD* тумор-супресорских гена. Потпуно синергистичко дејство са децитабином у *A549* испољили су силибинин и УДХ.

Закључак: С обзиром на добијене IC_{50} вредности за целекоксиб, закључује се да су малигне ћелије осетљивије на селективну *COX-2* инхибицију, у поређењу са нормалним ћелијама, што указује на важну улогу ензима *COX-2* у преживљавању и пролиферацији ћелија аденокарцинома плућа и колоне. Закључује се и да постоји могућност модулације експресије гена укључених у канцерогенезу применом

| | |
|---|---|
| | <p>селективног <i>COX-2</i> инхибитора. Показано је да деметилациони агенс има улогу у реактивацији епигенетски „утишаних” тумор-супресорских гена који кодирају синтезу Е-кадхерина и 15-ПГДХ у ћелијама аденокарцинома плућа. Такође, потврђена су синергистичка антинеопластична дејства силибинина и жучних киселина са целекоксибом и децитабином, што отвара могућности примене нових комбинованих фармаколошких стратегија у терапији аденокарцинома плућа и колона.</p> |
| Датум прихватања теме од стране надлежног већа: | 28. 03. 2016. |
| Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба) | |
| Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција) | Председник: Члан: Члан: Члан: |
| Напомена: | |

KEY WORD DOCUMENTATION²

| | |
|--|---|
| Document type: | Doctoral dissertation |
| Author: | Vanesa Sekeruš |
| Supervisor (title, first name, last name, position, institution) | Prof. Dr Karmen Stankov, MD, PhD, Full Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Novi Sad Prof. Dr Branislav Perin, MD, PhD, Full Professor, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Novi Sad |
| Thesis title: | <i>In vitro</i> research of the role of the enzyme cyclooxygenase-2 in etiopathogenesis and treatment of lung adenocarcinoma and colon adenocarcinoma |
| Language of text (script): | Serbian language (latin script) |
| Physical description: | Number of: Pages: 310 Chapters: 7 References: 368 Tables: 139 Illustrations: 15 Graphs: 138 Appendices: 1 |
| Scientific field: | Medicine |
| Scientific subfield (scientific discipline): | Biochemistry |
| Subject, Key words: | Cyclooxygenase 2; Lung Neoplasms; Colonic Neoplasms; Carcinogenesis; Epigenomics; Celecoxib; Decitabine; Silybin; Bile Acids and Salts; In Vitro Techniques |
| Abstract in English language: | Introduction: Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible COX isoenzyme, whose expression is very low in most tissues, but increases in states of acute and chronic inflammation, under the influence of numerous physical, chemical and biological factors, including carcinogens. Increased expression of the enzyme COX-2 and its most important product prostaglandin E2 (PGE2) has been detected in malignant tumors. DNA methylation, an epigenetic event mediated by DNA methyltransferases (DNMT) enzymes, is thought to play an important role in the transcriptional "silencing" of tumor-suppressor genes associated with COX-2 signaling pathways. Objective: <i>In vitro</i> determination of the cytotoxic activity of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, as well as 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), a demethylating agent, on human cell lines of lung adenocarcinoma (A549), colon adenocarcinoma (HT-29) and fetal lung fibroblasts (MRC-5). The aim is also to examine the expression of genes involved in the process of carcinogenesis in A549, HT-29 and MRC-5 cells treated with celecoxib and decitabine, as well as with their combinations with natural substances – |

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5б – Statement on the authority,

5в – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5г – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

silibinin and bile acids (chenodeoxycholic (CDCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA)).

Methods: The cytotoxicity of the tested substances on A549, HT-29 and MRC-5 cells was evaluated by the MTT test. Quantification of gene expression was performed using the qRT-PCR method, and was analyzed using the comparative $\Delta\Delta C_t$ method, with *ACTB* as a reference gene. Statistical processing of the results was done by one-factor analysis of variance (ANOVA) with Taki's *post-hoc* test.

Results: Celecoxib and decitabine exhibit concentration-dependent cytotoxicity, i.e. inhibition of viability and proliferation of malignant and normal cells. In A549 and HT-29 cells, compared to the results obtained in the untreated, control group of cells, it was observed that celecoxib decreased the expression of the genes involved in the synthesis of COX-2 and PGE2 (*PTGS2* and *PTGES*), and increased the expression of the gene responsible for the catabolism of PGE2 (*HPGD*), which encodes the synthesis of the enzyme 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH). Silibinin showed a synergistic anti-inflammatory effect with celecoxib in terms of increasing *HPGD* gene expression in A549 and HT-29, but also decreasing *PTGS2* gene expression in HT-29 cells. UDCA exhibited a fully synergistic anti-inflammatory effect with celecoxib in A549, while in HT-29 cells this synergism was observed in terms of decreasing *PTGS2* expression and increasing *HPGD* gene expression. In both malignant cell lines, celecoxib reduced the mRNA level for the pro-inflammatory transcription factor *NFκB*, with observed the additive effect of co-treatment with silibinin. The tested bile acids exhibited this synergistic effect only in HT-29 cells. Examining the expression of tumor-suppressor genes showed that celecoxib increased the expression of *TP53* in A549 cells, and *PTEN* expression in A549 and HT-29. In both cell lines addition of silibinin and UDCA to celecoxib increased the amounts of *TP53* and *PTEN*. In A549 cells CDCA also acted synergistically with celecoxib to increase the levels of these tumor-suppressors. Celecoxib caused an increase in the amount of mRNA for the proapoptotic *BAX* gene, and decreased the amount of mRNA for the antiapoptotic *BCL2* gene in A549 and HT-29 cells. Silibinin and bile acids acted differently on the genes involved in the regulation of the apoptosis, but the addition of these natural substances to celecoxib inevitably directed the malignant cells towards apoptosis, observing the *BAX/BCL2* mRNA ratio. The results show that the treatment of malignant cells with celecoxib increased the expression of the *CDH1* gene, which encodes the synthesis of the tumor-suppressor epithelial protein E-cadherin, and decreased the level of the genes responsible for the synthesis of important matrix metalloproteinases (*MMP2* and *MMP9*) that play a role in tumor invasion and metastasis. Silibinin and UDCA showed beneficial effects on reducing the metastatic potential of A549 and HT-29 cells, considering the synergistic effect with celecoxib regarding the modulation of the expression of the mentioned genes. Decitabine negatively affected mRNA levels for all three DNMT enzymes (*DNMT1*, *DNMT3A*, and *DNMT3B*) in A549 and HT-29 cells. The results show that the treatment of A549 cells with decitabine, by reducing the expression of the transcriptional repressor *ZEB1*, led to the transcriptional activation of *CDH1* and *HPGD* tumor-suppressor genes. A complete synergistic effect with decitabine in A549 was exhibited by silibinin and UDCA.

Conclusion: Taking into account the obtained IC_{50} values for celecoxib, it is concluded that malignant cells are more sensitive to selective COX-2 inhibition, compared to normal cells, which indicates an important role of the COX-2 enzyme in the survival and proliferation of lung and colon adenocarcinoma cells. It is also concluded that there is a possibility of modulating the expression of genes involved in carcinogenesis using the selective COX-2 inhibitor. It was shown that the demethylating agent has a role in the reactivation of epigenetically "silenced" tumor-suppressor genes that encode the synthesis of E-cadherin and 15-PGDH in lung adenocarcinoma cells. Also, the synergistic antineoplastic effects of silibinin

| | |
|---|---|
| | and bile acids with celecoxib and decitabine were confirmed, which opens the possibility of applying new combined pharmacological strategies in the therapy of lung and colon adenocarcinoma. |
| Accepted on Scientific Board on: | 28. 03. 2016. |
| Defended: (Filled by the faculty service) | |
| Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution) | President: Member: Member: Member: |
| Note: | |

Zahvalnica

Želela bih da se zahvalim svojim mentorima, prof. dr Karmen Stankov i prof. dr Branislavu Perinu, koji su svojim znanjem, iskustvom i iskrenim zalaganjem dali najveći doprinos izradi ove doktorske disertacije.

Od prvog dana naše saradnje, od osnovnih studija, prof. dr Karmen Stankov je usmeravala moj akademski razvojni put. Zahvaljujem joj se za pruženo znanje, vredne savete, ogromnu pomoć, naučne ideje, podršku i poverenje.

Prof. dr Branislav Perin je zaslužan za stručna i naučna nadograđivanja koja su oblikovala moj laboratorijski rad u Institutu za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Momiru Mikovu, rukovodiocu projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Interakcije ksenobiotika i uticaj na sisteme u biomedicini”, u okviru kojeg je urađena ova doktorska disertacija. Hvala prof. dr Mikovu na pruženoj časti i privilegiji da postanem deo istraživačkog tima koji je proširio moje naučne vidike i doprineo spoznaji lepote sveta nauke.

Veliku zahvalnost upućujem prof. dr Ljiljani Andrijević za dragocene naučne konsultacije tokom doktorskih studija, iskrenu podršku, pomoć i razumevanje.

Neizmernu zahvalnost dugujem doc. dr Nebojši Pavloviću na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu, obradi rezultata, nesebično podeljenom znanju i naučnom iskustvu, kolegijalnosti i prijateljskoj podršci.

Hvala asist. dr sci. med. Bojanu Stanimirovu za sugestije, podršku i divnu saradnju na Katedri za biohemiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Zahvalnost upućujem prof. dr Aleksandri Nikolić i doc. dr Jasmini Katanić koje su sa mnom podelile znanje i laboratorijsko iskustvo tokom mojih specijalističkih studija, što mi je veoma pomoglo u izvođenju eksperimenata i pisanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr sci. med. Gordani Bogdanović, dr sci. Vesni Kojić i doc. dr Ivi Barjaktarović na pomoći u realizaciji dela eksperimenata, savetima i srdačnoj komunikaciji.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj Majci, mom najboljem prijatelju i savezniku, na bezuslovnoj ljubavi, snazi, podršci, nemerljivom strpljenju, razumevanju i toplini kojom je prigrlila moj život.



Doktorsku disertaciju posvećujem mojim anđelima, Majkici i Dedi, Julki Sekeruš (1933-2015) i Toši Sekeruš (1930-2015), koji su utkali pravac mog celokupnog života i bili moj najsnažniji oslonac do kraja svog života. Sve njihovo zabeleženo je u meni kao najveći blagoslov. One tanane, nebeske niti spokoja koje znače da nikada nisam sama i da mogu sve. Hvala im za najlepše dane i boje mog detinjstva, odrastanja i beskonačne ljubavi.

Sa velikim poštovanjem, ponosom i posebnom emocijom pominjem njihova imena.

Vanesa Sekeruš

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Karcinom pluća..... | 1 |
| 1.2. Kolorektalni karcinom | 4 |
| 1.3. Inflamacija i karcinom | 8 |
| 1.4. Enzimi ciklooksigenaze, COX..... | 10 |
| 1.4.1. Tromboksan A2, TxA2..... | 13 |
| 1.4.2. Prostaciklin, PGI2 | 15 |
| 1.4.3. Prostaglandin E2, PGE2 | 16 |
| 1.4.3.1. PGE2, proinflamatorni i imunosupresivni prostanoid | 19 |
| 1.5. Uloga COX-2 u procesu apoptoze | 21 |
| 1.5.1. Biohemijske i molekularne osnove apoptoze | 21 |
| 1.5.2. Spoljašnji (receptorski) signalni put apoptoze..... | 23 |
| 1.5.3. Unutrašnji (mitohondrijalni) signalni put apoptoze..... | 24 |
| 1.5.4. Značaj tumor-supresor gena <i>TP53</i> u apoptozi | 25 |
| 1.6. Uloga COX-2 u regulaciji ćelijske proliferacije | 28 |
| 1.6.1. Transkripcijski faktor NF- κ B | 28 |
| 1.6.2. Tumor-supresor PTEN | 31 |
| 1.7. Povezanost COX-2 sa MRP1/ABCC1 transportnim proteinom | 33 |
| 1.8. Uloga COX-2 u procesima invazije i metastaziranja malignih ćelija | 36 |
| 1.8.1. Tumor-supresor E-kadherin..... | 37 |
| 1.8.2. Matriksne metaloproteinaze (MMP) | 38 |
| 1.9. Epigenetski aspekti kancerogeneze..... | 40 |
| 1.9.1. Farmakološki značaj 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabina) | 43 |
| 1.10. Oksidativni stres | 45 |
| 1.10.1. Reaktivne kiseonične i azotne vrste..... | 45 |
| 1.10.2. Antioksidativna zaštita organizma..... | 49 |
| 1.11. Celekoksib, selektivni COX-2 inhibitor | 52 |
| 1.12. Silibinin, flavonolignan izolovan iz biljke <i>Silybum marianum</i> | 57 |
| 1.13. Žučne kiseline u ulozi signalnih molekula..... | 60 |
| 1.13.1. Farnezoilni X receptor (FXR)..... | 63 |
| 1.13.2. TGR5 receptor | 65 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZE | 68 |
| 2.1. Ciljevi istraživanja | 68 |
| 2.2. Hipoteze istraživanja | 69 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 70 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Materijal..... | 70 |
| 3.1.1. Ćelijske kulture..... | 70 |
| 3.2. Metode..... | 71 |
| 3.2.1. Priprema ćelijskih kultura..... | 71 |
| 3.2.2. Određivanje citotoksičnosti ispitivanih supstanci..... | 72 |
| 3.2.2.1. Test odbacivanja boje..... | 72 |
| 3.2.2.2. MTT test..... | 73 |
| 3.2.3. Priprema uzoraka ćelijskih linija za genetska i biohemijska ispitivanja..... | 75 |
| 3.2.4. Analiza genske ekspresije..... | 76 |
| 3.2.4.1. Izolacija, određivanje koncentracije i ispitivanje kvaliteta izolovane RNA..... | 77 |
| 3.2.4.2. Postupak reverzne transkripcije..... | 80 |
| 3.2.4.3. Izvođenje metode qRT-PCR..... | 81 |
| 3.2.5. Biohemijske analize oksidativnog statusa..... | 86 |
| 3.2.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina..... | 86 |
| 3.2.5.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije..... | 86 |
| 3.2.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)..... | 87 |
| 3.2.5.4. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)..... | 88 |
| 3.2.5.5. Određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST)..... | 89 |
| 3.2.5.6. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)..... | 89 |
| 3.2.6. Statistička obrada rezultata..... | 91 |
| 4. REZULTATI..... | 92 |
| 4.1. Rezultati <i>in vitro</i> studije na A549 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma pluća..... | 92 |
| 4.1.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema A549 ćelijskoj liniji..... | 92 |
| 4.1.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji..... | 95 |
| 4.1.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema A549 ćelijskoj liniji..... | 98 |
| 4.2. Rezultati <i>in vitro</i> studije na HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona..... | 101 |
| 4.2.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema HT-29 ćelijskoj liniji..... | 101 |
| 4.2.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji..... | 104 |
| 4.2.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji..... | 107 |
| 4.3. Rezultati <i>in vitro</i> studije na MRC-5 ćelijskoj liniji humanih fetalnih fibroblasta pluća..... | 110 |
| 4.3.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema MRC-5 ćelijskoj liniji..... | 110 |
| 4.3.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji..... | 113 |
| 4.3.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji..... | 116 |
| 4.4. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom..... | 119 |
| 4.4.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije..... | 119 |
| 4.4.1.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u A549 ćelijskoj liniji..... | 120 |
| 4.4.1.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u HT-29 ćelijskoj liniji..... | 123 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.1.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u MRC-5 ćelijskoj liniji..... | 127 |
| 4.4.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije | 132 |
| 4.4.2.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u A549 ćelijskoj liniji . | 132 |
| 4.4.2.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji | 139 |
| 4.4.2.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u MRC-5 ćelijskoj liniji | 145 |
| 4.4.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese transporta | 151 |
| 4.4.3.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese transporta u A549 ćelijskoj liniji | 151 |
| 4.4.3.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese transporta u HT-29 ćelijskoj liniji..... | 153 |
| 4.4.3.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese transporta u MRC-5 ćelijskoj liniji | 155 |
| 4.4.4. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja | 158 |
| 4.4.4.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u A549 ćelijskoj liniji | 158 |
| 4.4.4.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u HT-29 ćelijskoj liniji | 163 |
| 4.4.4.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u MRC-5 ćelijskoj liniji | 167 |
| 4.4.5. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina | 171 |
| 4.4.5.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u A549 ćelijama..... | 171 |
| 4.4.5.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u HT-29 ćelijama..... | 174 |
| 4.4.5.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u MRC-5 ćelijama | 177 |
| 4.4.6. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane | 181 |
| 4.4.6.1. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u A549 ćelijama..... | 181 |
| 4.4.6.2. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u HT-29 ćelijama..... | 185 |
| 4.4.6.3. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u MRC-5 ćelijama | 189 |
| 4.5. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim decitabinom..... | 194 |
| 4.5.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom | 194 |
| 4.5.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom | 202 |
| 4.5.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom | 209 |
| 4.6. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom | 217 |
| 4.6.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom..... | 217 |
| 4.6.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom..... | 218 |
| 4.6.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom | 219 |
| 4.7. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom | 221 |

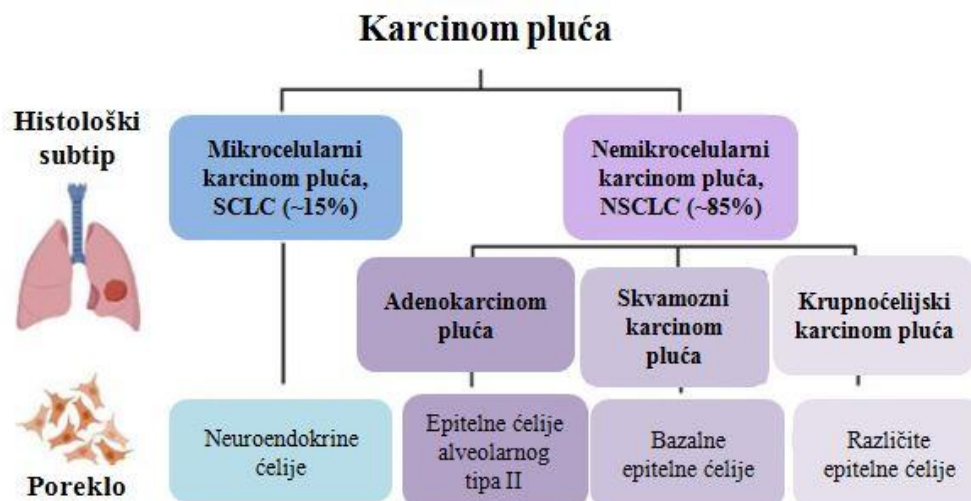
| | |
|--|------------|
| 4.7.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom | 221 |
| 4.7.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom | 225 |
| 4.7.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom | 229 |
| 5. DISKUSIJA | 234 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 272 |
| 7. LITERATURA | 276 |
| PRILOG - Lista skraćenica..... | 307 |

1. UVOD

1.1. Karcinom pluća

Najnoviji podaci Međunarodne agencije za istraživanje kancera i projekta GLOBOCAN 2020 navode da je, posmatrajući oba pola, karcinom pluća po incidenciji drugi karcinom u svetu, posle karcinoma dojke, i prvi uzrok smrtnosti usled malignih bolesti, sa 2.2 miliona novoobolelih, odnosno 1.8 miliona smrtnih slučajeva u 2020. godini. U muškoj populaciji karcinom pluća je vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta usled maligniteta, dok je u ženskoj populaciji treći po incidenciji (posle karcinoma dojke i kolorektalnog karcinoma), a na drugom mestu po stopi mortaliteta (iza karcinoma dojke) [1].

Patohistološki posmatrano, karcinom pluća (sin. karcinom bronha) vodi poreklo iz epitelnih ćelija bronhijalnog stabla i deli se na sitnoćelijski karcinom (*small-cell lung cancer*, SCLC), koji čini oko 15% svih karcinoma pluća, i na nesitnoćelijski karcinom pluća (*non-small-cell lung cancer*, NSCLC, približno 85%), kojem pripadaju adenokarcinom (oko 40%), skvamozni karcinom (oko 30%) i krupnoćelijski karcinom (oko 10%), kao najučestaliji NSCLC subtipovi (slika 1.1) [2-4].



Slika 1.1. Histološka klasifikacija karcinoma pluća (preuzeto i modifikovano iz [4]).

Tokom poslednje tri decenije, u Republici Srbiji postoji trend rasta incidencije karcinoma pluća. U periodu od 1999. do 2008. godine taj porast iznosio je 27,4% i bio je veći u ženskoj nego u muškoj populaciji. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, u 2019. godini zabeleženo je 6863 novodijagnostikovanih slučajeva karcinoma pluća (2069 kod žena i 4794 kod muškaraca), odnosno 16,2%

novodijagnostikovanih malignih tumora pripadalo je upravo karcinomu pluća. Podaci iz 2019. godine ukazuju da je 50% dokazanih karcinoma pluća bilo pod dijagnozom adenokarcinoma, a kod 60% obolelih bolest je dijagnostikovana u uznapredovalom stadijumu [5].

Najvažniji faktor rizika za nastanak karcinoma pluća jeste konzumiranje duvana. Smatra se da je pušenje odgovorno za nastanak 80-90% slučajeva karcinoma pluća. Komponente duvanskog dima izazivaju zapaljensku reakciju u disajnim putevima. Katran cigareta sadrži visoke koncentracije stabilnih slobodnih radikala (10^{17} spinova/g). Višegodišnje konzumiranje duvana doprinosi stvaranju oksidativnog stresa i hronične zapaljenske reakcije u disajnim putevima. Nakupljanje inflamatornih ćelija, uz oslobađanje slobodnih radikala i proinflamatornih citokina, poput interleukina-1 (IL-1), IL-6 i faktora tumorske nekroze- α (TNF- α), stvara medijum za inicijaciju karcinogeneze u epitelu disajnog stabla, a kasnije i za promociju i progresiju malignog procesa. Osim toga, pušenje je značajan faktor rizika za razvoj hronične opstruktivne bolesti pluća (HOBP), koja predstavlja hroničnu inflamatornu i progresivnu bolest, čime se zaključuje da je hronična inflamacija važan činilac u etiopatogenezi HOBP i karcinoma pluća. Brojne studije su ustanovile da je HOBP značajan faktor rizika za razvoj karcinoma bronha, posebno skvamoznog karcinoma kod pušača. Kod 40-70% pacijenata obolelih od HOBP dijagnostikovano je karcinom pluća. Iako se dugo smatralo da su pluća sterilna, savremene metode sekvenciranja bakterijske 16S ribozomalne ribonukleinske kiseline (rRNA) utvrdile su postojanje kompleksne mikrobiote u gornjim i donjim partijama respiratornog trakta. Komponente duvanskog dima menjaju sastav bakterijske flore, sa dominacijom bakterija vrsta *Moraxella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* i drugih, koje uzrokuju hroničnu patogensku stimulaciju i hroničnu zapaljensku reakciju. Svojim metabolitima izazivaju lokalnu imunosupresiju, aktivaciju proto-onkogeni i invaziju mukoze, čime učestvuju ne samo u progresiji HOBP, nego i u plućnoj karcinogenezi [6, 7].

U odnosu na ukupan broj obolelih, oko 10-20% karcinoma pluća, pogotovo adenokarcinoma, dijagnostikuje se kod nepušača. Osim pasivnog udisanja duvanskog dima, i drugi faktori rizika doprinose nastanku karcinoma pluća kod nepušača, koji se, genotipski posmatrano, razlikuje od bolesti dijagnostikovane kod pušača. Radon, radioaktivni gas, nastao degradacijom uranijuma, predstavlja vodeći faktor rizika kod nepušača. U uzročnu vezu sa karcinomom pluća dovode se i azbest, arsen, hrom, pesticidi, jonizujuće zračenje i hemijske komponente nastale kao produkti sagorevanja čvrstih goriva. Takođe, skorašnja studija je pokazala da hronična inflamacija izazvana intracelularnim patogenom *Mycobacterium tuberculosis* povećava rizik za karcinom pluća, sa značajnim latentnim periodom [8].

Karcinom pluća nastaje kao posledica složene interakcije faktora spoljašnje sredine i endogenih faktora. Molekularna osnova karcinoma pluća ogleda se u višestepenoj akumulaciji genetskih i epigenetskih promena u epitelnim ćelijama, koje vode ka destabilizaciji strukture deoksiribonukleinske kiseline (DNA), aktivaciji proto-onkogeni i inaktivaciji tumor-supresora. Prve molekularne promene u bronhijalnom epitelu jesu mikrosatelitna nestabilnost (*microsatellite instability*, MSI) ili, pak, gubitak heterozigotnosti (*loss of heterozygosity*, LOH). Aktiviraju se brojni faktori rasta i ćelijski signalni putevi koji vode ka gubitku kontrole ćelijske diferencijacije i proliferacije, izbegavanju mehanizama programirane ćelijske smrti i stimulaciji angiogeneze. Ćelije stiču invazivne osobine i sklonost ka metastaziranju. DNA mutacije, koje rukovode karcinogenezom, nazivaju se pokretačkim mutacijama (*driver mutations*). Upotreba savremenih molekularnih tehnologija ustanovila je da su solidni tumori veoma genetski heterogeni ako se pogleda isti histološki tip tumora različitih pacijenata, ali prisutna je i ćelijska i genetska heterogenost unutar tumora kod istog pacijenta (intratumorska heterogenost), kao i razlika u primarnom tumoru i udaljenim metastazama (intertumorska heterogenost), što otežava molekularnu dijagnostiku i terapiju. Takođe, molekularna ispitivanja pokazala su da sporadični tumori, uključujući i karcinom pluća, u svojoj etiopatogenezi zahtevaju najmanje tri ili više različitih događaja koji dovode do mutacija i aberantne aktivacije ćelijskih signalnih puteva [9].

Smatra se da manje od 5% karcinoma pluća poseduje naslednu komponentu, najčešće zasnovanu na naslednim, germinativnim mutacijama u tumor-supresor genu *TP53* (Li-Fraumenijev sindrom) ili na germinativnoj T790M mutaciji *EGFR* gena (*epidermal growth factor receptor*, *ERBB1*) [10].

Epigenetske promene, posebno ispitivanje uloga nekodirajućih mikroRNA (miRNA) u tumorima pluća, imaju sve veći značaj u torakalnoj onkologiji tokom poslednje decenije, kako u ranoj detekciji karcinoma pluća u uzorcima telesnih tečnosti (tečna biopsija), tako i u prognozi bolesti i predikciji odgovora na terapijske modalitete [11].

Najveći napredak učinjen je u lečenju pacijenata obolelih od uznapredovalog stadijuma NSCLC, u smislu otkrića prediktivnih biomarkera u tumorskom tkivu koji omogućuju savremeni pristup u personalizovanoj dijagnostici i terapiji karcinoma pluća, u okviru strategije precizne individualizovane medicine. Najvažnije genetske abnormalnosti, značajne za dijagnostiku i terapiju NSCLC (*druggable genes*), jesu mutacije u *EGFR* genu, *KRAS* mutacije (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *ALK* hromozomski rearanžmani (*anaplastic lymphoma kinase*), koji rezultuju u pojavi *ALK* genskih fuzija, *ROS1*

fuzije (*Ros proto-oncogene 1*), *BRAF* mutacije (*V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), amplifikacije i mutacije *MET* gena, koji kodira sintezu receptora hepatocitnog faktora rasta (*hepatocyte growth factor receptor*, HGFR), mutacije i amplifikacije *HER2* gena (*human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2*), *NTRK* fuzije (*neurotrophic receptor tyrosine kinase*), *RET* fuzije (*Ret proto-oncogene*) i drugi [12].

Inovativna strategija u onkologiji jeste i imunoterapija, koja ima za cilj da blokira interakciju imunske ćelije i maligne ćelije na mestu tzv. kontrolnog punkta i da podstakne imunološki sistem da prepozna maligne ćelije i eliminiše ih. U pitanju je primena monoklonalnih antitela, koja predstavljaju inhibitore kontrolnih punktova (*checkpoint inhibitors*), kao što je kontrolni punkt PD-1 receptor (*programmed death-1 receptor*) i njegov ligand PD-L1 (*programmed death-ligand 1*). Imunoterapija je doprinela velikom pomaku u lečenju uznapredovalog NSCLC [13].

1.2. Kolorektalni karcinom

Podaci projekta GLOBOCAN 2020 navode da je u 2020. godini bilo oko 1.9 miliona novodijagnostikovanih kolorektalnih karcinoma i 935.000 smrtnih slučajeva usled ovog malignog oboljenja, čime je kolorektalni karcinom prema broju novoobolelih dospelo na treće mesto (posle karcinoma dojke i pluća), ali na drugo mesto po mortalitetu (posle karcinoma pluća). Posmatrajući muški pol, kolorektalni karcinom je treći i po morbiditetu i mortalitetu, posle karcinoma pluća i prostate, odnosno karcinoma pluća i jetre. U ženskoj populaciji kolorektalni karcinom je drugi po incidenciji, čime prati karcinom dojke, a po stopi mortaliteta nosi treće mesto, prateći karcinom dojke i pluća [1].

Adenokarcinom, koji vodi poreklo iz epitelnih ćelija kolorektalne mukoze, čini više od 90% karcinoma kolorektuma. Karakteriše se žlezdanim strukturama na osnovu kojih se određuje histološki gradus – slabo, umereno i dobro diferentovani adenokarcinom [14].

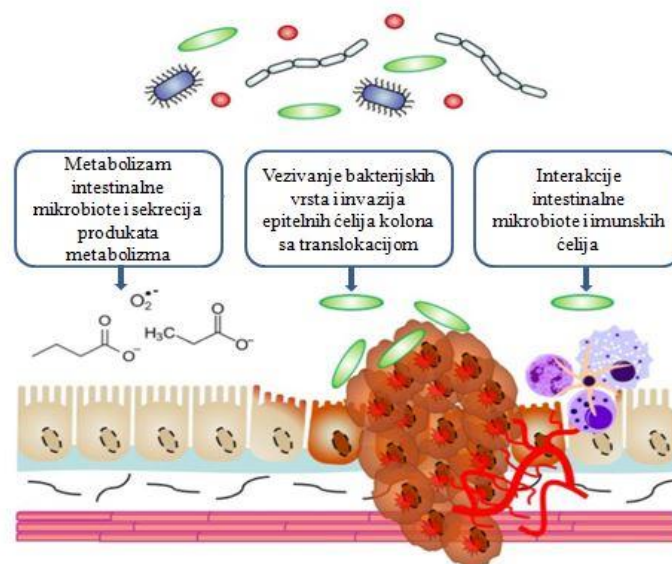
U Republici Srbiji u 2018. godini broj novoobolelih od kolorektalnog karcinoma bio je 6049, čime je ova bolest činila 12,6% svih dokazanih maligniteta u toj godini, dok je broj umrlih iznosio 3187 [15].

Smatra se da je starosna dob glavni faktor rizika za kolorektalni karcinom, odnosno da su osobe starije od 50 godina pod većim rizikom. Inflammatory bolest creva (IBD), koja predstavlja idiopatsku hroničnu bolest digestivnog trakta i kojoj pripadaju ulcerozni kolitis i Kronova bolest, takođe je povezana sa povećanim rizikom obolevanja od kolorektalne

neoplazme. Studije su pokazale da kod obolelih od ulceroznog kolitisa ili Kronove bolesti, sa bolešću koja traje 20 godina, taj rizik iznosi približno 8%. Starosna dob, u kojoj je postavljena dijagnoza IBD, trajanje i proširenost bolesti, kao i stepen histološke inflamacije doprinose riziku obolevanja od kolorektalnog karcinoma. Osim godina pacijenta i IBD, pozitivna porodična anamneza je važan faktor rizika o kojem je potrebno voditi računa. Faktorima rizika koji se mogu kontrolisati pripadaju način ishrane, nedostatak fizičke aktivnosti, gojaznost, posebno visceralnog tipa, pušenje i upotreba većih količina alkohola u dužem vremenskom periodu. Visceralno masno tkivo, putem sekrecije proinflamatornih citokina, stvara uslove za hroničnu inflamaciju u debelom crevu. Konzumiranje crvenog mesa i mesnih prerađevina dovodi do oslobađanja hem grupe u digestivnom traktu, čiji su produkti kancerogene N-nitrozo komponente, heterociklični amini i policiklični ugljovodonici, ali i prooksidativno gvožđe. Takođe, lipidna peroksidacija sastojaka crvenog mesa, prerađevina i masti stvara citotoksične i genotoksične aldehide. Acetaldehid, najvažniji metabolit etanola, i karcinogeni duvanskog dima povećavaju rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma. Fizička aktivnost, ishrana bogata dijetetskim vlaknima i ribom, voće, povrće, suplementi kalcijuma, magnezijuma, folata, vitamina D i B6, i upotreba nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) pokazali su se kao značajni protektivni faktori [16, 17].

Naučne činjenice ukazuju da intestinalna mikrobiota, sačinjena od 10^{13} - 10^{14} mikroorganizama, ima značajnu i kompleksnu ulogu u kolorektalnoj karcinogenezi. Normalna intestinalna mikrobiota je važna za održavanje integriteta intestinalnog epitela, obezbeđivanje energije, imunološki odgovor i odbranu od patogenih vrsta. Utvrđeno je da, osim obolelih od kolorektalnog karcinoma, i pacijenti sa dokazanim intestinalnim adenomima već sadrže drugačiji profil intestinalne mikrobiote. Bakterijske vrste koje se smatraju proto-onkogenom komponentom mikrobiote normalno kolonizuju crevni epitel, ali njihov povećan broj i sledstvena disbioza predstavljaju faktore koji remete crevnu homeostazu (slika 1.2). Najvažnije bakterijske vrste ove grupe su *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *Escherichia coli*. Hronična inflamacija, direktno aktiviranje onkogenih signalnih puteva, oksidativni stres, genotoksični efekti u smislu negativnog uticaja na strukturu DNA epitelnih ćelija, metaboličke promene i formiranje invazivnog biofilma jesu mehanizmi kojima ove vrste učestvuju u karcinogenezi. Toksin proizveden od strane *B. fragilis* izaziva proteolizu E-kadherina, koji održava međućelijske veze epitelnih ćelija, što omogućuje navedenim patogenima da izazovu invaziju tumorske strome. Bakterijska stimulacija imunog sistema

uzrokuje kontinuiranu sekreciju proinflamatornih citokina, sa infiltracijom imunskih ćelija i promocijom kancerogeneze. *S. bovis* indukuje produkciju IL-1, IL-8 i aktivaciju proinflamatornog enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2). Dominacija ovih bakterijskih vrsta suprimira rast bakterija koje proizvode kratkolančane organske kiseline, produkte fermentacije dijetetskih vlakana i celuloze, među kojima je najznačajniji butirat. Butirat, putem različitih biohemijskih mehanizama, ispoljava citoprotektivno dejstvo u lumenu kolona. Ishrana bazirana na crvenom mesu i životinjskim mastima remeti metaboličku homeostazu i značajan je činilac u poremećaju ravnoteže crevne flore jer doprinosi stvaranju karcinogenih produkata metabolizma, kao što su N-nitrozo komponente, vodonik sulfid i sekundarne žučne kiseline, uz smanjenje koncentracije butirata. Još uvek nije definisan bakterijski biomarker kolorektalnog karcinoma, ali ova oblast istraživanja se sve više razvija u cilju otkrivanja specifičnog biomarkera za prevenciju, ranu detekciju karcinoma, prognozu bolesti i terapiju [18, 19].

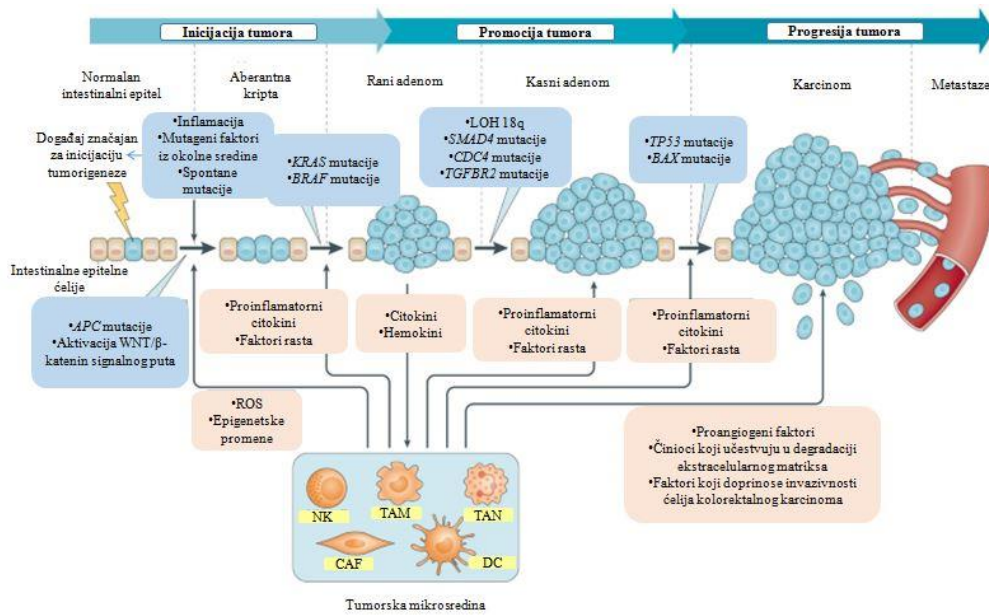


Slika 1.2. Uloga intestinalne mikrobiote u razvoju i progresiji kolorektalnog karcinoma (preuzeto i modifikovano iz [19]).

Oko 5% slučajeva kolorektalnog karcinoma javlja se u okviru poznatih naslednih sindroma, koji su identifikovani kao nasledni nepolipozni kolorektalni karcinom (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC, Linčov sindrom) i porodična adenomatozna polipoza (*familial adenomatous polyposis*, FAP). Kod pacijenata sa HNPCC ustanovljeno je autozomno dominantno nasleđivanje mutacija u genima zaduženim za popravljavanje oštećenja DNA, kao što su *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. U osnovi FAP sindroma nalaze se autozomno dominantno nasleđene mutacije u tumor-supresor genu *APC* (*adenomatous polyposis coli*).

Približno 20% kolorektalnih karcinoma smatra se familijarnim oblikom, u odsustvu opisanih sindroma, ukoliko se bolest javi kod više od jednog člana porodice, posebno ako je osoba mlađa od 50 godina, iako precizni, odnosno konkretni genetski faktori nisu dokazani [20].

Sporadični maligniteti kolona javljaju se kod 70-75% obolelih usled interakcija činilaca spoljašnje sredine sa genetskim faktorima, što za posledicu ima sekvencijalnu akumulaciju somatskih mutacija u proto-onkogenima, tumor-supresor genima i genima zaduženim za popravljjanje DNA oštećenja, uz sledstvenu genomsku nestabilnost (slika 1.3). Uz savremene metode biohemije i molekularne genetike, detekcija genetskih biomarkera predstavlja neizostavan segment savremene onkologije sa sve većim značajem ovih biomarkera u dijagnostici maligniteta, prognozi bolesti i predikciji odgovora na savremene terapijske režime. U procesu tzv. hromozomske nestabilnosti, tokom prve faze inicijacije karcinogeneze, najčešće se mutacije dešavaju u *APC* genu. Ove mutacije su odgovorne za alteraciju WNT signalnog puta i uzrokuju translokaciju β -katenina u ćelijsko jedro, koji stiče ulogu transkripcionog faktora, što dovodi do stvaranja nemalignih adenoma, polipa, koji daljom transformacijom mogu formirati malignu leziju. Mutacije *TP53* gena, koje dovode do inaktivacije njegove tumor-supresorske funkcije, kao i *KRAS*, *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), *BRAF* i *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) mutacije, koje vode ka aberantnoj aktivaciji intraćelijskih signalnih puteva, odgovorne su za fazu progresije, kao i svojstva invazivnosti kolorektalnog karcinoma. MSI je zadužena za gubitak mehanizama za popravljjanje DNA. U etiopatogenezi karcinoma kolona učestvuju i epigenetski mehanizmi, pogotovo hipermetilacije CpG ostrvaca u promoterima gena, sa posledičnim gubitkom funkcije tumor-supresor gena. Važan epigenetski element u karcinogenezi kolorektalnog karcinoma predstavljaju miRNA. U odnosu na gene čiju ekspresiju kontrolišu i kakve posledice u ćelijskoj signalizaciji izazivaju, miRNA se dele na proto-onkogene i tumor-supresorske, sa ulogom potencijalnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih biomarkera. Takođe, s obzirom na činjenicu da je kolorektalni karcinom heterogena bolest u čijoj su patogenezi krucijalni i imunološki mehanizmi, PD-1/PD-L1 imunoterapija zauzima sve veći značaj u terapiji ove neoplazme, pogotovo u tumorima sa visokim stepenom MSI [21-24].



Slika 1.3. Mehanizmi kolorektalne karcinogeneze; NK – ćelije prirodne „ubice”, TAM – tumor-ascocirani makrofagi, TAN – tumor-ascocirani neutrofilni granulociti, CAF – kancer-ascocirani fibroblasti, DC – dendritične ćelije (*preuzeto i modifikovano iz [24]*).

1.3. Inflamacija i karcinom

Inflamacija (sin. zapaljenje) je deo nespecifičnog, urođenog imuniteta i predstavlja odgovor organizma na oštećenje tkiva izazvano fizičkim, hemijskim ili biološkim agensima. Cilj akutnog, tranzitornog inflamatornog odgovora jeste uklanjanje štetnih noksi i oporavak oštećenog tkiva, odnosno uspostavljanje ćelijske i tkivne homeostaze. Međutim, hroničan, produžen inflamatorni odgovor uzrok je ozbiljnih morfoloških i biohemijskih promena u ćelijama i tkivima, sa posledičnim poremećajem homeostaze. Brojni faktori životne sredine, uključujući viruse, bakterije, hemijske agense kao komponente aerozagađenja, vode, zemljišta i namirnica, jonizujuće zračenje i duvanski dim, mogu izazvati hronične upale, posebno u organima koji su direktno ili indirektno izloženi spoljašnjem okruženju, kao što su pluća i debelo crevo. Hronična inflamacija je u epidemiološkim studijama prepoznata kao značajan uzročnik brojnih patoloških stanja, naročito bolesti metabolizma, autoimunih i neurodegenerativnih bolesti, ali i karcinoma [25]. Rudolf Virchow je u 19. veku uočio prisustvo leukocita u tumorima, čime je izneo prva saznanja o povezanosti inflamacije i maligniteta [26].

Kompleksna interakcija epitelnih ćelija i strome, zajedno sa kontinuiranom produkcijom citokina i faktora rasta u okviru tumorskog mikrokruženja, doprinosi

preživljavanju maligno-transformisanih ćelija, njihovoj proliferaciji, vaskularizaciji tumora i disregulaciji imunološkog odgovora organizma domaćina, zapravo ima ulogu u svim događajima koji su značajni za nastanak i progresiju malignih bolesti, pojavu metastaza i rezistencije na različite terapijske modalitete. Brojna istraživanja posvećena su upravo ispitivanju uloge prirodnih i sintetskih antiinflamatornih agenasa u hemoprevenciji karcinoma, ali i u terapiji, u smislu primene kako pojedinačnih antiinflamatornih komponenti, tako i u kombinaciji sa citotoksičnom, ciljanom *target* terapijom i imunoterapijom [27].

Egzogeni signali, u vidu komponenata patogenih mikroorganizama (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), kao i endogeni signali, koji potiču iz oštećenih epitelnih i endotelnih ćelija (*danger-associated molecular patterns*, DAMP), pokreću inflamatorne događaje, aktivacijom receptora-obrazaca (*pattern-recognition receptors*, PRR), najčešće iz grupe TLR (*Toll-like receptors*), koji su eksprimirani na neutrofilnim i eozinofilnim granulocitima, monocitima, makrofagima, limfocitima, ali i drugim ćelijama. PAMP i DAMP aktiviraju ove receptore, uz istovremenu aktivaciju mijeloidnog faktora diferencijacije 88 (MyD88), što dalje aktivira intracelularne signalne puteve, prvenstveno porodicu nuklearnog faktora *kappa* B (NF- κ B), porodicu mitogen-aktivisanih protein kinaza (MAPK) i Janus kinazu/signalni prenosilac i aktivator transkripcije (JAK/STAT). NF- κ B, MAPK i JAK/STAT deluju kao transkripcioni faktori, koji, prelaskom u ćelijsko jedro, aktiviraju transkripciju proinflamatornih citokina, faktora rasta, matriksnih metaloproteinaza, COX-2 i izazivaju oksidativni stres [28].

U početku inflamatorne reakcije inicira se brzo povlačenje neutrofilnih granulocita, kao prvih efektor procesa zapaljenja. Dolazi do njihove aktivacije, imobilizacije na vaskularni endotel i endotelne transmigracije, odnosno ekstravazacije. Aktiviraju se makrofagi koji, daljom produkcijom faktora rasta i citokina, privlače i druge inflamatorne ćelije u zahvaćeno područje. Brojni medijatori zapaljenja produkovani od strane imunskih ćelija aktiviraju signalne puteve u novostvorenim imunskim ćelijama koje pristižu u područje upale, ali i u epitelnim, endotelnim i tumorskim ćelijama, čime se stvara proinflamatorno mikrokruženje i amplifikuju inflamatorni signali [29].

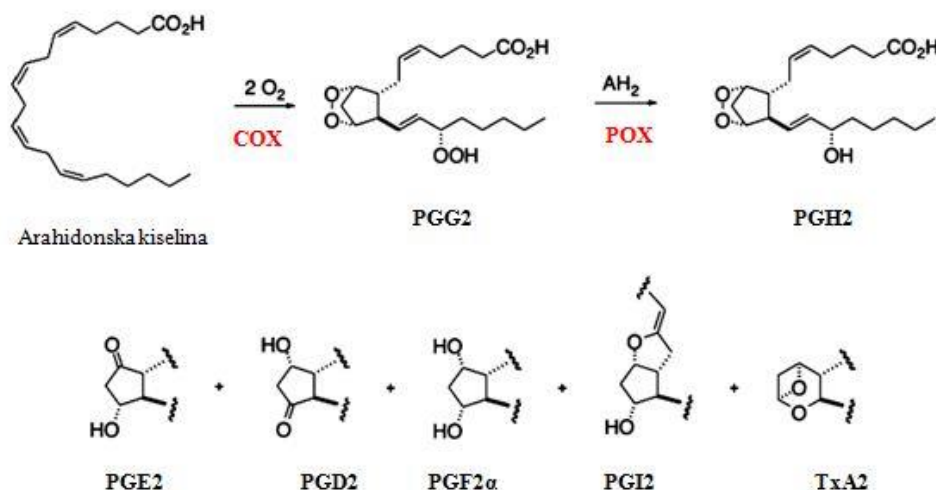
Nekoliko medijatora je ključno za trajanje procesa inflamacije. Transformišući faktor rasta- β (TGF- β), koji se sekretuje kao odgovor na fagocitozu apoptotičnih ćelija, posreduje u brzom eliminaciji oštećenih ćelija, kako bi se inflamatorni proces zaustavio pravovremeno i na odgovarajući način. Produžen, hroničan inflamatorni odgovor manifestuje se perzistiranjem abnormalnih makrofaga i limfocita, ali i mast ćelija, neutrofila, eozinofila i dendritičnih ćelija

u zapaljenskom području, gde dolazi do kontinuirane sinteze reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, citokina, faktora rasta, matriksnih metaloproteinaza, ali i produžene aktivacije enzima COX-2. Fenotipski posmatrano, maligne ćelije su slične zapaljenskim ćelijama jer sintetisu i luče citokine i faktore rasta, i ekspimiraju njihove receptore. Ovakvi događaji intenziviraju oksidativni stres, izazivaju perzistentno oštećenje ćelija, uz genetske i epigenetske alteracije, genomsku nestabilnost i izmenu mehanizama popravke DNA oštećenja. Dolazi do metaboličkih promena u ćeliji i aktivacije intracelularnih signalnih puteva koji vode ka proliferaciji i rezistenciji na apoptozu. Takođe, dolazi do degradacije bazalne membrane, sa sticanjem mogućnosti za ćelijsku invaziju i metastaziranje. Navedene činjenice upućuju na kompleksnu ulogu hronične inflamacije u svim fazama kancerogeneze – inicijaciji, promociji i progresiji [30].

1.4. Enzimi ciklooksigenaze, COX

Enzimi iz porodice ciklooksigenaza (COX) prvi put su izolovani 1976. godine, kada i počinje intenzivno proučavanje njihove uloge u sintezi prostanoida, koji predstavljaju grupu veoma važnih jedinjenja, lipidnih autokrinih i parakrinih modulatora brojnih fizioloških i patoloških procesa u organizmu. Za otkriće COX metaboličkih produkata i njihovih uloga, Nobelova nagrada za medicinu i fiziologiju uručena je 1982. godine istraživačkom timu Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelsson i John R. Vane [31]. COX enzimi su locirani na luminalnoj strani endoplazmatskog retikuluma i ćelijske membrane, kao i u jedarnoj membrani. Nasuprot tome, maligna alteracija ćelije podstiče akumulaciju COX enzima i njihovih produkata u posebnim ćelijskim formacijama pod nazivom lipidna telašca, čiji je broj povećan kod malignih tumora pluća, kolorektuma i jetre, a pozitivna korelacija između ekspresije COX-2 i broja lipidnih telašaca ukazuje na značajnu vezu između inflamacije i tumorogeneze [32, 33]. Sinteza prostanoida počinje od polinezasićenih masnih kiselina koje sadrže 20 ugljenikovih atoma, kao što je arahidonska kiselina koja se pod dejstvom enzima fosfolipaze A2 (PLA2) oslobađa iz fosfolipida ćelijskih membrana i predstavlja supstrat za ciklooksigenazni put, u kojem nastaju prostanoidi, ili lipooksigenazni put u kojem se sintetisu leukotrieni i lipoksini. Prostanoidi, leukotrieni i lipoksini pripadaju grupi tzv. eikozanoida. Enzimi COX poseduju dva aktivna centra – jedan ima aktivnost ciklooksigenaze (COX), a drugi aktivnost peroksidaze (POX). Aktivni centri su smešteni na suprotnim stranama enzimskog molekula, ali su fizički i funkcionalno povezani hem prostetičnom grupom. Arahidonska kiselina se vezuje za COX aktivan centar i dolazi do oduzimanja vodonika na

položaju 13 arahidonske kiseline, pri čemu nastaje arahidonil radikal, kojem se, potom, dodaju dva molekula kiseonika, čime nastaje prostaglandin endoperoksid G2 (PGG₂). PGG₂ se premešta na POX aktivan centar, redukuje se i formira prostaglandin endoperoksid H2 (PGH₂). Dejstvom tkivno-specifičnih izomeraza i sintaza nastaju najvažniji prostanoidi – prostaglandini i tromboksani (slika 1.4). Naime, PGH₂ se dalje prevodi u prostaglandin E2 (PGE₂), prostaglandin D2 (PGD₂), prostaglandin F₂α (PGF₂α), prostaglandin I2 (prostaciklin, PGI₂) i tromboksan A2 (TxA₂). Posmatrajući osnovnu strukturu, uočava se da prostaglandini poseduju petočlani, a tromboksani šestočlani ugljenični prsten sa etarskom vezom. Slovo u oznaci ovih jedinjenja označava prisustvo određenih funkcionalnih grupa na prstenu, a broj 2 oslikava dve dvostruke veze u ugljeničnom lancu. Lekovi iz grupe NSAIL inhibiraju COX enzimsku aktivnost tako što sprečavaju ili inhibiraju vezivanje arahidonske kiseline za COX aktivan centar [32-35].

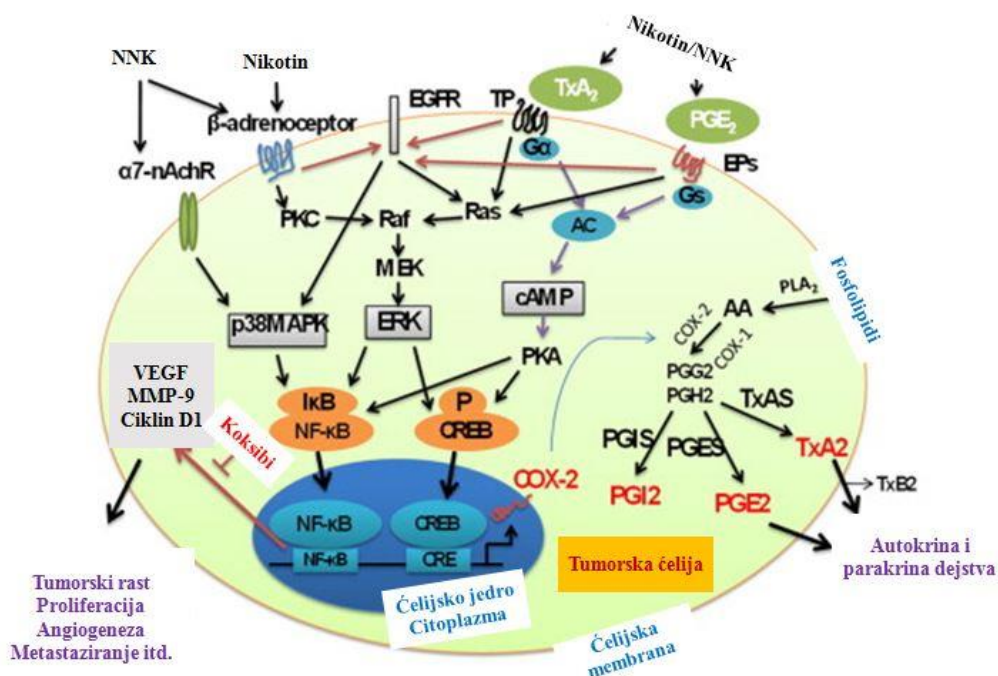


Slika 1.4. COX enzimsku aktivnost i sinteza prostanoida (preuzeto i modifikovano iz [35]).

Početkom devedestih godina 20. veka utvrđeno je da postoje dva COX izoenzima. COX-1 (prostaglandin endoperoksid sintaza 1, kodirana *PTGS1* genom, lociranom na hromozomu 9q33.2) predstavlja konstitutivni (*housekeeping*) izoenzim koji osigurava bazalnu produkciju prostaglandina i tromboksana u većini humanih ćelija, a pre svega u gastrointestinalnom traktu, bubrezima i trombocitima, održavajući tako fiziološke funkcije ćelija. Neosetljiv je na dejstvo glukokortikoida. COX-2 (prostaglandin endoperoksid sintaza 2, kodirana *PTGS2* genom, lociranom na hromozomu 1q31.1) inducibilan je COX izoenzim, čiju sintezu u brojnim ćelijama iniciraju IL-1, IL-2, TNF-α, faktori rasta, bakterijski lipopolisaharid (LPS), virusi, žučne kiseline i različiti karcinogeni, a konstitutivno je eksprimiran samo u pojedinim organima i ćelijama, kao što su bubrezi, krvni sudovi, mozak i

makrofagi. Glukokortikoidi su inhibitori COX-2 izoenzima. COX-1 i COX-2 su dimeri i identični su 60% u pogledu aminokiselinske sekvence u svojim strukturama [36, 37]. Opisana je još jedna COX varijanta, COX-3, koja predstavlja izoformni oblik COX-1, kodirana istim genom kao COX-1, a prisutna je u centralnom nervnom sistemu [38].

Duvanski dim sadrži više od 5000 različitih hemijskih komponenti, od kojih su 60 potvrđeni kancerogeni: N-nitrozoamini NNN i NNK, koji nastaju iz nikotina, policiklični aromatični ugljovodonici, aromatični amini, aldehidi, isparljivi ugljovodonici, nitro jedinjenja, fenoli i druge organske i neorganske komponente. Rizik za razvoj maligne bolesti postoji kako kod aktivnog, tako i kod pasivnog udisanja duvanskog dima. Brojna istraživanja su pokazala da su sastojci duvanskog dima snažni aktivatori COX-2-zavisne ćelijske signalizacije. Pretpostavlja se da nikotin i NNK mogu da aktiviraju COX-2 preko aktivacije β -adrenergičkih receptora i $\alpha 7$ -nikotinskog acetilholinskog receptora ($\alpha 7$ -nAChR), ali i aktivacijom transkripcionog faktora NF- κ B (slika 1.5) [39]. Smatra se da COX-2 učestvuje u metaboličkoj aktivaciji duvanskih kancerogena. Utvrđeno je da je peroksidazna aktivnost COX enzima odgovorna za konverziju mnogih ksenobiotika u aktivne kancerogene. To je naročito izraženo u organima koji su podložni mutagenim dejstvima duvanskog dima, a to su pluća, oralna mukoza, debelo crevo i mokraćna bešika [40].



Slika 1.5. Uticaj karcinogena iz duvanskog dima (nikotin i NNK) na biohemijski put sinteze prostanoida i intraćelijske signalne puteve značajne za karcinogenezu (*preuzeto i modifikovano* iz [39]).

Studije su utvrdile da je povećanje ekspresije informacione RNA (mRNA) za COX-2 rani događaj u kancerogenezi. Konstitutivna ekspresija COX-2 je detektovana u premalignim lezijama, malignim tumorima i metastatskim promenama različitih lokalizacija. U poslednje dve decenije, brojna istraživanja posvećena su ispitivanju uloge enzima COX i prostanoida u razvoju i progresiji malignih bolesti, uključujući njihovu povezanost sa tumorskim rastom i proliferacijom, slabljenjem imunološkog odgovora, rezistencijom na apoptozu, invazijom, angiogenezom, pojavom metastaza, ali i rezistencijom na hemioterapijske i radioterapijske protokole [41].

1.4.1. Tromboksan A2, TxA2

Trombociti imaju značajnu ulogu u procesu inflamacije, ali i kancerogeneze, putem svojih interakcija sa leukocitima, endotelnim, mišićnim i malignim ćelijama. Trombociti oslobađaju kalcijum, komponente lipidne strukture, poput tromboksana A2 (TxA2), i komponente proteinske strukture, kao što su faktori rasta i angiogeni činioci. Medijatori oslobođeni iz trombocita ispoljavaju brojna autokrini i parakrini dejstva, koja povlače leukocite u područje inflamacije i izazivaju fenotipske promene ćelija strome, što doprinosi patogenezi reumatoidnog artritisa, ateroskleroze, aterotromboze, kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti, intestinalne inflamacije, bronhijalne astme, plućne hipertenzije, bolesti jetre, bubrega i brojnih karcinoma [42]. TxA2 je fiziološki antagonist prostaciklina PGI₂, i poremećena ravnoteža u nivoima TxA2 i PGI₂, u korist povećanja nivoa TxA2, često se viđa u malignim tumorima [43].

Sintezu TxA2 iz PGH₂ katalizuje enzim tromboksan sintaza (TBXAS1), koji je vezan za membranu endoplazmatskog retikuluma i pripada porodici P450 monooksigenaza. Mesta biosinteze TxA2 su trombociti, cirkulišući monociti, makrofagi, neutrofilni, vaskularne endotelne ćelije i mnogi tipovi malignih ćelija. TxA2 je najnestabilniji prostanoid koji se, u vremenskom periodu od 30 sekundi, neenzimski hidrolizuje do biološki neaktivnog TxB₂ metabolita. Svoja dejstva TxA2 ispoljava preko tromboksan A2 receptora (TP/TBXA₂R), koji pripada porodici G-proteinskih receptora. Opisane su dve izoforme tromboksan A2 receptora, TP α i TP β . Trombociti sadrže samo TP α , a druge ćelije, poput ćelija glatke muskulature, endotelnih ćelija, ćelija pluća, srca, bubrega, timusa i slezine, oba receptora. TxA2 je značajan inicijator agregacije trombocita, procesa tromboze, angiogeneze, kontrakcije glatkih mišića, a deluje i kao mitogeni faktor. Kada trombociti dođu u kontakt sa intaktnim endotelom, ostaju u inaktivnom stanju jer endotel luči PGI₂. Normalan fiziološki odgovor na povredu krvnog suda

jeste brzo odlaganje trombocita na subendotelni matriks. Adhezija trombocita se odvija posredstvom cirkulišućeg von Willebrandovog faktora, koji se veže za subendotelni kolagen i za glikoproteinski receptor na trombocitima. Vezivanju trombocita pomažu kolagen i fibronektin iz endotela. Kolagen, adenozin difosfat (ADP), trombin i TxA₂, oslobođeni iz endotela, aktiviraju trombocite. Aktivacija trombocita dovodi do promene njihovog oblika, degranulacije i sekrecije vlastitih komponenti, njihove agregacije, stvaranja trombova i pojave tromboza, koje predstavljaju čestu komplikaciju malignih bolesti. U području tromboze dolazi do promene redoks stanja ćelija i povećane produkcije slobodnih radikala, koji izazivaju oštećenja ćelijskih membrana, neenzimsku peroksidaciju lipida membrana i produkciju izoprostana. Izoprostani su fiziološki agonisti receptora TP i time dodatno aktiviraju proces tromboze. Utvrđeno je da su koncentracije TxA₂ metabolita, 11-dehidro-TxB₂ i 2,3-dinor-TxB₂, znatno veće kod aktivnog i pasivnog izlaganja duvanskom dimu. Takođe, urinarna ekskrecija kotinina, glavnog nikotinskog urinarnog metabolita, povezana je sa povećanom ekskrecijom TxA₂ metabolita [39, 44-46].

Aktivacija trombocita doprinosi i pojavi metastaza. Tumorske ćelije, izdvojene iz primarnog tumora, povezuju se sa agregiranim trombocitima i lakše dosežu do udaljenih lokalizacija, vezuju se za endotel krvnih sudova i proliferišu. Kontrakcija glatkih mišića, podstaknuta TxA₂, takođe doprinosi tumorskoj progresiji i pojavi metastaza [47]. Vezujući se za receptor TP, TxA₂ aktivira nekoliko intraćelijskih signalnih puteva, poput MAPK puta ekstracelularnim signalima-regulisane kinaze (ERK) i fosfatidilinozitol 3-kinaze/protein kinaze B-AKT (PI3K/AKT). Ovi signalni putevi aktiviraju transkripcione faktore – ciklični adenozin monofosfat vezujući elemenat (CREB) i NF-κB. Oni povećavaju ekspresiju COX-2 i TBXAS1, čime se, mehanizmom pozitivne povratne sprege, intenzivira sinteza TxA₂. Takođe, ovi transkripcioni faktori povećavaju ekspresiju brojnih onkogenih faktora, kao što su proliferišući ćelijski nuklearni antigen (PCNA) i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), koji su važni činioci ćelijske proliferacije, invazije i angiogeneze [48].

Cathcart MC i sar. pokazali su da je u uzorcima NSCLC bila povećana ekspresija TBXAS1, pogotovo u adenokarcinomu pluća i kod žena, u poređenju sa kontrolnim uzorcima normalnog plućnog tkiva. Na humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma i skvamoznog karcinoma pluća, inhibicija ovog enzima suprimirala je proliferaciju malignih ćelija i pokrenula apoptozu [49]. U radu Huang RY i sar. pokazano je da se veća ekspresija TBXAS1 i receptora TP sreće u tkivima karcinoma pluća, pogotovo u tumorskim tkivima pušača, u poređenju sa kontrolnim, normalnim tkivima. *In vivo* studija na životinjama utvrdila je da

nitrozamini duvanskog dima povećavaju ekspresiju COX-2, TBXAS1 i TP, a na humanim ćelijskim linijama, nitrozamini su prvenstveno povećali ekspresiju TP α receptora [50].

1.4.2. Prostaciklin, PGI₂

Enzim prostaciklin sintaza (PGIS) katalizuje konverziju PGH₂ u prostaciklin (PGI₂). Vaskularni endotel je mesto najveće bazalne produkcije PGI₂, koja postaje znatno intenzivnija prilikom oštećenja zida krvnog suda. PGIS je lociran u ćelijskoj membrani, membrani endoplazmatskog retikuluma i jedarnoj membrani. PGI₂ je nestabilno jedinjenje koje se, u periodu od 30 sekundi do nekoliko minuta, neenzimski razlaže do neaktivnog 6-keto-PGF_{1 α} metabolita. PGI₂ ispoljava inhibitorna dejstva na agregaciju trombocita, izaziva vazodilataciju, smanjuje adhezivni potencijal leukocita i inhibira proliferaciju ćelija glatke muskulature, kao i sintezu njihove DNA. Delujući direktno na zidove krvnog suda, ispoljavajući antiinflamatorna i vazoprotektivna dejstva, kao i indirektnim uticajem na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i lipoproteina, kroz snižavanje serumskih koncentracija triglicerida i lipoproteina niske gustine (LDL) i povećanje koncentracije lipoproteina visoke gustine (HDL), PGI₂ agonisti su pokazali da PGI₂ ima prevenirajući učinak na proces ateroskleroze. Svoja dejstva PGI₂ ispoljava preko prostaciklinskog receptora (IP) i preko receptora aktiviranih proliferatorom peroksizoma (PPAR). Aktivacija G-proteinskog, membranskog receptora IP rezultuje u aktivaciji proteina G_s i adenilat ciklaze, što dovodi do generisanja cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) i sledstvene aktivacije protein kinaze A (PKA). Ova kaskada može da dovede do blokiranja aberantno aktiviranih MAPK ćelijskih signalnih puteva, koji su neophodni u regulaciji ćelijskog preživljavanja, diferencijacije, proliferacije i smrti. PPAR predstavljaju porodicu nuklearnih receptora, sa ulogom transkripcionih faktora, koji se pojavljuju kao izoforme PPAR α , PPAR γ i PPAR δ . Gradeći heterodimere sa retinoidnim X receptorom (RXR), vezuju se za molekule DNA i, na taj način, imaju pristup u regulaciji transkripcije i ekspresije gena. Utvrđeno je da su potrebne mnogo veće koncentracije PGI₂ analoga da aktiviraju nuklearne PPAR, u odnosu na aktivaciju membranskog IP receptora [51-54].

Brojne studije su pokazale da sastojci duvanskog dima smanjuju vaskularnu produkciju PGI₂. U malignim tkivima registrovana je epigenetskim mehanizmima-smanjena, odnosno „utišana” ekspresija PGIS. Oralna i intranazalna primena iloprosta, prostaciklinskog analoga, je, u kliničkim studijama, pokazala najizraženiji potencijal u hemoprevenciji karcinoma pluća, tačnije u zaustavljanju progresije premalignih endobronhijalnih lezija, kao i

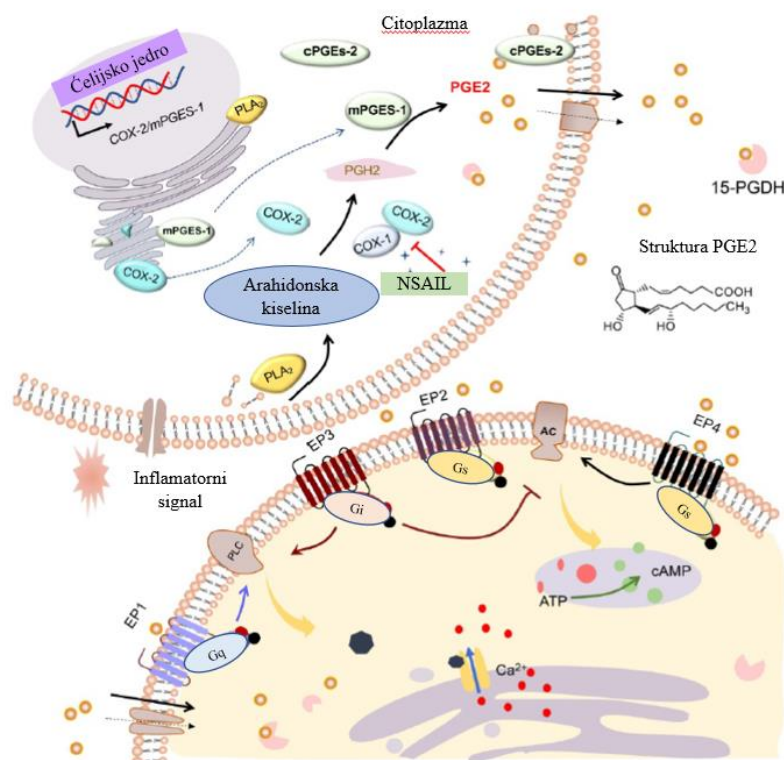
u njihovoj regresiji, naročito kod bivših pušača [55, 56]. Polimorfizmi *PGIS* gena nose rizik za razvoj kolorektalnih polipa, a *PGI2* je ispoljio supresivni efekat na razvoj karcinoma kolona, iako još uvek nije utvrđeno koji receptor ima najvažniju ulogu u tome. Najviše rezultata istraživanja je usmereno ka *PGI2*-*PPAR δ* signalizaciji [57].

Smanjena ekspresija *PPAR γ* pokazala se kao negativan prognostički faktor u karcinomu pluća, a njegova ekspresija je bila smanjena u većini tumora u životinjama koje su bile tretirane ekstraktom duvanskog dima. Istraživanja su pokazala da aktivacija *PPAR γ* receptora zaustavlja proliferaciju ćelija karcinoma pluća, ali i doprinosi senzitivnosti na protokole ciljane terapije i hemioterapije. Smatra se da *PGI2*, posredstvom aktivacije *PPAR γ* , može da zaustavi epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) u NSCLC, koja predstavlja značajan događaj tokom metastaziranja malignih ćelija. To dejstvo se manifestovalo kroz povećanu ekspresiju epitelnog markera E-kadherina, smanjenu ekspresiju *COX-2* i transkripcionog faktora Snail. Rezultati studije New ML i sar. pokazali su da je kod životinja sa tumorima pluća izazvanim izlaganjem kancerogenima duvanskog dima iloprost povećao ekspresiju *miR-34c*, čija je ekspresija bila smanjena, a smanjio je ekspresiju pro-onkogene mikroRNA *miR-221*, što upućuje na značajne i kompleksne uloge *PGI2* i njegovih analoga u mogućoj hemoprevenciji, kao važnoj oblasti u prevenciji nastanka karcinoma u visokorizičnoj populaciji [58].

1.4.3. Prostaglandin E2, PGE2

Prostaglandin E2 (*PGE2*) predstavlja najviše izučavan prostanoid. Sintetiše se gotovo u svim ćelijama, a najintenzivnija sinteza odvija se u epitelnim ćelijama, fibroblastima, inflamatornim i malignim ćelijama. Postoje tri izoenzima prostaglandin E2 sintaze (*PGES*), koji katalizuju konverziju *PGH2* do *PGE2*. Jedan izoenzim jeste citosolna prostaglandin E2 sintaza (*cPGES*), a druga dva izoenzima su membranski vezani: mikrozomalna prostaglandin E2 sintaza-1 i 2 (*mPGES-1* i *mPGES-2*). *mPGES-1* je glutation-zavisan izoenzim i uglavnom je povezan sa *COX-2* u situacijama kada je sinteza ovog prostanoida indukovana različitim činiocima, dok su *cPGES* i *mPGES-2* konstitutivni izoenzimi. Sintetisani *PGE2*, a smatra se i drugi prostanoidi izlučuju se iz ćelija jednostavnom difuzijom, ali i aktivno, prvenstveno putem transportera *MRP4/ABCC4* (*multidrug resistance protein 4*). Utvrđeno je da *NSAIL* deluju ne samo na inhibiciju produkcije *PGE2* putem *COX* blokade, nego i inhibiraju *MRP4*, a samim tim i oslobađanje *PGE2* iz ćelija. Sintetisani *PGE2* ispoljava svoja kompleksna biohemijska i biološka dejstva na autokrini i parakrini način, putem vezivanja za porodicu G-

proteinskih PGE2 receptora (EP1, EP2, EP3 i EP4), koji su locirani na ćelijskim membranama različitih ćelija, ali i na membranama ćelijskih organela. Konačan efekat PGE2 signalizacije zavisi od vrste receptora koji je aktiviran (slika 1.6), ali i od intenziteta signala. Aktivacija receptora EP1 (povezan sa proteinom Gq) i EP3 (povezan sa proteinom Gi) povezana je sa intraćelijskom mobilizacijom jona kalcijuma, posredstvom aktivacije fosfolipaze C (PLC). Receptori EP2 i EP4 su u vezi sa proteinom Gs, adenilat ciklazom (AC) i sintezom cAMP, dok EP3 inhibira cAMP-zavisnu ćelijsku signalizaciju [59].



Slika 1.6. Sinteza PGE2 i aktivacija EP receptora (preuzeto i modifikovano iz [60]).

EP receptori su povezani sa brojnim ćelijskim signalnim putevima kao što su EGFR-zavisni signalni putevi, PI3K/AKT, PKA, Src kinaza, STAT3 i RAS/MEK/ERK. Opisana je i ekspresija ovih receptora u ćelijskom jedru. Osim uloge u procesu inflamacije, veliki broj naučnih radova predstavio je svoje rezultate u kojima je nedvosmisleno potvrđena uloga PGE2, transportera MRP4 i EP receptora u razvoju i progresiji malignih tumora različitih lokalizacija. Opisane su uloge PGE2 u ćelijskoj proliferaciji, rezistenciji na apoptozu, angiogenezi, EMT, imunosupresiji, migraciji i invaziji ćelija. Dva proteina su zadužena za PGE2 internalizaciju, vraćanje u ćelije, sledstvenu inaktivaciju i prekidanje PGE2 dejstava. Prostaglandin transporter (PGT/SLCO2A1) transportuje PGE2 u ćeliju, gde on postaje supstrat za razgradnju katalizovanu nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺)-zavisnim

enzimom 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenazom (15-PGDH). Razgrađuje se oksidacijom do neaktivnog metabolita, 15-keto-PGE₂, a zatim i krajnjeg produkta PGE-M. Iako je, u poređenju sa drugim prostanoidima, PGE₂ *in vivo* nešto stabilniji molekul, njegov metabolizam se odvija brzo. PGT funkcioniše kao anjonski transporter, odnosno antiporter, koji omogućuje efluks laktatnog anjona, u zamenu za inluks PGE₂, koji je negativno naelektrisan pri fiziološkom pH. Aberantna ekspresija β-*kat*enina je povezana sa smanjenom PGT ekspresijom u intestinalnoj sluzokoži u karcinomu kolona. S obzirom na činjenicu da maligne ćelije obiluju glikolitičkim enzimima, a samim tim proizvode i veliku količinu laktata, bilo bi očekivano da pokazuju i veću ekspresiju transportera PGT. Međutim, pretpostavlja se da je u solidnim tumorima ekspresija PGT smanjena odnosno „utišana” epigenetskim mehanizmima. Maligne ćelije ekspimiraju druge transportne proteine za laktate, poput monokarboksilnog transportera 1 (MCT1), koji vrše efluks laktata, ali ne i inluks PGE₂. 15-PGDH, kodiran *HPGD* genom, naziva se tumor-supresorom i njegova ekspresija je smanjena u tumorima pluća i gastrointestinalnim tumorima. Kao i u slučaju PGT, smatra se da su epigenetski mehanizmi zaduženi za smanjenu ekspresiju ovog enzima. U nekim karcinomima je utvrđeno da je miR-21 negativni regulator 15-PGDH [61, 62].

EGFR je jedan od najviše ispitivanih receptora tirozin kinaza u području onkologije. Nalazi se na površini ćelijskih membrana, a njegova ligand-zavisna aktivacija pokreće niz signalnih puteva koji su značajni u održavanju ćelijske homeostaze. Amplifikacija *EGFR* gena, kao i *EGFR* mutacije predstavljaju rani događaj u kancerogenezi tumora pluća i kolona. Značajan događaj u patogenezi malignih bolesti jeste i nuklearna translokacija receptora EGFR (nEGFR), odnosno njegova internalizacija u ćelijsko jedro, gde EGFR pokazuje ulogu transkripcionog faktora, sa uticajem na regulaciju hromatina, genske ekspresije i DNA replikacije. Ovaj događaj predstavlja negativan prognostički faktor, koji je povezan sa agresivnijim fenotipom malignih ćelija, ali i lošijim odgovorom na primenu hemioterapije, radioterapije, anti-EGFR antitela i EGFR-tirozin kinaza inhibitora (EGFR-TKI) [63]. Bazzani L i sar. su istraživali uticaj PGE₂ na nuklearnu EGFR translokaciju u A549 i GLC82 humanim NSCLC ćelijskim linijama koje ekspimiraju *wild type* EGFR. Utvrdili su da PGE₂, proizveden od strane tumorskih ćelija i ćelija strome, promovise prelazak EGFR u ćelijsko jedro. Dokazano je da je nuklearna EGFR translokacija bila posredovana aktivacijom EP3 receptora i fosforilacijom intracelularnog EGFR domena, koji ima aktivnost tirozin kinaze. Takođe, utvrđeno je da PGE₂-EP3 signalizacija aktivira porodicu Src kinaza. Ovaj momenat je značajan za aktivaciju ADAM enzima (*A disintegrin and metalloproteinases*), prvenstveno

ADAM-10 i ADAM-17, koji proteolizom oslobađaju membranski-vezane EGFR ligande i time omogućavaju EGFR aktivaciju, čime je objašnjen PGE₂-zavisian mehanizam EGFR transaktivacije. Nekoliko liganada je bilo uključeno u EGFR aktivaciju i translokaciju, ali najintenzivniji uticaj ispoljili su amfiregulin i epiregulin. Nuklearna translokacija je povećala ekspresiju mRNA EGFR *target* gena, koji učestvuju u kontroli ćelijske proliferacije, progresije ćelijskog ciklusa i inflamacije, kao što su ciklin D1 (*CCND1*), c-Myc (*MYC*), COX-2 (*PTGS2*) i inducibilna sintaza azot oksida (*NOS2*). Povećana COX-2 ekspresija je posebno interesantan rezultat ovog istraživanja jer govori o pozitivnoj povratnoj sprezi, kojom PGE₂/nEGFR povećavaju sintezu enzima COX-2, najznačajnijeg enzima u kaskadi PGE₂ sinteze, čime se ovi onkogeni događaju amplifikuju [64].

In vitro i *in vivo* studije na karcinomima pluća i kolona pokazale su da tumorsupresorska dejstva TGF-β1 počivaju na povećanju ekspresije 15-PGDH, na nivou mRNA i proteina, ali i povećanju 15-PGDH enzimske aktivnosti [65, 66]. U radu Yang L i sar. prikazan je pozitivan uticaj erlotiniba, EGFR-TKI prve generacije, na povećanje ekspresije 15-PGDH u NSCLC ćelijskim linijama H1435, H1648 i H3255, dok u A549 ćelijama ovaj uticaj nije zabeležen. Ipak, u A549 ćelijama je, nakon tretmana sa erlotinibom, uočena smanjena ekspresija COX-2 proteina i smanjen nivo proizvedenog PGE₂. Alteracije u prostaglandinskom metaboličkom putu mogu biti jedan od benefita ciljane terapije karcinoma pluća sa EGFR-TKI. Ova grupa istraživača je opisala da je aktivacija EGFR/RAS/MEK/ERK signalnog puta značajan činilac u inhibiciji 15-PGDH, što predstavlja objašnjenje za dejstvo erlotiniba, koji blokira aktivnost ovog signalnog puta. Pokazano je da je u karcinomima pluća EGFR/RAS/MEK/ERK ćelijska signalizacija zadužena za pokretanje *zinc-finger* transkripcionih represora Zeb1 i Slug, koji kontrolišu, odnosno epigenetskim mehanizmima smanjuju transkripciju i ekspresiju *HPGD* gena. Sličan mehanizam, ali posredovan Snail transkripcionim represorom, zabeležen je u ćelijama karcinoma kolona [67].

1.4.3.1. PGE₂, proinflamatorni i imunosupresivni prostanoid

PGE₂ je jedan od najvažnijih medijatora u imunopatologiji akutne i hronične inflamacije i osećaja bola. Učestvuje u izazivanju vazodilatacije, povećanju vaskularne permeabilnosti, kao i u pokretanju hemotakse neutrofilnih granulocita, makrofaga i mast ćelija. PGE₂-indukovana sinteza IL-10 ispoljava imunosupresivno dejstvo, koje je povezano sa stanjima kao što su hronične inflamatorne bolesti i karcinom. Iako je PGE₂ značajan faktor u produkciji, sazrevanju i migraciji dendritičnih ćelija, centralnih ćelija u obezbeđivanju

antigen-specifičnog imuniteta, on remeti njihovu funkciju različitim mehanizmima na celularnom i subcelularnom nivou. Imunološka dejstva PGE2 ogledaju se i u poremećenoj funkciji neutrofila, makrofaga i Th1 limfocita, smanjenoj produkciji interferona- γ (IFN- γ) i inhibiranoj citotoksičnoj moći citotoksičnih T limfocita i NK ćelija (*natural killers*). Ove činjenice ističu paradoksalnu ulogu PGE2 u istovremenom ispoljavanju proinflamatornih i imunosupresivnih dejstava [68]. Ching MM i sar. navode da je EP4 receptor eksprimiran u tumorima prostate, pluća, kolona, ovarijuma, cerviksa i dojke. EP4-zavisna ćelijska signalizacija, posredovana aktivacijom cAMP/PKA, PI3K/AKT, ERK i NF- κ B signalnih puteva, odgovorna je za ćelijsku proliferaciju, migraciju, EMT, angiogenezu, pojavu metastaza, imunosupresivna dejstva i pojavu svojstava kancerskih matičnih ćelija (*cancer stem cells*). Rezultati istraživanja pokazali su da je aktivacija EP4 odgovorna za inhibiciju NK aktivnosti, njihove sposobnosti da liziraju ciljanu ćeliju, produkuju ključne citokine i da migriraju u područje u kojem treba da ispolje svoja dejstva. EP4 antagonisti, uključujući i Frondozyd A, smanjili su ekspresiju MHC klase I antigena na tumorskim ćelijama, koji, inače, ispoljavaju NK-inhibitorno dejstvo, čime se povećao intenzitet NK-posredovane lize tumorskih ćelija. Nekoliko EP4 antagonista se trenutno ispituje u kliničkim studijama, u kombinacijama sa standardnim hemioterapijskim protokolima, endokrinološkom terapijom i imunoterapijom, u cilju razvoja novog vida imunološke terapije [69].

U studiji Wang T i sar. prikazano je da je u karcinomu pluća PGE2 ispoljio intrinzična, direktna imunosupresivna dejstva, povećavajući rezistenciju ćelija karcinoma pluća prema citotoksičnim T limfocitima, kao i ekstrinzična imunosupresivna dejstva kroz angažovanje supresorskih ćelija mijeloidnog porekla (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) i kroz polarizaciju protumorskih M2 makrofaga. PGE2 je indukovao sintezu faktora stimulacije kolonije granulocita (G-CSF), koji je značajan u angažovanju MDSC ćelija [70]. MDSC predstavljaju heterogenu populaciju koju čine mijelodne progenitorske ćelije i nezrele mijeloidne ćelije, koje su ključni medijatori supresije T *helper* (CD4⁺) i citotoksičnih T limfocita (CD8⁺). Brojne studije su pokazale da PGE2, oslobođen iz tumorskih ćelija, deluje na prostaglandinske receptore na T limfocitima, menjajući citokinski profil T *helper* limfocita, favorizujući subpopulaciju Th2 limfocita, a suprimirajući Th1 limfocite. Ovaj disbalans promoviše humoralni imuni odgovor, koji je neaktivan u eliminaciji malignih ćelija, a blokira celularni antitumorski imuni odgovor. *In vivo* studije su pokazale da PGE2, osim što indukuje sintezu IL-10, imunosupresivnog citokina, inhibira i produkciju imunostimulatornih citokina, poput IL-12 i IFN- γ [71].

Ruan D i sar. su istraživali ulogu mikrosredine tumora koja produkuje PGE2 i stvara uslove za hroničnu inflamaciju i promociju tumorskog rasta. Uspostavili su ćelijsku liniju embrionih ćelija bubrega (HEK-293) koja eksprimira enzime COX-2 i mPGES-1, a samim tim proizvodi aberantne količine PGE2 (HEK-COX-2-10aa-mPGES-1). U ko-kulturi sa ovom ćelijskom linijom došlo je do višestrukog povećanja intenziteta rasta i proliferacije ćelija u ćelijskim kulturama karcinoma prostate (PC-3), pluća (A549) i kolona (DLD-1), u poređenju sa uticajem koinkubacije malignih ćelija sa HEK-293 ćelijskom kulturom koja ne proizvodi PGE2. Takođe, HEK-COX-2-10aa-mPGES-1 ćelijska linija je inokulirana zajedno sa PC-3, A549 ili DLD-1 ćelijama u imunodeficientne miševе. U ovoj *in vivo* studiji zabeleženo je formiranje, ali i intenzivan rast tumora prostate, pluća, odnosno kolona u eksperimentalnim životinjama. Western blot analiza je pokazala da je, u stimulaciji ćelijskog rasta i proliferacije, u sve tri ćelijske linije, EP1 bio dominantan subtip prostaglandinskih receptora [72].

1.5. Uloga COX-2 u procesu apoptoze

1.5.1. Biohemijske i molekularne osnove apoptoze

Apoptoza je precizno regulisan proces programirane ćelijske smrti, koji služi za eliminaciju neželjenih, nepotrebnih ili oštećenih ćelija. Jedno od najvažnijih obeležja malignih ćelija jeste izbegavanje procesa apoptoze, odnosno rezistencija na apoptozu, što maligno-transformisanim ćelijama omogućava da žive duže i da akumuliraju genetske promene u cilju sticanja odlika invazivnosti, izmenjene diferencijacije, stimulacije proliferacije i angiogeneze. Antitumorske terapijske strategije usmerene su ka aktivaciji proapoptotskih ili ka inhibiciji antiapoptotskih molekula [73]. Pojam apoptoze prvi put je opisan početkom sedamdesetih godina 20. veka u radovima Kerr JFR i sar. Apoptoza, kao visoko selektivan i genetski regulisan proces, ima ulogu u fiziološkim i patološkim događajima. Fiziološka apoptoza se dešava prilikom formiranja i oblikovanja tkiva tokom embrionalnog razvoja i obnavljanja zrelih tkiva, kao i involucije timusa. Apoptoza u patološkim stanjima je značajna za eliminaciju oštećenih ćelija tokom virusnih infekcija, nakon izlaganja citotoksičnim agensima, zračenju, hipoksiji, u degenerativnim i malignim bolestima [74]. COX-2/PGE2-zavisna aktivacija p38/JNK/c-Fos signalnog puta je ispoljila inhibitorno dejstvo na apoptozu u matičnim mezenhimalnim ćelijama [75]. Brojna istraživanja su potvrdila povezanost povećane COX-2 ekspresije sa rezistencijom na apoptozu u malignim ćelijama [76].

Apoptoza može biti pokrenuta različitim spoljašnjim i unutrašnjim signalima. Najznačajniji ekstracelularni stimuli jesu „signali smrti” proizvedeni od strane citotoksičnih T limfocita, kao odgovor na prisustvo inficiranih ili oštećenih ćelija, dok intracelularni signali uključuju oštećenje molekula DNA, nedostatak nekog citokina ili faktora rasta. Jedna od važnih karakteristika apoptoze jeste njena zavisnost od aktivacije gena i sinteze novih proteina. Među ovim molekulima, najvažniji su enzimi pod imenom kaspaze (*caspases*, *c* za cistein i *asp* za aspartat). Kaspaze pripadaju porodici proteaza koje imaju aminokiselinu cistein u svom aktivnom centru i vrše razgradnju ciljanih proteina na mestima gde se nalazi asparaginska kiselina. Kaspaze su prisutne u ćelijama u obliku neaktivnih prekursora, prokaspaza, koje se proteolitičkom razgradnjom prevode u aktivne kaspaze, formirajući jednu lančanu kaskadu, za koju se pretpostavlja da ireverzibilno vodi ka ćelijskoj smrti. U početnim fazama proteolitičke kaskade ulogu imaju inicijalne kaspaze (kaspaze-2, 8, 9, 10), čije delovanje pokreću posebni adaptorski proteini koji u svom sastavu nose tzv. domen smrti. Inicijalne kaspaze dalje aktiviraju izvršne kaspaze (kaspaze-3, 6, 7), sa ciljem da izazovu degradaciju proteina citoskeleta i nuklearnih proteina, umrežavanje proteina, fragmentaciju DNA i formiranje apoptotičnih telašaca. Postoje i kaspaze koje su uključene u inflamatorni odgovor ćelije i ne učestvuju u apoptozi (kaspaze-1, 4, 5) [77, 78].

Aktivacija kaspaza i ciljanih proteina dovodi do specifičnih morfoloških i biohemijskih promena ćelije, koje mogu biti upotrebljene za identifikaciju apoptotičnih ćelija. Apoptoza započinje kondenzacijom citoplazme, zaobljavanjem i skupljanjem ćelije. Dolazi do izbočenja ćelijske membrane i fragmentacije ćelije na manje delove, uz kondenzaciju hromatina i fragmentisanje jedra. Cela ćelija se raspadne u mnoštvo manjih delova (apoptotična telašca), koji su okruženi ćelijskom membranom i sadrže vitalne enzime i intaktne organele. Značajne su alteracije površinskih molekula na apoptotičnim ćelijama koje osiguravaju da će one biti ubrzo prepoznate i fagocitovane od strane obližnjih ćelija i makrofaga. U prepoznavanju apoptotične ćelije značajno je premeštanje fosfatidilserina iz unutrašnjosti ćelije na njenu površinu, kao i prisutvo proteina aneksina I i V, kalretikulina i trombospondina-I. Unutrašnji sastojci ćelije se nikada ne oslobađaju u okolinu ćelije, te nema elemenata koji bi mogli započeti inflamatornu reakciju [77].

Za razliku od nekroze, koja nastaje, na primer, kao odgovor na traumu i nedovoljnu ishranjenost tkiva krvlju i koja se bazira na inhibiciji vitalnih procesa, prestanku proizvodnje i korišćenja energije, apoptoza je aktivan enzimski proces, koji zahteva utrošak energije i koji nije praćen zapaljenskom reakcijom [79].

1.5.2. Spoljašnji (receptorski) signalni put apoptoze

Ekstracelularni signalni proteini koji se vezuju za tzv. receptore smrti (*death receptors*) izazivaju aktivaciju spoljašnjeg signalnog puta apoptoze. Receptori smrti pripadaju porodici TNF receptora (TNFR) i predstavljaju transmembranske proteine sa svojim ekstracelularnim ligand-vezujućim domenom, transmembranskim domenom, kao i intracelularnim domenom smrti. Ovoj grupi pripadaju receptori FasR, TNFR1, DR3, DR4 i DR5. Njih aktiviraju tzv. ligandi smrti, Fas, TNF i TRAIL. Nakon aktivacije receptora, unutrašnji (citosolni) domen smrti regrutuje intracelularne adaptorske proteine, od kojih su najpoznatiji FADD i TRADD. Svaki adaptorski molekul dalje vezuje inicijalne prokaspaze (prokaspaza-8 ili 10, ili, pak, obe), formirajući signalni kompleks koji indukuje ćelijsku smrt (*death-inducing signaling complex*, DISC). U okviru DISC kompleksa dolazi do aktivacije prokaspaza-8 i 10 u kaspaze. Zatim sledi aktivacija izvršnih kaspaza-3, 6 i 7, i dolazi do apoptoze ćelije. Mnoge ćelije poseduju sposobnost da proizvode proteine koji mogu da spreče aktivaciju spoljašnjeg signalnog puta. Najznačajniji je FLIP protein koji pokazuje strukturne sličnosti sa prokaspazama-8 i 10, te se kompetitivno vezuje u kompleks DISC, međutim inhibira apoptozu jer ne poseduje kaspaznu aktivnost [77, 78]. Takođe, pojedine ćelije eksprimiraju „mamac” receptore (*decoy receptors*), koji su izgrađeni samo iz ekstracelularnog ligand-vezujućeg domena, bez intracelularnog domena smrti [80]. Pod određenim uslovima i u zavisnosti od tipa ćelije, TNF i Fas receptori mogu da aktiviraju i druge signalne puteve koji ne dovode do apoptoze. TNF receptori mogu, na primer, da aktiviraju NF- κ B signalni put, koji vodi do preživljavanja i proliferacije ćelije, sa aktivacijom gena koji su uključeni u inflamatorni odgovor [81].

Studije su pokazale da selektivni COX-2 inhibitori povećavaju osetljivost malignih ćelija na apoptozu indukovanu spoljašnjim putem. Jedno od prvih istraživanja utvrdilo je da DuP-697 inhibitor povećava osetljivost HT-29 ćelija karcinoma kolona na TRAIL-pokrenutu apoptozu, posredstvom akumulacije arahidonske kiseline, što aktivira enzim sfingomijelinazu i sledstveno formiranje ceramid-bogatih regiona u spoljašnjem sloju ćelijskih membrana. To uzrokuje nakupljanje TRAIL receptora DR5 u ćelijskim membranama, povlačenje proteina FADD i aktivaciju prokaspaze-8 [82]. COX-2 selektivni inhibitori NS-398 i CAY10404 izazvali su povećanu ekspresiju receptora DR4 i DR5 na ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma, SK-Hep1 i HLE. Takođe, zabeležen je uticaj ovih inhibitora na smanjenu ekspresiju antiapoptotskih proteina survivina, XIAP i Bcl-xL [83]. Ispitivanjem skvamoznog karcinoma kože, u studiji Zhu J i sar, izneti su zaključci da celekoksib, selektivni COX-2

inhibitor, putem generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), u kombinaciji sa drugim farmakoterapijskim pristupima može da doprinese pokretanju procesa apoptoze, prvenstveno preko povećanja ekspresije DR5 receptora, ali i uticajem na unutrašnji apoptotski put [84].

1.5.3. Unutrašnji (mitohondrijalni) signalni put apoptoze

Ćelije mogu da aktiviraju program apoptoze i u svojoj unutrašnjosti, uglavnom kao odgovor na oštećenje ili stres, koji podrazumevaju prisustvo ROS i reaktivnih azotnih vrsta (RNS), aktivaciju onkogeni, oštećenje DNA, nedostatak kiseonika, nutrijenata ili signala za preživljavanje. Antiapoptotski i proapoptotski članovi porodice Bcl-2 proteina predstavljaju najvažnije intracelularne regulatore apoptoze. Strukturno i funkcionalno, podeljeni su u tri grupe: antiapoptotski Bcl-2 i Bcl-xL proteini poseduju sva četiri BH domena (BH1-4), proapoptotski efektorski proteini Bax i Bak sadrže domene BH1-3, dok su proapoptotski BH3-*only* proteini Bim, Bid, Puma i Noxa izgrađeni samo iz BH3 domena. Ovi proteini se međusobno vezuju, formiraju različite homo i heterodimere, inhibišući jedni drugima funkciju. Antiapoptotski proteini preveniraju oligomerizaciju i aktivaciju proapoptotskih proteina i zapravo je njihova međusobna ravnoteža ključan faktor u kontroli indukcije ovog mehanizma apoptoze. Bak je čvrsto vezan za spoljašnju mitohondrijalnu membranu, dok je Bax lociran u citosolu i premešta se do mitohondrija nakon apoptotskog signala. Ovi proteini su eksprimirani i na površini endoplazmatskog retikuluma i jedarne membrane, gde postaju aktivirani kao odgovor na stres endoplazmatskog retikuluma, oslobađajući jone kalcijuma u citosol, što pomaže u aktiviranju unutrašnjeg puta apoptoze. Bcl-2 i Bcl-xL su locirani na spoljašnjoj površini mitohondrijalne membrane, membrane endoplazmatskog retikuluma i jedra, čuvajući njihov integritet. Unutrašnji put započinje aktivacijom proteina BH3-*only* koji dalje aktiviraju proteine Bax i Bak. Ovi proteini podležu oligomerizaciji i agregaciji na površini mitohondrija, što vodi do povećane propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) i sledstvenog oslobađanja proteina, kao što su citohrom c, Smac/Diablo i Omi, iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora u citosol. Citohrom c ima ulogu u elektron-transportnom lancu mitohondrija, ali kada pređe u citoplazmu, ispoljava drugačije dejstvo. Naime, citohrom c se veže za prokaspaza-aktivirajući adaptorski protein Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), deoksiadenozin trifosfat (dATP) i inicijalnu prokaspazu-9, formirajući kružnu formaciju tzv. apoptozom. U okviru apoptozoma dolazi do aktivacije prokaspaze-9 u kaspazu-9. Aktivirana kaspaza-9 nishodno aktivira izvršnu prokaspazu-3 i tako indukuje ćelijsku smrt.

Postoje i dodatni koraci koji osiguravaju pravovremenu apoptozu. Proteini Smac/Diablo i Omi promovišu apoptozu inhibicijom IAP proteina (*inhibitors of apoptosis proteins*), kojima pripadaju IAP, XIAP i survivin. Konačan efekat izvršnih kaspaza jeste kaskada proteolitičkih događaja i formiranje apoptotičnih telašaca. Čak iako kaspaze nisu aktivirane, u nekim ćelijama povećana permeabilnost mitohondrijalne membrane dovodi do gubitka funkcije mitohondrija i ćelijske smrti [85, 86].

Spoljašnji put apoptoze može da aktivira unutrašnji put, u cilju amplifikacije kaskadnih proteolitičkih reakcija, kako bi se što efikasnije eliminisale neželjene ćelije i pojačao apoptotski signal. Bid protein iz grupe BH3-*only* proteina omogućuje vezu između ova dva puta. Nakon aktivacije spoljašnjeg puta apoptoze, inicijalna kaspaza-8 razgrađuje Bid i produkuje skraćenu formu Bid proteina, označenu kao tBid. tBid se translocira u mitohondrije gde inhibira antiapoptotske Bcl-2 proteine i uzrokuje agregaciju proapoptotskih Bax i Bak proteina, koji dalje nastavljaju aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze [87].

Sheng H i sar. su u svojoj studiji pokazali kako je na ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma HCA-7, koja pokazuje povećanu COX-2 ekspresiju, PGE2 inhibirao apoptozu indukovanu selektivnim COX-2 inhibitorom SC58125, posredstvom povećane ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 proteina [88]. Od tada, brojne studije ispituju povezanost COX-2, PGE2 i unutrašnjeg puta apoptoze. Slično kao i u slučaju spoljašnjeg puta apoptoze, utvrđeno je da COX-2 inhibicija i akumulacija arahidonske kiseline izazivaju nakupljanje proapoptotskih intraćelijskih ceramida i smanjenje Bcl-2 ekspresije [89, 90].

1.5.4. Značaj tumor-supresor gena TP53 u apoptozi

TP53 (*tumor protein 53*) gen, lociran na hromozomu 17p13.1, identifikovan je 1979. godine i opisan kao prvi tumor-supresor gen. Sadrži 11 egzona i kodira sintezu p53 proteina, molekulske mase 53 kDa. Porodicu proteina p53 čini više od 40 različitih izoformnih oblika ovog proteina, sa brojnim, važnim funkcijama u održavanju ćelijske homeostaze. P53 proteini regulišu ćelijski ciklus, popravku DNA, metabolizam, ćelijsku diferencijaciju, angiogenezu, starenje ćelije i različite vrste ćelijske smrti (apoptoza, autofagija, nekroptoza, ferroptoza i paraptoza). S obzirom na najvažniju ulogu p53 proteina da zaustavi napredovanje ćelijskog ciklusa oštećene i izmenjene ćelije, kao i da izazove ćelijsku smrt, u cilju očuvanja integriteta genoma, često se naziva „čuvarom genoma”. U fiziološkim okolnostima ovaj protein se nalazi u latentnom obliku u ćeliji i njegova ekspresija je niska zahvaljujući razgradnji dejstvom

protein ligaze MDM2. Oštećenje ćelijske DNA, hipoksija, aktivacija proto-onkogeni i izloženost ćelije stresogenim agensima izazivaju odvajanje p53 od MDM2 i translokaciju p53 u ćelijsko jedro, gde ovaj protein postaje aktiviran posttranslacionim modifikacijama, najčešće fosforilacijom i acetilacijom. Ovaj događaj promovise ulogu p53 kao važnog transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju i funkciju brojnih gena, čiji regulatorni regioni sadrže p53-vezujuća mesta, od kojih su najznačajniji geni koji kontrolišu ćelijski ciklus, popravku DNA i apoptozu. U više od 50% različitih karcinoma detektovana je smanjena ekspresija *TP53* gena, a ustanovljene su i *TP53* mutacije. *TP53* mutacije imaju aktivnu ulogu u procesu kancerogeneze. Osim što značajno smanjuju tumor-supresorsku funkciju ovog proteina, mnoge mutacije potpuno menjaju p53 ulogu, čineći ga onkogenim činiocem koji promovise malignu transformaciju ćelije [91, 92].

Somatske mutacije su opisane u gotovo svim malignim tumorima, sa najvećom zastupljenošću u tumorima kože, ovarijuma, dojke, jednjaka, glave i vrata, pluća i kolona. Gubitak funkcije p53 proteina opisan je kod više od 60% dokazanih NSCLC i kod 90% SCLC [93, 94]. Kod 50-75% kolorektalnih karcinoma detektovano je prisustvo nefunkcionalnog i inaktivnog p53 proteina [95].

Li-Fraumenijev sindrom predstavlja redak sindrom koji se nasleđuje autozomno dominantno, a u čijoj osnovi se nalaze germinativne mutacije *TP53* gena. Manifestuje se pojavom solidnih tumora i hematoloških maligniteta u relativno ranom životnom dobu [96].

P53-posredovano zaustavljanje ćelijskog ciklusa omogućuje ćelijama da poprave oštećenje DNA, nakon čega je ćelija spremna da ponovo uđe u proces odvijanja ćelijskog ciklusa. Ako je oštećenje DNA bilo velikog intenziteta, p53 transaktivira proapoptotske gene, indukujući apoptozu i potpunu eliminaciju oštećene ćelije. Najčešće se p53 mutacije detektuju u genomskom regionu koji kodira sintezu DNA-vezujućih domena p53, pa samim tim ovaj mutirani p53 protein ne pokazuje sekvenca-specifičnu transaktivacionu sposobnost. Neke mutacije izazivaju selektivan gubitak proapoptotske p53 funkcije, dok uloga u zaustavljanju ćelijskog ciklusa ostaje očuvana, iako postoje naučni rezultati sa tvrdnjama da svaka mutacija, u nekom stepenu, kompromituje sve p53 uloge. Aktivacija p53 transkripciono aktivira p21/WAF1, koji se potom direktno vezuje za ciklin E/cdk2 i ciklin D/cdk4 komplekse, zaustavljajući ćelijski ciklus u G1 fazi. Inhibicija cdk2 i cdk4 blokira fosforilaciju proteina retinoblastoma (pRb), čime se promovise njegova tumor-supresorska uloga, odnosno vezivanje pRb za E2F1, što dovodi do transkripcionog „utišavanja” E2F1-ciljanih gena zaduženih za DNA replikaciju i progresiju ćelijskog ciklusa. Istraživanja su ustanovila da se

p21 vezuje za PCNA i inhibiše DNA replikaciju. P53 aktivacija zaustavlja ćelijski ciklus i u G2/M fazi vezujući se za druge ciljane gene, prvenstveno za promotere gena koji kodiraju sintezu proteina 14-3-3 σ i GADD45. Ukoliko je oštećenje ćelije veće i p53/p21 aktivacija traje 3-5 dana, to može da uvede ćeliju u proces replikativnog starenja (*replicative senescence*), koje predstavlja stanje produženog, višenedeljnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa u kojem ćelija menja svoja morfološka i funkcionalna obeležja, za koja još uvek nije utvrđeno da li su ireverzibilna ili ne. U slučaju neophodne indukcije apoptoze, p53 transaktivira gene i proteine koji učestvuju u spoljašnjem (FasR, DR4, DR5) i unutrašnjem putu apoptoze (Puma, Noxa, Bad, Bax, Bak, Apaf-1, kaspaze). Istraživanja subcelularne p53 lokalizacije u slučaju DNA oštećenja utvrdila su da se p53 može detektovati na površini mitohondrija, čime može da direktno, transkripciono-nezavisnim mehanizmima, pokrene MOMP i gubitak mitohondrijalnog membranskog potencijala, izazivajući aktivaciju unutrašnjeg apoptotskog puta. Biohemijski, p53 poseduje sposobnost da svojim središnjim domenom (*core domain*), direktno veže proteine Bcl-2 i Bcl-xL, oslobađajući Bax i Bak. Uticajem na gene koji učestvuju u popravci DNA, metabolizmu, epigenetskim i antioksidativnim događajima, p53 suprimira inicijaciju kancerogeneze. Kada ćelije prođu kroz fazu inicijacije i steknu onkogeno obeležja, p53, putem zaustavljanja ćelijskog ciklusa, indukcije ćelijskog starenja i apoptoze, blokira tumorsku promociju i progresiju, čime učestvuje u svim fazama kancerogeneze [97].

U estrogen receptor-pozitivnom (ER⁺) karcinomu dojke, receptori za estrogen direktnom interakcijom sa p53 inhibiraju njegovu proapoptotsku funkciju. Kod osoba kod kojih je prisutna gojaznost, adipociti i stromalne ćelije masnog tkiva ekspimiraju leptin i aromatazu, ključni enzim u krajnjem koraku biosinteze estrogena, koji promoviše rast ER⁺ ćelija karcinoma dojke. Nekrotični adipociti, okruženi imunskim ćelijama, stvaraju proinflamatorne lokuse u kojima je poremećena diferencijacija adipocita i njihova funkcija, i povećana je proizvodnja proinflamatornih medijatora, kao što su interleukini, TNF- α i PGE2. Utvrđeno je da COX-2/PGE2 signalizacija povećava ekspresiju aromataze, ali i inhibira AMP-aktiviranu protein kinazu (AMPK), odnosno AMPK-posredovanu p53 fosforilaciju, značajnu posttranslacionu p53 modifikaciju. PGE2 deluje represivno na p53 translokaciju u ćelijsko jedro, nakon čega se inaktiviran i disfunkcionalan p53 akumulira u citoplazmi [98].

1.6. Uloga COX-2 u regulaciji ćelijske proliferacije

Rezistencija malignih ćelija na apoptozu neraskidivo je povezana sa nekontrolisanom i intenziviranom proliferacijom maligno-transformisanih ćelija, u čijim molekularnim mehanizmima važnu ulogu imaju COX-2, transkripcioni faktor NF- κ B i tumor-supresor PTEN [99, 100].

1.6.1. Transkripcioni faktor NF- κ B

Prva saznanja o transkripcionom faktoru NF- κ B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) potiču iz osamdesetih godina 20. veka [101]. NF- κ B predstavlja porodicu blisko povezanih transkripcionih faktora, koju čine članovi NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel i RelB. Ovi proteini sadrže Rel homologni domen (RHD) u svojoj sekvenci, koji učestvuje u njihovoj dimerizaciji, vezivanju za DNA i u interakciji sa specifičnim inhibitorima. NF- κ B proteini se mogu podeliti u dve grupe. Prvoj grupi pripadaju RelA, c-Rel i RelB, koji se sintetišu u zreloj formi i sadrže domen transaktivacije koji im dozvoljava interakciju sa transkripcionim aparatom. Drugu grupu čine NF- κ B1-p105/p50 i NF- κ B2-p100/p52, koji se sintetišu u obliku prekursorskih proteina p105 i p100, a zatim podležu proteazomalnoj proteolizi, formirajući konačne proteine p50 i p52. Ovi proteini sadrže DNA-vezujući domen, ali ne i domen transaktivacije [102].

U većini ćelija, NF- κ B dimeri su sekvestrirani u citoplazmi i zahvaljujući svojoj interakciji sa I κ B ostaju transkripciono neaktivni. Opisano je nekoliko I κ B proteina (I κ B α , I κ B β i I κ B ϵ), koji sadrže ankirin-ponavljajuće sekvence kojima se vezuju za RHD NF- κ B proteina i, na taj način, zadržavaju ih u citoplazmi. Bcl-3 je I κ B protein sa drugačijom ulogom. Naime, Bcl-3 sadrži transaktivacioni domen kojim se vezuje za p50 ili p52 homodimere, ispoljavajući koaktivatorsko dejstvo. Članovi I κ B α , I κ B β i I κ B ϵ sadrže ostatke serina koji predstavljaju mesta fosforilacije katalizovane I κ B kinazama (IKK). Najvažnije IKK su IKK α i IKK β sa katalitičkom ulogom, i IKK γ koja poseduje regulatornu ulogu. IKK-posredovana fosforilacija proteina I κ B α , I κ B β i I κ B ϵ čini ih podložnim za degradaciju u proteazomu [103, 104].

Opisani su različiti molekularni mehanizmi aktivacije NF- κ B. U tzv. kanonskom ili klasičnom putu aktivacije, koji je značajan u procesima inflamacije i urođenom imunitetu, učestvuju heterodimeri izgrađeni iz RelA ili c-Rel proteina i p50. Kao što je navedeno, dimeri su inaktivni u citoplazmi zbog vezivanja za I κ B proteine. Aktivacija ovog puta je izazvana

najčešće proinflamatornim citokinima ili virusnim infekcijama. Signali se prenose ligandima i receptorima, kao što su LPS, TNFR, TLR i IL-1R (*interleukin-1 receptor*). Nakon aktivacije, IKK kompleks fosforiliše I κ B α , izazivajući njegovu razgradnju, što oslobađa NF- κ B proteine i omogućava njihovu translokaciju u ćelijsko jedro, u kojem ispoljavaju ulogu transkripcionih faktora. Alternativni put, koji je važan u razvoju limfoidnih organa i stečenom imunitetu, aktivira se drugačijim receptorima i mehanizmima, poput CD40, TNFR2, RANK (*receptor activator for nuclear factor kappa B*), BAF (*B-cell activation factor*), LT β R (*lymphotoxin β receptor*), oksidativnim stresom, metalnim jonima i citotoksičnim agensima. U ovom putu učestvuju dimeri izgrađeni iz RelB i p52 jedinica. IKK α homodimer, aktiviran NF- κ B inducibilnom kinazom (NIK), katalizuje fosforilaciju p100 i njegovu proteolizu, generišući p52, koji u formi RelB-p52 heterodimera prelazi u ćelijsko jedro i aktivira transkripciju različitih gena. Iako su dimeri klasičnog i alternativnog puta (RelA-p50, c-Rel-p50, RelB-p52) najviše izučavani, i drugi tipovi homodimera i heterodimera mogu na različite načine da, atipičnim aktivacionim putevima, prouzrokuju NF- κ B aktivaciju. Signalni putevi, poput RAS/MAPK i PI3K/AKT, pokrenuti citokinima, faktorima rasta i receptorima tirozin kinaza, mogu aktivirati NF- κ B. U adenokarcinomu pluća je utvrđeno da EGFR aktivacija, podstaknuta ligandom epidermalnim faktorom rasta (EGF), može da pokrene atipičnu, IKK-nezavisnu NF- κ B aktivaciju, preko fosforilacije I κ B α na tirozinskoj rezidui pozicije 42 [105, 106].

NF- κ B aktivacija je, generalno, precizno regulisan događaj. U normalnim ćelijama NF- κ B postaje aktiviran samo nakon odgovarajućeg stimulusa i učestvuje u regulaciji transkripcije određenih, ciljanih gena, nakon čega regulatorni mehanizmi, prvenstveno I κ B, prevode NF- κ B u inaktivno stanje. Prema tome, u normalnim ćelijama aktivacija NF- κ B je inducibilan i prolazan proces. Ključna uloga ovog transkripcionog faktora ogleda se u kontroli imunološkog odgovora u različitim situacijama. U tumorskim ćelijama solidnih tumora, uključujući tumore pluća i kolona, ali i hematoloških maligniteta vrlo često je izgubljena regulacija NF- κ B aktivacije, čime NF- κ B postaje konstitutivno aktiviran. Vezujući se za specifične DNA sekvence, koje se nazivaju κ B mesta, prouzrokuje deregulisanu ekspresiju gena koji su pod NF- κ B kontrolom. U tu grupu spadaju geni koji regulišu ćelijsku proliferaciju, apoptozu, adheziju, migraciju i angiogenezu [107, 108].

NF- κ B učestvuje u progresiji ćelijskog ciklusa posredstvom uticaja na povećanje ekspresije različitih ciklina, a pogotovo ciklina D1, vezujući se za njegov promotor. Ciklin D1, čija je sinteza kodirana *CCND1* genom, vezuje se za kinaze cdk4 i cdk6, izazivajući

fosforilaciju tumor-supresora pRb i njegovu inaktivaciju. Ovaj događaj aktivira E2F porodicu transkripcionih faktora, koji dalje aktiviraju brojne gene zadužene za progresiju ćelijskog ciklusa i sledstvenu ćelijsku proliferaciju. Ispitivana je uloga NF- κ B u aktivaciji transkripcije gena koji učestvuju u inhibiciji spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze, čime doprinosi pojavi rezistencije malignih ćelija na apoptozu. NF- κ B povećava ekspresiju spomenutog apoptoza-inhibitornog proteina FLIP. Takođe, NF- κ B indukuje ekspresiju IAP i pojedinih antiapoptotskih članova Bcl-2 porodice. NF- κ B učestvuje u smanjenju ekspresije PTEN i p53 tumor-supresora. Tumorske ćelije u kojima je dokazana konstitutivna NF- κ B ekspresija pokazuju rezistenciju na hemioterapijske i radioterapijske protokole. Jedan od mehanizama rezistencije na citotoksičnu terapiju jeste povećana sinteza P-glikoproteina, važnog transportnog efluks proteina. Takođe, NF- κ B indukuje ekspresiju ćelijskih adhezionih proteina, poput ICAM-1, VCAM-1 i E-selektina, proteina uključenih u invaziju (matriksne metaloproteinaze, MMP-2 i MMP-9), kao i proangiogenih činilaca (VEGF) [102, 105]. Povećana ekspresija NF- κ B jedan je od mehanizama primarne i stečene rezistencije na primenu EGFR-TKI [109].

Brojne studije su pokazale da NF- κ B povećava COX-2 ekspresiju, vezujući se za promotor *PTGS2* gena, i da je NF- κ B-zavisna ćelijska signalizacija blisko povezana sa inflamacijom. Takođe, COX-2-posredovana produkcija različitih hemokina i citokina može dalje, pozitivnom povratnom spregom, da aktivira NF- κ B nuklearnu translokaciju. Značajan činilac u aberantnoj NF- κ B aktivaciji jeste duvanski dim [110].

Ispituju se različiti farmakoterapijski pristupi, uključujući monoklonalna antitela, antiinflamatorne lekove i prirodne supstance, sa ciljem inhibicije NF- κ B i izazivanja antitumorskog delovanja, ali bez oštećenja pravovremenog imunološkog odgovora. Takođe, značajna su i ispitivanja inhibitora proteazomalne degradacije, koji preveniraju NF- κ B aktivaciju posredstvom sprečavanja degradacije NF- κ B inhibitora I κ B, NF- κ B1/p105 i NF- κ B2/p100 proteina. Pojedini NSAIL, blokiranjem COX-2, inhibirali su proteazomalnu degradaciju I κ B, a samim tim i nuklearnu translokaciju NF- κ B i vezivanje za DNA, zaustavljajući ćelijsku proliferaciju i prouzrokujući apoptozu ćelija karcinoma pluća [105, 111-113].

1.6.2. Tumor-supresor PTEN

Istraživanja su pokazala da su COX-2 i PGE2 u malignim ćelijama povezani sa aktivacijom PI3K/AKT signalnog puta, posredstvom inaktivacije ili smanjene aktivnosti PTEN tumor-supresor proteina, što predstavlja i jedan od uzroka izazivanja aberantne NF- κ B aktivacije [114]. Jedno naučno istraživanje pokazalo je da povećana ekspresija receptora HER2, člana porodice transmembranskih receptora tirozin kinaza, delujući na promotor *PTGS2* gena, povećava ekspresiju enzima COX-2. Opisano je da je povećana ekspresija COX-2 prouzrokovana aktivacijom HER2/MEK/ERK signalnog puta, što dalje inaktivira PTEN i izaziva aktivaciju AKT signalnog puta, izazivajući aberantnu ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i invaziju A549 ćelijske linije karcinoma pluća [115]. PTEN inaktivacija, prouzrokovana različitim činiocima, ima značajnu ulogu u etiopatogenezi karcinoma pluća. Smanjena PTEN proteinska ekspresija sreće se kod više od 40% NSCLC. *PTEN* mutacije su zabeležene u NSCLC – javljaju se kod 15% skvamoznih karcinoma i 3% adenokarcinoma pluća, ali i kod 10-18% SCLC. Gubitak PTEN aktivnosti je definisan kao negativan prognostički faktor, ali i negativan prediktivni faktor jer je povezan sa smanjenom senzitivnošću i lošijim odgovorom na primenu EGFR-TKI. U jednoj studiji, pacijenti sa karcinomom pluća, dokazanom *EGFR* mutacijom i konkomitantnom delecijom *PTEN* gena pokazali su kraći period preživljavanja bez progresije bolesti (*progression-free survival*) i kraće ukupno preživljavanje (*overall survival*), u toku primene EGFR-TKI [116, 117]. Potpuni gubitak PTEN proteinske ekspresije opisan je kod 58% kolorektalnih karcinoma, dok su mutacije *PTEN* gena zastupljene kod 4% pacijenata sa ovom malignom bolešću. Poremećena PTEN tumor-supresorska aktivnost je negativan prognostički faktor, ali i negativan prediktivni činilac u adjuvantnoj hemioterapiji karcinoma kolona [118, 119].

PTEN gen je lociran na hromozomu 10q23 i njegovih 9 egzona kodiraju sintezu PTEN proteina, molekulske mase 48 kDa, izgrađenog iz 403 aminokiseline. Dve nezavisne grupe istraživača prvi put su identifikovali ovaj gen 1997. godine. Utvrđeno je da njegov proteinski produkt pokazuje homologiju sa sekvencom superfamilije tirozin fosfataza, kao i sa tenzinom, odatle i naziv PTEN (*phosphate and tensin homolog deleted from chromosome ten*). Prve analize kristalne strukture humanog PTEN proteina otkrile su postojanje dva blisko povezana domena. Jedan je katalitički N-terminalni domen, sa aktivnošću fosfataze, a drugi je C2 domen, zadužen za vezivanje za ćelijske membrane. Protein sadrži i N-terminalnu PtdIns (4,5) P₂ vezujuću sekvencu, koja dozvoljava interakciju sa površinama membrana koje sadrže supstrat, ali, sadrži i citoplazmatske i nuklearne signalne delove koji diktiraju subcelularnu

PTEN lokalizaciju. C-terminalni deo sadrži jedan „okrajak” koji učestvuje u posttranslacionoj regulaciji PTEN ekspresije. Utvrđeno je da mnoge ćelije sadrže niske koncentracije produžene PTEN varijante (PTEN-L), koja poseduje dodatnu sekvencu od 173 aminokiselina na N-terminalnom delu. Postoje pretpostavke da PTEN i PTEN-L mogu biti sekretovani i izmenjeni između ćelija, ispoljavajući interćelijsku aktivnost [120]. Unutar ćelija, PTEN se nalazi u ćelijskim organelama ili je povezan sa organelama, poput mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, jedra i jedarca [121]. Za razliku od drugih tumor-supresora, koji zatevaju potpuni gubitak svoje funkcije za indukciju kancerogeneze, parcijalni gubitak PTEN funkcije može imati drastičan uticaj na tumorigenezu i tumorsku progresiju. PTEN je glavni negativni regulator ćelijskog signalnog puta PI3K/AKT/mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*), koji ima ključnu ulogu u kontroli ćelijskog metabolizma, rasta, preživljavanja i proliferacije. Aktivacija intracelularne PI3K prouzrokovana je različitim ćelijskim receptorima, uključujući receptore za integrine, receptore tirozin kinaza aktivirane faktorima rasta i G-proteinske receptore, u koje spadaju i prostaglandinski EP receptori. Aktivisana PI3K katalizuje fosforilaciju fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata (PIP₂) i prelazak u fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP₃), membranski-povezan lipid koji ima ulogu drugog glasnika, sa uticajem na različite intracelularne događaje. PIP₃ vezuje brojne proteine koji dalje učestvuju u ćelijskom anabolizmu, rastu i proliferaciji, poput proto-onkogeno AKT kinaza i mTOR. Katalitička PTEN uloga, kao lipidne fosfataze i antagoniste PI3K/AKT/mTOR ose, ogleda se u defosforilaciji aktivnog PIP₃ i stvaranju neaktivnog PIP₂. Smatra se da su PTEN/PTEN homodimerizacija i PTEN/PTEN-L heterodimerizacija važni činioci u ispoljavanju kompletne tumor-supresorske funkcije. Gubitak PTEN funkcije dovodi do hiperaktivacije PIP₃ signala i aberantne aktivacije PI3K/AKT/mTOR kaskade. U malignim ćelijama ovaj signalni put je veoma često deregulisan amplifikacijom gena, pojavom mutacija u nekoj od komponenata signalne kaskade ili gubitkom PTEN antagonističke funkcije. Osim katalitičke PTEN uloge, ispituju se njegova tumor-supresorska dejstva koja su kataliza-nezavisna, a uzrokovana protein-protein interakcijama, poput pozitivnog uticaja na stabilnost hromozoma i popravku oštećenja DNA. Istraživanja su usmerena na proučavanju značaja nuklearne PTEN translokacije, za koju je utvrđeno da modulira funkciju p53, drugog tumor-supresora, i smanjuje nuklearnu AKT aktivaciju [122, 123]. PTEN je povezan i sa pomenutom Bcl-2 porodicom proteina. U slučaju gubitka PTEN funkcije, aktivirana PI3K/AKT signalizacija fosforiliše protein Bad, čime mu narušava proapoptotsku funkciju. Bad fosforilacija izaziva njegovu sekvencijaciju u citoplazmi pod uticajem proteina 14-3-3. Pretpostavlja se da COX-2 učestvuje u ovom mehanizmu jer su NSAIL (sulindak,

indometacin i SC-236), inhibicijom 14-3-3 ekspresije, indukovali apoptozu u HT-29 ćelijskoj liniji karcinoma kolona. Prostaglandinski receptori koji povećavaju koncentraciju cAMP i aktiviraju PKA takođe fosforilišu i inhibiraju Bad [124].

U regulaciji PTEN ekspresije i funkcije uključeni su genetski i epigenetski mehanizmi, na transkripcionom, posttranskripcionom ili posttranslacionom nivou. Identifikovano je više tipova *PTEN* mutacija u regionima gena koji kodiraju sintezu fosfataznog ili C2 domena (egzoni 1-8). S obzirom na to da su oba domena neophodna za potpunu enzimsku funkciju, ove mutacije smanjuju ili potpuno inhibiraju katalitičku fosfataznu PTEN aktivnost. Ređe su mutacije u egzonu 9, koji kodira sintezu C-terminalnog okrajka PTEN proteina, koje remete proteinsku stabilnost [120, 125].

Nekoliko transkripcionih faktora vezuju se direktno za *PTEN* promoter i pozitivno regulišu njegovu ekspresiju. U ovu grupu spadaju tumor-supresor protein p53 i PPAR γ receptor. Istraživanja su potvrdila povezanost PTEN i p53 proteina i međusobnu regulaciju, kojom jedan drugom pozitivno regulišu ekspresiju. *PTEN* promoter je, takođe, mesto vezivanja transkripcionih represora, poput NF- κ B i *zinc-finger* transkripcionih faktora Snail i Slug, koji se „takmiče” sa p53 u vezivanju za *PTEN* promoterski region. U „utišavanju” *PTEN* genske ekspresije značajnu ulogu imaju epigenetski mehanizmi poput deacetilacije histona i aberantne hipermetilacije CpG ostrvaca u *PTEN* promoteru. Studije su pokazale da ROS-posredovana oksidacija cisteinskih rezidua stvara cistinske disulfidne mostove u PTEN strukturi i smanjuje fosfataznu aktivnost, promovišući aktivnost AKT signalnog puta [120].

Brojna istraživanja su posvećena proučavanju uloge COX-2, PGE2 i EP receptora u regulaciji različitih nekodirajućih RNA molekula, posebno miRNA, koji mogu da povećaju ili smanje PTEN ekspresiju. [126, 127]. Utvrđeno je da miR-21 negativno deluje na PTEN ekspresiju, uzrokujući rezistenciju na primenu gefitiniba, EGFT-TKI prve generacije, u terapiji NSCLC [128].

1.7. Povezanost COX-2 sa MRP1/ABCC1 transportnim proteinom

COX-2/PGE2 ćelijska signalizacija je blisko povezana sa aktivacijom transportnih proteina koji pripadaju superporodici ABC transportera (*adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters*), i to prvenstveno proteina koji su uključeni u eliminaciju citotoksičnih antitumorskih lekova iz tumorskih ćelija. Najvažniji članovi ABC superporodice, koji posreduju u intrinzičnoj i stečenoj rezistenciji na različite antitumorske

lekove (*multidrug resistance*, MDR), jesu MDR1/P-gp1/ABCB1 (*multidrug resistance 1/P-glycoprotein 1*), MRP1/ABCC1 (*multidrug resistance protein 1*) i BCRP/ABCG2 (*breast cancer resistance protein*). Brojna istraživanja potvrdila su da COX-2 i PGE2 učestvuju u povećanju ekspresije ovih transportera na tumorskim ćelijama, što stvara uslove za hemorezistenciju, smanjenu efikasnost antitumorskih lekova, ali i povećanu sistemsku toksičnost jer se, u tom slučaju, ovi lekovi akumuliraju u cirkulaciji pacijenta. U K562 ćelijama humane eritroleukemije COX-2/PGE2 signal je, posredstvom receptora EP4, aktivirao PI3K/AKT signalni put i povećao ekspresiju MDR1 proteina, što je doprinelo rezistenciji K562 ćelija na primenu imatiniba. Takođe, utvrđeno je da PGE2 povećava ekspresiju i drugih članova ABC superporodice transportera, aktivacijom različitih EP receptora i signalnih puteva, poput NF- κ B, RAS/RAF/MEK/ERK/CREB i puta kinaze glikogen sintaze-3 β (GSK-3 β)/ β -katenin/TCF4–LEF. Primena COX-2 inhibitora povećala je efikasnost antitumorskih agenasa putem smanjenja ekspresije ABC transportera i povećanja hemosenzitivnosti tumorskih ćelija [129, 130]. Meloksikam, COX-2 inhibitor, povećao je doksorubicin-indukovanu citotoksičnost u A549 ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća, posredstvom smanjenja ekspresije MRP1 i MRP4 transportera i posledičnog povećanja intracelularne akumulacije doksorubicina [131].

ABC transporteri predstavljaju heterogenu superporodicu transportnih proteina koju čini 49 članova, podeljenih u 7 porodica, obeleženih slovima od A do G. U pitanju su transmembranski proteini, široko rasprostranjeni u organizmu i locirani na ćelijama i ćelijskim organelama. ABC transporteri, podeljeni na importere i eksportere, omogućavaju prenos različitih supstrata kroz ćelijsku membranu, poput neorganskih i organskih molekula, sterola, metalnih jona, polipeptida i proteina, a energiju za taj proces dobijaju hidrolizom ATP-a. Posebno mesto u ispitivanju uloga ovih transportera zauzimaju maligne bolesti i poremećaji metabolizma lipida jer je dokazana ekspresija ABC transportera na malignim ćelijama i ćelijama koje učestvuju u metabolizmu lipida, kao što su makrofagi. Poremećaji metabolizma masnog tkiva, inflamatorne i maligne bolesti predstavljaju blisko povezana patološka stanja, u čijoj povezanosti značajnu ulogu imaju upravo ABC transporteri. Tipičan ABC transporter sastoji se iz dva transmembranska domena (TMD) i dva citoplazmatska nukleotid-vezujuća domena (NBD). Transmembranski domeni su veoma raznoliki u pogledu proteinske sekvence, dok su citoplazmatski domeni konzervirani i imaju karakteristične aminokiselinske motive, nazvane Walker A i Walker B. Najčešće, jedan transporter sadrži sva četiri domena (*full transporter*), ali neki transporteri sadrže samo jedan TMD i jedan NBD

(*half transporter*), što ih obavezuje da stvaraju homo ili heterodimere u cilju obezbeđivanja potpune funkcionalnosti. Postoje i transporteri sa drugačijim sadržajem ovih domena. TMD su isprepletani sa 4-6 transmembranska α -heliksa, kako bi obrazovali šupljinu koja je značajna za prepoznavanje, vezivanje i transport supstrata, kao i za kontakt sa NBD. Transportni procesi ovih proteina baziraju se na izmeni konformacije TMD, tokom koje transporter biva orijentisan ka spoljašnjoj (*outward state*) ili unutrašnjoj (*inward state*) strani ćelije. Pojedini transporteri, kao što su ABCA1 i ABCC6, poseduju dodatnu TMD0 hidrofobnu sekvencu, izgrađenu iz 250 aminokiselina, koja je veoma značajna za transportnu funkciju. NBD vezuje i hidrolizuje ATP, obezbeđujući energiju za konformacione promene TMD, a samim tim i za transportni proces. Za transport su značajni i supstrat-vezujući proteini (SBP), koji vezuju supstrat i stupaju u fuziju sa TMD. Upravo je kontakt supstrat-SBP-TMD presudan za aktivaciju ATP-aze i sledstvenu hidrolizu ATP-a u okviru NBD-a. Nakon prolaska supstrata kroz ćelijsku membranu, transporter se vraća u svoje prvobitno konformaciono stanje [132, 133].

C porodici ABC superporodice transportera pripadaju transportni MRP efluks proteini ABCC1-6 i ABCC10-13, ATP-zavisani hloridni kanal (CFTR/ABCC7) i ATP-zavisni receptori sulfonilureje (SUR/ABCC8, 9). Protein MRP1 (ABCC1), molekulske mase 190 kDa, kodiran *ABCC1* genom, prvi put je izolovan iz doksorubicin-rezistentne SCLC ćelijske linije H69AR 1992. godine. Sadrži tri transmembranska domena i dva nukleotid-vezujuća domena. MRP1 je široko distribuiran u organizmu, a posebno u nadbubrežnoj žlezdi, mokraćnoj bešici, horoidnom pleksusu, T ćelijama i mišićnim ćelijama. Povećana MRP1 ekspresija detektovana je u tumorima pluća, dojke, prostate, ovarijuma, melanoma, gastrointestinalnim tumorima i leukemijama, i definisana je kao negativan prognostički faktor. MRP1 učestvuje u efluksu brojnih terapijskih agenasa i, uopšte, ksenobiotika. MRP1 supstrati su metotreksat, doksorubicin, etopozid, vinkristin, vinblastin, irinotekan, paklitaksel, antiandrogeni, pojedini antiviroci i antibiotici, teški metali, različiti organski anjoni i aflatoxin B1. MRP1 učestvuje i u eliminaciji glutation, glukuronid i sulfatnih konjugata. Takođe, transportuje različite fiziološke supstrate kao što su folati, glutation i glutation disulfid, bilirubin, prostaglandini i leukotrieni. MRP1 poseduje protektivnu ulogu jer eliminacijom endogenih intermedijera i potencijalno štetnih jedinjenja učestvuje u regulaciji ćelijske homeostaze. Održavajući balans glutationa i glutation disulfida, MRP1 predstavlja važan regulator ćelijskog odgovora na oksidativni stres. Povećana ekspresija MRP1 u malignim ćelijama smanjuje njihovu senzitivnost na terapijske agense i predstavlja ozbiljan

klinički problem, što je i pokrenulo brojna istraživanja novih supstrata i potencijalnih inhibitora MRP1, ali i drugih transportera [134, 135].

1.8. Uloga COX-2 u procesima invazije i metastaziranja malignih ćelija

Važan deo toka maligne bolesti predstavljaju procesi invazije i metastaziranja, sa negativnim uticajem na prognozu bolesti i mortalitet. Pod invazijom i metastaziranjem podrazumevaju se višestepeni procesi, u kojima ćelije gube svoje međućelijske kontakte, oslobađaju se i izlaze iz svog primarnog ležišta, primarnog tumora, kao cirkulišuće tumorske ćelije, izbegavajući programiranu ćelijsku smrt anoikis. Anoikis se javlja usled gubitka interakcija između ćelija i međućelijskog matriksa, ali cirkulišuće tumorske ćelije postižu rezistenciju na anoikis formiranjem ćelijskih agregata, usled povišene ekspresije fibronektina, što je nađeno kod malignih tumora pluća i dojke. Smanjena ekspresija fibronektina otežava agregaciju ćelija i povećava stopu anoikisa. Oslobođene ćelije migriraju, učestvuju u degradaciji ekstracelularnog matriksa (ECM), penetriraju u krvne i limfne sudove, sa posledičnom diseminacijom u okolna tkiva i organe, uz adheziju na endotelne ćelije i sekundarni rast na novoj lokaciji. Krajnji efekat ovih procesa jeste lokalno zahvatanje okolnog tkiva (limfne žlezde, krvni sudovi, masno tkivo i drugo), susednih i udaljenih tkiva i organa. Različiti molekularni mehanizmi omogućuju malignim ćelijama da prođu kroz endotel kapilara i da infiltruju okolno tkivo, sa daljim afinitetom limfogenog i hematogenog širenja. Interakcije tumorskih ćelija sa komponentama ECM, inflamacija, enzimi matriksne metaloproteinaze, imunosupresija i angiogeneza predstavljaju značajne činioce invazije i metastaziranja [136-138].

Epitelno-mezenhimalna tranzicija (EMT) predstavlja važan proces tokom embrionalnog razvoja i obnavljanja tkiva, ali ima ulogu i u patološkim stanjima fibroze tkiva i metastaziranja malignih tumora. Tokom EMT maligne ćelije prolaze kroz niz biohemijskih promena, sa gubitkom epitelnih karakteristika i polariteta, i sticanjem fenotipskih odlika mezenhimalnih ćelija. Maligne ćelije menjaju svoj oblik, proliferišu, stiču rezistenciju na apoptozu i anoikis, odvajaju se od bazalne membrane i primarnog tumora, povećavaju svoju invazivnost, kao i migratorni kapacitet, čime dostižu metastatski potencijal. Brojni faktori rasta, citokini, proinflamatorni medijatori, uključujući prostaglandine, hipoksija i drugi činioci doprinose patogenezi EMT. U ovom procesu dolazi do indukcije različitih transkripcionih faktora sa promenom ekspresije gena i proteina, pogotovo proteina na ćelijskoj površini,

aktivacije različitih enzima i signalnih puteva, izmene i reorganizacije proteina citoskeleta, sa sledstvenom izmenom morfologije i funkcije ćelije koja podleže EMT [139].

1.8.1. Tumor-supresor E-kadherin

E-kadherin predstavlja najznačajniji adhezioni molekul u međućelijskim kontaktima epitelnih ćelija. Nalazi se u mnogim tkivima, sa važnom ulogom u organogenezi i kontroli EMT, u cilju održavanja arhitekture i funkcije tkiva, čime predstavlja tumor-supresor. Pripada grupi proteina koji se nazivaju kalcijum-zavisni ćelijski adhezioni molekuli. Lociran je na površini ćelija, u regionima adherentnih spojeva. Porodica kadherina prvi put je otkrivena sedamdesetih godina 20. veka, zahvaljujući istraživačkom radu Takeichi Masatoshi i sar. *CDH1* gen (16q22.1) kodira sintezu E-kadherina, koji je, po strukturi, glikoprotein molekulske mase 120 kDa. Posедуje veliki N-terminalni ekstracelularni domen, koji vezuje jone kalcijuma, transmembranski segment i kratak C-terminalni citoplazmatski domen, koji stupa u interakciju sa aktinskim citoskeletom posredstvom *linker* molekula, alfa, beta i gama katenina. Citoplazmatski domen, svojom povezanošću sa citoskeletom, reguliše ekstracelularni domen i njegovu ulogu u grupisanju kadherina u međućelijskim kontaktima, a reguliše i jačinu tih spojeva. U stvaranju međućelijskih kontakata značajno je formiranje E-kadherinskih homodimera između ekstracelularnih domena (homofilna lateralna dimerizacija). Paralelni dimeri se zbližavaju sa paralelnim dimerima susednih ćelija formirajući kontakte. E-kadherin učestvuje i u drugim ćelijskim procesima, poput regulacije proliferacije, diferencijacije, migracije i apoptoze. Takođe, važna tumor-supresorska uloga E-kadherina jeste negativna regulacija WNT/ β -katenin signalnog puta, značajnog činioca u karcinogenezi karcinoma pluća i kolona. Ovu ulogu E-kadherin sprovodi putem sekvenciranja citoplazmatskog β -katenina i sprečavanja njegove translokacije u ćelijsko jedro i aktivacije transkripcionih faktora TCF/LEF koji, inače, učestvuju u aktivaciji brojnih proto-onkogeno [140-142].

In vitro i *in vivo* studije, kao i klinička istraživanja utvrdili su povezanost enzima COX-2 sa smanjenom ekspresijom ili potpunim gubitkom E-kadherina u ćelijama karcinoma pluća i debelog creva. Somatske i germinativne mutacije u domenu *CDH1* gena su retke i dovode do izmene strukture i funkcije E-kadherina. Epigenetski mehanizmi, prvenstveno hipermetilacija *CDH1* promotera, ali i drugi mehanizmi transkripcione represije, imaju važnu ulogu u gubitku ekspresije E-kadherina. Studija Dohadwala M i sar. pokazala je da dodatak egzogenog PGE₂, na autokrini i parakrini način, povećava ekspresiju transkripcionih

represora *Zeb1* i *Snail* na humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća (A549) i skvamoznog karcinoma pluća (NCI-H157). *Zeb1* i *Snail* se vezuju *CDH1* promoter i smanjuju ekspresiju E-kadherina, što se manifestovalo smanjenim kapacitetom za agregaciju ćelija u ovim ćelijskim kulturama. Recipročna ekspresija COX-2 i E-kadherina, odnosno *Zeb1* i E-kadherina, koekspresija COX-2 i *Zeb1*, kao i vrlo retko prisutna koekspresija COX-2, *Zeb1* i E-kadherina, dokazana je imunohistohemijskom analizom na humanim hirurškim uzorcima adenokarcinoma pluća [143].

EMT i smanjena ekspresija E-kadherina imaju ulogu u primarnoj i sekundarnoj (stečenoj) rezistenciji na primenu EGFR-TKI u karcinomu pluća [144, 145].

1.8.2. Matriksne metaloproteinaze (MMP)

Matriksne metaloproteinaze (MMP) predstavljaju porodicu cink-zavisnih endopeptidaza. Njihova primarna uloga jeste kataliza hidrolize komponenata ECM, prvenstveno kolagena (kolagenoliza). MMP-posredovana hidroliza kolagena značajna je u fiziološkim procesima remodelovanja tkiva tokom embrionalnog razvoja i odrasle dobi, ali ima ulogu i u patogenezi različitih bolesti. Brojna istraživanja ispitivala su uloge MMP u patogenezi inflamatornih i autoimunih bolesti, karcinoma, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Dekompozicija kolagena ECM i bazalne membrane značajan je činilac u EMT, invaziji i metastaziranju malignih ćelija. Prvi enzim ove porodice (MMP-1) otkriven je i opisan 1962. godine u radu Gross Jerome i Lapiere M. Charles [146, 147].

Opisano je više od 20 MMP, podeljenih u nekoliko grupa, sa značajem u humanom organizmu. Ekspresija gena koji kodiraju sintezu MMP detektovana je u fibroblastima, neutrofilnim granulocitima, monocitima, makrofagima, endotelnim i malignim ćelijama. Biološka aktivnost MMP podleže neuroimunohormonalnoj regulaciji i regulisana je na nivou transkripcije gena, sekrecije iz ćelija, aktivacije proenzima (zimogena, pro-MMP), ali i na nivou katalize. U fiziološkim okolnostima MMP su u bliskoj vezi sa endogenim tkivnim MMP inhibitorima (TIMP), zbog čega je MMP ekspresija u ćelijama niska, ali postaje indukovana pod uticajem faktora rasta, proinflamatornih medijatora, hormona, ultraljubičastog (UV) i jonizujućeg zračenja, međućelijskih interakcija, kao i interakcija ćelija sa ECM. MMP su prvenstveno proteini ECM, mada se pojedini MMP mogu detektovati i intracelularno. Tipičan enzim MMP se sastoji iz nekoliko domena – predomen, propeptidni domen, katalitički domen, hemopeksin domen i transmembranski domen. MMP interreaguju

sa receptorima iz grupe kadherina, integrina, selektina i CD44 receptora. MMP se sintetišu u malignim ćelijama u niskim količinama, ali maligne ćelije, na parakrini način, sekrecijom interleukina, interferona, faktora rasta i ekstracelularnih MMP induktora, stimulišu okolne ćelije da produkuju MMP. Ovi enzimi se, potom, vezuju za maligne ćelije posredstvom receptora i utiču na njihov rast, proliferaciju, apoptozu, angiogenezu, invaziju i metastaziranje. Nakon EMT i sticanja mezenhimalnog fenotipa, maligne ćelije proizvode veće količine MMP. U procesu kancerogeneze, MMP-2 i 9 su, možda, i najviše proučavane MMP. Pripadaju grupi želatinaza (želatinaza A i B), koje imaju najveći afinitet prema želatinu, elastinu i različitim tipovima kolagena [148-150]. U brojnim karcinomima povećana ekspresija MMP-2 i 9 definisana je kao negativan prognostički faktor [151].

Angiogeneza, proces formiranja novih krvnih sudova iz postojećih, zahteva degradaciju vaskularne bazalne membrane i remodelovanje ECM, u cilju omogućavanja endotelnim ćelijama da migriraju, pređu u okolno tkivo i obrazuju novu mikrovaskulaturu, u čemu MMP imaju važnu ulogu [152]. Razgradnja ECM ne otklanja samo fizičku barijeru za rast tumora, nego oslobađa mnoge biološki aktivne molekule iz ECM i otkriva „skrivena” mesta i receptore u ECM. Važan mehanizam u MMP-posredovanoj regulaciji tumorskog rasta jeste dejstvo na oslobađanje membranski-vezanih prekursora pojedinih faktora rasta i sinteza aktivnih faktora rasta, kao što je VEGF, uz modulaciju njihove biološke raspoloživosti i indirektno regulacije proliferativnih i angiogenih signala [153].

Visoka koncentracija VEGF učestvuje u stvaranju abnormalne tumorske vaskulature, koja se sastoji iz nezrelih, neorganizovanih i permeabilnih krvnih sudova, koji pružaju lošu perfuziju tumorskog tkiva. U takvom okruženju, stvaraju se hipoksični uslovi koji doprinose agresivnijem i invazivnijem fenotipu tumorskih ćelija, prvenstveno posredstvom lošije difuzije citotoksičnih antitumorskih agenasa i jonizujućeg zračenja. Inflammatory medijatori, uključujući i prostaglandine, sekretovani iz tumorskih ćelija i tumorskog okruženja, putem aktivacije MAPK i PI3K/AKT signalnih puteva, aktiviraju MMP, VEGF i hipoksija-inducibilni faktor (HIF), ostvarujući poželjne uslove za ćelijsku invaziju, angiogenezu i metastaziranje [154]. *In vitro* studija na humanim endotelnim ćelijama pokazala je da COX-2 i PGE2 aktiviraju AKT signalni put, povećavajući aktivnost MMP-2 i ubrzavajući formiranje nove vaskulature. Navedene činjenice upućuju na značajnu ulogu enzima COX-2 i prostanoida u regulaciji procesa invazije i metastaziranja [155].

1.9. Epigenetski aspekti kancerogeneze

Pored genskih alteracija, promene strukture hromatina i ekspresije gena imaju važnu ulogu u procesu kancerogeneze. Pojam epigenetike definisao je Waddington Conrad 1942. godine kao nasledne promene fenotipa koje nisu uzrokovane promenama genotipa. Epigenetika, dakle, predstavlja ispitivanje promena u genskoj ekspresiji, koje nisu izazvane izmenom redosleda nukleotida u sekvenci gena [156].

Epigenetski događaji rezultuju pojavom fenotipa koji se stabilno nasleđuje na nivou regulacije ekspresije gena i proteina. Uloga epigenetskih procesa ogleda se u ostvarivanju značajnih razlika u ekspresiji gena na ćelijskom i tkivnom nivou, uprkos identičnom genotipu, što omogućuje sprovođenje specifičnih funkcija u multicelularnom humanom organizmu. Faktori spoljašnje sredine, ali i mutacije gena koji kodiraju sintezu regulatornih proteina u hromatinu utiču na epigenetske događaje. Epigenetika upućuje na sve kontrolisane, reverzibilne promene u ekspresiji gena, koje se odvijaju na nivou hromatina, mnogo češće u odnosu na genetske promene sekvence nukleotida. Epigenetske alteracije se mogu podeliti u nekoliko grupa, među kojima su najvažnije promene u metilaciji DNA i posttranslacione modifikacije histona, najčešće acetilacija i metilacija. Ovi događaji utiču na mogućnost vezivanja faktora transkripcije za specifične sekvence DNA, usled čega direktno regulišu nivo sinteze mRNA i određuju da li će i u kojoj meri neki gen biti eksprimiran u ćeliji. Oblasti epigenetike pripadaju i proučavanja nekodirajućih RNA kao što su miRNA [157, 158].

Hromatin je kompleks DNA i proteina, predominantno histona, malih, baznih proteina. Histoni imaju ulogu u kondenzaciji DNA, ali u potpunosti učestvuju i u regulaciji gena. Nukleozom predstavlja osnovnu strukturnu, repetitivnu jedinicu hromatina. Svaki nukleozom se sastoji iz histonskog oktamera, odnosno H2A, H2B, H3 i H4 histona. Ovi histoni obrazuju globularno jezgro oko koga je 1,65 puta namotano 147 parova DNA baza. Histon H1 (*linker* histon) ne pripada nukleozomu, nego se vezuje za *linker* DNA koja razdvaja dva histonska kompleksa. Internukleozomalne interakcije doprinose daljem pakovanju nukleozoma u fibrile i hromatinska vlakna. Metilacija DNA i modifikacije histona regulišu pristup transkripcionog aparata ciljanim genima i utiču na prelazak transkripciono inaktivnog, kondenzovanog hromatina (heterohromatina) u transkripciono aktivan, relaksiran hromatin (euhromatin), i obrnuto, čime učestvuju u preciznoj kontroli strukture hromatina i ekspresije gena [159].

Epigenetske modifikacije mogu biti prenete na ćerke ćelije tokom mitoze, što obezbeđuje klonalno nasleđivanje, ali nisu stabilne tokom mejoze i može doći do njihovog

iščezavanja u germinativnom epitelu. Međutim, ukoliko ostanu stabilne u germinativnom epitelu roditelja, mogu se zadržati tokom procesa mejoze i gametogeneze i preneti na potomstvo [160].

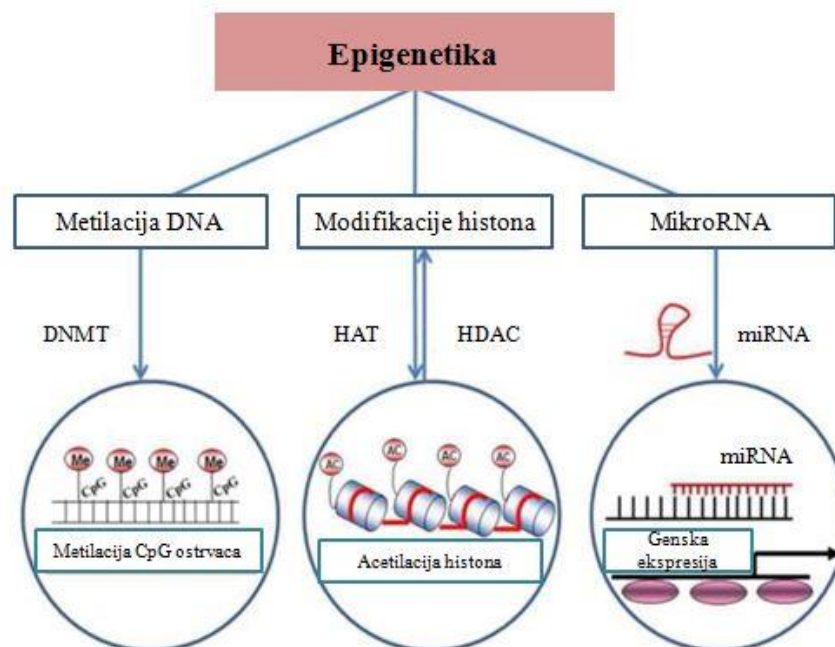
Metilacija DNA predstavlja kovalentnu modifikaciju citozina u smislu stvaranja 5-metilcitozinskih rezidua i to u okviru CpG dinukleotida. Preciznije, metilacija citozina se dešava u regionima CpG ostrvaca, koji su definisani kao regioni dužine više od 200 baznih parova, sa više od 50% G+C sadržaja. Približno 70% regiona promotera gena sadrži CpG ostrvca. Obrazovanje metil-CpG katalizovano je DNA metiltransferazama (DNMT), koje predstavljaju enzime sa ulogom katalize prenosa metil grupe sa S-adenozil-L-metionina na ugljenikov atom pozicije 5 u strukturi citozina. U humanim ćelijama najvažnije su tri DNMT: DNMT1, koja učestvuje u održavanju stanja metiliranosti, dok DNMT3A i DNMT3B pokazuju *de novo* metiltransferaznu aktivnost. Metilacija CpG ostrvaca u promoterskim regionima gena povezana je sa „utišavanjem” gena, odnosno sa smanjenom transkripcijom gena. Represija genske transkripcije sprovodi se posredstvom nekoliko mehanizama. Metilirana DNA može direktno inhibirati transkripciju tako što metilirana mesta ostaju neprepoznata od strane transkripcionih faktora. Takođe, metilacija DNA može promovisati povlačenje proteina koji učestvuju u remodelovanju hromatina, kao što su metil-vezujući domen proteini (MBD) koji dalje učestvuju u aktivaciji hromatin-modifikujućih kompleksa na metiliranoj DNA. Metilacija DNA je značajan homeostatski mehanizam u domenu protekcije stabilnosti hromozoma i integriteta genoma, imajući u vidu činjenicu da se značajan udeo metiliranih CpG ostrvaca nalazi u repetitivnim elementima, čime se prevenira transkripcija neželjenih sekvenci [161, 162].

Alteracije u procesu metilacije DNA i ekspresije gena, u čijoj osnovi se, uglavnom, nalazi disregulacija aktivnosti enzima DNMT i mutacije gena koji kodiraju sintezu DNMT, blisko su povezane sa kancerogenezom. Neoplastična transformacija ćelije najčešće je praćena globalnom hipometilacijom DNA, ali i regionalnom hipermetilacijom CpG ostrvaca u regionima promotera pojedinih gena. Globalan prekid metilacije DNA može se javiti u najranijim fazama kancerogeneze, ali nastavlja se i tokom progresije i metastaziranja. Prekid metilacije normalno hipermetiliranih repetitivnih sekvenci doprinosi nestabilnosti genoma i učestvuje u aktivaciji proto-onkogeni u onkogene. Hipermetilacija CpG ostrvaca predstavlja rani događaj u kancerogenezi i najčešće se dešava u promoterskim regijama tumor-supresor gena, što je praćeno smanjenjem genske ekspresije i smanjenjem količine proteinskog produkta [163].

Pored metilacije DNA, modifikacije histona predstavljaju drugi najvažniji epigenetski mehanizam u regulaciji ekspresije gena. Kondenzovani hromatin, u kojem su nukleozomi tesno povezani i čvrsto upakovani, nije lako dostupan transkripcionom aparatu, za razliku od hromatina u kojem nukleozomi nisu tako tesno povezani. Aminoterminalni krajevi molekula histona predstavljaju potencijalna mesta za različite posttranslacione modifikacije (acetilacija, fosforilacija, metilacija, glikozilacija itd), među kojima je acetilacija najviše izučavan mehanizam. Acetilacija ϵ -amino grupa rezidua lizina u histonima, katalizovana enzimima histon acetiltransferaze (HAT), neutrališe pozitivno naelektrisanje lizinskih ostataka u histonima. Ovakva kovalentna modifikacija histona smanjuje jačinu njihove interakcije sa negativno naelektrisanim molekulom DNA i uzrokuje formiranje „otvorene” hromatinske kompozicije, što olakšava pristup transkripcionim faktorima. Uklanjanje acetil grupa sa molekula histona dejstvom enzima histon deacetilaze (HDAC) omogućava snažniju interakciju pozitivno naelektrisanih histona sa negativno naelektrisanom DNA, što stvara uslove za kondenzovaniji hromatin. Tako tesno upakovan hromatin teško je dostupan transkripcionim faktorima i dolazi do transkripcione represije, odnosno tzv. „utišavanja” gena. Hipoacetilacija histona, uzrokovana povećanom ekspresijom HDAC proteina, odlika je leukemija i solidnih tumora. Niži stepen acetilacije histona u promoterskim regionima tumorsupresor gena uzrok je njihovog „utišavanja” i može biti važan činilac u tumorigenezi. Iako su histoni najvažniji supstrati za dejstvo HDAC, ovi enzimi svoja dejstva ispoljavaju i na drugim ćelijskim proteinima. U odnosu na proteinsku strukturu i mehanizam katalize, humane HDAC mogu se podeliti u dve porodice. Prvoj porodici pripadaju tzv. klasične HDAC, koje imaju visoko konzerviran katalitički domen koji zahteva jon cinka za katalitičku aktivnost. Toj porodici pripadaju HDAC klase I, II i IV. Druga HDAC porodica jesu tzv. sirtuini (klasa III HDAC), koji zahtevaju NAD^+ za svoju aktivnost i otporni su na inhibiciju pod dejstvom pan-HDAC inhibitora, kao što je trihostatin A [157].

Velika i značajna oblast epigenetike (slika 1.7) pripada miRNA, koje predstavljaju klasu nekodirajućih, kratkih RNA, dužine 18-24 nukleotida. Najvažnija uloga miRNA ogleda se u posttranskripcionoj kontroli ekspresije gena. Profili aberantne ekspresije različitih miRNA specifični su za svaki tip tumora. Najveći izazov u ovoj oblasti epigenetike predstavlja činjenica da jedna miRNA može da utiče na stotine ciljanih gena i, na taj način, miRNA učestvuju u regulaciji različitih ćelijskih i tkivnih procesa, poput proliferacije, apoptoze, diferencijacije, angiogeneze itd. Ove endogeno stabilne RNA vezuju se za komplementarno mesto u 3' netransliranom regionu ciljane mRNA, formirajući inhibicioni

kompleks, što dovodi do sledstvene inhibicije translacije ciljane mRNA i ekspresije gena. Takođe, miRNA mogu izazvati degradaciju mRNA i posledično „utišavanje” gena. U zavisnosti od činjenice na koje mRNA deluju, miRNA mogu ispoljiti proto-onkogeno i tumorsupresorsko dejstvo [164, 165].



Slika 1.7. Epigenetski mehanizmi – uloga mehanizama metilacije DNA, modifikacije histona i posttranskripcione kontrole genske ekspresije od strane miRNA (*preuzeto i modifikovano iz [166]*).

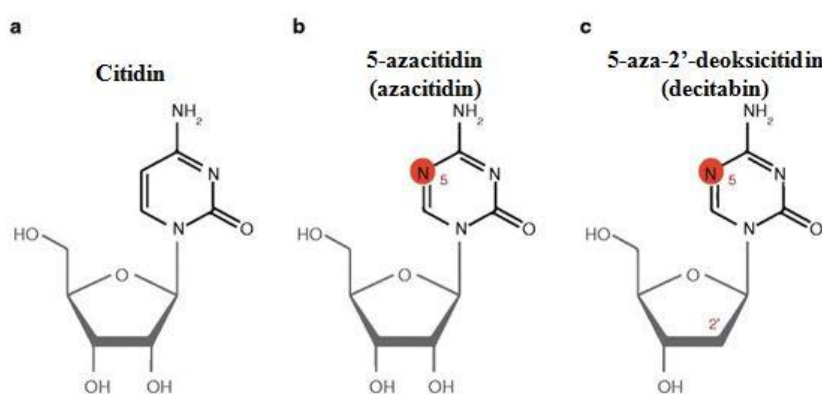
S obzirom na sve navedeno, sasvim je jasna važnost proučavanja potencijalno reverzibilnih epigenetskih promena u malignim ćelijama. Epigenetski biomarkeri su veoma važni u molekularnoj dijagnostici maligniteta, prognozi bolesti i predikciji terapijskog odgovora. Oblast farmakoepigenetike, sa intenzivnim proučavanjem demetilacionih agenasa i inhibitora deacetilacije histona, kao i manipulacijama ekspresije miRNA, zauzima sve značajnije mesto u savremenoj onkologiji i personalizovanoj medicini [167].

1.9.1. Farmakološki značaj 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabina)

Farmakološka inhibicija metilacije DNA nalazi se u fokusu brojnih istraživanja u karcinomu pluća i kolona, u cilju reverzije aberantno izmenjene genske ekspresije i signalnih puteva [168, 169]. Američka Agencija za hranu i lekove (FDA) je, do sada, odobrila dva

inhibitora DNMT za kliničku upotrebu, odnosno za terapiju mijelodisplastičnog sindroma: 5-azacitidin (azacitidin) i 5-aza-2'-deoksicitidin (decitabin) [170].

Azacitidin i decitabin predstavljaju nukleozidne analoge citozina (slika 1.8) u kojima je ugljenik u položaju 5 citozinskog prstena supstituisan atomom azota. Ovi analozi (prolektovi) bivaju preuzeti od strane ćelija uz pomoć različitih nukleozidnih transportera. Tri sukcesivna koraka fosforilacije rezultuju u stvaranju aktivnih metabolita. Naime, iz 5-azacitidina nastaje 5-azacitidin-trifosfat, a 5-aza-2'-deoksicitidin daje 5-aza-2'-deoksicitidin-trifosfat. Enzimi koji katalizuju prvu, ključnu fosforilaciju jesu uridin-citidin kinaza (za azacitidin) i deoksicitidin kinaza (za decitabin). Enzim citidin deaminaza katalizuje inaktivaciju citozinskih analoga i posreduje u rezistenciji ćelija na primenu ovih lekova. Azacitidin i decitabin su specifični za S fazu ćelijskog ciklusa jer se ugrađuju u DNA za vreme replikacije. Dok se decitabin inkorporira isključivo u lanac DNA umesto citozina, samo 10-20% molekula azacitidina pokazuje taj potencijal jer se azacitidin ugrađuje pretežno u RNA. Azacitizin-guanin dinukleotidi bivaju prepoznati od strane DNMT, koje pokreću metilaciju, ali obrazuju i kovalentnu vezu između samog enzima i ugljenikovog atoma u položaju 6 citozinskog prstena. Ova kovalentna veza se u slučaju prisutnog citozina brzo raskida pod uticajem ugljenikovog atoma u položaju 5, ali u slučaju prisutnog azacitizina, koji u položaju 5 sadrži azot, kovalentna veza ostaje stabilna, blokira dejstvo enzima i dovodi do njegove brze razgradnje. Rezultat je odsustvo DNMT-posredovane metilacije i reaktivacija „utišanih” gena uključenih u apoptozu, regulaciju ćelijskog ciklusa, ćelijsku diferencijaciju i druge ćelijske procese [171].



Slika 1.8. Hemijska struktura: a) citidin nukleozida, b) 5-azacitidina i c) 5-aza-2'-deoksicitidina (*preuzeto i modifikovano iz [172]*).

Osim u terapiji mijelodisplastičnog sindroma, kliničke studije ispituju primenu decitabina i u lečenju drugih hematoloških maligniteta, ali i solidnih tumora. Decitabin se primenjuje intravenski i njegov afinitet vezivanja za proteine plazme je manji od 1%. Prodire kroz hematoencefalnu barijeru, tako da koncentracije u cerebrospinalnoj tečnosti iznose više od 50% u odnosu na plazmatske koncentracije, što ukazuje na dobar potencijal ovog leka u lečenju moždanih metastaza različitih tumora. Poluživot ovog leka u plazmi je svega 20 minuta zbog brzog metabolizma i inaktivacije u jetri i slezini, pod dejstvom enzima citidin deaminaze. Urinarna ekskrecija neizmenjenog (nemetabolizovanog) decitabina je manja od 1%. U toku je sinteza oralnih formulacija decitabina, kao i dizajn novih terapijskih strategija u cilju povećanja hemijske stabilnosti decitabina, koje se baziraju na kombinacijama decitabina sa inhibitorima citidin deaminaze, ali i drugim prirodnim i sintetskim komponentama [173].

1.10. Oksidativni stres

Termin „oksidativni stres” prvi je uveo Helmut Sies 1985. godine i označio ga kao poremećenu ravnotežu između stvaranja slobodnih radikala (oksidanasa) i njihovog uklanjanja upotrebom antioksidativnih mehanizama (antioksidanasa). Koncept oksidativnog stresa može da se definiše i kao stanje prevazilaženja antioksidativnog kapaciteta ćelije, u korist povećanja nivoa oksidanasa, sa rezultujućim poremećajem u ćelijskoj redoks signalizaciji i mogućnošću oštećenja bioloških sistema [174].

1.10.1. Reaktivne kiseonične i azotne vrste

Slobodni radikali predstavljaju hemijske vrste koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj spoljašnjoj orbitali. Prisutni nespareni elektroni uzrok su visoke i neselektivne reaktivnosti slobodnih radikala. Reakcije slobodnih radikala su najčešće lančanog tipa. Najznačajniju klasu slobodnih radikala u živim sistemima predstavljaju radikali dobijeni iz kiseonika, odnosno reaktivne kiseonične vrste (*reactive oxygen species*, ROS). Najvažniji predstavnici iz grupe ROS jesu superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksi radikal (HO^{\bullet}), hidroperoksi (HO_2^{\bullet}), alkoksi (RO^{\bullet}) i peroksi (RO_2^{\bullet}) radikali, ali i neradikalni derivati kiseonika, poput singlet kiseonika (1O_2), vodonik peroksida (H_2O_2), organskih hidroperoksida ($ROOH$) i hipohloritne kiseline ($HOCl$). Značajne su i reaktivne azotne vrste (*reactive nitrogen species*, RNS), od kojih je biološki najvažniji azot oksid radikal (NO^{\bullet}) [175, 176].

ROS i RNS se stvaraju u niskim koncentracijama tokom normalnog aerobnog metabolizma i obavljaju važne fiziološke funkcije. Učestvuju u reakcijama stvaranja energije, u sintezi hormona i prostaglandina, u regulaciji intracelularne signalizacije, ćelijskog ciklusa i ćelijske smrti, u održavanju vaskularnog tonusa i odbrani od uzročnika infektivnih oboljenja. Visoke koncentracije ovih reaktivnih vrsta ispoljavaju štetna dejstva jer ROS i RNS reaguju sa biomolekulima. Izazivaju peroksidaciju lipida citoplazmatskih membrana, membrana jedra i drugih organela, ali i lipoproteina plazme. Zbog ovog procesa, membrane postaju porozne, gube akcioni potencijal, menja se funkcija jonskih kanala, inaktiviraju se enzimi i membranski-vezani receptori, što rezultuje gubitkom funkcija membrana, bubrenjem ćelije i apoptozom ili nekrozom. ROS i RNS mogu oksidirati aminokiselinske ostatke u proteinima, stvarajući Schiff-ove baze i disulfidne mostove, a rezultat oksidacijskih promena proteina jeste njihova fragmentacija, kružno povezivanje, agregacija i sklonost ka proteolitičkoj razgradnji. ROS i RNS reaguju sa purinskim i pirimidinskim bazama u DNA, što može rezultirati mutagenozom i kancerogenozom [177].

Izvori stvaranja ROS i RNS mogu biti egzogeni i endogeni. Egzogeni izvori jesu jonizujuće zračenje, koje uzrokuje radiolizu molekula vode, joni prelaznih metala, duvanski dim i različiti ksenobiotici. Glavni izvor endogene produkcije ROS jeste elektron-transportni lanac unutrašnje membrane mitohondrija (na nivou kompleksa I i III), koji učestvuje u oksidativnoj fosforilaciji, ali u kojem se 1-2% molekula kiseonika nepotpuno redukuje, produkujući ROS. U važne intracelularne izvore spadaju citohromi P450 i β -oksidacija u peroksizomima. U procesu fagocitoze, u neutrofilnim i eozinofilnim granulocitima, monocitima i makrofagima, aktivacijom NADPH oksidaze (NOX) i mijeloperoksidaze stvaraju se velike količine ROS sa baktericidnim delovanjem (*oxidative burst*) [178, 179].

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) se često označava kao „primarna” ROS jer nastaje jednoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, a, zatim, može ući u interakciju sa drugim molekulima i učestvovati u generisanju „sekundarnih” ROS. Može nastati i jednoelektronskom oksidacijom vodonik peroksida.

Vodonik peroksid (H_2O_2) najčešće nastaje dismutacijom superoksid anjon radikala, neenzimski ili dejstvom enzima superoksid dismutaze (SOD): $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Može nastati i dvoelektronskom redukcijom molekula kiseonika u peroksizomima, gde se i stvara najveća količina vodonik peroksida. Vodonik peroksid je najstabilniji i najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Toksičan je u velikim koncentracijama, a glavna opasnost pri njegovom nakupljanju jeste stvaranje visoko reaktivnog hidroksi radikala (HO^{\cdot}),

u prisustvu jona gvožđa ili bakra. Vrlo je važan, jer kao lipofilan prolazi kroz biološke membrane i izaziva lipidnu peroksidaciju. Takođe, katalizom mijeloperoksidaze, učestvuje u stvaranju hipohloritne kiseline snažnog baktericidnog dejstva [180].

Hidroksi radikal (HO^\bullet) je najreaktivnija ROS. Može nastati homolitičkom razgradnjom vodonik peroksida pod dejstvom radijacije: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{HO}^\bullet$. U Fentonovoj reakciji, hidroksi radikal nastaje putem reakcije jona metala, prvenstveno gvožđa ili bakra, sa vodonik peroksidom: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$. Takođe, u Haber-Weiss-ovoj reakciji, u prisustvu malih količina gvožđa ili bakra, superoksid anjon radikal reaguje sa vodonik peroksidom, gradeći hidroksi radikal: $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$. Hidroksi radikal pokazuje izrazitu reaktivnost prema ćelijskim biomolekulima. Započinje lipidnu peroksidaciju oduzimanjem jona vodonika polinezasićenim lipidima, što rezultuje stvaranjem lipidnog radikala L^\bullet . Dodatkom kiseonika, stvara se peroksi radikal LO_2^\bullet i lipidni hidroperoksid LOOH. Preuređenjem jednog elektrona, dolazi do razgradnje lipida i stvaranja vrlo reaktivnih proizvoda, kao što su malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), koji oštećuju ćelijske makromolekule [181, 182].

Azot oksid radikal (NO^\bullet) je najvažnija RNS. Nastaje iz L-arginina, u reakciji katalizovanoj azot oksid sintazom (NOS). Ovi enzimi mogu biti konstitutivni, kalcijum-zavisni, odgovorni za održavanje bazalnog nivoa NO^\bullet u endotelnim (eNOS) i nervnim ćelijama (nNOS), i inducibilni (iNOS), kalcijum-nezavisni, čiju ekspresiju u fagocitima indukuju različiti citokini. NO^\bullet izaziva vazodilataciju i učestvuje u regulaciji krvnog pritiska, i zapravo je prvi slobodni radikal za koji je utvrđeno da ima značajnu fiziološku ulogu. Uprkos prisutnom nesparenom elektronu, ne reaguje odmah sa biomolekulima. Relativno lagano reaguje sa drugim radikalima stvarajući manje reaktivne molekule. No, u slučaju paralelnog stvaranja većih količina superoksid anjon radikala i azot oksid radikala, međusobno reaguju, stvarajući vrlo reaktivan peroksinitrit (OONO^\bullet), koji predstavlja posebno značajnu česticu u izazivanju tzv. nitrozativnog stresa, koji je praćen nitrozilacijom proteina, lipidnom peroksidacijom i fragmentacijom DNA [183].

ROS i RNS imaju ulogu intracelularnih i ekstracelularnih signalnih molekula, sa svojstvima aktivacije kompleksnih ćelijskih signalnih puteva, čime utiču i na ekspresiju gena zaduženih za preživljavanje ćelije, proliferaciju, diferencijaciju, migraciju i apoptozu. Posebno je proučavana ROS-zavisna aktivacija MAPK signalnih puteva, kao što su ERK, p38 kinaza i JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Na ćelijskoj liniji humanih keratinocita utvrđeno je da je akutno mehaničko oštećenje ćelija izazvalo povećanu produkciju ROS putem NOX

aktivacije. ROS su pokrenule aktivaciju ERK fosforilacije, što je izazvalo povećanje ekspresije COX-2 mRNA i proizvodnju PGE2 [184].

Poseban značaj slobodni radikali imaju u procesu inflamacije. Aktivacijom PLC i fosforilacijom IP3-senzitivnih kalcijumskih kanala, ROS izazivaju influks kalcijumovih jona u ćeliju. Takođe, aktiviraju MAPK i NF- κ B signalne kaskade koje aktiviraju transkripcione faktore AP-1 i CREB protein, vodeći ka povećanoj ekspresiji PLA2 i COX-2, što dovodi do povećanog oslobađanja arahidonske kiseline iz ćelijskih membrana i sinteze PGE2 i TxA2. Utvrđeno je da peroksinitrit može da inaktivira PGIS i produkciju prostaciklina [185]. U akutnim i hroničnim inflamatornim bolestima, kao i u malignim tumorima, brojni citokini, poput TNF- α , IL-6 i TGF- β , potenciraju proizvodnju ROS i RNS, koji doprinose progresiji inflamatornih i malignih bolesti [186]. U stanju hronične inflamacije ROS i RNS se proizvode ne samo od strane inflamatornih ćelija nego i od strane epitelnih ćelija. Posebno je značajna ireverzibilna karbonilacija gvožđe-vezujućih proteina, naročito karbonilacija transferina, koji postaju nefunkcionalni, oslobađaju gvožđe koje, učestvovanjem u pomenutoj Fentonovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji, doprinosi daljem povećanju produkcije ROS i RNS [187].

Kao što je navedeno, produkti lipidne peroksidacije, poput aldehida HNE, predstavljaju značajne signalne molekule. HNE aktivira NF- κ B, koji, potom, vezujući se za promotor *PTGS2* gena, indukuje COX-2 ekspresiju. COX-2 je detektovan u ateromatoznim lezijama, tačnije u epitopima makrofaga, koji su bili izmenjeni lipidnom peroksidacijom. Lipidna peroksidacija menja strukturu lipida, ali i apolipoproteina B u česticama LDL, koje postaju oksidativno izmenjene i denaturisane. Tako izmenjene LDL čestice predstavljaju endogene ligande za CD36 *scavenger* receptor makrofaga, koji ih preuzimaju, pri čemu makrofagi postaju penaste ćelije, sa značajnom ulogom u procesu ateroskleroze, i generalno, inflamacije. CD36 receptor aktivira p38 MAPK signalni put, koji učestvuje u povećanju COX-2 ekspresije. HNE izaziva i oksidativnu modifikaciju receptora EGFR u epitelnim ćelijama, izazivajući kovalentne modifikacije u njegovoj proteinskoj strukturi, sa posledičnim povećanjem katalitičke aktivnosti ovog receptora i autofosforilacije njegovih tirozinskih rezidua, što aktivira EGFR-zavisne signalne puteve i doprinosi karcinogenezi [188].

ROS i RNS izazivaju prekinde DNA lanaca i menjaju DNA strukturu u smislu izmene purinskih i pirimidinskih baza, kao i deoksiriboze. Najčešća posledica izmene DNA je formiranje 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina (8-OHdG), koji ima mutageno dejstvo izazivajući guanin-timin transverziju. Veoma je značajan odnos slobodnih radikala i tumor-supresora

p53, koji u svojoj strukturi sadrži klastere cisteinskih rezidua koje mogu biti oksidovane uticajem ROS i RNS, čime se smanjuje tumor-supresorska moć ovog proteina. Sa druge strane, p53 je značajan redoks protein koji ima uticaj na produkciju ROS i na odluku o daljoj sudbini ćelije. U slučaju sniženog intenziteta stvaranja ROS, p53 aktivira transkripciju antioksidativnih gena, prvenstveno antioksidativnih enzima, smanjujući oksidativni stres, odnosno održavajući redoks ravnotežu. Kada dođe do intenzivne ROS produkcije u ćeliji, JNK-posredovana aktivacija p53 smanjuje transkripciju antioksidativnog transkripcionog faktora NRF2 (*nuclear factor E2-related factor*), aktivira prooksidativne gene, kao što je proapoptotski gen *PUMA*, vodeći ćeliju ka apoptozi [189].

Osim toga, oksidativne DNA lezije menjaju epigenetski obrazac metilacije. Naime, oksidativni stres i masovno formiranje 8-OHdG u CpG ostrvcima širom genoma otežava pristup enzimima DNMT, sa posledičnom pojavom globalne hipometilacije, genomske nestabilnosti i transkripcione aktivacije brojnih proto-onkogeno [190].

1.10.2. Antioksidativna zaštita organizma

Akumulacija oksidativnih oštećenja i oksidativni stres u ćelijama doprinose razvoju brojnih patoloških stanja kao što su ateroskleroza, hipertenzija, HOBP, idiopatska plućna fibroza, neurodegenerativne bolesti, dijabetes i kancer. Zbog potencijalne mogućnosti stvaranja većih koncentracija slobodnih radikala, organizam je razvio brojne mehanizme antioksidativne odbrane, u cilju održavanja ravnoteže između stvaranja ROS i RNS i njihove eliminacije. Ti mehanizmi uključuju uklanjanje ROS i RNS pomoću citoprotektivnih enzima i neenzimskih antioksidanasa u ćelijama i telesnim tečnostima, kako bi se koncentracija ROS i RNS zadržala na nivou na kom one pokazuju fiziološke uloge. Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza i glutation-S-transferaza. Grupi neenzimskih antioksidanasa pripadaju glutation, vitamini C i E, selen i drugi. Vezivanjem jona gvožđa i bakra, hema i hemoglobina u komplekse sa proteinima, poput transferina, feritina, ceruloplazmina, albumina, hemopeksina i haptoglobina, zatim kompartmentalizacijom enzima, koji katalizuju stvaranje slobodnih radikala, u ćelijske organele, kao što su mitohondrije, peroksizomi i lizozomi, sprečava se oslobađanje ROS i RNS. Takođe, organizam poseduje brojne mehanizme popravke nastalih oštećenja i uklanjanja oštećenih molekula i ćelija, kako njihova akumulacija ne bi izazvala patološka stanja. Velika pažnja istraživanja posvećena je ispitivanju uloge NRF2 transkripcionog faktora, koji se aktivira u prisustvu ROS i RNS, i vezuje za ARE promoterske

regione gena antioksidativnih enzima (*antioxidant response element*). Aktivacija NRF2-ARE ima centralnu ulogu u povećanju ekspresije antioksidativnih enzima [191].

Superoksid dismutaza (SOD) katalizuje reakciju dismutacije, u kojoj se dva superoksid anjon radikala spajaju, pri čemu se jedan oksiduje, a drugi redukuje, gradeći vodonik peroksid: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Ova reakcija se označava kao primarna odbrana od oksidativnog stresa jer je superoksid anjon radikal snažan inicijator lančanih reakcija. U humanim ćelijama postoje tri SOD izoenzima: bakar/cink-zavisan (Cu/Zn-SOD ili SOD-1), mangan-zavisan (Mn-SOD ili SOD-2) i ekstracelularni (EC-SOD ili SOD-3). SOD-1 je lociran u citoplazmi, jedru i mitohondrijalnoj membrani. Homodimer je, čije obe subjediniice sadrže po jedan jon bakra i cinka. Bakar učestvuje u katalitičkoj aktivnosti ovog enzima, a cink stabilizuje njegovu konformaciju. SOD-2 se nalazi u matriksu mitohondrija i homotetramer je, koji u svakoj subjediniici sadrži jon mangana, zadužen za katalitičku aktivnost. SOD-3 je sekretorni glikoprotein, homotetramer, koji sadrži bakar i cink u aktivnom centru [192].

Katalaza (CAT) je enzim koji katalizuje razgradnju vodonik peroksida do vode i molekuskog kiseonika: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Po strukturi je homotetramer, čija svaka subjediniica sadrži hem prostetičnu grupu, tačnije feri protoporfirin IX. Lociran je primarno u peroksizomima unutar ćelije, u kojima se i stvaraju veće količine vodonik peroksida [193].

Glutation peroksidaza (GPx) je glavni enzim koji razgrađuje vodonik peroksid. S obzirom na činjenicu da pokazuje nižu K_m vrednost, odnosno veći afinitet prema vodonik peroksidu u poređenju sa katalazom, GPx ima ključnu ulogu u razgradnji vodonik peroksida. Uklanja vodonik peroksid u prisustvu redukovanoj glutationa, pri čemu nastaju voda i oksidovani, disulfidni oblik glutationa: $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + G-S-S-G$. Takođe, katalizuje redukciju organskih peroksida (najčešće lipidnih peroksida, LOOH) do vode i alkohola: $LOOH + 2GSH \rightarrow H_2O + LOH + G-S-S-G$. Kod čoveka je, do sada, opisano postojanje osam različitih GPx izoenzima, koji se intenzivno proučavaju. Pokazuju različitu proteinsku strukturu i ćelijsku lokalizaciju. Poznato je da GPx-1-4 i GPx-6 u svom aktivnom centru sadrže selen, u vidu rezidue selenocisteina. GPx-1 je najviše rasprostranjen GPx izoenzim, a nalazi se u citoplazmi gotovo svih ćelija. GPx-2 je prvobitno smatran isključivo gastrointestinalnim izoenzimom, ali je detektovan i u endotelnim ćelijama. GPx-3 je ekstracelularni glikoprotein, prisutan u krvnoj plazmi. GPx-4, nazvan i fosfolipidna hidroperoksidaza, nalazi se u citoplazmi, jedru i mitohondrijama različitih ćelija. GPx-5 pokazuje značajnu ulogu u lumenu epididimisa, dok se uloga GPx-6 vezuje za nazalnu

mukozu i različite regije centralnog nervnog sistema. Za GPx-7 je poznato da je lociran u lumenu endoplazmatskog retikuluma, a GPx-8 je opisan kao transmembranski protein [194].

Glutation reduktaza (glutation disulfid reduktaza, GR) predstavlja flavoprotein koji katalizuje regeneraciju redukovanog glutaciona, tačnije NADPH-zavisnu redukciju oksidovanog glutaciona, čime ćelijama osigurava dostupnost glutaciona u njegovom redukovanom obliku: $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{G-S-S-G} \rightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{GSH}$. GR je homodimer, čiji monomeri sadrže tri domena: flavin adenin dinukleotid (FAD)-vezujući domen, NADPH-vezujući domen i domen koji učestvuje u dimerizaciji. Nalazi se u citoplazmi, mitohondrijama i jedru eukariotskih ćelija [195].

Glutation-S-transferaza (GST) katalizuje reakciju konjugacije sulfhidrilnih grupa redukovanog glutaciona sa širokim spektrom egzogenih i endogenih supstrata, uključujući razne hemijske karcinogene, lekove i produkte oksidativnog stresa. Obrazovanjem konjugata nastaju hidrofilni metaboliti koji se izlučuju iz organizma. Opisano je sedam klasa citosolnih GST (α , μ , π , σ , θ , ξ i ω) [196].

Glutation (GSH) predstavlja tripeptid γ -L-glutamil-L-cisteinilglicin, koji se sintetiše u ćelijama i pokazuje centralnu ulogu u antioksidativnoj odbrani. Osim što je kofaktor nekoliko antioksidativnih enzima, glutacion i direktno, neenzimski, reaguje sa ROS, RNS i različitim ksenobioticima, detoksikujući ih. Učestvuje i u regeneraciji drugih antioksidanasa, poput vitamina C i E. Ključna uloga u glutacion-posredovanoj redukciji i konjugaciji pripada sulfhidrilnoj grupi njegovih cisteinskih rezidua. Reagujući sa oksidansima, GSH prelazi u svoj oksidovani oblik G-S-S-G, koji je potencijalno toksičan za ćelije, ali javlja se samo prolazno u citoplazmi i, zahvaljujući enzimu glutacion reduktaza, brzo se prevodi u redukovani oblik GSH. Glutacion je u ćelijama prisutan u visokoj koncentraciji, čak i do 10 mM, i lociran je u različitim ćelijskim kompartmentima, gde, pored uloge u antioksidativnoj zaštiti, pokazuje značaj i u procesima ćelijske deobe, proliferacije, apoptoze i nekroze. GSH se sintetiše *de novo* intracelularno iz aminokiselina L-glutamat, L-cistein i glicin, u ATP-zavisnim, sekvencijalnim reakcijama. U prvoj, ključnoj reakciji reaguju glutamat i cistein, uz katalizu enzima glutamat cistein ligaza, odnosno γ -glutamil-cistein sintazom (γ -GCS), gradeći dipeptid γ -glutamilcistein. U drugom koraku, enzim glutacion sintaza povezuje nastali dipeptid sa glicinom, formirajući GSH. Tri osnovna mehanizma koja regulišu sintezu glutaciona jesu aktivnost enzima γ -GCS, dostupnost supstrata, naročito cisteina, i inhibicija γ -GCS pomoću GSH, negativnom povratnom spregom. Za razliku od sinteze, razgradnja se obavlja ekstracelularno, gde prvo dolazi do hidrolize γ -glutamil grupe pomoću γ -glutamil

transpeptidaze, a, zatim, i do razdvajanja ostatka na glicin i cistein uz dipeptidazu. Hepatociti su glavni izvori ekstracelularnog GSH, ali degradacija se dešava brzo i ireverzibilno, stoga je ekstracelularna koncentracija GSH svega nekoliko μM [197-199].

Na osnovu navedenog, sasvim je evidentna kompleksna uloga ROS, RNS i antioksidativnih mehanizama u patogenezi različitih patoloških stanja, a posebno karcinoma. Velika pažnja naučnog sveta posvećena je ispitivanju terapijskih strategija usmerenih ka modifikaciji redoks događaja, naročito u inflamatornim i malignim bolestima [200].

1.11. Celekoksib, selektivni COX-2 inhibitor

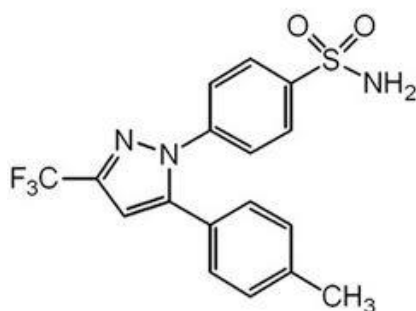
Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) predstavljaju veliku i heterogenu grupu lekova koji inhibiraju COX enzime, čime deluju antiinflamatorno, analgetski i antipiretički, ublažavajući crvenilo, otok i bol na mestu zapaljenja. Klasični, neselektivni NSAIL blokiraju oba COX izoenzima (COX-1 i COX-2). Prema hemijskoj strukturi, dele se na derivate salicilne kiseline (acetilsalicilna kiselina (aspirin), sulfasalazin), aril i heteroaril derivate propanske kiseline (naproksen, ibuprofen), indol i inden derivate sirćetne kiseline (sulindak, indometacin), antranilate (diklofenak) i analoge enolne kiseline (meloksikam, piroksikam). Posebnoj kategoriji NSAIL pripada paracetamol, za koji se smatra da inhibira COX-3, pokazujući analgetsko i antipiretičko, ali ne i antiinflamatorno dejstvo. Aspirin je kovalentni, ireverzibilni COX inhibitor koji vrši acetilaciju serina u položaju 529 COX-1 izoenzima pretežno, čime sprečava pristup supstrata (arahidonske kiseline) aktivnom centru. Drugi NSAIL su nekovalentni, reverzibilni COX inhibitori koji na kompetitivan način sprečavaju ulazak supstrata u supstrat-vezujući kanal na aktivnom centru enzima. Neselektivni NSAIL izazivaju neželjene gastrointestinalne reakcije u vidu krvarenja i perforacije ulkusa, što se objašnjava činjenicom da ovi lekovi terapijski efekat ispoljavaju blokadom COX-2, a da su neželjene reakcije posledica inhibicije COX-1 izoenzima. Naime, dugo se smatralo da je COX-2 izoenzim odgovoran isključivo za sintezu prostaglandina u inflamatornoj reakciji, a da je COX-1 izoenzim bitan za sintezu prostanoida u želucu, bubrezima i trombocitima, u cilju održavanja njihove fiziološke funkcije. Ovakvi neželjeni događaji ispoljili su potrebu za razvojem selektivnih COX-2 inhibitora tzv. koksiba. Koksibi imaju manji rizik od neželjenih gastrointestinalnih događaja jer pokazuju veoma slabu COX-1 inhibitornu aktivnost u epitelnim ćelijama gastrointestinalnog trakta. Vrlo brzo su lekovi iz ove grupe (valdekoksisb i rofekoksib) povučeni sa tržišta zbog neprihvatljivo čestih i ozbiljnih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih neželjenih događaja. Kontradiktorni su podaci o činjenici da i selektivni i

neselektivni NSAIL povećavaju kardiovaskularni rizik, bez još uvek utvrđene jasne razlike među predstavnicima. Svi NSAIL mogu da inhibiraju COX-1 i COX-2 *in vitro* na koncentracijski-zavisan način. Čak i visoko selektivni COX-2 inhibitori pri visokim koncentracijama pokazuju svojstvo veoma slabe COX-1 inhibicije. Uz izraženu interindividualnu farmakokinetiku varijabilnost, smatra se da je COX-2 selektivna inhibicija više relativan nego apsolutan pojam [201].

Iako je COX-2 prvenstveno inducibilan COX izoenzim, čiju ekspresiju povećavaju faktori rasta, proinflamatorni citokini i tumor-promoteri, on je i konstitutivno eksprimiran u tkivima kao što su vaskularni zid, srce i bubrezi. Selektivna inhibicija COX-2 i sinteze njegovih prostanoida, prvenstveno PGI₂ i PGE₂, u ovim tkivima razjašnjava mehanizam neželjenih događaja upotrebe koksiba. Inhibicija COX-2 smanjuje sintezu PGI₂ u vaskularnim endotelnim ćelijama što je dokazano *in vivo*, ali i u kliničkim studijama preko detekcije smanjene koncentracije urinarnog PGI₂ metabolita 2,3-dinor-6-keto-PGF_{1α}. PGI₂ je značajan vazodilatator i najpotentniji endogeni TxA₂ antagonista i inhibitor trombocita, koji povećava sintezu trombomodulina i smanjuje ekspresiju tkivnog faktora, zbog čega ima važnu ulogu u kontroli krvnog pritiska, održavanju bubrežne hemodinamike i endotelnoj tromboresistenciji. Studije su pokazale da je najveća ekspresija COX-1 prisutna u trombocitima i da je trombocitni COX-1 glavni izvor biosinteze TxA₂. Dakle, pretpostavlja se da je razvoj infarkta miokarda i cerebrovaskularnog inzulta upravo posledica selektivnosti i inhibicije vazodilatatornog i antiagregacionog PGI₂, čiju sintezu u endotelnim ćelijama prevashodno kontroliše COX-2, dok izostaje inhibicija sinteze proagregacionog i vazokonstriktornog TxA₂, čija je sinteza pod kontrolom COX-1 izoenzima u trombocitima. I upravo je dominantan TxA₂ odgovoran za neželjena dejstva. Koksibi inhibiraju COX-2 i proizvodnju PGI₂ u vaskularnom endotelu i ćelijama glatkih mišića krvnih sudova, čime uklanjaju značajan kardioprotektivni činilac. U stanjima hipertenzije i poremećene strukture vaskularnog endotela, na mestima rupture aterosklerotskog plaka u koronarnim i cerebralnim arterijama, trombociti su veoma aktivni i sintetišu veće količine TxA₂. Kompenzatorno, vaskularni endotel proizvodi i veće količine PGI₂. U tako osetljivoj i predisponiranoj grupi pacijenata primena koksiba upućuje na veći stepen agregacije i aktivacije trombocita, što stvara uslove za aterotrombozu, vazokonstrikciju i pogoršanje hipertenzije, što nosi rizik od razvoja kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih neželjenih događaja. Vaskularna COX-2 inhibicija je uzrok i smanjene ekspresije eNOS i sledstvene sinteze i oslobađanja vazodilatatornog azot oksida. Takođe, delecija *PTGS2* gena je *in vivo* povisila nivo

endogenih NOS inhibitora, kao što su asimetrični dimetilarginin (ADMA) i N-monometil-L-arginin (L-NMMA). Selektivna blokada COX-2 i smanjena sinteza PGE2 i PGI2 u kardiomiocitima može prouzrokovati aritmije i poremećen srčani rad, a u bubrezima smanjen protok krvi i brzinu glomerularne filtracije, uz smanjenu ekskreciju vode i natrijuma [202, 203].

Celekoksib, 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzensulfonamid (slika 1.9), jeste pripadnik grupe koksiba, selektivnih COX-2 inhibitora, koji sadrži diaril-supstituisani pirazol, a primenjuje se u terapiji reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, ankilozirajućeg spondilitisa i akutnog bola. Imajući u vidu iznete činjenice o značaju inflamacije, COX-2 izoenzima i prostanoida u razvoju i progresiji malignih tumora, sasvim je jasna potencijalna antitumorska uloga celekoksiba, pored već dobro ustanovljenog njegovog antiinflamatornog, analgetskog i antipiretičkog dejstva. Iako antitumorska dejstva celekoksiba još uvek nisu dobro definisana, preklinička i klinička ispitivanja predstavila su COX-2-zavisne antineoplastične mehanizme ovog koksiba u smislu sposobnosti indukcije apoptoze, inhibicije ćelijske proliferacije, imunoregulacije, antiangiogenih efekata i uticaja na tumorsku mikrosredinu. Čak i COX-2-nezavisni mehanizmi celekoksiba doprinose njegovom antitumorskom dejstvu. Ovakvi rezultati pokrenuli su razmišljanja o velikom potencijalu celekoksiba u hemoprevenciji i terapiji karcinoma. Takođe, celekoksib je pokazao značaj i u adjuvantnoj terapiji, odnosno povećanju osetljivosti malignih ćelija prema citotoksičnim lekovima i jonizujućem zračenju [204-206].



Slika 1.9. Hemijska struktura celekoksiba (preuzeto i modifikovano iz [207]).

Jedna od najbolje proučenih proto-onkogenih uloga COX-2 jeste u stvaranju gastrointestinalnih adenoma (polipa) i u njihovoj malignoj transformaciji. Povezanost izoenzima COX-2, APC gena i WNT/ β -katenin signalnog puta je kompleksna. β -katenin ima ulogu transkripcionog faktora koji izaziva transkripciju gena zaduženih za ćelijski rast i

deobu, kao što je proto-onkogen *MYC*, ali povećava ekspresiju i *PTGS2* gena. *APC* prevenira nekontrolisan ćelijski rast učestvujući u degradaciji β -katenina. U slučaju mutacija *APC* gena, kao što se to dešava u sindromu FAP, tumor-supresorska uloga *APC* je izgubljena. Navedena povezanost *APC* gena i COX-2 je osnova primene celekoksiba u prevenciji kolorektalnih polipa kod pacijenata sa FAP sindromom, što je i odobreno od strane FDA [208].

Iako na osnovu aminokiselinske sekvence COX-1 i COX-2 izoenzima postoji strukturna identičnost od 60%, njihovi aktivni centri se razlikuju. Aktivni centri oba izoenzima sadrže tzv. dodatno vezno mesto (bočni džep) koje je mnogo pristupačnije u COX-2 izoenzimu. Aktivan centar COX-2 je fleksibilniji i prostraniji za 25% u odnosu na aktivan centar COX-1. Koksibi, zbog veličine svoje molekule, odnosno zbog prisustva diaril heterociklične strukture koja nosi SO_2CH_3 i SO_2NH_2 grupe, ne mogu da se vežu za COX-1 aktivan centar, što im, praktično, omogućava COX-2 selektivnost. Strukturne analize pokazale su da aktivan centar COX-2 sadrži aminokiselinu Val523 koja ima manji bočni lanac od Ile523 u COX-1. Ova razlika u strukturi dozvoljava konformacione promene Tyr355 u molekulu COX-2, koje otvaraju hidrofobni prostor bočnog džepa i omogućuju pristup selektivnim COX-2 inhibitorima. Značajna razlika jeste i prisustvo Val434 u COX-2 aktivnom centru, koji menja konformaciju Phe518 i, takođe, otvara prolaz ka aktivnom centru, što glomazniji Ile434 u COX-1 ne dozvoljava. Uočena je još jedna strukturna razlika, a to je prisustvo Arg513 u COX-2, za razliku od His513 u COX-1. Ove razlike u strukturama omogućile su sintezu selektivnih COX-2 inhibitora, koji mogu da se vežu za bočni džep i da interreaguju sa specifičnim aminokiselinskim reziduama u COX-2 aktivnom centru. Celekoksib formira čvrstu nekovalentnu vezu sa COX-2 aktivnim centrom tako što njegova sulfonamidna grupa reaguje sa bočnim džepom i obrazuje elektrostatičke interakcije sa Asn192, Leu352 i Arg513. Drugi deo molekula celekoksiba formira Van der Waalsove veze sa aktivnim centrom, a atom azota iz pirazolskog prstena pokazuje elektrostatičke interakcije sa Arg120. Takođe, sulfonamidna grupa formira vodonične veze sa Leu338, Arg499, Ser339, Val335, Arg106 i His75 u COX-2 aktivnom centru [209-211].

Farmakokinetska ispitivanja ukazuju da se posle oralne administracije celekoksib brzo apsorbuje i nakon 3 časa njegova koncentracija u serumu doseže maksimalnu vrednost. Pokazuje slabiju rastvorljivost u vodi i u plazmi je više od 97% celekoksiba vezano za proteine, pretežno za albumin. Metaboliše se u jetri, sa poluvremenom eliminacije 11-15 časova, a manje od 3% leka izlučuje se nepromenjeno. Primarna reakcija metabolizma celekoksiba jeste metil hidrosilacija katalizovana prvenstveno citohromima CYP2C9, ali i

CYP3A4, čime nastaje hidroksicelekoksib. Ovaj metabolit može dalje da se oksidiše citosolnim alkohol dehidrogenazama ADH1 i ADH2, gradeći karboksicelekoksib. On se, potom, konjuguje sa glukuronskom kiselinom, uz katalizu enzimom uridin difosfat (UDP)-glukuronozil transferaza, obrazujući 1-O-glukuronid. Svi pomenuti metaboliti su farmakološki inaktivni i izlučuju se putem bubrega i intestinalnog trakta. Polimorfizmi CYP2C9 imaju direktan uticaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku celekoksiba. Iako nije supstrat CYP2D6, celekoksib inhibira ovaj enzim, što treba imati u vidu kod razmatranja interakcija sa drugim lekovima. Neželjena dejstva celekoksiba zavise od primenjene doze, dužine trajanja terapije i individualnog kardiovaskularnog rizika svakog pacijenta. Interindividualne razlike u metabolizmu celekoksiba, visina krvnog pritiska, stanje endotela krvnih sudova, primena drugih lekova, koji utiču na metabolizam celekoksiba, određuju mogućnost razvijanja kardiovaskularnog i cerebrovaskularnog rizika. Celekoksib je jedini koksib koji je na tržištu odobren od strane FDA. U poređenju sa ostalim koksibima, celekoksib ipak inhibira u značajnijem obimu COX-1 i sintezu TxA₂, zbog čega pokazuje i manji procenat aterotrombotičkih i vazokonstriktornih neželjenih reakcija, pogotovo ako se koristi u dozama nižim od 400 mg dnevno. Takođe, opisani su i protektivni COX-2-nezavisni mehanizmi koji obezbeđuju bezbedniji profil primene celekoksiba, kao što je uticaj na smanjenje ekscitabilnosti i kontraktilnosti glatke muskulature krvnih sudova, odnosno smanjenje vaskularnog tonusa, posredstvom blokiranja L-tipa kalcijumskih kanala. Postavljaju se pitanja da li su neželjena dejstva povučениh COX-2 inhibitora isključivo povezana sa COX-2 inhibicijom ili i neki drugi, COX-2-nezavisni činioci doprinose endotelnoj disfunkciji, kao što je, recimo, intenzivirana lipidna peroksidacija i poremećaj redoks stanja u organizmu, koji nastaju u toku primene rofekoksiba [212, 213].

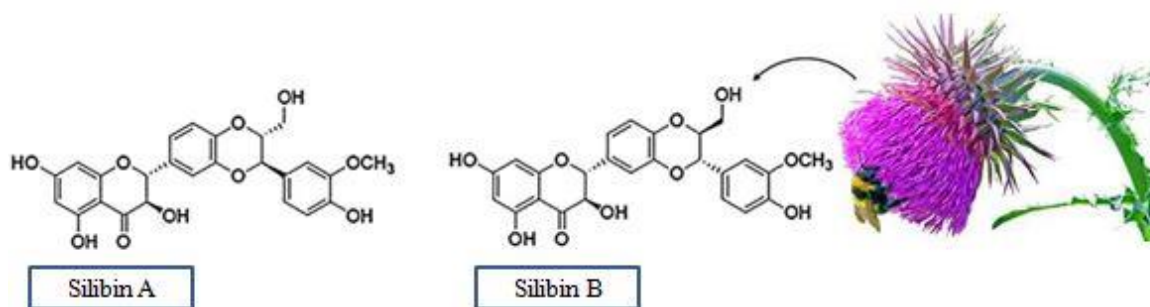
Ove činjenice upućuju na značaj ispitivanja molekularnih mehanizama dejstva celekoksiba, kao i načina smanjenja potencijalnih neželjenih događaja, u cilju primene ovog multifunkcionalnog leka u prevenciji i terapiji malignih oboljenja. Ispituju se i nove farmaceutsko-tehnološke formulacije celekoksiba kojima se smanjuju njegova sistemska neželjena dejstva [214].

1.12. Silibinin, flavonolignan izolovan iz biljke *Silybum marianum*

Flavonoidi predstavljaju polifenolne komponente koje se sintetišu u biljkama kao bioaktivni sekundarni metaboliti. Odgovorni su za boju i ukus biljaka, ali imaju i protektivna antioksidativna dejstva, štiteći biljke od nepoželjnih uslova okoline. Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja, kao i epidemiološke studije pokazali su značajna antiinflamatorna, antimikrobna, imunomodulatorna i antikancerska svojstva flavonoida, čime su ova jedinjenja stekla biomedicinski značaj u tretmanu različitih akutnih i hroničnih stanja. Posebno je važna njihova dualna priroda u redoks homeostazi. Utvrđeno je da u normalnim ćelijama deluju kao antioksidansi, a u malignim ćelijama ispoljavaju prooksidativne efekte, pokazujući proapoptotska, antiproliferativna i antiinvazivna dejstva. Svi flavonoidi imaju u osnovi strukturu flavana, odnosno sastoje se iz dva aromatična prstena povezana heterocikličnim prstenom pirana. Na osnovu hemijske strukture, stepena oksidacije i prisutnih bočnih grupa, flavonoidi su klasifikovani u šest glavnih klasa: izoflavonoidi, flavanoni, flavanoli, flavonoli, flavoni i antocijanidini [215, 216].

Flavonolignani su posebna klasa sekundarnih metabolita biljaka čija se struktura sastoji iz flavonoidnog dela i fenilpropanoidne jedinice. Flavonolignani izolovani iz biljke *Silybum marianum* predstavljaju grupu jedinjenja sa dokazanim hepatoprotektivnim i antineoplastičnim svojstvima [217, 218].

Silybum marianum (milk thistle plant) je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka koja pripada porodici Asteraceae. Njeno prirodno stanište jeste region Mediterana, ali gaji se u kultivisanim uslovima širom sveta. U našem narodu poznata je pod tradicionalnim imenima gujina trava, gospin trn, sikavica, divlja artičoka, mlečni čkalj i badelj. Vekovima se koristi u tradicionalnoj medicini u lečenju bolesti bubrega, slezine i žučnih puteva, a prvenstveno u lečenju bolesti jetre, kao što su akutni i hronični hepatitis i ciroza jetre različite etiologije. Silimarin predstavlja standardizovani suvi ekstrakt semena (ploda) ove biljke čiji su glavni sastojci flavonolignani (70-80%), a ostatak ekstrakta čine mešavine različitih flavonoida i masnih kiselina (linoleinska, oleinska i palmitinska kiselina), steroli, tokoferol (vitamin E) i fosfolipidi. Najvažniji flavonolignani su silibin, izosilibin, silidianin i silikristin. Kvantitativno posmatrano, silibin (silibinin, slika 1.10) predstavlja najvažniji flavonolignan i najznačajnija je biološki aktivna komponenta silimarina. Pod pojmom silibin, odnosno silibinin, smatra se mešavina dva diastereoizomera – silibin A i silibin B, u ekvimolarnim odnosima (1:1). Silibinin pokazuje slabu rastvorljivost u vodi i polarnim rastvaračima, a nerastvorljiv je u nepolarnim rastvaračima [219].



Slika 1.10. Hemijska struktura silibina A i silibina B, koji u ekvimolarnim odnosima čine silibin, odnosno silibinin (*preuzeto i modificirano iz [220]*).

Američka agencija FDA odobrila je primenu parenteralnog preparata na bazi silibinina kao antidota u slučajevima intoksikacije gljivom *Amanita phalloides* i srodnim vrstama. Njegov aktivan sastojak jeste hidrosolubilni derivat silibinina, silibinin-C-2',3-dihidrogen sukcinat u obliku dinatrijumove soli. Iako precizni mehanizmi hepatoprotektivnog dejstva silibinina nisu rasvetljeni, smatra se da silibinin sprečava vezivanje amanita toksina za hepatocitnu membranu, kao i da se kompetitivno vezuje za isti transportni sistem OATP1B3, čime inhibiše transmembranski transport toksina, njegovu bilijarnu sekreciju i enterohepatičnu recirkulaciju. Takođe, silibinin sprečava oslobađanje TNF- α i apoptozu hepatocita. Studije su pokazale da silibinin povećava broj ribozoma i količinu rRNA u hepatocitima, čime poboljšava njihov biosintetski kapacitet. Hepatoprotektivnom dejstvu silibinina u tretmanu akutnog oštećenja jetre pripisuju se i njegova antioksidativna, antiinflamatorna i antifibrozna svojstva [221].

Osim hepatoprotektivnog dejstva, brojna istraživanja su dokazala antikancerska dejstva silibinina, kao i terapijski značaj u lečenju Alchajmerove i Parkinsonove bolesti i dijabetes melitusa. Studije su, takođe, pokazale bezbednost primene ekstrakta silimarina kod ljudi – čak i visoke doze od 700 mg tri puta na dan nisu ispoljile neželjena dejstva, osim blagih gastrointestinalnih smetnji. Jedna klinička studija je predstavila svoje rezultate bezbedne primene silimarina u trudnoći. Ovaj ekstrakt nije pokazao ni značajne interakcije u toku primene drugih lekova [222].

Metabolizam silibinina odvija se u jetri, kroz faze I i II biotransformacije, sa poluvremenom eliminacije od približno 6 časova. Svega 3-8% nemetabolizovanog silibinina

izlučuje se putem bubrega. Silibinin, generalno, pokazuje slabu interakciju sa citohromima. Uz pretpostavku da se silibinin metabolizira putem citohroma CYP2C8, precizni metabolički citohrom-zavisni putevi I faze metabolizma nisu definisani. Detektovani su metaboliti O-demetilsilibinin, mono i dihidroksisilibinin. Smatra se da je faza II biotransformacije mnogo značajnija u metabolizmu silibinina jer se više od 80% silibinina sekretuje u formi glukuronida i sulfata putem žuči i intestinalnog trakta, sa sposobnošću enterohepatičke recirkulacije 20-40% [223].

Prva objašnjenja hepatoprotektivnog dejstva ekstrakta silimarina bila su bazirana na njegovim snažnim antioksidativnim dejstvima, koja su zasnovana na sposobnosti neutralisanja ROS i RNS, inhibicije lipidne peroksidacije, indukcije sinteze antioksidativnih enzima i glutaciona. Takođe, njegovi sastojci pokazali su efikasnost u heliranju metalnih jona, kao što su gvožđe i bakar, što isto predstavlja mehanizam zaštite od oksidativnog stresa. *In vitro* studija uticaja silimarina na ćelijsku liniju mišijih makrofaga RAW264.7 i *in vivo* studija na miševima, sa intraperitonealnom administracijom silimarina, pokazale su da je silimarin smanjio LPS-indukovanu ekspresiju iNOS i sintezu NO^{*}, smanjujući mogućnost razvijanja nitrozativnog stresa. Antioksidativna svojstva silimarina su značajna u terapiji alkoholnog oštećenja jetre. Istraživanja su pokazala da su antioksidativna, citoprotektivna i antiinflamatorna dejstva silimarina zapravo dejstva njegove najvažnije komponente, silibinina, i da su posredovana inhibicijom transkripcionih faktora NF-κB i STAT, kao i smanjenjem ekspresije gena koja su pod kontrolom ovih faktora, a to su prvenstveno geni čiji su produkti COX-2, PGE2 i proinflamatorni citokini. Brojni *in vitro* i *in vivo* modeli malignih ćelija i tumora dokazali su da su ova antiinflamatorna dejstva silibinina blisko povezana sa njegovim antikancerogenim efektima. Silibinin inhibira TNF-α-indukovanu aktivaciju MAPK intraćelijskih signalnih puteva, a to su ERK1/2, JAK/STAT i p38 MAPK putevi, kao i aktivaciju mTOR signalnog puta, koji su zaduženi za ćelijski rast, preživljavanje, proliferaciju i inhibiciju apoptoze, a aberantno su aktivirani u malignim ćelijama. Na modelu azoksimetan-indukovane kancerogeneze u kolonu pacova, silibinin je aktivirao apoptozu posredstvom povećanja količine proapoptotskog proteina Bax i sniženja količine antiapoptotskog proteina Bcl-2, ali je uticao i na smanjenje invazivnosti malignih ćelija putem inhibicije ekspresije MMP-7. Utvrđeno je da silibinin pokazuje imunomodulatorno dejstvo, koje još uvek nije dovoljno ispitano, ali studije pokazuju pozitivne rezultate u terapiji autoimunih bolesti [224].

Preklinička istraživanja na modelima bazocelularnog i skvamocelularnog karcinoma kože utvrdila su nekoliko važnih antineoplastičnih mehanizama silibinina. Na modelima UV-

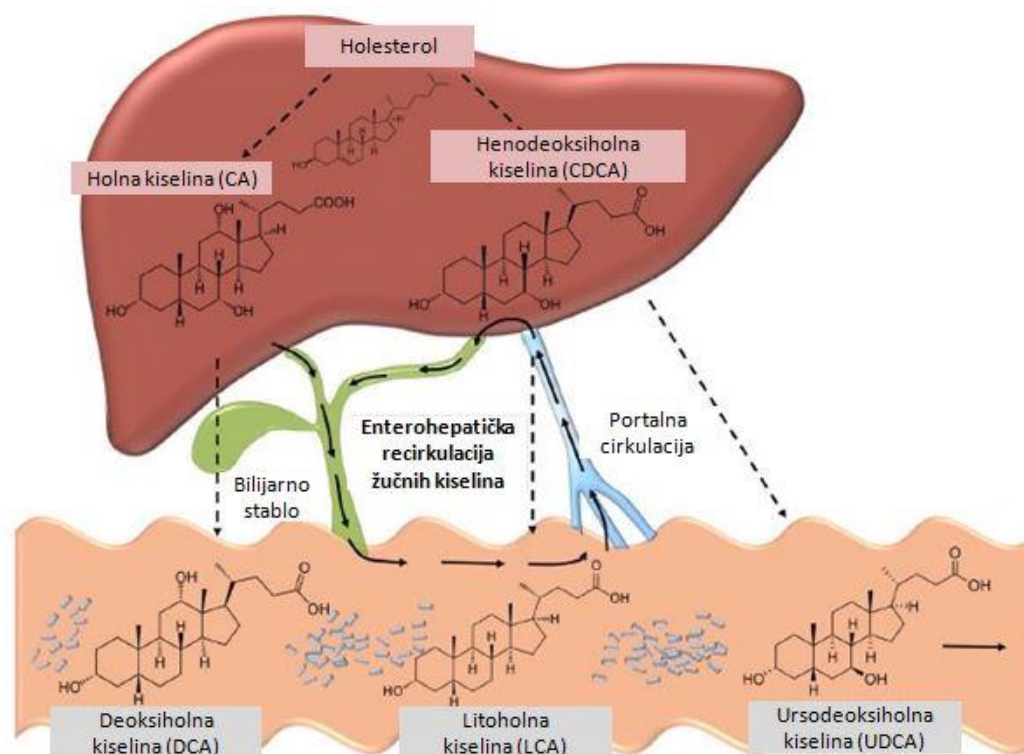
izazvanih promena u strukturi DNA kože, prvenstveno pojave timin dimera i oksidativnih oštećenja DNA (8-OHdG), silibinin je povećao sadržaj proteina p53, Cip1/p21, Kip1/p27, a smanjio je količine cdk2, cdk4, ciklina A, E i D1, čime je uticao na zaustavljanje progresije ćelijskog ciklusa i ćelijske proliferacije. Zaustavljanje ćelijskog ciklusa aktiviralo je mehanizme popravke oštećene DNA (*nucleotide excision repair*, NER). U produženom izlaganju kože UV zračenju, tretman silibininom izazvao je posttranslacionu modifikaciju tumor-supresor proteina p53, u vidu fosforilacije Ser15 u strukturi proteina p53, i promovisao je apoptozu oštećenih ćelija, što je dokazano povećanom aktivnošću kaspaze-3 i smanjenim nivoima antiapoptotskih proteina Bcl-2 i survivina. Zaustavljanjem ćelijskog ciklusa i indukcijom apoptoze, silibinin je zaustavio prvu fazu kancerogeneze. I druge studije su dokazale plejotropne efekte silibinina na modelima karcinoma kože, u smislu njegove sposobnosti da blokira proliferativne (MAPK, PI3K/AKT) i inflamatorne (TNF- α , IL-1 α , COX-2) signalne puteve, da suprimira dejstvo VEGF i HIF-1 α proangiogenih faktora, kao i da poveća nivoe antioksidativnih enzima. Danas su na svetskom tržištu komercijalno dostupne različite formulacije silibinina čije su indikacije za primenu prvenstveno akutne i hronične bolesti jetre, ali dostupni su i topikalni preparati za tretman dermatitisa i kožnih oštećenja različite etiologije [225].

Postoji veliki entuzijazam i perspektiva za proučavanje biohemijskih i molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi antineoplastičnih dejstava silibinina [226].

1.13. Žučne kiseline u ulozi signalnih molekula

Žučne kiseline predstavljaju fiziološke surfaktante steroidne strukture, koje se, nizom enzimski-katalizovanih reakcija, sintetišu iz holesterola. Kod ljudi, u jetri se sintetišu dve primarne žučne kiseline – holna kiselina (CA) i henodeoksiholna kiselina (CDCA), koje se, potom, preko karboksilne grupe na poziciji C-24 svog steroidnog prstena, konjuguju sa taurinom ili glicinom. Ovi konjugati žučnih kiselina označavaju se kao žučne soli, koje su negativno naelektrisane pri pH vrednosti intestinalne sredine, a pokazuju veću rastvorljivost u vodi, manju citotoksičnost i manju sklonost ka taloženju. Sintetisane žučne soli se sekretuju u žučnu kesicu i izlučuju u tanko crevo. Intestinalne bakterije metabolišu žučne soli, najpre dekonjugacijom, odnosno hidrolizom i oslobađanjem slobodnih žučnih kiselina pod dejstvom enzima hidrolaze, a, zatim, i dehidroksilacijom katalizovanom enzimom 7 α -dehidroksilaza. Ovim reakcijama, CA i CDCA prelaze u sekundarne žučne kiseline, deoksiholnu kiselinu (DCA) i litholnu kiselinu (LCA). Ursodeoksiholna kiselina (UDCA) nastaje 7 β -

epimerizacijom CDCA, katalizovanom bakterijskim enzimima u debelom crevu. Žučne kiseline imaju specifičnu hemijsku strukturu (slika 1.11), karakterisanu velikim, rigidnim, hidrofobnim i planarnim steroidnim jezgrom, fleksibilnim kiselinskim bočnim lancem i hidroksilnim grupama, čiji se broj, pozicija i orijentacija razlikuju među različitim žučnim kiselinama. Zbog svoje strukture, odnosno prisutnih bočnih hidroksilnih grupa na jednoj strani molekule, žučne kiseline su amfifilne supstance, koje u vodenoj sredini formiraju supramolekularne agregate, micelle. Hidrofobnost žučnih kiselina je najvažnija determinanta koja utiče na njihovu citotoksičnost, ali i na sposobnost formiranja micela. Hidrofobnost raste sledećim redosledom: UDCA < CA < CDCA < DCA < LCA, pri čemu je UDCA najhidrofilnija, a LCA najhidrofobnija žučna kiselina. Amfifilna svojstva žučnih kiselina imaju veliki fiziološki značaj u smislu esencijalne uloge žučnih kiselina u intestinalnoj micelarnoj solubilizaciji, odnosno emulgovanju masti iz hrane, uključujući i liposolubilne vitamine, što omogućava lipidni transport, olakšava digestiju lipida i apsorpciju. U tom pogledu, konjugovane žučne kiseline pokazuju superiornije solubilizacione karakteristike, u poređenju sa nekonjugovanim žučnim kiselinama [227].



Slika 1.11. Hemijska struktura primarnih (CA, CDCA) i sekundarnih žučnih kiselina (DCA, LCA i UDCA) (preuzeto i modifikovano iz [228]).

Postoje dva puta biosinteze žučnih kiselina u jetri – klasičan (neutralni), kojim se sintetiše više od 90% žučnih kiselina u organizmu, i alternativni (kiseli) put sinteze, u kojem

se produkuje manje od 10% ukupne količine žučnih kiselina. Klasičan put biosinteze započinje hidroksilacijom holesterola uz pomoć mikrozomalnog enzima holesterol 7α -hidroksilaze (CYP7A1), pri čemu nastaje 7α -hidroksiholesterol. Ova reakcija je ujedno i ključna reakcija u sintezi žučnih kiselina, a enzim CYP7A1 najvažniji regulator katabolizma holesterola. Iz 7α -hidroksiholesterola sintetiše se 7α -hidroksi-4-holesten-3-on, koji postaje supstrat za enzim sterol 12α -hidroksilazu (CYP8B1), a zatim i za enzim sterol 27-hidroksilazu (CYP27A1), što vodi ka sintezi CA. Intermedijer 7α -hidroksi-4-holesten-3-on koji izbegne dejstvo enzima CYP8B1 podleže dejstvu samo CYP27A1 i transformiše se u CDCA. Iz navedenog, može se zaključiti da enzim CYP8B1 reguliše odnos sintetisanih CA i CDCA i hidrofilitnost *pool*-a primarnih žučnih kiselina. U alternativnom putu biosinteze prva reakcija podrazumeva hidroksilaciju na poziciji 27, uz katalizu enzimom CYP27A1, čime nastaje 27-hidroksiholesterol. On dalje podleže katalitičkoj aktivnosti enzima oksisterol 7α -hidroksilaze (CYP7B1), gradeći CDCA. Iako se hidroksisteroli najviše stvaraju u jetri, i oni hidroksisteroli koji su nastali u perifernim tkivima, kao što su mozak i pluća, mogu, nakon transporta u jetru, da se uključe u alternativni put biosinteze žučnih kiselina. Sintetisane primarne žučne kiseline konjuguju se sa taurinom i glicinom uz pomoć dva enzima: žučna kiselina-CoA sintaza (BACS) i žučna kiselina-CoA: amino kiselina N-aciltransferaza (BAAT) [229].

Dok nekonjugovane žučne kiseline slobodno difunduju kroz membrane, žučne soli zahtevaju aktivan transport, stoga se iz hepatocita u lumen žučnih kanalića transportuju ABC transportnim sistemima – eksportnom pumpom za žučne soli (BSEP/ABCB11) i transportnim proteinom MRP2 (ABCC2). Nakon obroka, žučne kiseline i njihove soli se oslobađaju iz žučne kesice u intestinalni lumen aktivnošću hormona holecistokinina, koji se luči iz enteroendokrinih ćelija duodenuma. Nakon obavljene uloge u emulgovanju masti iz hrane, 95% žučnih kiselina i soli podleže enterohepatičnoj recirkulaciji. U distalnim segmentima ileuma, žučne soli se reapsorbuju uz pomoć apikalnog natrijum-zavisnog transportera za žučne soli (ASBT/SLC10A2) na membrani enterocita. Transenterocitni transport odigrava se posredstvom gastrotropina, intestinalnog vezujućeg proteina za žučne kiseline (IBAP/FABP6). Poslednji korak je transport kroz bazolateralnu membranu enterocita preko heterodimernog transportera $OST\alpha/\beta$, čime žučne kiseline i soli prelaze u portalnu cirkulaciju. Hepatociti preuzimaju žučne soli putem natrijum-zavisnog transportera za žučne soli (NTCP/SLC10A1), a nekonjugovane žučne kiseline preko natrijum-nezavisnih OATP transportera. Enterohepatička recirkulacija se odvija 4-14 puta na dan, a frakcija žučnih

kiselina koja se izgubi fecesom (manje od 5% ukupne količine) kompenzuje se *de novo* sintezom iz holesterola [228].

Osim uloge u solubilizaciji i varenju masti iz hrane, jedna od osnovnih uloga žučnih kiselina jeste i održavanje homeostaze holesterola, s obzirom na to da one predstavljaju glavne proizvode katabolizma 90% ukupnog holesterola u organizmu. Tokom poslednje dve decenije velika pažnja nauke usmerena je ka ispitivanju uloge žučnih kiselina u metaboličkoj homeostazi. Žučne kiseline predstavljaju značajne signalne molekule koje učestvuju u regulaciji i integraciji energetskog metabolizma, metabolizma glukoze i lipida. Enterohepatička recirkulacija žučnih kiselina je važan fiziološki mehanizam koji reguliše njihovu sintezu i celokupan humani metabolizam. Uloge žučnih kiselina kao signalnih molekula ispoljavaju se prvenstveno njihovim dejstvom na nuklearni receptor farnezoid X receptor (FXR) i membranski Takeda receptor povezan sa G-proteinom (TGR5). Takođe, žučne kiseline se vezuju i za druge nuklearne receptore, kao što su vitamin D receptor (VDR), konstitutivni androstanski receptor (CAR) i pregnan X receptor (PXR) [230, 231].

1.13.1. Farnezoid X receptor (FXR)

Farnezoid X receptor (FXR α , NR1H4) predstavlja nuklearni faktor transkripcije, koji je prvi put okarakterisan 1995. godine, a četiri godine kasnije otkriveno je da su žučne kiseline i njihovi konjugati najpotentniji endogeni ligandi ovog receptora [232].

Opisana su dva gena za FXR. *NR1H5* je pseudogen kod čoveka, a kod životinja kodira sintezu FXR β . *NR1H4* (lociran na hromozomu 12q23.1) kodira sintezu FXR α , koji se često označava samo kao FXR. Kod ljudi je dokazano postojanje četiri FXR α izoforme, FXR α_{1-4} , koje se razlikuju u pogledu tkivne distribucije. FXR je eksprimiran u hepatocitima, bilijarnom epitelu, enterocitima, renalnim tubularnim ćelijama i nadbubrežnim žlezdama. Niska ekspresija je detektovana u adipocitima, β ćelijama pankreasa, srčanom mišiću, glatkim mišićima, vaskularnom endotelu i imunskim ćelijama. Najveći afinitet za vezivanje za FXR pokazuje primarna žučna kiselina CDCA. Sekundarne žučne kiseline DCA i LCA su, takođe, FXR agonisti. CA je slab agonista, dok UDCA ne pokazuje svojstvo aktivacije ovog receptora. Protein FXR poseduje strukturu sličnu ostalim nuklearnim receptorima. Sastoji se od visoko konzerviranog DNA-vezujućeg domena na N-terminalnom regionu, koji sadrži dva *zinc-finger* motiva. U ovom regionu nalazi se i AF1, ligand-nezavisni transaktivacioni domen. C-terminalni region predstavlja ligand-vezujući domen, za koji se vezuju žučne kiseline, ali i

brojni polusintetski i sintetski FXR agonisti. U ovom delu strukture prisutan je i AF2, ligand-zavisni transaktivacioni domen. N- i C-terminalni regioni su povezani tzv. *hinge* regionom, koji modulira aktivnost receptora. FXR formira kompleks sa RXR i vezuje se za specifične DNA sekvence (*FXR response element*, FXRE) u promoterskim regionima ciljanih gena, regulišući gensku ekspresiju. Vezivanje liganda za FXR uzrokuje konformacione promene FXR/RXR heterodimera, oslobađanje korepresorskih proteina i aktivaciju koaktivatorskih proteina. Ovi događaji utiču na remodelovanje hromatina i pokretanje transkripcionog aparata [233, 234].

Najvažnije uloge FXR jesu regulacija metabolizma žučnih kiselina, lipida i ugljenih hidrata, a učestvuje i u zapaljenskim reakcijama, čime pokazuje biohemijski i farmakološki značaj u metaboličkim poremećajima, bolestima jetre i kardiovaskularnog sistema [235].

Aktivacija FXR u hepatocitima povećava ekspresiju SHP (*small heterodimer partner*) koji deluje represivno na CYP7A1 i CYP8B1, čime smanjuje sintezu žučnih kiselina u klasičnom putu biosinteze. SHP smanjuje ekspresiju NTCP, što u jetri redukuje obim preuzimanja žučnih kiselina iz portalnog krvotoka. Takođe, FXR/SHP aktivacija povećava efluks žučnih kiselina iz jetre u žuč povećanjem BSEP ekspresije, ali i iz enterocita u portalnu cirkulaciju povećanjem ekspresije OST α/β transportnog sistema. Ovim mehanizmima hepatociti detektuju prisustvo žučnih kiselina i, posredstvom FXR, sprečavaju akumulaciju žučnih kiselina u jetri, njihovo toksično dejstvo na parenhim jetre i mogućuolestazu. U enterocitima i hepatocitima aktivacija FXR inicira sintezu i produkciju fibroblastnog faktora rasta 19 (FGF19) i aktivaciju njegovog receptora FGFR4, koji, takođe, deluje represivno na CYP7A1. FXR utiče na smanjenje koncentracije serumskih triglicerida putem regulacije ekspresije gena koji su uključeni u metabolizam lipida. Povećava jetreno preuzimanje lipoproteinskih čestica bogatih holesterolom i trigliceridima. Hepatoprotektivno dejstvo FXR ogleda se i u smanjenju potencijalne hepatosteatoze, ali i u antiinflamatornoj aktivnosti kroz FXR-posredovano smanjenje ekspresije NF- κ B. Aktivacija FXR/SHP inhibiše ključne enzime glukoneogeneze u jetri. Hipoglikemijskom efektu aktivacije FXR doprinosi i povećano preuzimanje glukoze od strane adipocita i povećana sekrecija insulina iz β ćelija pankreasa [236].

Osim predstavljenih i relativno dobro proučenih uloga FXR u regulaciji metaboličkih puteva, tokom poslednje decenije, ističu se uloge ovog receptora u patogenezi malignih bolesti različitih lokalizacija. Naučna istraživanja su pokazala da FXR može da učestvuje u modulaciji NF- κ B, EGFR/ERK, PI3K/AKT, JAK/STAT, WNT/ β -katenin i p38/MAPK

signalnih puteva, čija disregulacija je potvrđena u brojnim karcinomima. Takođe, *in vivo* i *in vitro* studije potvrdile su povezanost FXR aktivacije sa ekspresijom ciklina, kaspaza, citokina, tumor-supresor proteina p53 i pRb, MMP i drugih EMT biomarkera. Smatra se da su funkcije FXR u kancerogenezi tkivno-specifične i zato se ne može definisati precizna i jedinstvena uloga ovog receptora u malignim ćelijama. FXR je visoko eksprimiran u NSCLC ćelijama i smanjenje njegove ekspresije inhibiše ćelijsku proliferaciju *in vitro* i tumorski rast *in vivo*. Prvi rezultati ispitivanja uloge FXR u kolorektalnom karcinomu pokazali su da je u adenomima i karcinomima kolona smanjena ekspresija FXR mRNA: Rezultati naučnih studija pokazuju su da FXR inhibiše WNT/ β -katenin put, interakcijom sa β -kateninom i opstrukcijom formiranja transkripcionog kompleksa β -katenin/TCF4. *In vivo* studija na miševima otkrila je da je smanjena FXR ekspresija povezana sa tumorskom progresijom, odnosno povećanom proliferacijom i inhibisanom apoptozom u mukozi kolona, posredstvom aktivacije WNT signalnog puta, aktivacije neutrofila i makrofaga, kao i povećanja nivoa TNF- α . Takođe, gubitak funkcije FXR utiče na pojavu invazivnijeg fenotipa malignih ćelija kolona, preko indukcije ekspresije EMT markera, kao i IL-6 i zapaljenskog procesa [237].

U studiji Tsai CL i sar. opisana je povećana koncentracija žučnih kiselina u pleuralnom izlivu pacijenata sa adenokarcinomom pluća. Imunohistohemijska analiza biopsija pokazala je povećanu FXR ekspresiju u tumorskim ćelijama, ali i u endotelnim ćelijama mikrovaskulature pleure. Dodatak ove pleuralne tečnosti HUVEC ćelijskoj kulturi endotelnih ćelija povećao je ekspresiju FXR u HUVEC kulturi. Rezultati ove studije naglasili su potencijalnu povezanost FXR sa indukcijom tumorske angiogeneze u karcinomu pluća [238].

1.13.2. TGR5 receptor

TGR5, poznat pod nazivom M-BAR, GPBAR, GPR131 i BG37, predstavlja membranski-vezan receptor, koji je prvi put opisan 2002. godine. Njegovu sintezu kodira gen *GPBAR1*, lociran na hromozomu 2q35. TGR5 pripada klasi receptora koji su vezani za G-protein. Ekspresija TGR5 je detektovana u hepatobilijarnom traktu, slezini, pankreasu, gastrointestinalnom traktu, srcu, bubrezima, placenti, smeđem masnom tkivu, skeletnim mišićima, mozgu, ali i u malignim tumorima. Aktivacija ovog receptora izaziva njegovu internalizaciju i oslobađanje $G\alpha$ subjedinice. Ovaj događaj aktivira adenilat ciklazu, koja proizvodi cAMP i dalje aktivira PKA i CREB. Faktor transkripcije CREB utiče na aktivaciju intracelularnih signalnih puteva i reguliše ekspresiju brojnih gena, čime TGR5 učestvuje u regulaciji različitih metaboličkih događaja, ali i kancerogeneze [239].

Ligandi TGR5 receptora su nekonjugovane i konjugovane žučne kiseline. Vezuju se za ovaj receptor prema sledećem afinitetu: TLCA > LCA > DCA > CDCA > CA. Uočava se da je tauro-LCA najsnažniji agonista, dok UDCA ne pokazuje TGR5 agnostičku aktivnost. TGR5 predstavlja važnu farmakološku metu u terapiji metaboličkog sindroma. Jedan od prvih uočenih efekata aktivacije TGR5 bio je njegov hipoglikemijski efekat preko povećanja oslobađanja insulina iz β ćelija pankreasa, ali i povećanja senzitivnosti perifernih tkiva za insulin, posredstvom uticaja na sekreciju GLP-1 (peptid sličan glukagonu-1) i peptida YY iz enteroendokrinih ćelija. Aktivacija TGR5 u smeđem masnom tkivu i mišićima aktivira enzim jodotironin dejodinazu tip 2, koja konvertuje tiroksin (T4) u trijodotironin (T3), čime se intenzivira energetska metabolizam. Važan antidijabetički efekat TGR5 jeste i prevencija renalnog oštećenja u dijabetesu preko smanjenja oksidativnog stresa i akumulacije lipida u bubrezima. Na HepG2 ćelijama hepatocelularnog karcinoma utvrđeno je da TGR5 negativno reguliše hepatski inflamatorni odgovor tako što antagonizuje TLR4/NF- κ B signalizaciju i produkciju proinflamatornih citokina. Utvrđeno je da aktivacija TGR5 suprimira fosforilaciju I κ B α , translokaciju p65 u jedro i njegovu DNA-vezujuću i transkripcionu aktivnost, što upućuje na antiinflamatorno i hepatoprotektivno dejstvo ovog receptora. Takođe, smanjujući NF- κ B aktivnost u makrofagima masnog tkiva, TGR5 doprinosi smanjenju insulinske rezistencije [240].

Činjenica da je TGR5/cAMP/PKA/CREB aktivacija povezana sa PI3K/AKT/mTOR, NF- κ B, ERK1/2, STAT, ali i sa RhoA (*Ras homolog family member A*) i Epac (*exchange protein activated by cAMP*) signalnim kaskadama, upućuje na veoma kompleksnu ulogu receptora TGR5 u ćelijskom metabolizmu i rastu, adheziji, diferencijaciji, proliferaciji, migraciji, inflamaciji i kancerogenezi. Rezultati studija još uvek nisu konzistentni po pitanju definisanja uloge ovog receptora u njegovim potencijalnim tumor-supresorskim, odnosno proto-onkogenim dejstvima [241].

TGR5 je eksprimiran na monocitima i makrofagima, što ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u imunološkim i inflamatornim reakcijama. U *in vivo* studiji Zhao L i sar. pokazano je da aktivacija TGR5/cAMP/STAT3/STAT6 signalnog puta uzrokuje polarizaciju protumorskih M2 makrofaga, inhibiciju CD8⁺ T limfocita i sledstvenu supresiju antitumorskog imunološkog odgovora u karcinomu pluća. Takođe, pokazano je da je u humanim NSCLC tkivima povećana ekspresija TGR5 negativan prognostički faktor [242].

Negativan uticaj povećane TGR5 ekspresije na prognozu bolesti prikazan je i u studiji Liu X i sar, u kojoj je dokazana pozitivna korelacija između ekspresije TGR5 i fosforilisanog

STAT3 (pSTAT3) u NSCLC. Rezultati istraživanja pokazali su da je TGR5-posredovana aktivacija JAK2/STAT3 signalnog puta odgovorna za ćelijsku proliferaciju, migraciju i invaziju [243].

Drugačiji rezultati dobijeni su za karcinom želuca, u studiji Guo C i sar, čija istraživanja su pokazala da je TGR5 antagonizovao STAT3 signalni put i njegovu transkripcionu aktivnost indukovanu LPS-om ili IL-6. Aktivacija TGR5 je suprimirala fosforilaciju STAT3, smanjujući proliferaciju i migraciju malignih ćelja želuca [244].

Značaj žučnih kiselina i njihovih receptora u različitim metaboličkim procesima doprineo je razvoju polusintetskih i sintetskih derivata žučnih kiselina, koji imaju poboljšane farmakokinetske i farmakodinamske karakteristike, sa ciljem dizajna novih farmakoterapijskih pristupa, prvenstveno u lečenju bolesti metabolizma. Sve bogatija saznanja o ulozi žučnih kiselina u genetskim i epigenetskim događajima, koji su značajni u putevima kancerogeneze, postavila su ove signalne molekule na važno mesto u proučavanju mehanizama nastanka malignih oboljenja i interakcija sa antitumorskim lekovima, što im dodaje potencijalnu ulogu terapijskih agenasa u savremenoj onkološkoj farmakoterapiji [245].

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. Ciljevi istraživanja

Prvi cilj ove disertacije podrazumeva *in vitro* utvrđivanje citotoksične aktivnosti celekoksiba, selektivnog inhibitora enzima ciklooksigenaze-2 (COX-2), kao i 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabina), demetilacionog agensa, na humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća (A549), adenokarcinoma kolona (HT-29) i fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5). Takođe, cilj ovog dela istraživanja jeste ispitivanje uticaja prirodnih supstanci, silibinina i žučnih kiselina (hidrofobne henodeoksiholne (CDCA) i hidrofilne ursodeoksiholne kiseline (UDCA)) na citotoksičnost celekoksiba, odnosno decitabina na navedenim ćelijskim linijama, sa svrhom odabira adekvatnih koncentracija ispitivanih supstanci za dalje analize.

Drugi cilj ovog *in vitro* istraživanja predstavlja analizu ekspresije gena koji su uključeni u puteve kancerogeneze u ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća i kolona tretiranim celekoksibom, u poređenju sa normalnim ćelijama. Takođe, cilj ovog rada jeste i ispitivanje uticaja silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju različitih grupa gena u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom. Geni od interesa u ovom istraživanju jesu geni koji kodiraju sintezu proteina zaduženih za regulaciju procesa COX-2-posredovane inflamacije, apoptoze, proliferacije, ćelijskog transporta, invazije, metastaziranja, homeostaze žučnih kiselina i antioksidativne zaštite.

Treći cilj ovog rada ogleda se u ispitivanju ekspresije gena koji su uključeni u epigenetske događaje u ćelijskim linijama A549, HT-29 i MRC-5 koje su tretirane decitabinom i kombinacijama decitabina i silibinina, odnosno decitabina i žučnih kiselina.

Četvrti cilj ovog istraživanja predstavlja ispitivanje uticaja silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidativnih enzima u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama koje su tretirane celekoksibom.

Peti cilj disertacije jeste da se, na osnovu dobijenih rezultata, iznesu zaključci o ulozi enzima COX-2 i epigenetskih događaja u patogenezi karcinoma pluća i kolona. Takođe, važan cilj ovog istraživanja jesu zaključci o mogućoj primeni selektivnog COX-2 inhibitora, celekoksiba, odnosno demetilacionog agensa, decitabina, kao i njihovih kombinacija sa silibininom i žučnim kiselinama u terapiji malignih bolesti pluća i kolona.

2.2. Hipoteze istraživanja

Celekoksib i decitabin pokazuju koncentracijski-zavisnu citotoksičnu aktivnost na humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća (A549), adenokarcinoma kolona (HT-29) i fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5). Silibinin i žučne kiseline (CDCA i UDCA) modifikuju citotoksičnu aktivnost celekoksiba, odnosno decitabina u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama, čime omogućuju konačnu primenu nižih koncentracija celekoksiba i decitabina u *in vitro* ćelijskim modelima malignih i normalnih ćelija.

Prirodne supstance, kao što su silibinin i žučne kiseline, pokazuju sposobnost modulacije ekspresije gena čiji su proteinski produkti uključeni u regulaciju različitih intraćelijskih signalnih puteva. Uticajem na ekspresiju gena koji učestvuju u procesima inflamacije, apoptoze, proliferacije, ćelijskog transporta, invazije, metastaziranja, homeostaze žučnih kiselina i antioksidativne zaštite, silibinin i žučne kiseline doprinose antitumorskoj aktivnosti celekoksiba.

Silibinin i navedene žučne kiseline ispoljavaju sinergizam sa demetilacionim agensom decitabinom u regulaciji ekspresije gena koji učestvuju u epigenetskim događajima u malignim i normalnim ćelijama.

Silibinin i žučne kiseline, na različite načine, utiču na biohemijske pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama tretiranim celekoksibom.

Hronična inflamacija i enzim COX-2 imaju važnu ulogu u razvoju i progresiji malignih tumora pluća i kolona. Takođe, važan činilac u kancerogenezi tumora pluća i kolona jesu i epigenetski događaji. Stoga, celekoksib i decitabin predstavljaju potencijalne agense u prevenciji i terapiji karcinoma pluća i kolona. Povećanje antitumorske aktivnosti celekoksiba, odnosno decitabina, uz smanjenje primenjenih doza ovih agenasa, može da se postigne njihovom kombinovanom primenom sa silibininom i žučnim kiselinama.

3. MATERIJAL I METODE

Eksperimenti i laboratorijska ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su u Laboratoriji za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, u Službi za patološko-anatomsku i molekularnu dijagnostiku Instituta za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici, na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, u Centru za sudsku medicinu, toksikologiju i molekularnu genetiku Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu i na Zavodu za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, u periodu od maja 2016. do decembra 2019. godine.

Sva ispitivanja su izvedena *in vitro*, na trima humanim ćelijskim linijama: ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća, adenokarcinoma kolona i fetalnih plućnih fibroblasta. Eksperimentalni deo je bio usmeren ka cilju ispitivanja farmakoloških efekata primene celekoksiba i 5-aza-2'-deoksicitidina, kao i njihovih kombinacija sa prirodnim agensima, silibininom i žučnim kiselinama (henodeoksiholnom i ursodeoksiholnom kiselinom). Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu.

3.1. Materijal

Celekoksib (čistoće $\geq 99\%$) i 5-aza-2'-deoksicitidin, odnosno decitabin (čistoće $\geq 99\%$) nabavljeni su od proizvođača Tocris Bioscience (Velika Britanija). Silibinin (čistoće $\geq 98\%$), henodeoksiholna kiselina (CDCA, čistoće $\geq 97\%$) i ursodeoksiholna kiselina (UDCA, čistoće $\geq 98\%$) proizvedeni su u kompaniji Sigma-Aldrich (Nemačka). Sve supstance su rastvorene u dimetil-sulfoksidu (DMSO, čistoće $\geq 99,9\%$), proizvođača Sigma-Aldrich (Nemačka).

3.1.1. Ćelijske kulture

Ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća A549 (ATCC[®] CCL-185[™]) razvijena je 1972. godine iz tumorskog tkiva pacijenta muškog pola kavkaskog porekla, starog 58 godina, obolelog od primarnog adenokarcinoma pluća. A549 ćelije su epitelijalne i adherentne ćelije koje rastu u monosloju (*monolayer*) [246].

Ćelijska linija humanog adenokarcinoma kolona HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) uspostavljena je 1964. godine, iz primarnog tumora pacijentkinje kavkaskog porekla, stare 44 godina, obolele od kolorektalnog adenokarcinoma. HT-29 ćelije su epitelijalne ćelije, koje, kao adherentne ćelije, rastu u monosloju i u velikim kolonijama [247].

Ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća MRC-5 (ATCC[®] CCL-171[™]) uspostavljena je 1966. godine iz plućnog tkiva fetusa muškog pola kavkaskog porekla, starosti 14 nedelja. MRC-5 ćelije su adherentne ćelije koje rastu u monosloju [248].

3.2. Metode

3.2.1. Priprema ćelijskih kultura

A549, HT-29 i MRC-5 ćelijske kulture su uzgajane u flaskonima površine 25 cm², u koje se dodaje hranljivi medijum za kultivisanje ćelija, u inkubatoru na temperaturi 37 °C, sa postignutom atmosferom od 100% vlažnosti i 5% ugljen-dioksida. Gustina zasejavanja ćelija bila je 5x10⁵ ćelija po kvadratnom centimetru. Korišćeni medijum za rast A549, HT-29 i MRC-5 ćelija bio je DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), koji je obogaćen fetalnim goveđim serumom (FBS, 10%), glutaminom 2 mM, streptomycinom 100 µg/mL i penicilinom 100 IJ/mL. Koncentracija ćelija u kulturi predstavlja kritičan parametar za adekvatnu vijabilnost kulture. Deoba ćelija je ograničena kontaktnom inhibicijom, kada ćelije počinju da se dodiruju, a u kulturi je postignuta konfluentnost. Usled navedenih činjenica, neophodno je ćelije presađivati u cilju redukcije gustine ćelija i dostizanja optimalnog nivoa za rast i deobu (pasažiranje ćelija). Takođe, ćelije se moraju premeštati u novi, sveži medijum, kako ne bi došlo do inhibicije proliferacije usled nagomilavanja ćelijskih metaboličkih produkata u medijumu u kojem se nalaze, potrošnje hranljivih materija i prerastanja obima prostora za kultivaciju, usled povećanog broja ćelija nakon njihove proliferacije. Po postizanju konfluentnosti od 80 do 90%, ćelije su presađivane dva puta nedeljno. Disocijacija monosloja (tripsinizacija), odnosno dobijanje ćelijske suspenzije vršeno je dodatkom rastvora tripsina (0,5%) u EDTA-PBS 0,1% puferu (*Ethylenediaminetetraacetic acid-Phosphate Buffered Saline*), nakon čega je usledila inkubacija ćelija na temperaturi 37 °C, tokom 5 minuta. Zaustavljanje enzimske reakcije postignuto je dodatkom medijuma sa serumom, čije komponente inaktiviraju enzimsku aktivnost tripsina. Usledilo je centrifugiranje ćelijske suspenzije na 1500 obrtaja/minuti, tokom 10 minuta, a ćelijski sediment je, potom, resuspendovan u svežem medijumu. Određeni su broj ćelija i ćelijska vijabilnost. U daljim

ispitivanjima, korišćene su ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta, između trećeg i desetog presađivanja. U svim navedenim postupcima, moraju se koristiti aseptične tehnike kako ne bi došlo do mikrobiološke kontaminacije materijala [249, 250].

3.2.2. Određivanje citotoksičnosti ispitivanih supstanci

Citotoksično dejstvo celekoksiba, decitabina, silibinina, henodeoksiholne i ursodeoksiholne kiseline, primenjenih pojedinačno ili u kombinacijama, prema A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskoj liniji, ispitano je testom odbacivanja boje i MTT testom.

3.2.2.1. Test odbacivanja boje

Test odbacivanja boje (*dye exclusion test*, DET), uz upotrebu rastvora tripan plavog, upotrebljen je za određivanje broja ćelija i njihove vijabilnosti. Test se zasniva na principu da su ćelijske membrane živih ćelija intaktne, pa ne dozvoljavaju ulazak boje tripan plavo, tačnije žive ćelije odbacuju boju. Naprotiv, tripan plavo može da prodre u nevijabilnu ćeliju, kojoj je narušen integritet ćelijske membrane, pri čemu se citoplazma nevijabilnih ćelija boji u plavo. I upravo je ovo način razlikovanja živih i mrtvih ćelija. U ogledima su upotrebljene samo vijabilne (žive) ćelije.

U ćelijsku suspenziju (50 μ L) dodat je rastvor tripan plavog (0,1%, 200 μ L) i obojene ćelije su izbrojane u Bürker-Türk hemocitometru na svetlosnom mikroskopu [251, 252].

Broj živih ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema navedenoj formuli, uz uzimanje u obzir razblaženja i dimenzija komore:

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

N – ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije, N_0 – broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra, 5 – faktor dilucije, 10^4 – korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u mL).

Broj živih ćelija i citotoksičnost (%) određeni su uz pomoć dva nezavisna ogleda, koji su urađeni u triplikatu, u skladu sa formulama:

$$\% \text{ vijabilnih ćelija} = (\text{broj vijabilnih ćelija} / \text{ukupan broj ćelija}) \times 100$$

$$\% \text{ citotoksičnosti} = [1 - (\text{broj vijabilnih ćelija} / \text{ukupan broj ćelija})] \times 100$$

Vijabilnost ćelija je bila veća od 90% i, kao takve, upotrebljene su za drugi deo eksperimenta.

3.2.2.2. MTT test

Antitumorska aktivnost tj. citotoksičnost prethodno navedenih supstanci evaluirana je kolorimetrijskim testom korišćenjem tetrazolijuma (MTT test), prema metodi po Mossmanu. Test se zasniva na razgradnji žuto obojenog 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT) do tamno plavog pigmenta formazana koji nije rastvorljiv u vodi. Metabolizam tetrazolijum soli se odvija isključivo u aktivnim mitohondrijama vijabilnih ćelija, posredstvom mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina formiranog formazana direktno je srazmerna broju vijabilnih ćelija u kulturi [253, 254].

Ćelije su sakupljene u eksponencijalnoj fazi rasta, potom su istaložene centrifugiranjem pri brzini od 200 x g, tokom 10 minuta, a zatim je ispitana njihova vijabilnost uz pomoć rastvora tripan plavog. U mikrotitar ploče sa 96 otvora posejane su vijabilne ćelije u oktuplikatu, tako da je u jednom otvoru bilo 90 μL medijuma i 5×10^3 ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama preinkubirane su na temperaturi 37 °C, u atmosferi sa 5% ugljen-dioksida, u periodu od 24 časova, kako bi se ćelije stabilisale pre dodatka ispitivanih supstanci. Po isteku stabilizacionog perioda, u sve otvore, osim u kontrolne, dodato je po 10 μL rastvora ispitivanih supstanci (celekoksib, decitabin, silibinin, henodeoksiholna i ursodeoksiholna kiselina), u rastućim koncentracijama, i mikrotitar ploče su inkubirane u periodu od 48 časova, na 37 °C, u atmosferi sa 5% ugljen-dioksida. U toku pilot eksperimenta, eksperimentalne grupe ćelija tretirane su rastvorima rastućih koncentracija ispitivanih supstanci: celekoksib (10; 25; 50; 100 i 200 μM), decitabin (0,5; 1; 5; 10 i 50 μM), silibinin (10; 50; 100; 250 i 500 μM), henodeoksiholna kiselina (10; 50; 100; 250 i 500 μM) i ursodeoksiholna kiselina (10; 50; 100; 250 i 500 μM). Svi rastvori su pripremani rastvaranjem ispitivanih supstanci u DMSO.

Rastvor boje MTT (5 mg/mL) pripremljen je neposredno pre izvođenja testa i dodat je u svaki otvor na mikrotitar ploči u zapremini od 10 μL , 3 časa pre kraja perioda inkubacije. Po isteku vremena inkubacije (48 časova), rastvor MTT i medijum su uklonjeni sukcijom, a, zatim, u svaki otvor je pipetirano po 100 μL hlorovodonične kiseline (HCl, 0,04 M) u izopropanolu, kako bi se rastvorili tamno plavi kristali formiranog formazana. Nekoliko minuta nakon rastvaranja kristala na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbanca na

spektrofotometrijskom čitaču za mikrotitar ploče Multiscan MCC340 (Thermo-Scientific, SAD), na test talasnoj dužini 540 nm i referentnoj talasnoj dužini 690 nm. Kao slepa proba koristili su se otvori koji su sadržavali kompletni medijum bez ćelijske kulture, u koji je, takođe, dodat MTT.

Citotoksičnost se izražava u procentima i izračunava se uz pomoć formule:

$$CI [\%] = (1 - A_U / A_K) \times 100$$

A_K – apsorbanca kontrolnih uzoraka (uzoraka ćelija u medijumu, bez dodatih supstanci), A_U – apsorbanca uzoraka sa ispitivanom supstancom.

Citotoksičnost pojedinačnih supstanci, na svakoj od ispitivanih ćelijskih kultura, izražena je kao IC_{50} vrednost, odnosno kao koncentracija supstance koja postiže 50% inhibicije ćelijskog rasta (*half maximal inhibitory concentration*) [255]. IC_{50} vrednost je određena analizom *Median effect*, uz pomoć Calcu Syn programa.

Nakon ispitivanja citotoksične aktivnosti pojedinačnih supstanci, na trima ćelijskim kulturama analizirana je citotoksičnost kombinovane primene odabrane koncentracije celekoksiba i decitabina, koja je za celekoksib iznosila 25 μ M, a za decitabin 1 μ M. Te koncentracije odgovaraju približnoj vrednosti IC_{20} - IC_{40} . Ispitana je citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa silibininom i žučnim kiselinama, kao i citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa silibininom i žučnim kiselinama. Trideset minuta pre tretmana ćelijskih linija celekoksibom koncentracije 25 μ M, odnosno pre tretmana decitabinom u koncentraciji od 1 μ M, ćelije su pretretirane rastućim koncentracijama silibinina (0; 5; 10; 25; 50 i 100 μ M), henodeoksiholne kiseline (0; 5; 10; 25; 50 i 100 μ M) i ursodeoksiholne kiseline (0; 5; 10; 25; 50 i 100 μ M). Nakon 48 časova, ispitivana su citotoksična dejstva, prema opisanoj proceduri. Ćelije su zasejane u oktuplikatu, a postupak je ponovljen putem dva nezavisna eksperimenta (test I i test II).

Kontrola kvaliteta pri izvođenju testa:

- vijabilnost zasejanih ćelija bila je veća od 90%, određena DET testom;
- upotrebljene su ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta, u broju ćelija koji je obezbeđivao takav rast ćelija tokom trajanja eksperimenta (5×10^3 ćelija/otvoru);
- koeficijent varijacije u kontrolnim i eksperimentalnim grupama bio je niži od 15%, a uglavnom se kretao ispod 10%;

- apsorbanca (A) kontrole (netretirane ćelije u medijumu) bila je najmanje tri puta veća od srednje vrednosti A slepe probe (samo medijum).

3.2.3. Priprema uzoraka ćelijskih linija za genetska i biohemijska ispitivanja

Nakon ispitivanja i utvrđenog citotoksičnog dejstva pojedinačnih supstanci i njihovih kombinacija, ćelije su tretirane odabranim koncentracijama ispitivanih supstanci, kako bi se uzorci pripremili za dalje genetske i biohemijske analize. U flaskone od 25 cm² zasejano je 1x10⁶ A549, HT-29 i MRC-5 ćelija i kultivisano poštujući prethodno opisane procedure i uslove. Nakon postizanja konfluentnosti, eksperimentalne grupe A549, HT-29 i MRC-5 ćelija su pretretirane dodavanjem 25 µM silibinina, 15 µM henodeoksiholne kiseline, odnosno 25 µM ursodeoksiholne kiseline, rastvorenih u DMSO, 30 minuta pre dodavanja celekoksiba rastvorenog u DMSO u koncentraciji od 25 µM, odnosno 30 minuta pre dodavanja DMSO rastvora decitabina koncentracije 1 µM. Ove koncentracije kombinacija supstanci su odabrane kao klinički relevantne, a kojima je postignuta manja IC vrednost od IC₅₀ vrednosti. Negativnoj kontrolnoj grupi dodat je samo DMSO, a pozitivnim kontrolnim grupama (grupa celekoksib, odnosno grupa decitabin) dodat je DMSO 30 minuta pre dodavanja celekoksiba, odnosno decitabina. Dakle, za sve tri ćelijske linije, definisano je po devet eksperimentalnih grupa:

- Kontrola
- Celekoksib 25 µM
- Celekoksib 25 µM + Silibinin 25 µM
- Celekoksib 25 µM + CDCA 15 µM
- Celekoksib 25 µM + UDCA 25 µM
- Decitabin 1 µM
- Decitabin 1 µM + Silibinin 25 µM
- Decitabin 1 µM + CDCA 15 µM
- Decitabin 1 µM + UDCA 25 µM

Nakon tretmana ćelija u trajanju od 48 časova, medijum je dekantovan i ćelije (prosečno 2-3x10⁶ ćelija/mL) su isprane pomoću PBS pufera. Ćelije su lizirane u sveže pripremljenom rastvoru za liziranje, koji predstavlja smešu 600 µL lizirajućeg pufera, koji sadrži gvanidin tiocijanat, i 4,2 µL β-merkaptetanola. Navedeni reagensi su deo seta reagenasa za izolaciju RNA, Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies, SAD).

Neophodno je ovom smešom potpuno prekriti sloj ćelija u flaskonu [256]. Nakon kolekcije ćelijskog lizata u sterilne mikrotube, potrebno je lizat dobro promešati (vorteksovati), kako bi homogenizacija bila potpuna i lizat posedovao nizak viskozitet. Visok viskozitet smanjuje prinos RNA i povećava kontaminaciju sa DNA. U ovom koraku, zahvaljujući dejstvu gvanidin tiocijanata, dolazi do denaturacije ćelijskih proteina i inaktivacije ribonukleaza (RNaza), koje predstavljaju problem pri izolaciji RNA. Radi se o veoma stabilnim enzimima koji su ubikvitarno prisutni endogeno, u samom uzorku, ali i egzogeno, na radnim laboratorijskim površinama. Dobijeni ćelijski lizat je čuvan na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do izolacije RNA i reverzne transkripcije.

Za biohemijske analize, nakon tretmana ćelija u trajanju od 48 časova, ćelijska suspenzija je pripremana dodavanjem rastvora tripsina (0,5%, 500 μL) na sloj ćelija i inkubiranjem na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 minuta. Ćelijska suspenzija je, potom, resuspendovana u DMEM-u sa dodatkom FBS (10%), a zatim je centrifugirana pri brzini od 1500 obrtaja/minuti, tokom 10 minuta. Dobijeni ćelijski sediment (oko 1×10^6 ćelija/mL) je resuspendovan u 5 mL PBS pufera. Direktno iz uzoraka ćelijskih suspenzija urađeno je ispitivanje intenziteta lipidne peroksidacije. Analize aktivnosti enzima antioksidativne odbrane izvedene su iz uzoraka citosolnih frakcija koje su pripremane dodavanjem 2,5 μg digitonina (Sigma-Aldrich, Nemačka) na 1×10^6 ćelija i postupkom centrifugiranja na brzini od 4000 obrtaja/minuti, tokom 10 minuta. Nakon postupka centrifugiranja, prikupljen je supernatant, koji je čuvan na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momenta ispitivanja enzimske aktivnosti.

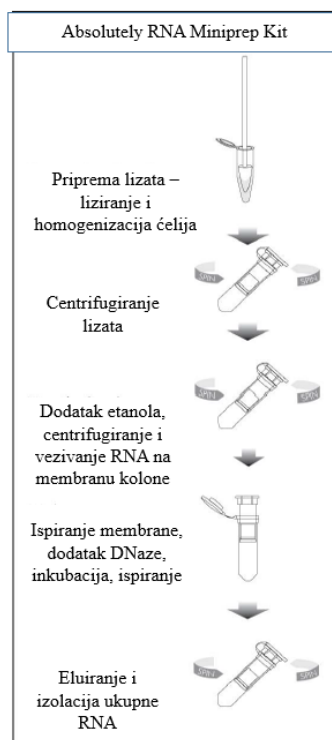
3.2.4. Analiza genske ekspresije

Analiza genske ekspresije urađena je metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu, uz reverznu transkriptazu (*quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, qRT-PCR). Prvi korak se zasnivao na izolaciji RNA iz uzoraka pripremljenih ćelijskih lizata, a zatim su sintetisane komplementarne DNA (cDNA) metodom reverzne transkripcije, i, primenom gen-specifičnih oligonukleotidnih prajmera, određena je količina ciljanih mRNA, odnosno izvršena je kvantifikacija genske ekspresije.

3.2.4.1. Izolacija, određivanje koncentracije i ispitivanje kvaliteta izolovane RNA

RNA je izolovana iz uzoraka A549, HT-29 i MRC-5 ćelija pomoću komercijalnog seta reagenasa Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent Technologies, SAD), koji je pripremljen i upotrebljen prema uputstvu proizvođača. Ovaj set sadrži neophodne reagense, membranozne kolone (filter membrane) i tube za izolaciju ukupne RNA. Nakon odmrzavanja prethodno pripremljenog ćelijskog lizata, izvršen je transfer dobijenog homogenata na filter kolonu *Prefilter Spin Cup*, koja je bila uklopljena u tubu zapremine 2 mL. Vršeno je centrifugiranje pri brzini 12 000 x g, 5 minuta, na temperaturi 4 °C, pri čemu su na koloni ostali ostaci ćelija, a za dalju proceduru zadržan je filtrat, koji sadrži RNA. U filtrat je dodata približno jednaka zapremina etanola (70%) u cilju precipitacije i vezivanja RNA. Smeša je vorteksovana kako bi se potpuno pomešao filtrat sa etanolom, nakon čega je dobijena smeša prebačena na filter kolonu *RNA Binding Spin Cup*, koja je bila uklopljena u tubu zapremine 2 mL. Usledilo je centrifugiranje pri brzini 12 000 x g, tokom 1 minuta, na temperaturi 4 °C. Nakon ovog koraka, uklonjen je filtrat, a zadržana je filter kolona, koja je premeštena u novu tubu zapremine 2 mL. Na filter kolonu dodato je 600 µL pufera *Low-Salt Wash Buffer* i izvršeno je centrifugiranje pri brzini 12 000 x g, 1 minut, na temperaturi 4 °C. Filtrat je uklonjen, a filter kolona je uklopljena u novu tubu i ponovljeno je centrifugiranje pri istim uslovima, tokom 2 minuta. U cilju uklanjanja eventualno prisutne DNA, na filter membranu je dodat sveže pripremljen rastvor deoksiribonukleaze (DNaze), koji je dobijen mešanjem 50 µL DNaze pufera (*DNase Digestion Buffer*) i 5 µL rekonstituisane DNaze I (*RNase-Free DNase I*). Tube su inkubirane u termobloku na temperaturi 37 °C, 15 minuta. U narednim koracima, filter membrana, koja sadrži vezanu RNA, je isprana puferima (prvo sa 600 µL *High-Salt Wash Buffer*, zatim sa 600 µL *Low-Salt Wash Buffer* i, na kraju, sa 300 µL *Low-Salt Wash Buffer*) i, posle dodavanja svakog pufera, filter membrana je centrifugirana tokom 1 minuta (u poslednjem koraku 2 minuta, u cilju potpunog sušenja membrane) pri brzini 12 000 x g, na temperaturi 4 °C. Ispiranje filter membrane puferom *High-Salt Wash Buffer*, koji sadrži guanidin tiocijanat, eliminiše eventualno zaostale ili naknadno unete RNaze, a poslednje centrifugiranje omogućava uklanjanje preostalog etanola sa kolone, čije prisustvo u izolatu RNA izaziva inaktivaciju enzima reverzne transkriptaze i onemogućava sintezu cDNA. Filter membrana je postavljena u sterilnu *safe-lock* mikrotubu (1,5 mL) i usledio je korak elucije, u kojem je na filter membranu sa vezanom RNA pipetirano 2 x 50 µL, odnosno 100 µL pufera za eluciju (*Elution Buffer*), zatim inkubacija 2 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiranje tokom 1 minuta, pri brzini 12 000 x g i temperaturi 4 °C. Dobijen je prečišćen rastvor ukupne

RNA u elucionom puferu (slika 3.1), koji je, za dalje analize, čuvan na temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [257].

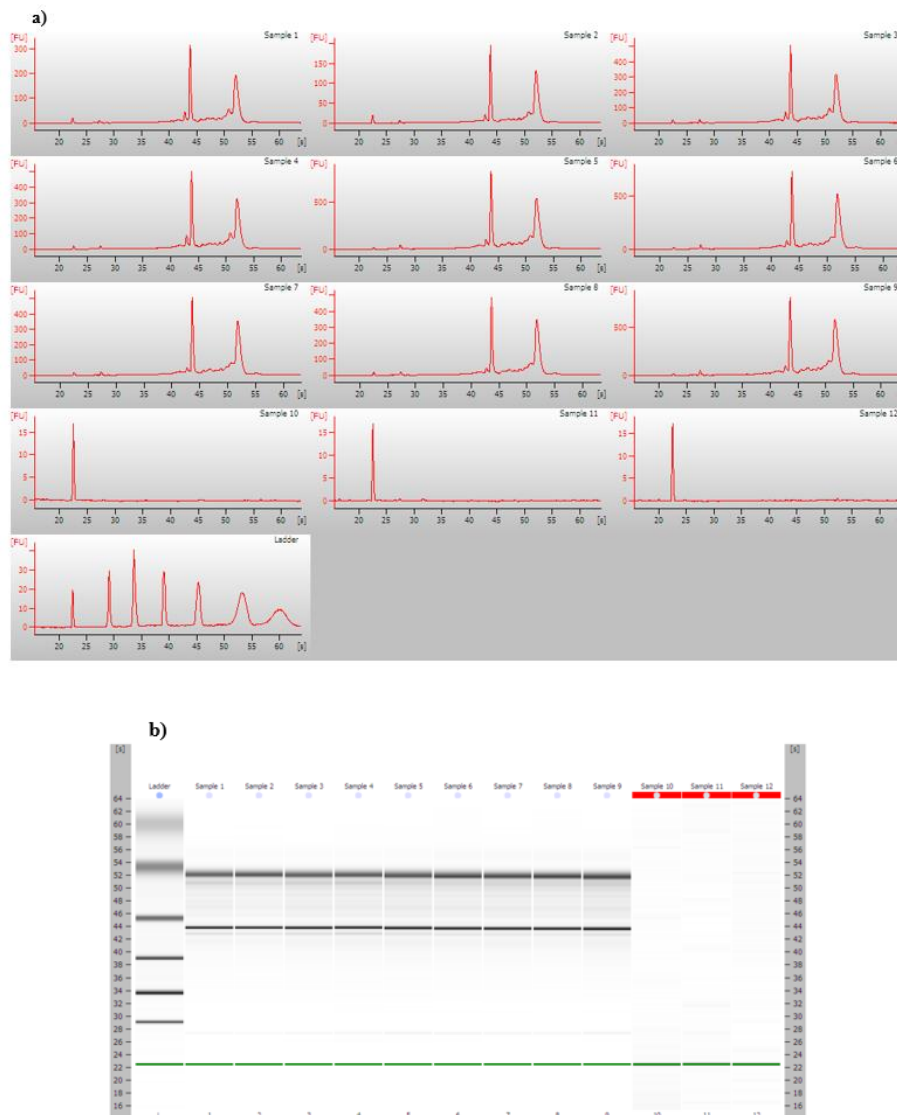


Slika 3.1. Prikaz izolacije ukupne RNA iz uzoraka ćelija pomoću komercijalnog seta reagenasa (*preuzeto i modificirano iz [257]*).

Određivanje koncentracije i čistoće izolovane RNA urađeno je metodom spektrofotometrije, na aparatu BioSpec-Nano (Shimadzu Corporation, Japan), koji omogućava tzv. *nanodrop* tehnologiju. DNA i RNA pokazuju istaknuti maksimum apsorpcije UV svetlosti talasne dužine od 260 nm, pa se očitavanjem apsorbance na toj talasnoj dužini može odrediti koncentracija izolovane RNA. Kao slepa proba koristio se pufer za eluciju RNA, upotrebljen pri izolaciji RNA. Ovaj spektrofotometar pruža podatke o koncentraciji izolovane RNA izraženoj u $\text{ng}/\mu\text{L}$, uz upotrebu veoma malog, mikrolitarskog uzorka ($0,5\text{--}2\ \mu\text{L}$). Računanjem odnosa apsorbanci na talasnim dužinama 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}), kao i odnosa apsorbanci na 260 i 230 nm (A_{260}/A_{230}), može se utvrditi čistoća izolovane RNA. Očitavanje ovih odnosa je važno s obzirom na činjenicu da na talasnoj dužini od 280 nm svojstvo apsorpcije pokazuju fenoli i proteini, inače mogući kontaminanti, a na talasnoj dužini od 230 nm apsorbuju organska jedinjenja, poput EDTA, ugljenih hidrata, gvanidina i fenola. Uzorci RNA u kojima je odnos A_{260}/A_{280} pokazivao vrednost veću od 1,8 i odnos A_{260}/A_{230} vrednost veću od 2 smatrani su uzorcima čiste izolovane RNA, koja se dalje može koristiti za

sintezu cDNA i amplifikaciju [258-260]. Svi uzorci RNA izolovani iz eksperimentalnih grupa A549, HT-29 i MRC-5 ćelija ispunili su navedene zahteve za čistoću izolovane RNA.

Provera kvaliteta, tačnije integriteta izolovane RNA izvršena je tehnologijom „laboratorija na čipu” upotrebom uređaja Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, SAD) i seta Agilent RNA 6000 Nano Kit, prema uputstvima proizvođača, uz korišćenje 1-4 μL uzorka izolovane RNA. Ovaj uređaj vrši kvantifikaciju 28S i 18S rRNA. Metoda je bazirana na mikrokapilarnoj elektroforezi na čipu i laserski indukovanoj fluorescentnoj spektroskopiji. RNA izolati i standard RNA (*RNA ladder*, fragmenti poznate koncentracije i veličine), u zapremini od 1 μL , preneti su na test pločicu, čija je unutrašnjost izgrađena od međusobno povezanih mikrokanala ispunjenih puferom, gelom i bojom. Nakon postavljanja uzoraka i standarda (markera), pločica se integriše u električno kolo u aparatu. Negativno naelektrisani molekuli RNA kreću se elektroforetski u zavisnosti od voltažnog gradijenta. Fragmenti RNA se razdvajaju metodom elektroforeze na gelu, u vidu traka, na osnovu odnosa mase i naelektrisanja. Boja se ugrađuje u RNA molekule, koji se, potom, detektuju i kvantifikuju preko merenja laserom-indukovane fluorescencije. Dobijeni podaci se prezentuju u vidu virtuelnog gela i elektroferograma, a pomoću softvera se izračunava RIN vrednost (*RNA integrity number*), koja predstavlja meru za kvalitet izolovane RNA. RIN vrednost je izračunata na osnovu eventualnog prisustva ili odsustva, kao i distribucije fragmenata RNA. RIN imaju vrednosti od 1 (u potpunosti fragmentisana RNA) do 10 (potpuno očuvana RNA). Vrednosti RIN veće od 5 se prihvataju kao adekvatne i pogodne za dalja molekularna ispitivanja [261, 262]. U ovom istraživanju, vrednosti RIN kretale su se u intervalu 8,3-9,0 za RNA izolovane iz A549 ćelija, 7,8-8,3 za RNA izolovane iz HT-29 ćelija i 7,9-8,7 za RNA ekstrahovane iz MRC-5 ćelija, dakle uzorci RNA izolata su bili minimalno fragmentisani i u potpunosti prihvatljivi za izvođenje reverzne transkripcije i qRT-PCR metode. Na slici 3.2. prikazan je primer elektroferograma i virtualnog gel prikaza izolovane RNA iz uzoraka A549 ćelija.



Slika 3.2. Elektroferogrami (a) i virtualni gel prikazi (b) izolovane RNA iz uzoraka A549 ćelija.

3.2.4.2. Postupak reverzne transkripcije

Za ispitivanje ekspresije gena, pre izvođenja metode qRT-PCR, neophodno je „prepisati” mRNA u cDNA. Sinteza cDNA iz svakog uzorka izolovane RNA izvedena je uporebom komercijalnog seta reagenasa AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, SAD), u skladu sa uputstvom proizvođača. Za izvođenje reverzne transkripcije, upotrebjeno je 1 μ g izolovane RNA iz uzoraka ćelija, što je omogućilo normalizaciju i rad sa istovetnim koncentracijama RNA. cDNA je sintetisana iz mRNA upotrebom enzima reverzne transkriptaze, koji u ovom setu predstavlja genetskim inženjeringom dobijenu verziju

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), uz dodatak inhibitora RNaza. Reverzna transkripcija je izvršena pomoću kombinacije jednakih količina nespecifičnih oligo(dT) prajmera i *random* nonamera. U reakcionu smešu dodati su i *cDNA Synthesis Master Mix*, koji sadrži pufer, magnezijum-hlorid i deoksiribonukleotid-trifosfate (dNTP), kao i RNaze-free voda do finalnog volumena od 20 µL. Prajmeri oligo(dT) jesu sekvence deoksitimidin (dT) nukleotida, a važni su za sintezu cDNA jer se hibridizuju sa poli(A) repom mRNA, dok *random* nonameri predstavljaju sekvence od 9 nasumičnih deoksiribonukleotida. Postupak reverzne transkripcije se odvijao u mikrotubama *safe-lock* zapremine 1,5 mL na termobloku, tokom sledećih koraka: 5 minuta na temperaturi 25 °C u cilju hibridizacije prajmera, zatim sinteza cDNA tokom 45 minuta na temperaturi 42 °C i, na kraju, 5 minuta na temperaturi 95 °C u cilju završetka reakcije sinteze cDNA. Pripremljena cDNA je skladištena na temperaturi -20 °C, do postupka izvođenja qRT-PCR metode [263].

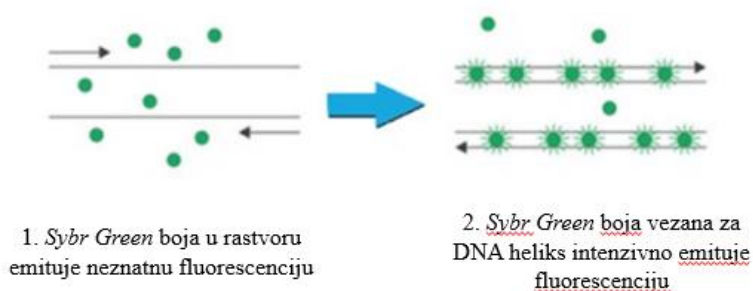
3.2.4.3. Izvođenje metode qRT-PCR

Nakon izvedene izolacije RNA iz uzoraka ćelija i sinteze cDNA, urađena je kvantifikacija ekspresije ispitivanih gena metodom qRT-PCR. Cilj merenja, odnosno kvantifikacije ekspresije gena jeste poređenje ekspresije gena od interesa između eksperimentalnih grupa i kontrolne, netretirane grupe.

PCR metoda je zasnovana na amplifikaciji sekvence nukleinske kiseline i sastoji se iz tri faze, tačno determinisanog trajanja i visine temperature: 1. denaturacija, koja predstavlja razdvajanje DNA lanaca, 2. hibridizacija prajmera/oligonukleotidnih graničnika i 3. faza elongacije, u toku koje enzim DNA polimeraza sintetiše dvolančanu DNA u regionu definisanom prajmerima. Metoda qRT-PCR se bazira na detekciji i merenju intenziteta signala fluorescencije, koji se intenzivira proporcionalno sa akumulacijom proizvoda u svakom ciklusu umnožavanja (amplifikacije).

Tehnika qRT-PCR metode, upotrebljena u eksperimentima ove doktorske disertacije, podrazumevala je upotrebu DNA-vezujuće fluorescentne boje *SYBR Green*. Ova boja se vezuje za dvolančanu DNA i, nakon laserski indukovane ekscitacije, fluorescira u stepenu proporcionalnom broju kopija dvolančane DNA. Sa svakim ciklusom PCR amplifikacije fragmenata povećava se intenzitet fluorescencije (slika 3.3). S obzirom na činjenicu da boja *SYBR Green* pokazuje fluorescenciju samo kada je inkorporirana u dvolančanu DNA molekulu, tokom početnih qRT-PCR ciklusa fluorescentni signal je uglavnom veoma slabog

intenziteta i ne može biti detektovan, odnosno, praktično je na nivou signala kojeg emituje negativna kontrola u kojoj se ne nalazi uzorak (*non-template control*, NTC). U toku eksponencijalne faze, qRT-PCR fluorescentni signal se udvostručuje sa svakim ciklusom, nakon čega nastaje linearna faza, u kojoj je smanjena brzina reakcije amplifikacije zbog redukovane količine enzima DNA polimeraze. U trenutku kada je količina slobodne DNA polimeraze nedovoljna za nastavak amplifikacije, intenzitet fluorescentnog signala doseže plato, što sugeriše na činjenicu da je proces qRT-PCR postigao status saturacije amplifikovanim, odnosno umnoženim DNA produktom.



Slika 3.3. SYBR Green tehnika u qRT-PCR metodi (preuzeto i modifikovano iz [264]).

Detekcija qRT-PCR amplifikacije izvodi se u eksponencijalnoj fazi, u kojoj je reakcija PCR amplifikacije precizna, specifična i u kojoj se DNA amplifikacija dešava najbrže. Vrednost „praga” fluorescencije (*threshold*) predstavlja nivo fluorescencije koji treba da se detektuje za svaki uzorak i postavlja se u eksponencijalnom delu reakcije, a potom se softverom aparata detektuju i analiziraju podaci o broju PCR ciklusa koji su potrebni za dostizanje zahtevanog nivoa fluorescencije. Taj broj PCR ciklusa se naziva prag ciklusa i označava kao Ct vrednost (*cycle threshold*). Ispitivani uzorci se međusobno razlikuju u pogledu broja PCR ciklusa koji je neophodan za dostizanje zadate vrednosti fluorescencije. Ukoliko je veća početna količina nekog gena u ispitivanom uzorku, potreban je manji broj PCR ciklusa za dostizanje zadate vrednosti fluorescencije, pa je manja Ct vrednost, i obrnuto. Kvantifikacija ekspresije gena zasnovana je na postojanju linearne zavisnosti između dobijene Ct vrednosti i logaritma inicijalne koncentracije uzorka, odnosno mRNA za ispitivani gen. U cilju eliminisanja varijabilnosti u kvalitetu i inicijalnoj koncentraciji RNA, kao i u efikasnosti sinteze cDNA, nivo ekspresije ciljanog, ispitivanog gena je normalizovan u odnosu na nivo referentnog gena, koji ima ulogu endogene kontrole. Referentni (*housekeeping*) geni

predstavljaju gene koji pokazuju konstitutivnu i stabilnu ekspresiju u svim tkivima i ćelijama, nezavisnu od načina izvođenja eksperimenta.

Za svaki uzorak utvrđuje se razlika broja ciklusa potrebnih da se dostigne isti nivo fluorescencije:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gena od interesa} - Ct \text{ referentnog gena}$$

Na osnovu dobijene razlike, izračunava se količina mRNA za svaki ispitivani gen, odnosno nivo ekspresije ispitivanog gena.

U eksperimentima ove doktorske disertacije, mereni su nivoi ekspresije gena od interesa pomoću qRT-PCR metode, uz upotrebu Power SYBR Green PCR Master Mix seta (Applied Biosystems, SAD), koji sadrži sve komponente koje su potrebne za PCR reakciju: Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerazu, pufer, smešu dNTP, jone magnezijuma, dejonizovanu sterilnu vodu *PCR grade* stepena čistoće, fluoroforu *SYBR Green*, kao i inertnu boju ROX, čija se fluorescencija ne menja tokom trajanja reakcije i u odnosu na koju se normalizuje fluorescencija boje *SYBR Green* [265]. Kao referentni gen korišćen je gen za β -aktin, *ACTB*. Za referentne i ciljane, ispitivane gene dizajnirani su oligonukleotidni graničnici (prajmeri), koristeći softver Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, SAD) i strategiju povezivanja egzona, kako bi se izbeglo umnožavanje genomske DNA. *In silico* testiranjem, uz pomoć programa NCBI Primer-BLAST, isključena je homologija kreiranih sekvenci prajmera sa pseudogenima i drugim nepoželjnim hibridizacionim metama. U tabeli 3.1. prikazana je lista prajmera za humane gene koji su korišćeni u qRT-PCR analizi, a koji su sintetisani u kompaniji Invitrogen, SAD. Analizirana je ekspresija 22 gena u uzorcima A549, HT-29 i MRC-5 ćelija.

Reakcione ploče, plejtovi sa 96 otvora, bile su pripremljene i sadržavale su reakcione smeše ispitivanih uzoraka, ispitanih u triplikatu. Reakciona smeša finalnog volumena 20 μ L sastojala se iz 10 μ L Power SYBR Green Master Mix-a, 5 μ L prethodno sintetisane cDNA i 5 μ L smeše 2,4 μ M *forward* i *reverse* prajmera. Takođe, u reakcijama su postavljane i negativne kontrole (NTC), odnosno kontrole bez matrice cDNA, a koje su značajne u detekciji eventualno prisutne PCR kontaminacije i pojave dimera prajmera. U otvore za negativne kontrole je, umesto uzorka cDNA, pipetirano 5 μ L sterilne vode za molekularnu genetiku (Sigma-Aldrich, Nemačka). qRT-PCR analiza izvedena je na *real-time* PCR uređaju SaCycler-96 (Sacace Biotechnologies, Italija), uz početnu denaturaciju na 95 °C tokom 10 minuta, a, zatim, amplifikaciju od 40 ciklusa. Svaki ciklus se sastojao od denaturacije na 95

°C tokom 15 sekundi, hibridizacije i elongacije na 60 °C u trajanju od 1 minuta. Detektovani signal fluorescencije nastalih produkata PCR amplifikacije je automatski analiziran softverskim paketom instaliranom u PCR uređaju.

Broj kopija ispitivanog gena u ampliconu izražen je aritmetičkom formulom $2^{-\Delta Ct}$, pri čemu je:

$$\Delta Ct = Ct \text{ ispitivanog gena} - Ct \text{ referentnog gena}$$

Relativna kvantifikacija genske ekspresije izvršena je i pomoću tzv. komparativne $\Delta\Delta Ct$ metode, koja prikazuje koliko je puta ekspresija ispitivanog gena u eksperimentalnoj grupi veća ili manja u odnosu na ekspresiju istog gena u kontrolnoj grupi:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ eksperimentalne grupe} - \Delta Ct \text{ kontrolne grupe}$$

Ekspresija ispitivanog, ciljanog gena u eksperimentalnoj grupi, normalizovana u odnosu na referentni *housekeeping* gen, u odnosu na gensku ekspresiju u kontrolnoj grupi, analizira se komparativnom $\Delta\Delta Ct$ metodom i izražava aritmetičkom formulom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [266].

Tabela 3.1. Sekvence prajmera korišćenih u qRT-PCR analizi genske ekspresije.

| Redni broj | Gen | Sekvenca prajmera (5' → 3') | Naziv gena |
|------------|--------------|---|---|
| 1. | <i>PTGS2</i> | F CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA R GCCCTCGCTTATGATCTGTC | <i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Homo sapiens)</i> |
| 2. | <i>PTGES</i> | F GAAGAAGGCCTTTGCCAAC R GGAAGACCAGGAAGTGCATC | <i>prostaglandin E synthase-1 (Homo sapiens)</i> |
| 3. | <i>HPGD</i> | F TGGAACCTATCTTGGTTTGGGA R GATTAGCAGCCAACGCTG | <i>15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (Homo sapiens)</i> |
| 4. | <i>NFκB</i> | F CACAAGGAGACATGAAACAGC R CCAGAGACCTCATAGTTGTCCA | <i>nuclear factor kappa B (Homo sapiens)</i> |
| 5. | <i>PTEN</i> | F AAATTTAATTGCAGAGTTGCACA R GCTATAATAATACACATAGCGCCTCT | <i>phosphatase and tensin homolog (Homo sapiens)</i> |
| 6. | <i>TP53</i> | F TGCTCAGATAGCGATGGTCT R ACAGTCAGAGCCAACCTCAG | <i>tumor protein 53 (Homo sapiens)</i> |
| 7. | <i>BCL2</i> | F GATTTCAGGAGAGCCTTGTCT R GTATAGCTCCTGTCTGTCCCTTA | <i>BCL2 apoptosis regulator (Homo sapiens)</i> |

| | | | |
|-----|---------------|---|---|
| 8. | <i>BAX</i> | F TTTGCTTCAGGGTTTCATCC R GCAATCATCCTCTGCAGCTC | <i>BCL2</i> associated <i>X</i> , apoptosis regulator (<i>Homo sapiens</i>) |
| 9. | <i>MMP2</i> | F TCACATACAGGATCATTGGCTAC R GAGTCCGTCCTTACCGTCAA | matrix metalloproteinase 2 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 10. | <i>MMP9</i> | F TCGTGGTTCCAACCTCGGTTT R CAGGAAAGTGAAGGGGAAGA | matrix metalloproteinase 9 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 11. | <i>CDH1</i> | F TAACATATCGGATTTGGAGAGAC R AGCAGAAGTGCCCTGTTC | cadherin 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 12. | <i>ABCC1</i> | F CCACACTGAATGGCATCAC R CACGGAGCCCTTGATAGC | multidrug resistance associated protein 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 13. | <i>SOD</i> | F CGTCACCGAGGAGAAGTACC R CTGATTTGGACAAGCAGCAA | superoxide dismutase (<i>Homo sapiens</i>) |
| 14. | <i>CAT</i> | F TCCACTGTTGCTGGAGAATC R ATGTCCGGATCCTTCAGATG | catalase (<i>Homo sapiens</i>) |
| 15. | <i>GST</i> | F GAGAGAGCCCTGATTGATATGTA R GCCAACAAGGTAGTCTTGTC | glutathione-S-transferase (<i>Homo sapiens</i>) |
| 16. | <i>FXR</i> | F ACAAAGTCATGCAGGGAGAA R GTACATGATTGGTTGCCATTTTC | farnesoid X nuclear receptor (<i>Homo sapiens</i>) |
| 17. | <i>SHP</i> | F TCCTCTCAACCCCGATGT R AAGAAGAGGTCCCAAGCAG | small heterodimer partner (<i>Homo sapiens</i>) |
| 18. | <i>ZEB1</i> | F GCCAAATGGAAATCAGGATG R TGCCTTTTTACAGATTCCACA | zinc finger E-box binding homeobox 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 19. | <i>DNMT1</i> | F GAGGAGCCGGACAGAGAAG R TTCATCCTCGTCTTTTTCATCA | DNA methyltransferase 1 (<i>Homo sapiens</i>) |
| 20. | <i>DNMT3A</i> | F TCCAAAGGTTTACCCACCTG R GTCCCCGACGTACATGATCT | DNA methyltransferase 3 alpha (<i>Homo sapiens</i>) |
| 21. | <i>DNMT3B</i> | F TGTAATCCAGTGATGATTGATGC R GGCTATCCTATTGTATTCCAAGCA | DNA methyltransferase 3 beta (<i>Homo sapiens</i>) |
| 22. | <i>ACTB</i> | F GGCATCCTCACCTGAAGTA R ACATGATCTGGGTCATCTTCTC | actin beta (<i>Homo sapiens</i>) |

3.2.5. Biohemijske analize oksidativnog statusa

U cilju određivanja oksidativnog statusa u eksperimentalnim grupama A549, HT-29 i MRC-5 ćelija, određeni su intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnosti enzima antioksidativne odbrane: superoksid dismutaze, katalaze, glutation-S-transferaze i glutation peroksidaze. Sve analize bile su zasnovane na metodi spektrofotometrije, uz korišćenje Agilent 8453 UV/VIS spektrofotometra (Agilent Technologies, SAD) sa multićelijskim, termostatiranim sistemom za pozicioniranje uzoraka i softverom za analizu enzimske kinetike. U cilju poređenja vrednosti dobijenih u ispitivanim grupama, svi rezultati specifične aktivnosti enzima izraženi su prema miligramu proteina.

3.2.5.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Princip metode: Određivanje koncentracije ukupnih proteina u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama zasnivalo se na izvođenju Biuretske metode. Ova metoda je bazirana na reakciji peptidne veze proteina sa jonima bakra u alkalnoj sredini, pri čemu nastaje plavo-ljubičasto obojeni kompleks, čija se apsorbance očitava na 540 nm. Intenzitet nastale boje direktno je proporcionalan koncentraciji proteina [267]. Određivanje koncentracije ukupnih proteina izvedeno je pomoću komercijalnog seta reagenasa proizvođača Sentinel Diagnostics (Milano, Italija), u skladu sa uputstvima proizvođača.

Izvođenje analize: U 1 mL reagensa, koji sadrži 6 mmol bakar (II)-sulfata (CuSO_4), 6 mmol kalijum-jodida (KI) i 0,75 mmol natrijum-hidroksida (NaOH) i čiji je $\text{pH} \geq 10$, dodato je 10 μL ispitivanog uzorka. Osim reagensa, u slepu probu je dodato 10 μL destilovane vode, a u epruvetu za standard 10 μL standardnog rastvora albumina koncentracije 6 g/dL. Reakcione smeše u sve tri epruvete su dobro promešane i nakon 15 minuta očitane su apsorbance standarda (A_S) i uzorka (A_U), normalizovane u odnosu na slepu probu.

Izračunavanje rezultata:

Koncentracija ukupnih proteina = $(A_U/A_S) \times$ koncentracija standardnog rastvora (6 g/dL)

3.2.5.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Princip metode: U procesu lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, koje se nalaze u sastavu bioloških membrana, nastaje malondialdehid (MDA) koji reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA). MDA je pokazatelj, odnosno indikator lipidne

peroksidacije, stoga se koristi u proceni oksidativnog stresa u ćeliji. U kiseloj sredini i pri povišenoj temperaturi, MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, formirajući konjugat crvene boje, koji se određuje spektrofotometrijski jer pokazuje maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti talasne dužine od 535 nm [268].

Izvođenje analize: U 1 mL smeše TBA (0,375%) i trihlorsirćetne kiseline (TCA, 15%) u 0,25 M HCl dodato je 300 μ L uzorka ćelijske kulture. Reakciona smeša je izmešana pomoću vorteks mešalice i zagrevana je na vodenom kupatilu 15 minuta, na temperaturi od 90 °C. Nakon hlađenja na ledu tokom 5 minuta, epruvete su centrifugirane na 10 000 obrtaja/minuti, tokom 10 minuta, i izdvojen je supernatant. Koncentracija MDA određena je iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm, uz TBA/TCA/HCl reagens i destilovanu vodu kao slepu probu.

Izračunavanje rezultata:

$$C_{\text{MDA}} = \frac{(\Delta A_{\text{u}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10}{1,56 \times V_{\text{u}} \times C_{\text{p}}}$$

pri čemu je: ΔA_{u} – srednja vrednost apsorbanse uzorka, ΔA_{sp} – srednja vrednost apsorbanse slepe probe, V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL], V_{u} – zapremina uzorka [mL], C_{p} – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za formirani konjugat MDA-TBA iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija MDA se izražava u jedinicama nmol/mg proteina.

3.2.5.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Princip metode: U reakciji ksantina sa ksantin oksidazom generiše se superoksid anjon radikal, koji redukuje oksidovani citohrom c. Brzina redukcije prati se spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 550 nm. Superoksid dismutaza (SOD) katalizuje reakciju dismutacije superoksid anjon radikala, odnosno uklanjanje ove ROS i, na taj način, smanjuje brzinu redukcije citohroma c. Ovo smanjenje brzine redukcije je proporcionalno aktivnosti enzima SOD. Aktivnost SOD koja je potrebna za smanjenje brzine redukcije citohroma c za 50%, pri promeni apsorbanse od 0,025/minuti, definiše se kao jedinica aktivnosti SOD [269].

Izvođenje analize: Za ovu analizu pripremljeni su rastvor A (50 μ L 100 mmol EDTA, 50 μ L 30 mmol natrijum-azida (NaN_3), 500 μ L 5 mM ksantina, 200 μ L 5 mmol citohroma c, dopunjeno do 50 mL 0,1 M fosfatnim puferom čiji je pH 7,8) i rastvor B (400 μ L 1 mmol

EDTA, 3595 μL 0,1 M fosfatnog pufera pH 7,8 i 20 μL ksantin oksidaze aktivnosti 50 U/2 mL). U kivetu spektrofotometra pipetirano je 650 μL rastvora A, 200 μL uzorka i 50 μL rastvora B. Dodatkom rastvora B počinje reakcija i apsorbance se prati na 550 nm, tokom 3 minuta, na temperaturi 25 °C.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost SOD} = \frac{\Delta\text{Asp} \times 50 \times 1000}{\Delta\text{Au} \times 100 \times \text{Cp}}$$

pri čemu je: ΔAu – srednja vrednost promene apsorbance uzorka u minuti, ΔAsp – srednja vrednost promene apsorbance slepe probe u minuti, Cp – koncentracija ukupnih proteina u uzorku [mg/mL].

Specifična aktivnost SOD izražava se u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina.

3.2.5.4. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Princip metode: Ova spektrofotometrijska metoda se zasniva na praćenju brzine razgradnje vodonik peroksida (H_2O_2) na 240 nm u prisustvu enzima katalaze (CAT), jer upravo na toj talasnoj dužini vodonik peroksid pokazuje maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti. Smanjenje apsorbance na 240 nm tokom vremena proporcionalno je aktivnosti katalaze u uzorku [270].

Izvođenje analize: U 0,05 M fosfatni pufer pH vrednosti 7,0 dodat je 30% H_2O_2 u količini da apsorbance slepe probe na talasnoj dužini od 240 nm bude u opsegu 0,525-0,550. U 1,5 mL podešenog rastvora vodonik peroksida u fosfatnom puferu pipetirano je 10 μL uzorka, nakon čega započinje enzimski reakcija. Na temperaturi od 25 °C prati se pad apsorbance na 240 nm, tokom 3 minuta.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost CAT} = \frac{(\Delta\text{Au} - \Delta\text{Asp}) \times \text{Vrs} \times 1000}{43,6 \times \text{Vu} \times \text{Cp}}$$

pri čemu je: ΔAu – srednja vrednost promene apsorbance uzorka u minuti, ΔAsp – srednja vrednost promene apsorbance slepe probe u minuti, Vrs – zapremina reakcione smeše [mL], Vu – zapremina uzorka [mL], Cp – koncentracija ukupnih proteina u uzorku [mg/mL].

Specifična aktivnost CAT izražava se u jedinicama aktivnosti enzima na mg proteina.

3.2.5.5. Određivanje aktivnosti glutathion-S-transferaze (GST)

Princip metode: Enzim glutathion-S-transferaza (GST) katalizuje reakciju konjugacije tiolne grupe glutathiona sa 1-hloro-2,4-dinitro-benzenom (CDNB). Formirani konjugat CDNB-glutathion pokazuje maksimum apsorpcije na 340 nm, pa se merenjem promene apsorpcije na toj talasnoj dužini određuje aktivnost enzima GST [271].

Izvođenje analize: U epruvete za uzorak i slepu probu pipetirano je po 200 μL 0,5 M fosfatnog pufera pH vrednosti 6,5, zatim 20 μL 25 mM rastvora CDNB u koncentrovanom etanolu i 680 μL destilovane vode. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 $^{\circ}\text{C}$, u periodu od 10 minuta, u reakcionu smešu za uzorak pipetirano je 50 μL 20 mM redukovanog glutathiona i 50 μL uzorka ćelijske kulture, a u slepu probu 50 μL 20 mM redukovanog glutathiona i 50 μL destilovane vode. Promena apsorbanca na 340 nm je očitavana tokom 3 minuta.

Izračunavanje rezultata:

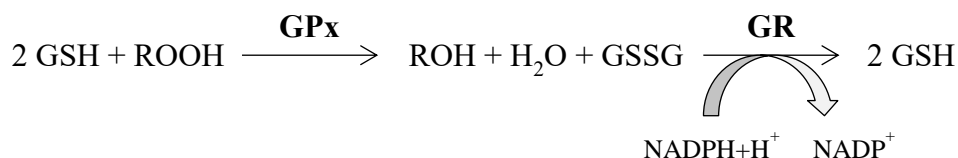
$$\text{Specifična aktivnost GST} = \frac{(\Delta A_u - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{9,6 \times V_u \times C_p}$$

pri čemu je: ΔA_u – srednja vrednost promene apsorbanca uzorka u minuti, ΔA_{sp} - srednja vrednost promene apsorbanca slepe probe u minuti, V_{rs} – zapremina reakcione smeše [mL], V_u – zapremina uzorka [mL], C_p – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za nastali konjugat CDNB-glutathion iznosi 9,6 $\text{Lmmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična aktivnost GST se izražava kao broj nmol konjugata CDNB-glutathion formiranog u minutu po mg proteina.

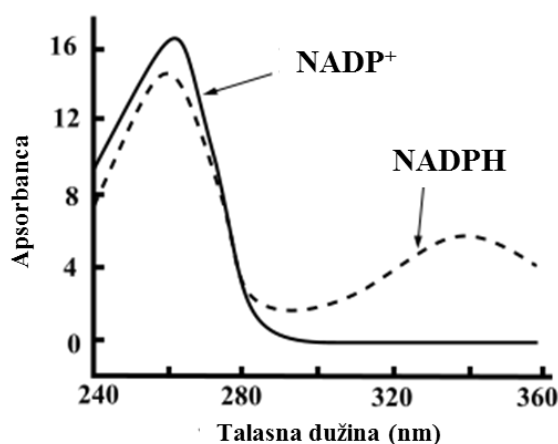
3.2.5.6. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx)

Princip metode: Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze (GPx) se zasniva na reakciji:



Enzim GPx katalizuje brzinu redukcije organskog peroksida (ROOH) uz redukovani glutathion (GSH), pri čemu nastaje oksidovani glutathion (G-S-S-G), koji se ponovo redukuje do oblika GSH u reakciji katalizovanoj enzimom glutathion reduktaza (GR), uz pomoć redukovanog

oblika koenzima nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH), koji ima ulogu donora redukcionih ekvivalenata. Aktivnost enzima GPx prati se indirektno, metodom spektrofotometrije, praćenjem pada vrednosti apsorbance u oblasti talasnih dužina od 300 do 365 nm (optički test), s obzirom na činjenicu da u toj oblasti samo redukovani oblik NADPH pokazuje sposobnost apsorpcije svetlosti, sa maksimumom apsorpcije na 340 nm, dok oksidovani oblik NADP⁺ ne pokazuje svojstvo apsorpcije svetlosti u toj oblasti talasnih dužina (slika 3.4) [272].



Slika 3.4. Princip određivanja aktivnosti GPx i GR merenjem pada apsorbance na talasnoj dužini 340 nm koja potiče od apsorpcionih svojstava koenzima NADPH.

Izvođenje analize: U epruvete se dodaje po 100 μ L rastvora GSH 1 mM, 500 μ L destilovane vode, 200 μ L rastvora NADPH 0,2 mM, 35 μ L rastvora EDTA 1 mM, 100 μ L fosfatnog pufera 0,5 M pH vrednosti 7, 35 μ L t-butil-hidroperoksida 30 mM i 50 μ L ispitivanog uzorka. Smeša je inkubirana na temperaturi 37 $^{\circ}$ C, tokom 10 minuta. Reakcija počinje dodatkom 1,7 μ L enzima GR aktivnosti 105 U/mg proteina. Pad apsorbance na 340 nm očitava se i beleži tokom 3 minuta. U slepu probu se pipetira 1,7 μ L destilovane vode, umesto GR.

Izračunavanje rezultata:

$$\text{Specifična aktivnost GPx} = \frac{(\Delta Au - \Delta Asp) \times Vrs \times 1000}{6,22 \times Vu \times Cp}$$

pri čemu je: ΔAu – srednja vrednost promene apsorbance uzorka u minuti, ΔAsp – srednja vrednost promene apsorbance slepe probe u minuti, Cp – koncentracija proteina u uzorku [mg/mL], Vrs – zapremina reakcione smeše [mL], Vu – zapremina uzorka [mL]. Molarni apsorpcioni koeficijent za NADP⁺ na 340 nm iznosi $6,22 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Specifična aktivnost GPx se izražava kao broj nmol koenzima NADPH oksidovanih u minutu, po mg proteina.

3.2.6. Statistička obrada rezultata

Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je standardnim statističkim metodama. Sve analize su urađene u triplikatu, a za statističku obradu uzete su srednje vrednosti rezultata analiza u triplikatu. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički, u vidu aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD). Određivanje stepena značajnosti razlika između dobijenih srednjih vrednosti parametara urađeno je jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa Takijevim *post-hoc* testom. Kao granica statističke značajnosti uzete su vrednosti $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$. Softverski paket SPSS (verzija 23; IBM, SAD) korišćen je u svim analizama ove disertacije.

4. REZULTATI

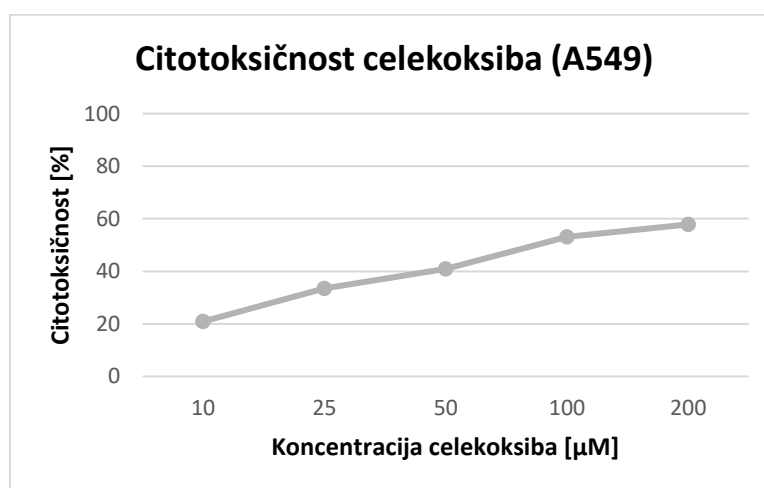
4.1. Rezultati *in vitro* studije na A549 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma pluća

4.1.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema A549 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost celekoksiba, selektivnog COX-2 inhibitora, prema A549 humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća prikazana je u tabeli 4.1. i na grafikonu 4.1. Utvrđeno je koncentracijski-zavisno smanjenje vijabilnosti i proliferativnog potencijala A549 ćelija, u intervalu ispitivanih koncentracija celekoksiba od 10 do 200 μM , nakon tretmana u trajanju od 48 časova. Izračunata vrednost IC_{50} , odnosno koncentracija koja izaziva citotoksičan efekat kod 50% ćelija, iznosila je 95,24 μM . Za ispitivanje udruženog citotoksičnog dejstva celekoksiba sa prirodnim agensima (silibininom i žučnim kiselinama), prema A549 ćelijskoj liniji, odabrana je koncentracija celekoksiba 25 μM , kojom se postigla citotoksičnost prema 33% ćelija (IC_{33}).

Tabela 4.1. Vrednosti citotoksične aktivnosti celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji.

| Celekoksib [μM] | 10 | 25 | 50 | 100 | 200 | IC_{50} |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 20,91 \pm 1,69 | 33,44 \pm 0,73 | 40,92 \pm 2,75 | 53,14 \pm 2,73 | 57,84 \pm 0,69 | 95,24 |



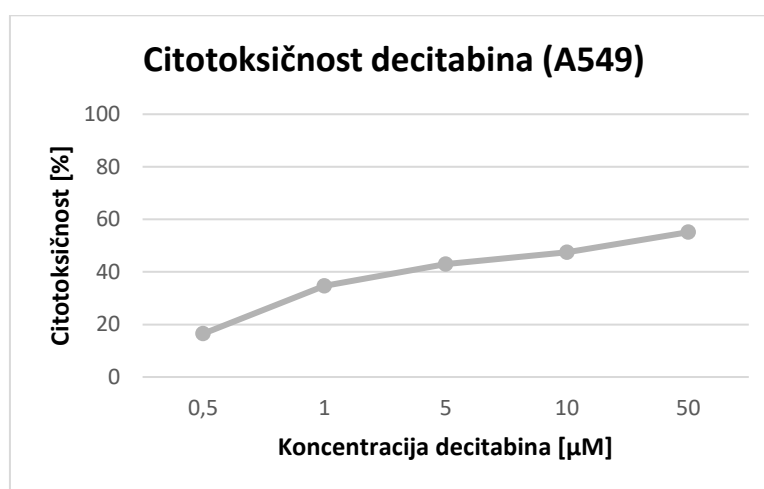
Grafikon 4.1. Citotoksično dejstvo celekoksiba prema A549 ćelijama.

Citotoksična aktivnost demetilacionog agensa decitabina (5-aza-2'-deoksicitidina) na ćelijskoj liniji A549 prikazana je u tabeli 4.2. i na grafikonu 4.2. Utvrđena je koncentracijski-zavisna citotoksična aktivnost decitabina nakon tretmana A549 ćelija, u opsegu ispitivanih

koncentracija (0,5-50 μM), u vremenskom periodu od 48 časova. Dobijeni rezultati ukazuju na izraženije citotoksično dejstvo decitabina u poređenju sa celekoksibom. Izračunata IC_{50} vrednost iznosila je 17,08 μM . Za dalja ispitivanja uticaja kombinacija decitabina sa prirodnim supstancama, odabrana je koncentracija decitabina 1 μM , kojom ovaj agens ispoljava citotoksičnu aktivnost prema približno 35% A549 ćelija (IC_{35}).

Tabela 4.2. Vrednosti citotoksične aktivnosti decitabina prema A549 ćelijskoj liniji.

| Decitabin [μM] | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 50 | IC_{50} |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 16,49 \pm 2,43 | 34,62 \pm 1,92 | 42,92 \pm 0,12 | 47,47 \pm 1,55 | 55,11 \pm 1,45 | 17,08 |

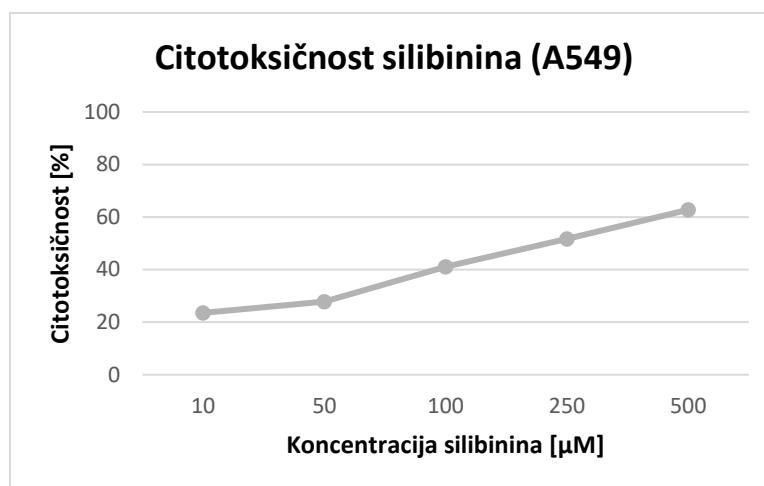


Grafikon 4.2. Citotoksično dejstvo decitabina prema A549 ćelijama.

U tabeli 4.3. i na grafikonu 4.3. predstavljen je uticaj silibinina, prirodnog flavonolignana, na vitalnost A549 ćelija, tokom 48-časovnog tretmana. Zapažen je koncentracijski-zavisan porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u intervalu koncentracija silibinina od 10 do 500 μM , pri čemu je IC_{50} vrednost iznosila 210,12 μM .

Tabela 4.3. Vrednosti citotoksične aktivnosti silibinina prema A549 ćelijskoj liniji.

| Silibinin [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC_{50} |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 23,55 \pm 0,77 | 27,82 \pm 1,32 | 41,13 \pm 0,68 | 51,69 \pm 0,52 | 62,77 \pm 2,87 | 210,12 |

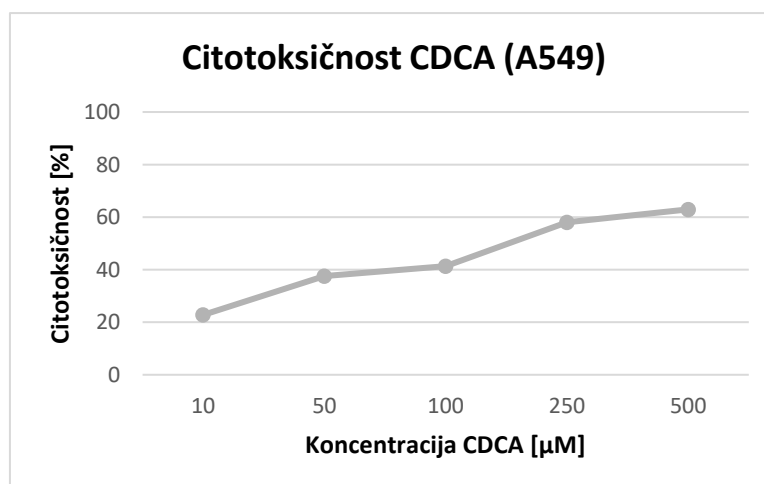


Grafikon 4.3. Citotoksično dejstvo silibinina prema A549 ćelijama.

Rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti henodeoksiholne kiseline (CDCA), prirodne hidrofobne žučne kiseline, prikazani su u tabeli 4.4. i na grafikonu 4.4. U opsegu ispitivanih koncentracija, od 10 do 500 μM, tokom 48 časova, CDCA je ispoljila rastuću citotoksičnu aktivnost. Vrednost IC₅₀ iznosila je 152,51 μM.

Tabela 4.4. Vrednosti citotoksične aktivnosti CDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

| CDCA [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC ₅₀ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 22,79 ± 1,83 | 37,55 ± 2,08 | 41,39 ± 1,36 | 58,05 ± 0,86 | 62,94 ± 0,26 | 152,51 |



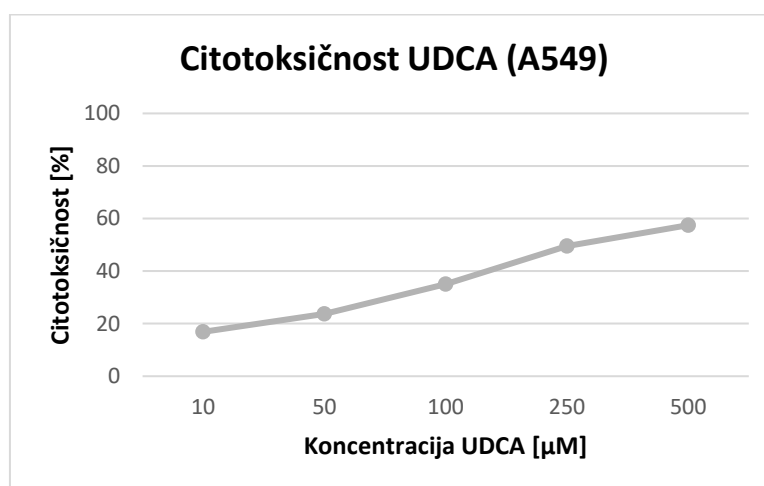
Grafikon 4.4. Citotoksično dejstvo CDCA prema A549 ćelijama.

U tabeli 4.5. i na grafikonu 4.5. prikazani su rezultati ispitivanja citotoksične aktivnosti prirodne hidrofilne žučne kiseline, ursodeoksiholne kiseline (UDCA), nakon tretmana ćelija koji je trajao 48 časova. Uočava se koncentracijski-zavisna citotoksičnost na A549 ćelijskoj liniji u opsegu ispitivanih koncentracija (10-500 μM). Izračunata IC₅₀

vrednost, odnosno koncentracija UDCA koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosila je 260,01 μM , što ukazuje na slabije citotoksično dejstvo ove hidrofilne žučne kiseline u poređenju sa hidrofobnom CDCA.

Tabela 4.5. Vrednosti citotoksične aktivnosti UDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

| UDCA [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC ₅₀ |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 16,89 \pm 1,02 | 23,70 \pm 0,20 | 35,04 \pm 0,73 | 49,58 \pm 0,43 | 57,48 \pm 1,24 | 260,01 |



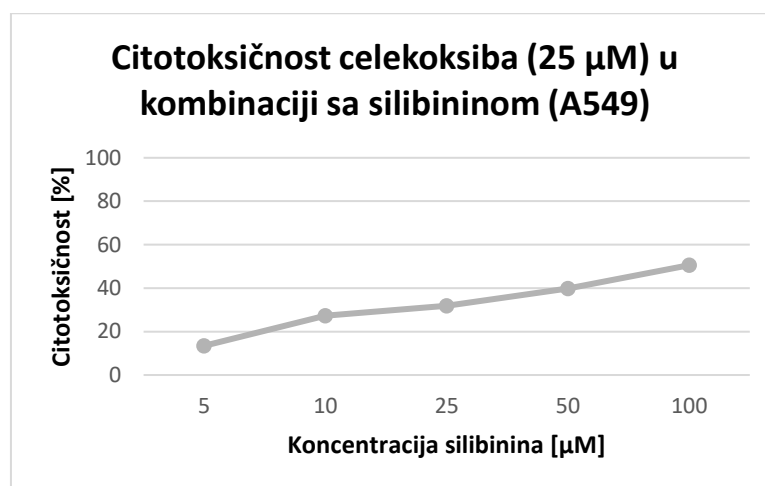
Grafikon 4.5. Citotoksično dejstvo UDCA prema A549 ćelijama.

4.1.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji

U cilju ispitivanja uticaja silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba, A549 ćelije su tretirane kombinacijom odabrane koncentracije celekoksiba (25 μM) i rastućih koncentracija silibinina (5-100 μM), u vremenskom periodu od 48 časova. Rezultati ispitivanja kombinovane primene prikazani su u tabeli 4.6. i na grafikonu 4.6. Za dalji tretman A549 ćelija, ispitivanja ekspresije gena i biohemijske analize, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i silibinina 25 μM , kojom se postiže približno IC₃₂.

Tabela 4.6. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | $13,45 \pm 1,13$ | $27,30 \pm 1,66$ | $31,93 \pm 1,71$ | $39,81 \pm 0,20$ | $50,55 \pm 3,24$ |

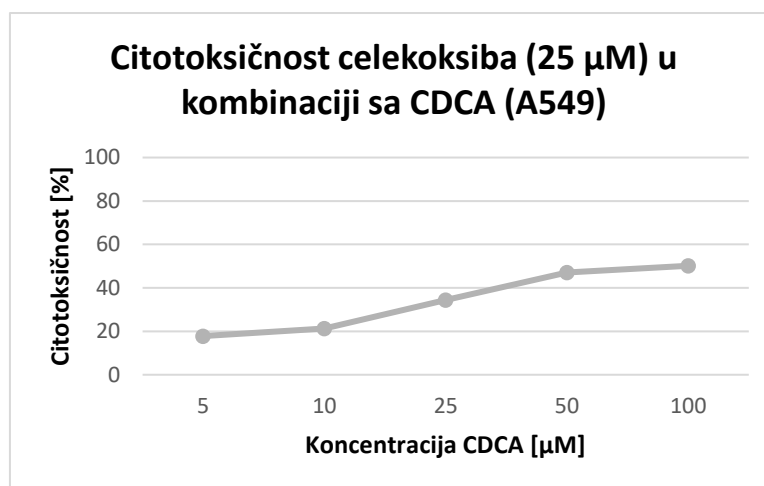


Grafikon 4.6. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.7. i na grafikonu 4.7. prikazani su rezultati ispitivanja kombinovane primene celekoksiba u koncentraciji od $25 \mu\text{M}$ i rastućih koncentracija CDCA ($5\text{-}100 \mu\text{M}$), u trajanju od 48 časova. Za dalje genetske i biohemijske analize, odabrana je kombinacija celekoksiba koncentracije $25 \mu\text{M}$ i CDCA koncentracije $15 \mu\text{M}$, koja dovodi do citotoksičnog efekta kod približno 30% A549 ćelija (IC_{30}).

Tabela 4.7. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | $17,80 \pm 2,68$ | $21,22 \pm 1,00$ | $34,33 \pm 1,98$ | $47,13 \pm 1,01$ | $50,16 \pm 0,15$ |

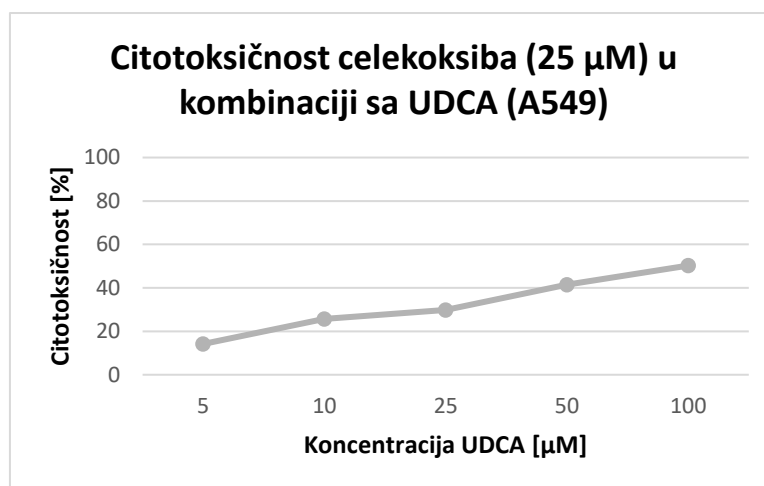


Grafikon 4.7. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

Rezultati kotretmana A549 ćelijske linije sa celekoksibom koncentracije 25 μM i rastućih koncentracija UDCA (5-100 μM), tokom 48 časova, predstavljeni su u tabeli 4.8. i na grafikonu 4.8. Za finalan tretman A549 ćelija, u cilju izvođenja genetskih i biohemijskih analiza, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i UDCA 25 μM , kojom se postiže približno IC_{30} .

Tabela 4.8. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema A549 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 14,17 ± 2,07 | 25,71 ± 1,53 | 29,83 ± 1,77 | 41,53 ± 0,61 | 50,25 ± 0,92 |



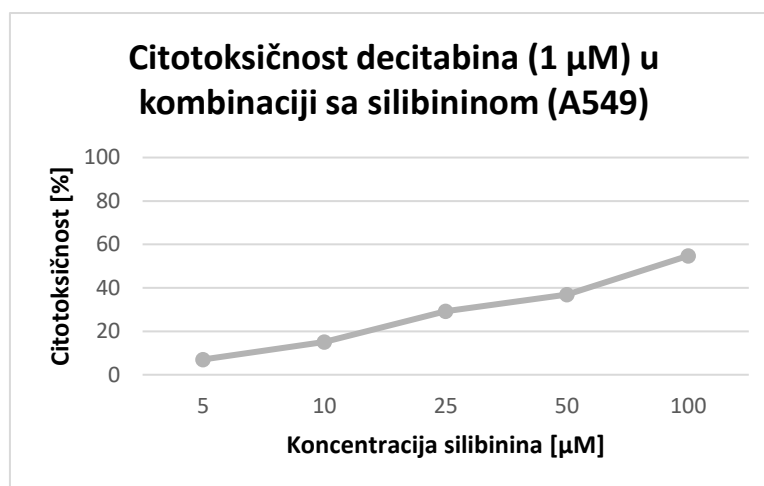
Grafikon 4.8. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

4.1.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema A549 ćelijskoj liniji

U cilju odabira adekvatne kombinacije silibinina i decitabina za dalja ispitivanja na A549 ćelijskoj liniji, rezultati kombinovane primene, u trajanju od 48 časova, decitabina u koncentraciji od 1 μM i rastućih koncentracija silibinina (5-100 μM), prikazani su u tabeli 4.9. i na grafikonu 4.9. Za izvođenje eksperimenata genske ekspresije, odabrana je koncentracija silibinina 25 μM za kombinaciju sa 1 μM decitabina, koja dovodi do citotoksičnog efekta kod približno 29% ćelija (IC_{29}).

Tabela 4.9. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost decitabina prema A549 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 7,03 ± 0,38 | 15,12 ± 1,36 | 29,23 ± 0,84 | 36,86 ± 0,52 | 54,75 ± 0,43 |

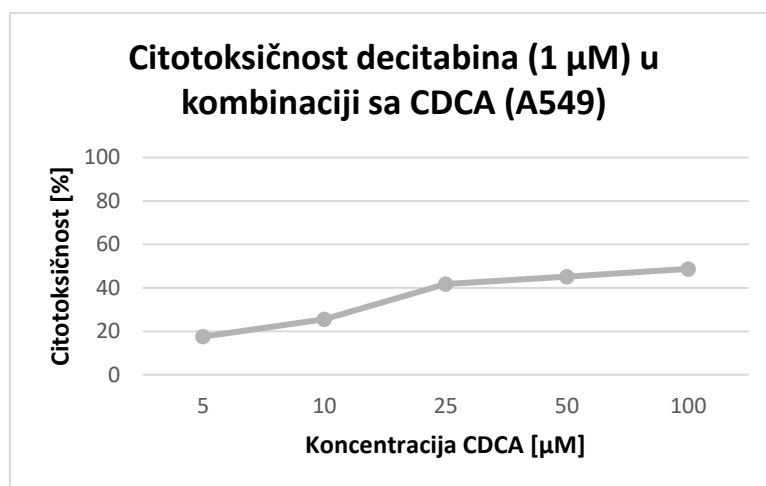


Grafikon 4.9. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema A549 ćelijskoj liniji.

Ispitan je uticaj žučnih kiselina na citotoksičnu aktivnost decitabina prema A549 ćelijama. Tretmani kombinacijom decitabina koncentracije 1 μM i rastućih koncentracija CDCA (5-100 μM), odnosno kombinacijom decitabina 1 μM i rastućih koncentracija UDCA (5-100 μM), u trajanju od 48 časova, prikazani su u tabelama 4.10. i 4.11, odnosno na grafikonima 4.10. i 4.11. U cilju izvođenja daljih analiza, odabrana je kombinacija decitabina 1 μM i CDCA 15 μM (približno IC₂₈) i kombinacija decitabina 1 μM i UDCA 25 μM (približno IC₃₂).

Tabela 4.10. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema A549 ćelijskoj liniji.

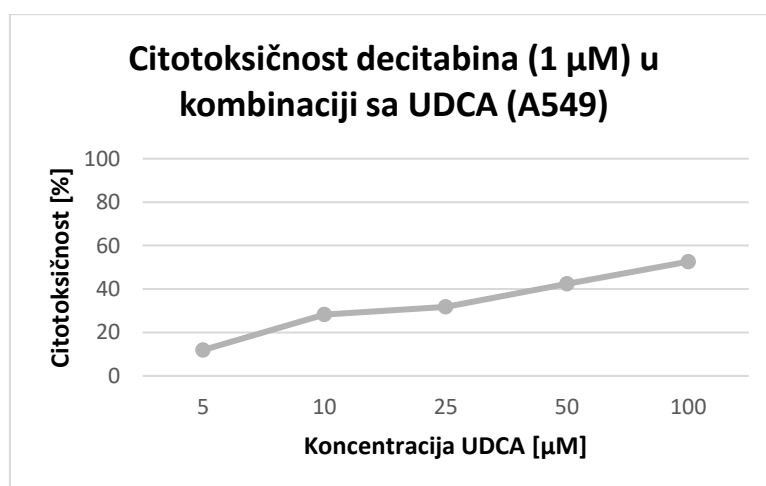
| | | | | | |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 17,53 ± 2,01 | 25,56 ± 3,04 | 41,70 ± 0,54 | 45,11 ± 0,99 | 48,74 ± 1,28 |



Grafikon 4.10. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama CDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.11. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema A549 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 11,93 ± 0,31 | 28,21 ± 0,66 | 31,75 ± 0,39 | 42,38 ± 0,96 | 52,60 ± 2,45 |



Grafikon 4.11. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema A549 ćelijskoj liniji.

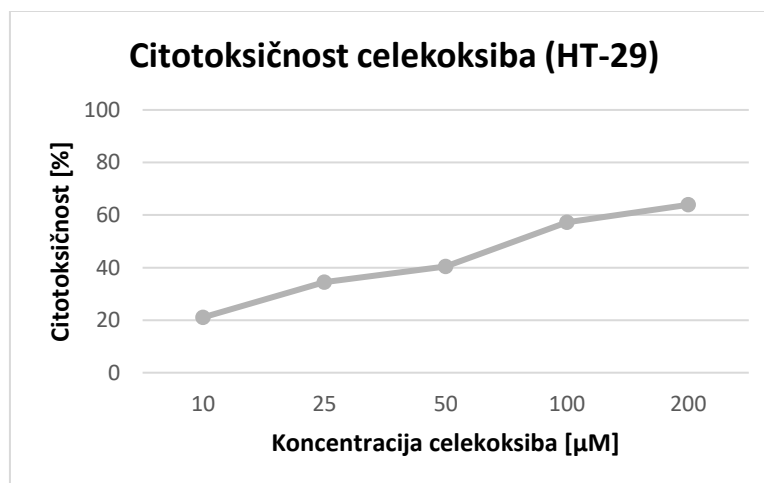
4.2. Rezultati *in vitro* studije na HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona

4.2.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema HT-29 ćelijskoj liniji

Citotoksična aktivnost selektivnog COX-2 inhibitora, celekoksiba, prema HT-29 ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma kolona prikazana je u tabeli 4.12. i na grafikonu 4.12. Utvrđena je koncentracijski-zavisna citotoksična aktivnost celekoksiba u opsegu ispitivanih koncentracija od 10 do 200 μM , nakon tretmana HT-29 ćelijske linije u trajanju od 48 časova. Izračunata IC_{50} vrednost, odnosno koncentracija koja dovodi do citotoksičnog efekta kod 50% ćelija, iznosila je 74,97 μM . Za ispitivanje udruženog citotoksičnog dejstva celekoksiba sa prirodnim agensima (silibininom i žučnim kiselinama), na HT-29 ćelijskoj liniji, odabrana je koncentracija celekoksiba 25 μM , kojom se postigla citotoksičnost prema 34% ćelija (IC_{34}).

Tabela 4.12. Vrednosti citotoksične aktivnosti celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| Celekoksib [μM] | 10 | 25 | 50 | 100 | 200 | IC_{50} |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 21,08 \pm 0,68 | 34,46 \pm 0,02 | 40,39 \pm 0,05 | 57,21 \pm 0,08 | 63,89 \pm 0,13 | 74,97 |



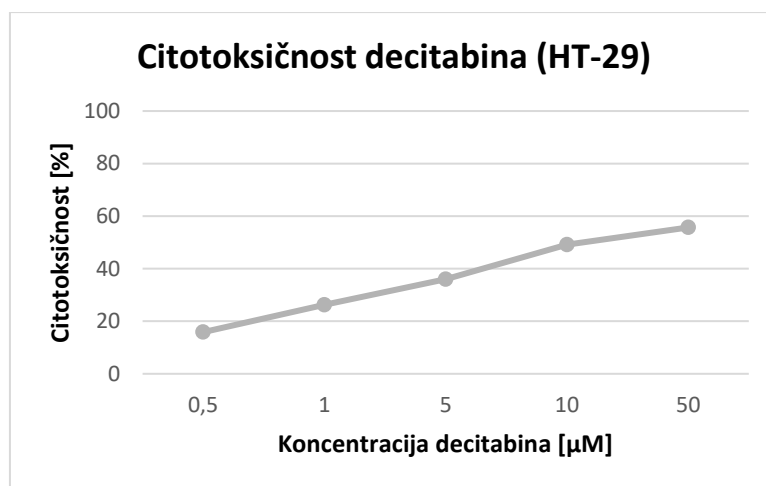
Grafikon 4.12. Citotoksično dejstvo celekoksiba prema HT-29 ćelijama.

Ispitivanjem uticaja hipometilacionog agensa 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabina) na vitalnost HT-29 ćelija, u razdoblju od 48 časova, utvrđena je koncentracijski-zavisna citotoksična aktivnost, u rasponu koncentracija od 0,5 do 50 μM , što je prikazano u tabeli 4.13. i na grafikonu 4.13. IC_{50} vrednost iznosila je 19,53 μM . U cilju daljeg ispitivanja uticaja prirodnih supstanci (silibinina i žučnih kiselina) na aktivnost decitabina, odabrana je

koncentracija decitabina 1 μM , kojom se postigla citotoksičnost prema 26% HT-29 ćelija (IC_{26}).

Tabela 4.13. Vrednosti citotoksične aktivnosti decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| Decitabin [μM] | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 50 | IC_{50} |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 15,86 \pm 0,76 | 26,21 \pm 1,06 | 36,01 \pm 0,12 | 49,18 \pm 0,03 | 55,69 \pm 3,56 | 19,53 |

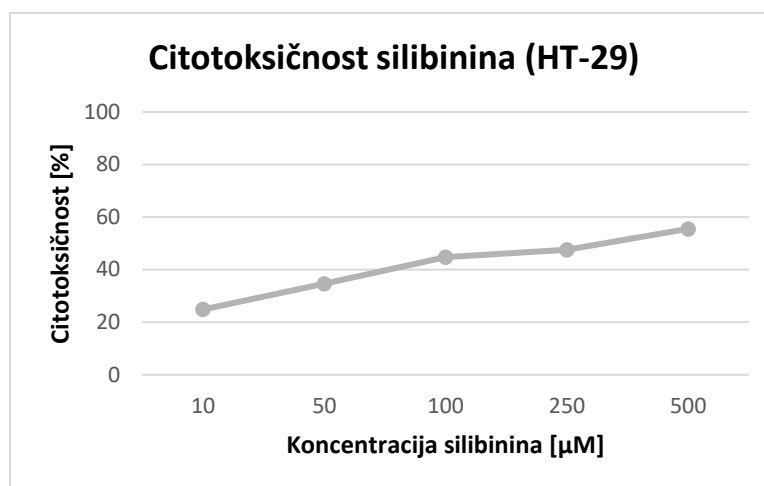


Grafikon 4.13. Citotoksično dejstvo decitabina prema HT-29 ćelijama.

U tabeli 4.14. i na grafikonu 4.14. predstavljen je uticaj silibinina na vitalnost HT-29 ćelija, tokom tretmana u trajanju od 48 časova. Utvrđen je koncentracijski-zavisan porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija silibinina od 10 do 500 μM , pri čemu je IC_{50} vrednost iznosila 274,01 μM .

Tabela 4.14. Vrednosti citotoksične aktivnosti silibinina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| Silibinin [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC_{50} |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 24,86 \pm 0,08 | 34,60 \pm 3,40 | 44,74 \pm 4,59 | 47,50 \pm 1,49 | 55,53 \pm 3,99 | 274,01 |

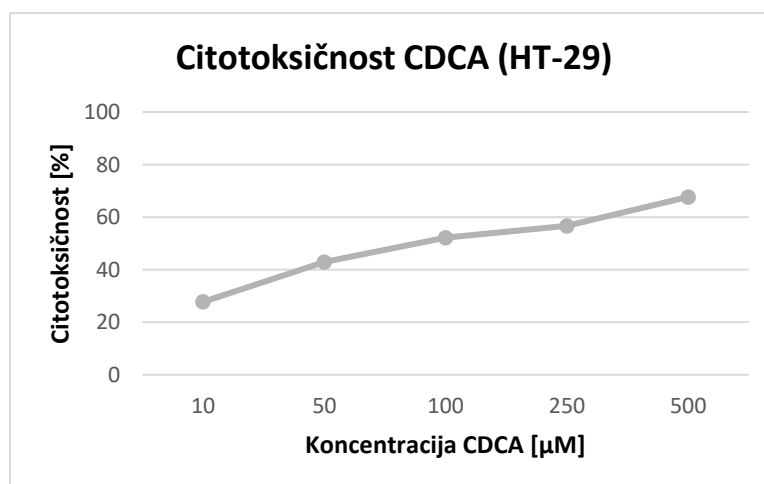


Grafikon 4.14. Citotoksično dejstvo silibinina prema HT-29 ćelijama.

Tabela 4.15. i grafikon 4.15. prikazuju uticaj tretiranja HT-29 ćelija prirodnom žučnom hidrofobnom kiselinom, CDCA, na vitalnost ćelija, tokom tretmana u trajanju od 48 časova. Utvrđen je koncentracijski-zavisani porast citotoksičnosti, u opsegu koncentracija od 10 do 500 μM . Izračunata IC_{50} vrednost iznosila je 96,29 μM .

Tabela 4.15. Vrednosti citotoksične aktivnosti CDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| CDCA [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC_{50} |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 27,76 ± 0,68 | 42,88 ± 0,17 | 52,22 ± 1,55 | 56,67 ± 2,21 | 67,68 ± 0,13 | 96,29 |



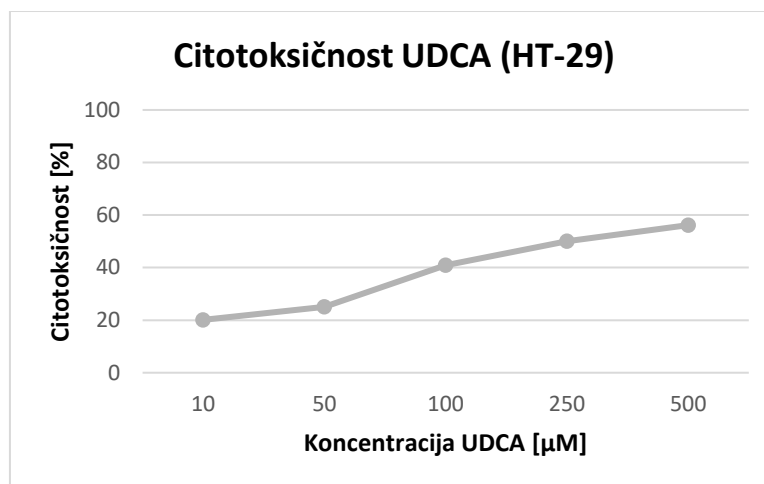
Grafikon 4.15. Citotoksično dejstvo CDCA prema HT-29 ćelijama.

Tabela 4.16. i grafikon 4.16. prikazuju rezultate tretiranja HT-29 ćelija prirodnom hidrofilnom žučnom kiselinom, UDCA, tokom 48 časova. Utvrđen je koncentracijski-zavisani porast citotoksičnosti u tretiranim ćelijama, u opsegu koncentracija od 10 do 500 μM . IC_{50}

vrednost UDCA prema HT-29 ćelijama iznosila je 292,08 μM , što ukazuje na slabije citotoksično dejstvo UDCA, u poređenju sa CDCA.

Tabela 4.16. Vrednosti citotoksične aktivnosti UDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| UDCA [μM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC ₅₀ |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 20,12 \pm 0,59 | 25,06 \pm 0,07 | 40,94 \pm 0,09 | 50,06 \pm 1,92 | 56,17 \pm 2,33 | 292,08 |



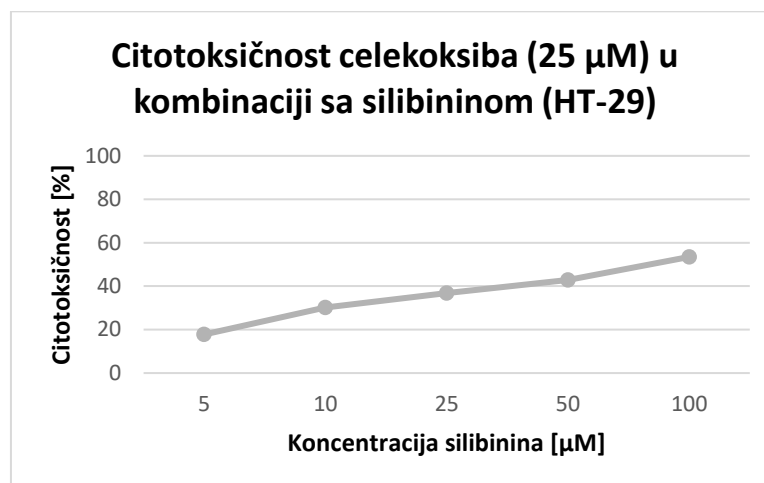
Grafikon 4.16. Citotoksično dejstvo UDCA prema HT-29 ćelijama.

4.2.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji

U cilju ispitivanja uticaja silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba, HT-29 ćelijska linija je tretirana kombinacijom odabrane koncentracije celekoksiba (25 μM) i rastućih koncentracija silibinina (5-100 μM), u vremenskom periodu od 48 časova. Rezultati ispitivanja kombinovane primene prikazani su u tabeli 4.17. i na grafikonu 4.17. Za dalji tretman HT-29 ćelija, ispitivanje ekspresije gena i biohemijske analize, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i silibinina 25 μM , kojom se postiže približno IC₃₇.

Tabela 4.17. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji.

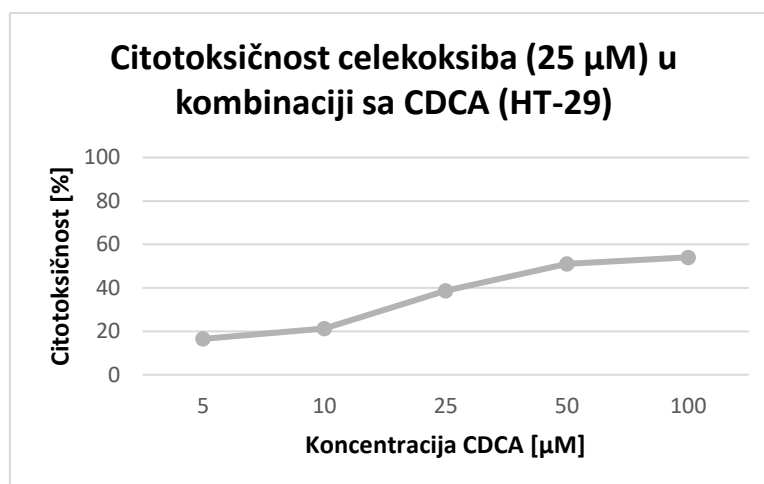
| | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | $17,78 \pm 0,66$ | $30,13 \pm 1,98$ | $36,78 \pm 2,06$ | $42,82 \pm 1,64$ | $53,47 \pm 0,94$ |

**Grafikon 4.17.** Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

Rezultati ispitivanja kombinovane primene celekoksiba koncentracije $25 \mu\text{M}$ i rastućih koncentracija CDCA ($5-100 \mu\text{M}$), u trajanju od 48 časova, prikazani su u tabeli 4.18. i na grafikonu 4.18. Za dalje genetske i biohemijske analize odabrana je kombinacija celekoksiba koncentracije $25 \mu\text{M}$ i CDCA koncentracije $15 \mu\text{M}$, koja dovodi do citotoksičnog efekta kod približno 28% HT-29 ćelija (IC_{28}).

Tabela 4.18. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | $16,52 \pm 0,94$ | $21,27 \pm 1,15$ | $38,72 \pm 0,52$ | $51,09 \pm 1,03$ | $54,06 \pm 1,06$ |

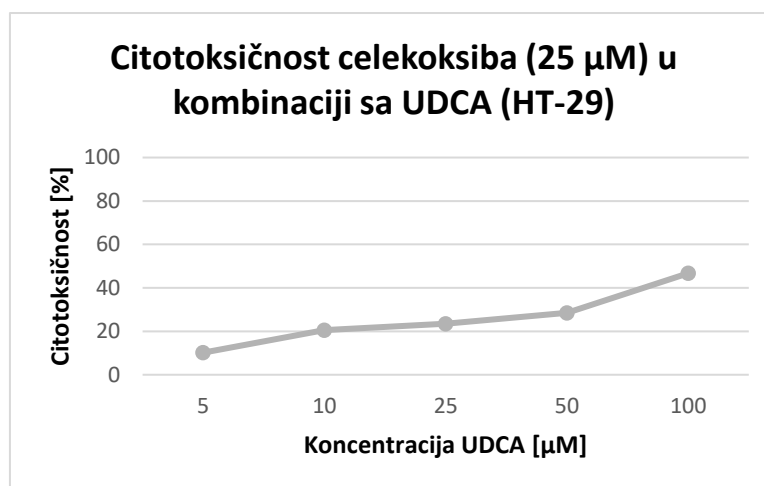


Grafikon 4.18. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

Rezultati 48-časovnog kotretmana HT-29 ćelijske linije sa celekoksibom koncentracije 25 μM i rastućih koncentracija UDCA (5-100 μM) predstavljeni su u tabeli 4.19. i na grafikonu 4.19. Za konačan tretman HT-29 ćelija, u svrhu izvođenja genetskih i biohemijskih analiza, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i UDCA 25 μM , kojom se postiže približno IC₂₃.

Tabela 4.19. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 10,16 ± 0,22 | 20,60 ± 0,68 | 23,42 ± 1,04 | 28,55 ± 0,45 | 46,71 ± 0,42 |



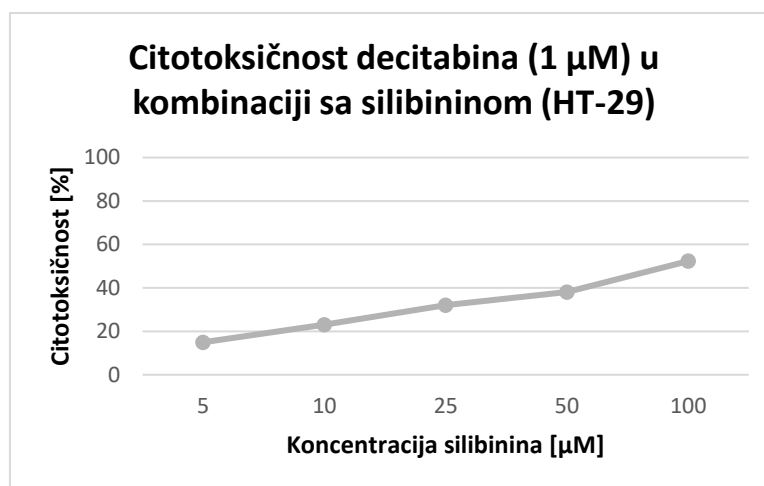
Grafikon 4.19. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

4.2.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji

Odabrana koncentracija decitabina ($1 \mu\text{M}$) upotrebljena je za kombinovani tretman HT-29 ćelijske linije sa rastućim koncentracijama silibinina ($5\text{-}100 \mu\text{M}$), tokom trajanja kotretmana u periodu od 48 časova. Rezultati su prikazani u tabeli 4.20. i na grafikonu 4.20. Za konačan tretman, odabrana je kombinacija decitabina $1 \mu\text{M}$ i silibinina $25 \mu\text{M}$ jer se njome postiže prihvatljiva citotoksičnost prema približno 32% HT-29 ćelija (IC_{32}).

Tabela 4.20. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | $14,96 \pm 0,62$ | $23,09 \pm 0,87$ | $32,07 \pm 1,40$ | $38,13 \pm 0,33$ | $52,32 \pm 2,20$ |

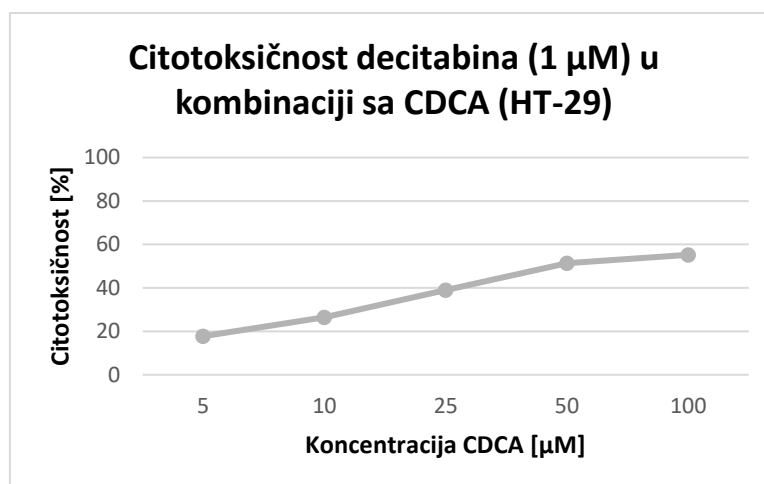


Grafikon 4.20. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

Za ispitivanje uticaja CDCA na citotoksični efekat decitabina, izvršen je 48-časovni tretman HT-29 ćelija sa kombinacijom decitabina koncentracije 1 μM i rastućih koncentracija CDCA (5-100 μM). Rezultati kotretmana prikazani su u tabeli 4.21. i na grafikonu 4.21. U cilju izvođenja ispitivanja genske ekspresije odabrana je kombinacija decitabina 1 μM i CDCA 15 μM , kojom je postignuta približno IC_{31} .

Tabela 4.21. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 17,74 ± 0,62 | 26,43 ± 0,87 | 38,90 ± 0,54 | 51,31 ± 1,31 | 55,20 ± 0,75 |

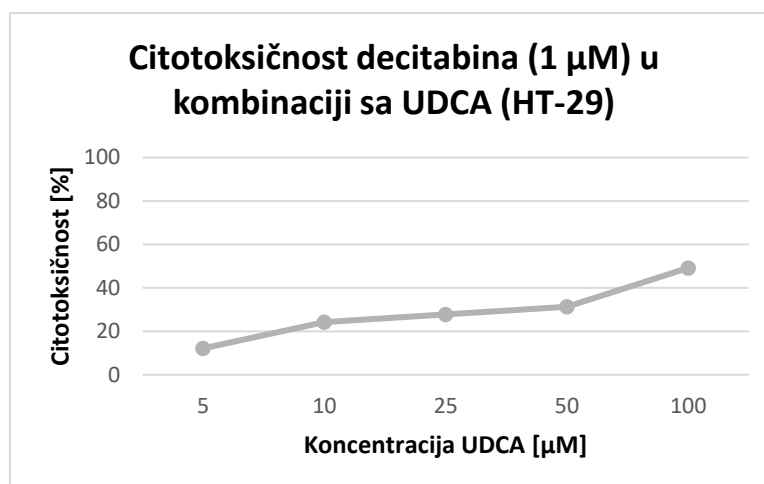


Grafikon 4.21. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

Uticaj rastućih koncentracija UDCA (5-100 μM) na citotoksični efekat 1 μM decitabina, prema HT-29 ćelijskoj liniji, u tretmanu koji je trajao 48 časova, predstavljen je u tabeli 4.22. i na grafikonu 4.22. Za dalje eksperimente, odabrana je kombinacija 1 μM decitabina i 25 μM UDCA, kojom se postiže prihvatljiva citotoksičnost (približno IC_{28}) za izolaciju RNA i ispitivanje genske ekspresije.

Tabela 4.22. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema HT-29 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 12,15 ± 0,81 | 24,27 ± 0,50 | 27,84 ± 1,22 | 31,28 ± 0,95 | 49,15 ± 1,13 |



Grafikon 4.22. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema HT-29 ćelijskoj liniji.

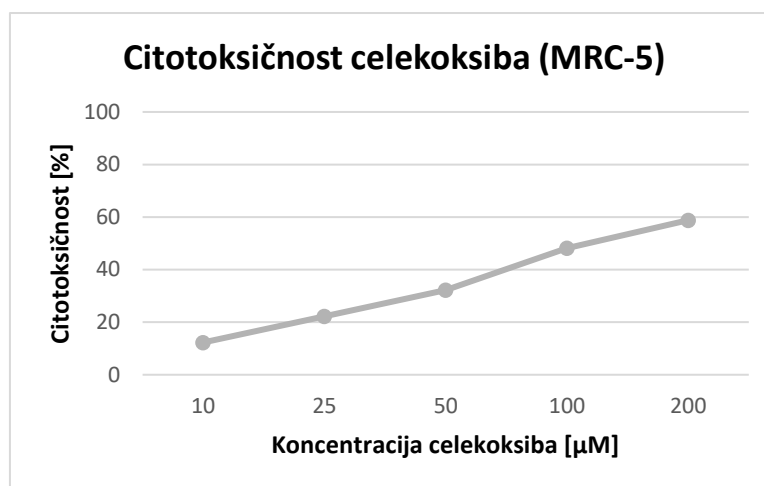
4.3. Rezultati *in vitro* studije na MRC-5 ćelijskoj liniji humanih fetalnih fibroblasta pluća

4.3.1. Citotoksičnost celekoksiba, decitabina, silibinina i žučnih kiselina prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Ispitivanjem citotoksičnog učinka celekoksiba na MRC-5 ćelijskoj liniji, u vremenskom periodu od 48 časova, utvrđeno je da sa porastom koncentracije celekoksiba u opsegu od 10 do 200 μM dolazi do porasta njegove citotoksičnosti (tabela 4.23. i grafikon 4.23). Izračunata IC_{50} vrednost iznosila je 105,19 μM . U cilju daljeg ispitivanja uticaja silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba, odabrana je koncentracija celekoksiba 25 μM , kojom se postiže citotoksičnost kod približno 22% MRC-5 ćelija (IC_{22}).

Tabela 4.23. Vrednosti citotoksične aktivnosti celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| Celekoksib [μM] | 10 | 25 | 50 | 100 | 200 | IC_{50} |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 12,28 ± 1,01 | 22,23 ± 1,06 | 32,21 ± 0,23 | 48,17 ± 2,57 | 58,80 ± 1,55 | 105,19 |

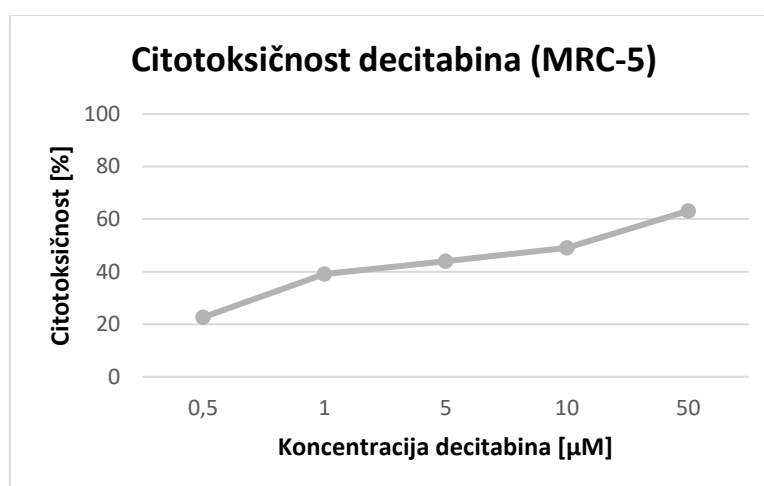


Grafikon 4.23. Citotoksično dejstvo celekoksiba prema MRC-5 ćelijama.

Rezultati 48-časovnog ispitivanja uticaja decitabina na vitalnost MRC-5 ćelija prikazani su u tabeli 4.24. i na grafikonu 4.24. Uočava se koncentracijski-zavisani porast citotoksičnosti, u opsegu primenjenih koncentracija decitabina od 0,5 do 50 μM, sa izračunatom IC₅₀ vrednosti koja je iznosila 9,54. Za dalje eksperimente, odabrana je koncentracija decitabina 1 μM, koja odgovara približnoj vrednosti IC₃₉.

Tabela 4.24. Vrednosti citotoksične aktivnosti decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| Decitabin [μM] | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 50 | IC ₅₀ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 22,64 ± 0,14 | 39,10 ± 1,68 | 43,98 ± 0,46 | 49,11 ± 0,33 | 63,13 ± 0,91 | 9,54 |



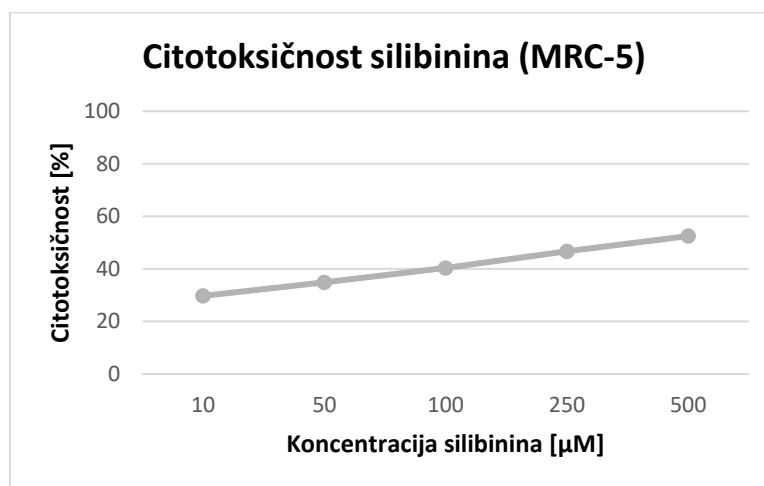
Grafikon 4.24. Citotoksično dejstvo decitabina prema MRC-5 ćelijama.

U cilju ispitivanja uticaja silibinina na vitalnost MRC-5 ćelija, ćelije su tretirane rastućim koncentracijama silibinina (10-500 μM), u vremenskom periodu od 48 časova. Utvrđen je koncentracijski-zavisani porast citotoksičnosti, što je prikazano u tabeli 4.25. i na

grafikonu 4.25. Koncentracija koja dovodi do citotoksičnog efekta prema 50% ćelija, odnosno IC_{50} , iznosila je 432,65.

Tabela 4.25. Vrednosti citotoksične aktivnosti silibinina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| Silibinin [μ M] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC_{50} |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| % citotoksičnosti | 29,74 \pm 4,02 | 34,94 \pm 3,52 | 40,31 \pm 0,37 | 46,76 \pm 0,30 | 52,49 \pm 0,75 | 432,65 |

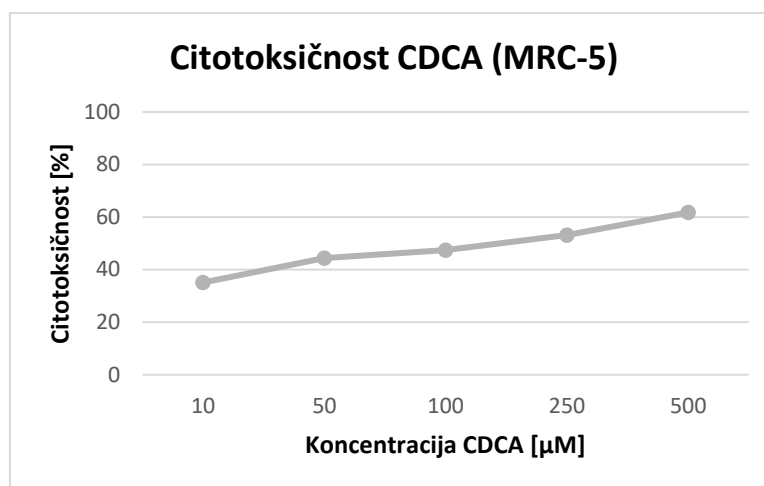


Grafikon 4.25. Citotoksično dejstvo silibinina prema MRC-5 ćelijama.

MRC-5 ćelijska linija tretirana je hidrofobnom žučnom kiselinom CDCA (tabela 4.26. i grafikon 4.26) i hidrofilnom žučnom kiselinom UDCA (tabela 4.27. i grafikon 4.27). U oba eksperimenta utvrđen je koncentracijski-zavisan porast citotoksičnosti, u rasponima koncentracija žučnih kiselina od 10 do 500 μ M. IC_{50} vrednosti iznosile su 117,13 μ M za CDCA, odnosno 523,92 μ M za UDCA, što ukazuje na izraženiju citotoksičnost CDCA, u poređenju sa UDCA.

Tabela 4.26. Vrednosti citotoksične aktivnosti CDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

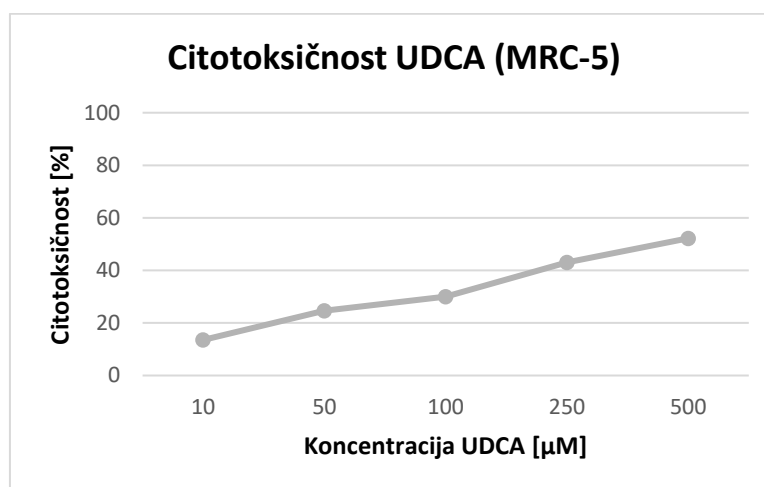
| CDCA [μ M] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC_{50} |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| % citotoksičnosti | 35,10 \pm 3,03 | 44,33 \pm 1,45 | 47,48 \pm 0,99 | 53,16 \pm 3,00 | 61,77 \pm 1,71 | 117,13 |



Grafikon 4.26. Citotoksično dejstvo CDCA prema MRC-5 ćelijama.

Tabela 4.27. Vrednosti citotoksične aktivnosti UDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| UDCA [µM] | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | IC ₅₀ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| % citotoksičnosti | 13,54 ± 0,12 | 24,60 ± 0,13 | 30,05 ± 1,06 | 43,09 ± 0,88 | 52,20 ± 0,49 | 523,92 |



Grafikon 4.27. Citotoksično dejstvo UDCA prema MRC-5 ćelijama.

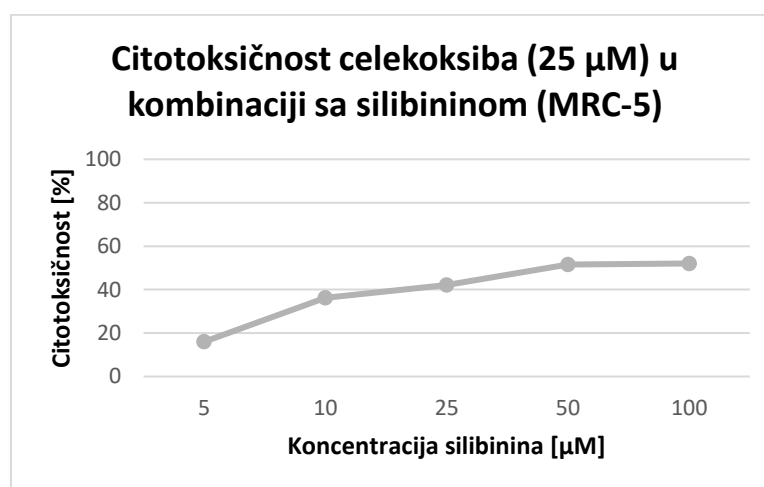
4.3.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji

U vremenskom periodu od 48 časova, sa ciljem ispitivanja uticaja silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba, MRC-5 ćelije su tretirane kombinacijom odabrane koncentracije celekoksiba (25 µM) i rastućih koncentracija silibinina (5-100 µM). Rezultati ispitivanja kombinovane primene prikazani su u tabeli 4.28. i na grafikonu 4.28. Za ispitivanje

ekspresije gena i za biohemijske analize na MRC-5 ćelijama, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i silibinina 25 μM , kojom se postiže približno IC_{42} .

Tabela 4.28. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 16,00 \pm 1,12 | 36,22 \pm 1,92 | 42,05 \pm 1,90 | 51,57 \pm 3,97 | 52,04 \pm 0,61 |

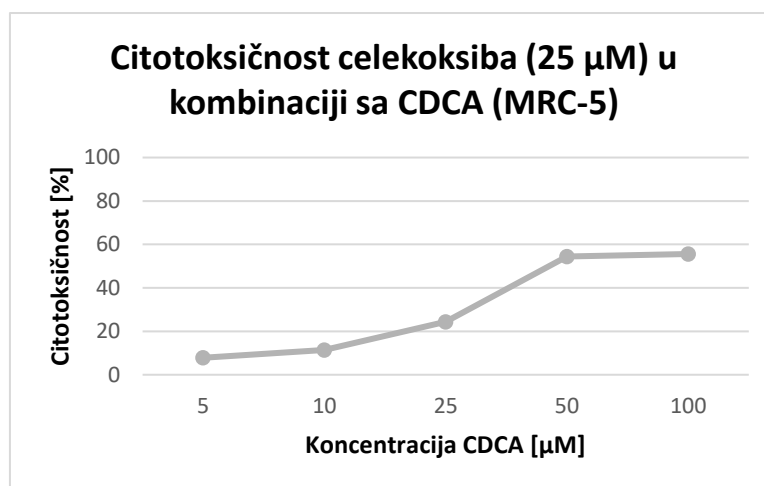


Grafikon 4.28. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

Uticaji kombinacija rastućih koncentracija CDCA (5-100 μM) i odabrane koncentracije celekoksiba (25 μM) na vitalnost MRC-5 ćelija, tokom 48 časova trajanja tretmana, predstavljeni su u tabeli 4.29. i na grafikonu 4.29. Za dalji tretman MRC-5 ćelija, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i CDCA 15 μM , kojom se postiže približno IC_{18} .

Tabela 4.29. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 7,82 \pm 0,67 | 11,47 \pm 0,85 | 24,38 \pm 1,73 | 54,40 \pm 3,74 | 55,59 \pm 1,21 |

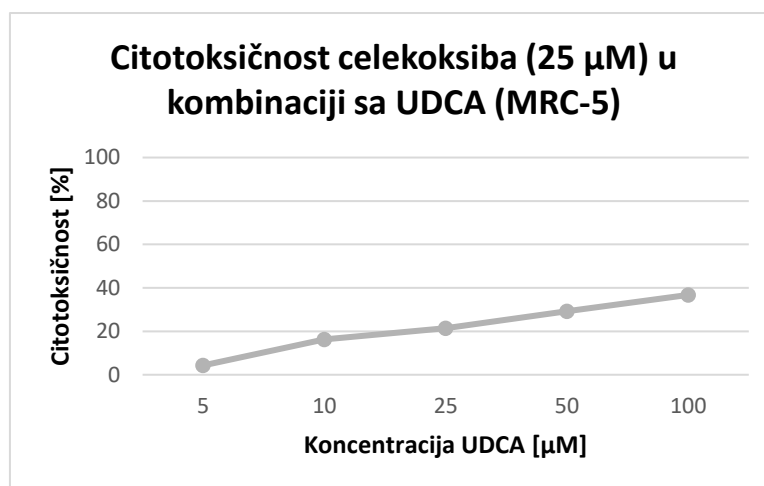


Grafikon 4.29. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.30. i na grafikonu 4.30. prikazan je uticaj rastućih koncentracija UDCA (5-100 μM) na citotoksičnost celekoksiba (25 μM) prema MRC-5 ćelijskoj liniji, u vremenskom periodu trajanja tretmana od 48 časova. Za ispitivanje ekspresije gena i za biohemijske analize, odabrana je kombinacija celekoksiba 25 μM i UDCA 25 μM , kojom se postigao citotoksični učinak prema približno 22% MRC-5 ćelija (IC_{22}).

Tabela 4.30. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost celekoksiba prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Celekoksib [μM] | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 4,29 \pm 0,35 | 16,22 \pm 0,01 | 21,50 \pm 1,14 | 29,22 \pm 0,22 | 36,75 \pm 0,41 |



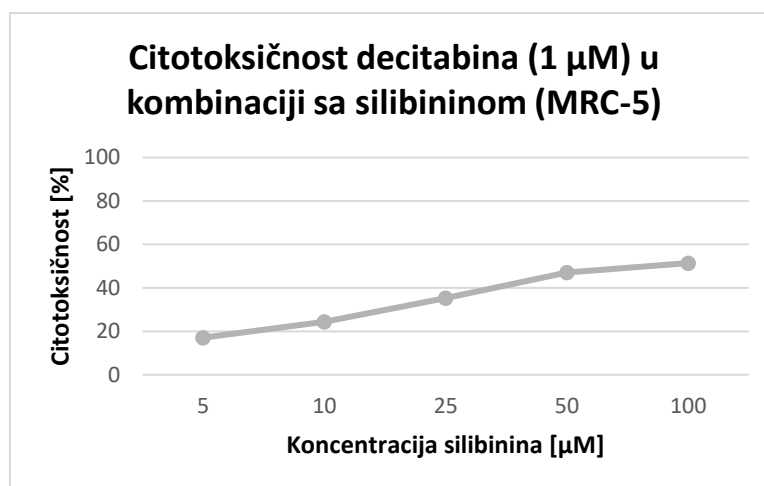
Grafikon 4.30. Citotoksičnost celekoksiba u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

4.3.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na citotoksičnost decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji

Za dalja ispitivanja epigenetskih događaja na MRC-5 ćelijskoj liniji, odabrana koncentracija decitabina (1 μM) upotrebljena je za kombinovani tretman sa rastućim koncentracijama silibinina (5-100 μM), tokom trajanja kotretmana u periodu od 48 časova. Rezultati su prikazani u tabeli 4.31. i na grafikonu 4.31. Za konačan tretman, odabrana je kombinacija decitabina 1 μM i silibinina 25 μM , jer se njome postiže prihvatljiva citotoksičnost prema približno 35% MRC-5 ćelija (IC_{35}).

Tabela 4.31. Uticaj rastućih koncentracija silibinina na citotoksičnu aktivnost decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Silibinin [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 17,07 \pm 2,43 | 24,45 \pm 1,98 | 35,23 \pm 0,06 | 47,06 \pm 0,73 | 51,40 \pm 0,42 |

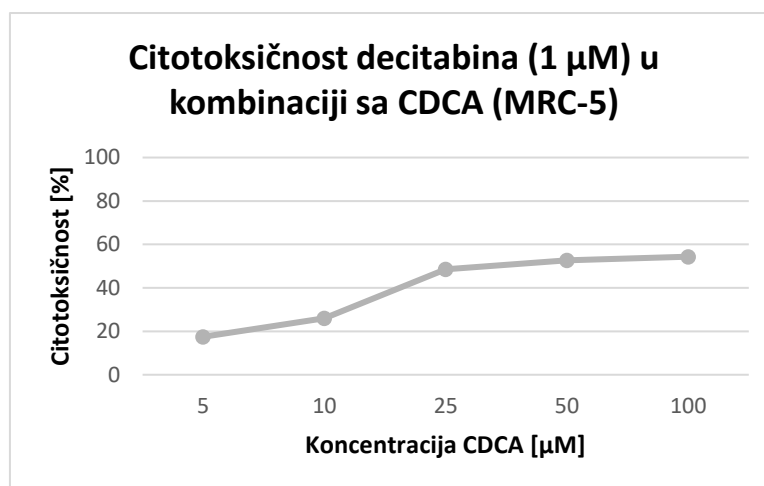


Grafikon 4.31. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama silibinina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

Uticaji rastućih koncentracija (5-100 μM) žučnih kiselina (CDCA i UDCA) na citotoksičnost odabrane koncentracije decitabina (1 μM), tokom trajanja kotretmana u vremenskom razdoblju od 48 časova, prikazani su u tabelama 4.32. i 4.33, kao i na grafikonima 4.32. i 4.33. Za dalja ispitivanja, odabrana je kombinacija 1 μM decitabina i 15 μM CDCA, kojom se postiže citotoksičnost prema približno 33% MRC-5 ćelija (IC_{33}), kao i kombinacija 1 μM decitabina i 25 μM UDCA, kojom je postignuta približno IC_{26} .

Tabela 4.32. Uticaj rastućih koncentracija CDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

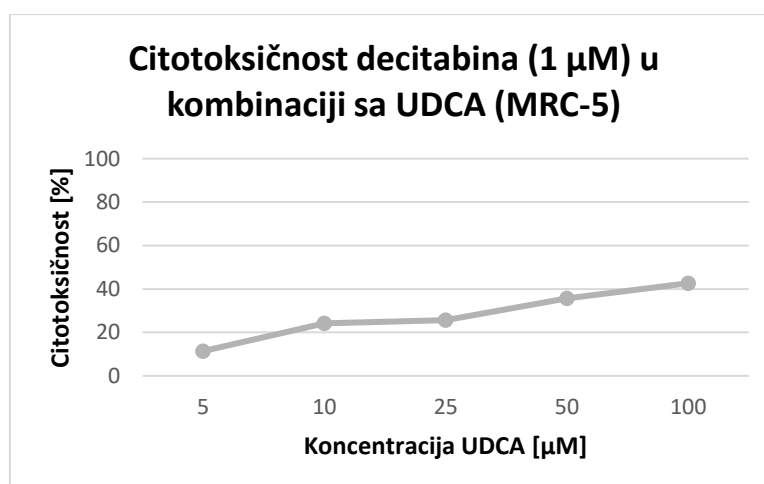
| | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 17,48 ± 0,56 | 26,05 ± 0,72 | 48,55 ± 0,49 | 52,66 ± 1,96 | 54,34 ± 3,41 |



Grafikon 4.32. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama CDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.33. Uticaj rastućih koncentracija UDCA na citotoksičnu aktivnost decitabina prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

| | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Decitabin [μM] | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| UDCA [μM] | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |
| % citotoksičnosti | 11,40 ± 1,26 | 24,12 ± 0,45 | 25,57 ± 3,40 | 35,68 ± 2,35 | 42,63 ± 2,45 |



Grafikon 4.33. Citotoksičnost decitabina u kombinaciji sa rastućim koncentracijama UDCA prema MRC-5 ćelijskoj liniji.

4.4. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom

Pomoću qRT-PCR metode, ispitivana je ekspresija gena, odnosno određivana je količina mRNA ciljanih gena, u odnosu na *ACTB* referentni gen, u svim eksperimentalnim grupama A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija tretiranim celekoksibom. Na osnovu prethodno prikazanih rezultata *in vitro* studija, koje su izvođene u svrhu odabira koncentracija ispitivanih supstanci, vršen je tretman ćelija celekoksibom i kombinacijama celekoksiba i silibinina, odnosno celekoksiba i žučnih kiselina (CDCA i UDCA), sa ciljem ispitivanja potencijalnog sinergističkog antitumorskog dejstva. Ćelije su tretirane tokom 48 časova samim celekoksibom u koncentraciji od 25 μ M (grupa C) ili u kombinaciji sa silibininom koncentracije 25 μ M (grupa CS), u kombinaciji sa CDCA koncentracije 15 μ M (grupa CC) ili u kombinaciji sa UDCA koncentracije 25 μ M (grupa CU). Ove koncentracije su odabrane kao klinički relevantne, a kojima je postignuta prihvatljiva IC za sve tri ćelijske linije (IC₁₈₋₄₂). U negativnu kontrolnu grupu dodat je samo DMSO rastvarač (grupa K). Ispitivani su geni koji kodiraju sintezu proteina zaduženih za regulaciju procesa inflamacije, apoptoze, proliferacije, transporta, invazije, homeostaze žučnih kiselina i antioksidativne zaštite. Navedeni ćelijski procesi su od velikog značaja za kancerogenezu, a samim tim predstavljaju i potencijalne mete za terapiju malignih bolesti.

4.4.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije

Ispitivana je relativna ekspresija gena koji regulišu proces inflamacije i koji su uključeni u regulaciju COX-2-zavisnih signalnih puteva u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama, nakon tretmana celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama, CDCA i UDCA. U ovom delu eksperimenta, ispitivane su ekspresije sledećih gena: *PTGS2*, koji kodira sintezu enzima COX-2, *PTGES*, koji kodira sintezu mPGES-1, enzima neophodnog u sintezi PGE₂, i *HPGD*, koji se smatra tumor-supresorom jer kodira sintezu 15-PGDH, važnog enzima u degradaciji PGE₂.

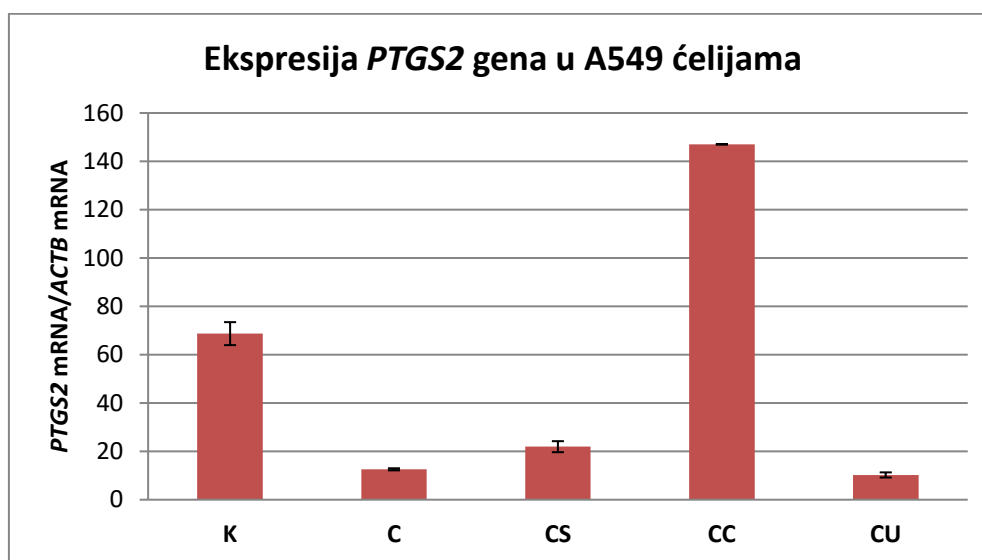
Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija analiziranog gena veća ili manja u odnosu na ekspresiju datog gena u kontrolnoj grupi ili grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom.

4.4.1.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u A549 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.34. i na grafikonu 4.34. prikazana je relativna ekspresija *PTGS2* gena u A549 ćelijskoj liniji. U odnosu na kontrolnu grupu, ekspresija *PTGS2* gena je bila negativno regulisana u svim tretiranim grupama, uz visoku statističku značajnost ($p < 0,001$), osim u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i CDCA, u kojoj je zabeležena povećana ekspresija, visoko statistički značajna ($p < 0,001$). U odnosu na celekoksib grupu, smanjenje relativne ekspresije ovog gena bilo je prisutno jedino u grupi tretiranoj kombinacijom celekoksiba i UDCA, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.34. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| <i>PTGS2</i> | 68,7034 ± 4,7593 | 12,5584 ± 0,4352 | 21,9355 ± 2,2776 | 147,0334 ± 0,0000 | 10,2333 ± 1,0625 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |



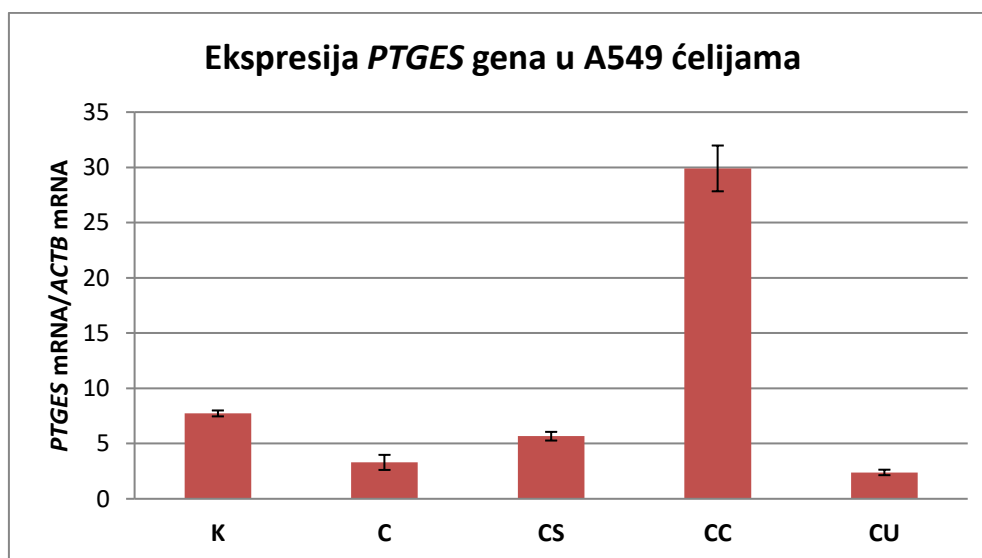
Grafikon 4.34. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u A549 ćelijskoj liniji.

Ispitujući relativnu ekspresiju *PTGES* gena (tabela 4.35. i grafikon 4.35), uočava se smanjenje ekspresije *PTGES* gena u C, CS i CU grupama, u odnosu na kontrolnu grupu, i to

smanjenje je bilo visoko statistički značajno u slučaju grupa C ($p < 0,01$) i CU ($p < 0,001$). U grupi CC došlo je do povećanja *PTGES* ekspresije, uz visoku statističku značajnost ($p < 0,001$ vs. K, C). U odnosu na C grupu, dalje smanjenje relativne ekspresije ovog gena bilo je prisutno jedino u kombinaciji CU, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.35. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>PTGES</i> | 7,7306 ± 0,2679 | 3,2960 ± 0,6817 | 5,6659 ± 0,3925 | 29,9049 ± 2,0716 | 2,3870 ± 0,2478 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CC | vs. CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CC, CU | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |



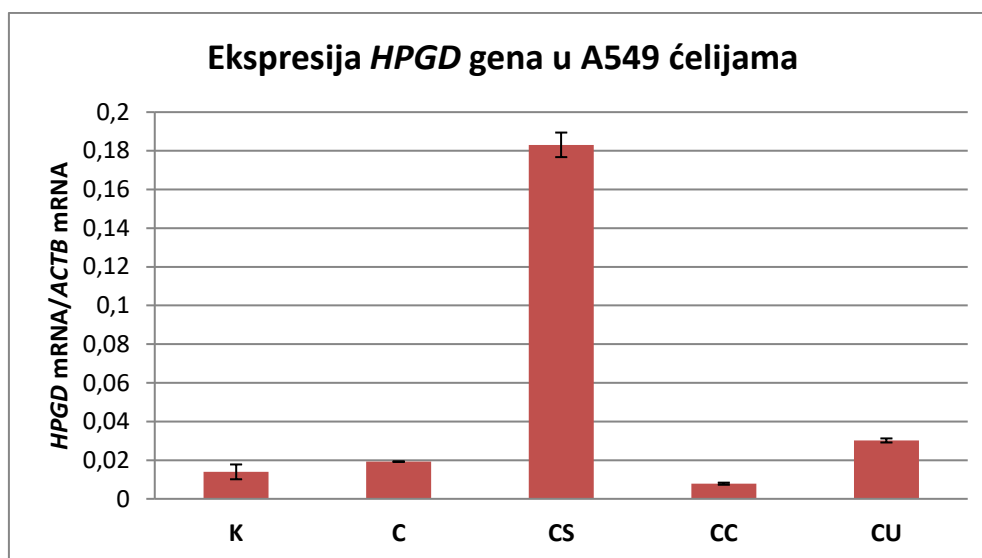
Grafikon 4.35. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u A549 ćelijskoj liniji.

Ispitivana je relativna ekspresija *HPGD* gena, čiji rezultati su prikazani u tabeli 4.36. i na grafikonu 4.36. Tretman celekoksibom doveo je do blagog povećanja ekspresije *HPGD*, u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti. Kotretman CS izazvao je najveće povećanje ekspresije ovog gena ($p < 0,001$ vs. K, C). U grupi CU zapaža se, takođe, povećana ekspresija ($p < 0,01$ vs. K; $p < 0,05$ vs. C). Suprotno, u grupi CC došlo je do smanjenja

ekspresije *HPGD* u odnosu na K grupu i do statistički značajnog smanjenja ekspresije u poređenju sa C grupom ($p=0,013$).

Tabela 4.36. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>HPGD</i> | $0,0139 \pm 0,0038$ | $0,0192 \pm 0,0000$ | $0,1831 \pm 0,0063$ | $0,0078 \pm 0,0005$ | $0,0302 \pm 0,0010$ |
| $p < 0,05$ | vs. CS, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CU | vs. CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS | vs. CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS, CU | vs. CS, CC |

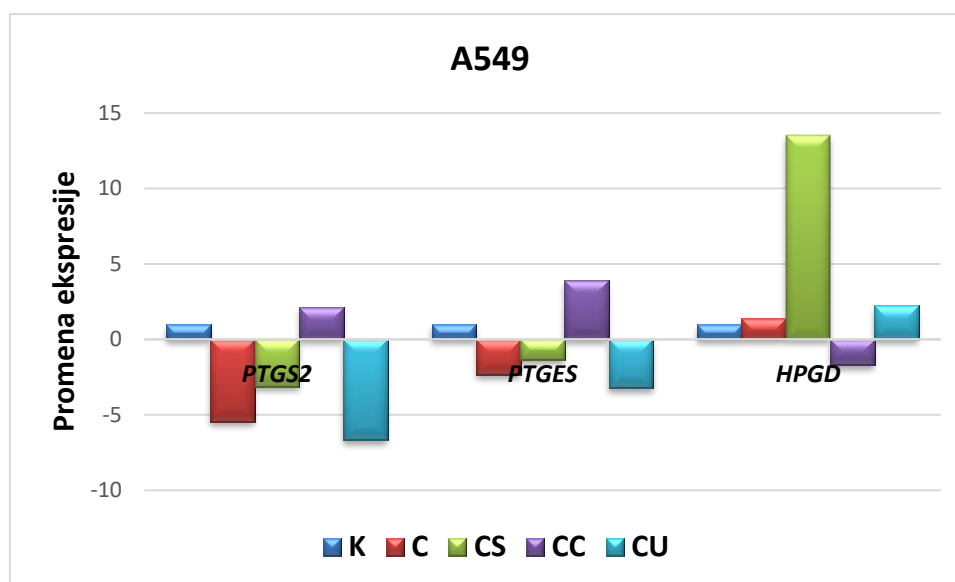


Grafikon 4.36. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) gena uključenih u proces inflamacije u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.37. i na grafikonu 4.37.

Tabela 4.37. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>PTGS2</i> | | <i>PTGES</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,18 ± 0,01 | 1 | 0,43 ± 0,09 | 1 | 1,41 ± 0,00 | 1 |
| CS | 0,32 ± 0,05 | 1,76 ± 0,25 | 0,74 ± 0,08 | 1,75 ± 0,19 | 13,49 ± 1,04 | 9,54 ± 0,74 |
| CC | 2,15 ± 0,21 | 11,77 ± 1,15 | 3,91 ± 0,60 | 9,30 ± 1,43 | 0,58 ± 0,09 | 0,41 ± 0,06 |
| CU | 0,15 ± 0,02 | 0,82 ± 0,08 | 0,31 ± 0,03 | 0,74 ± 0,08 | 2,24 ± 0,28 | 1,58 ± 0,20 |



Grafikon 4.37. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

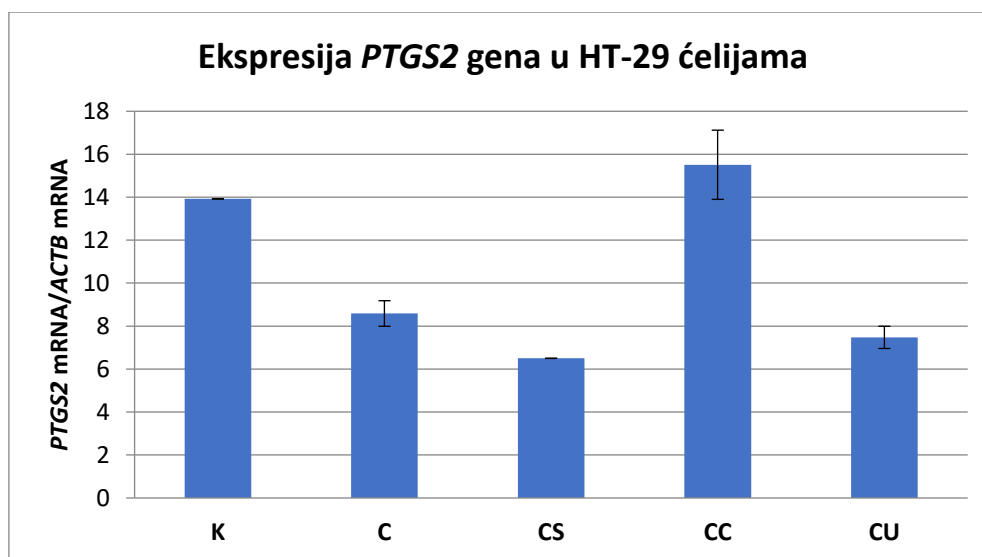
4.4.1.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u HT-29 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.38. i na grafikonu 4.38. prikazana je relativna ekspresija *PTGS2* gena u HT-29 ćelijskoj liniji. Uočava se smanjena ekspresija ovog gena u grupama C, CS i CU, pri čemu je to smanjenje relativne ekspresije bilo visoko statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). Dodatak silibinina, odnosno UDCA celekoksibu izazvao je smanjenje ekspresije *PTGS2*, u odnosu na sâm celekoksib, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

U grupi CC došlo je do povećanja ekspresije *PTGS2* u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti, ali je to povećanje bilo visoko statistički značajno u odnosu na grupu tretiranu samo celekoksibom ($p < 0,001$).

Tabela 4.38. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>PTGS2</i> | 13,9288 ± 0,0000 | 8,5879 ± 0,5949 | 6,4980 ± 0,0000 | 15,5107 ± 1,6105 | 7,4762 ± 0,5179 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |

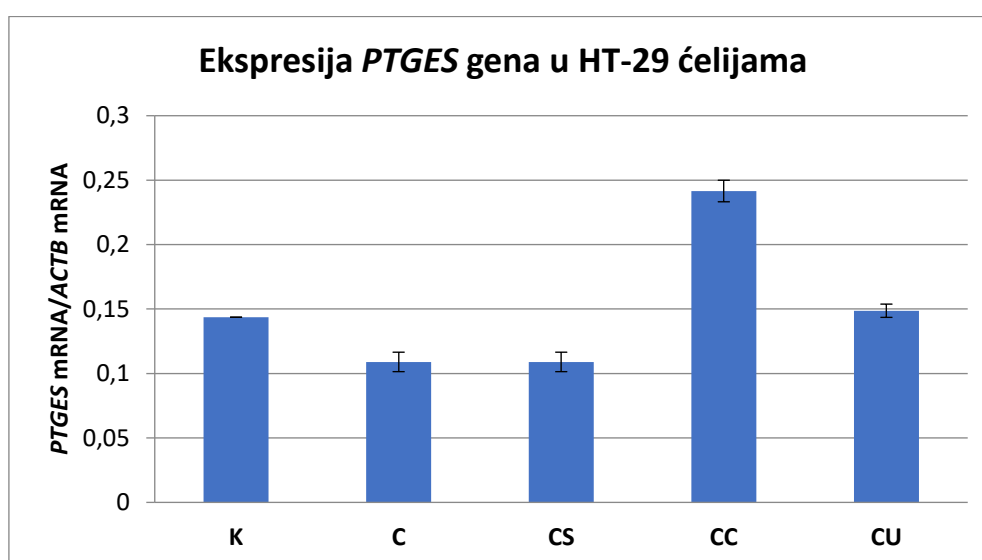


Grafikon 4.38. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Analizirajući relativnu ekspresiju *PTGES* gena u HT-29 ćelijskoj liniji (tabela 4.39. i grafikon 4.39) utvrđeno je smanjenje ekspresije ovog gena u grupama C i CS ($p < 0,001$ vs. K). Dodatak silibinina celekoksibu nije promenio *PTGES* ekspresiju u odnosu na učinak samog celekoksiba. Kotretman sa obe žučne kiseline povećao je *PTGES* ekspresiju. U grupi CC došlo je do visoko statistički značajnog ($p < 0,001$) povećanja relativne ekspresije *PTGES* gena u odnosu na grupe K i C. U grupi CU zabeležena je blago povećana ekspresija u poređenju sa K grupom, bez statističke značajnosti, ali je to povećanje bilo visoko statistički značajno u odnosu na C grupu ($p < 0,001$).

Tabela 4.39. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>PTGES</i> | 0,1436 ± 0,0000 | 0,1090 ± 0,0075 | 0,1090 ± 0,0075 | 0,2416 ± 0,0084 | 0,1487 ± 0,0051 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |

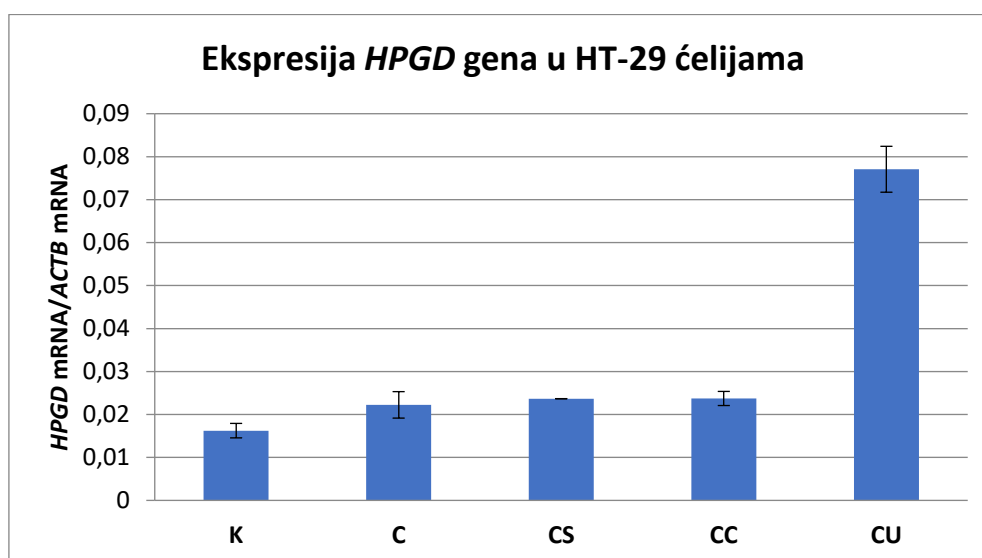


Grafikon 4.39. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije *HPGD* gena prikazane su u tabeli 4.40. i na grafikonu 4.40. U grupama C, CS i CC došlo je do blagog povećanja genske ekspresije u odnosu na kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti. Dodatak silibinina i CDCA celekoksibu nije značajno uticao na promenu ekspresije ovog gena, u odnosu na ekspresiju gena u grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom. U grupi CU došlo do izraženijeg povećanja ekspresije *HPGD* gena i to povećanje je bilo visoko statistički značajno u odnosu na sve ostale grupe (p<0,001 vs. K, C, CS i CC).

Tabela 4.40. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| <i>HPGD</i> | 0,0162 ± 0,0017 | 0,0222 ± 0,0031 | 0,0237 ± 0,0000 | 0,0237 ± 0,0016 | 0,0771 ± 0,0053 |
| p<0,05 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |

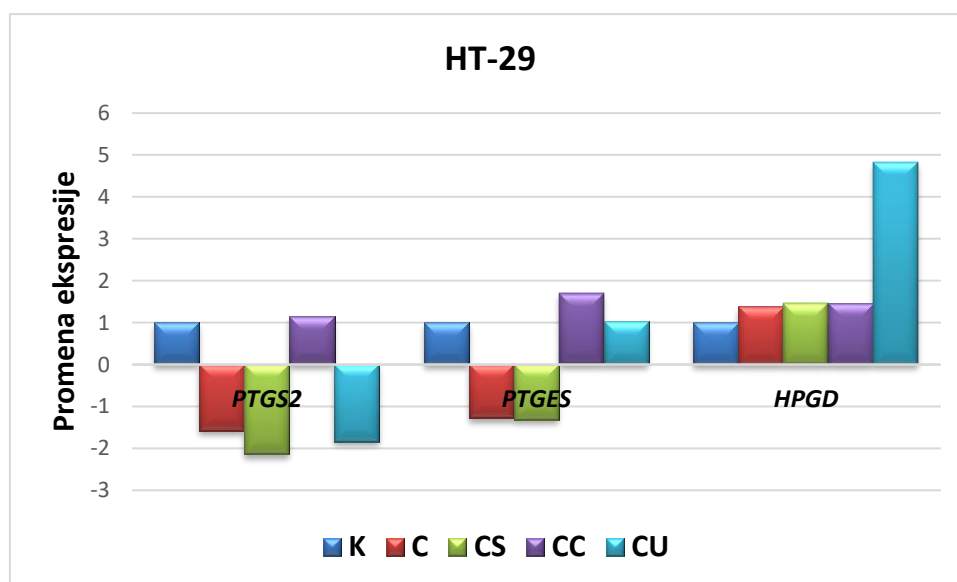


Grafikon 4.40. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) opisanih gena, uključenih u proces inflamacije u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.41. i na grafikonu 4.41.

Tabela 4.41. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>PTGS2</i> | | <i>PTGES</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,63 ± 0,16 | 1 | 0,78 ± 0,19 | 1 | 1,38 ± 0,19 | 1 |
| CS | 0,47 ± 0,00 | 0,76 ± 0,00 | 0,76 ± 0,05 | 1,00 ± 0,07 | 1,46 ± 0,00 | 1,07 ± 0,00 |
| CC | 1,14 ± 0,26 | 1,85 ± 0,42 | 1,69 ± 0,21 | 2,24 ± 0,28 | 1,47 ± 0,16 | 1,08 ± 0,12 |
| CU | 0,54 ± 0,08 | 0,88 ± 0,14 | 1,04 ± 0,08 | 1,37 ± 0,11 | 4,81 ± 0,74 | 3,52 ± 0,54 |



Grafikon 4.41. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

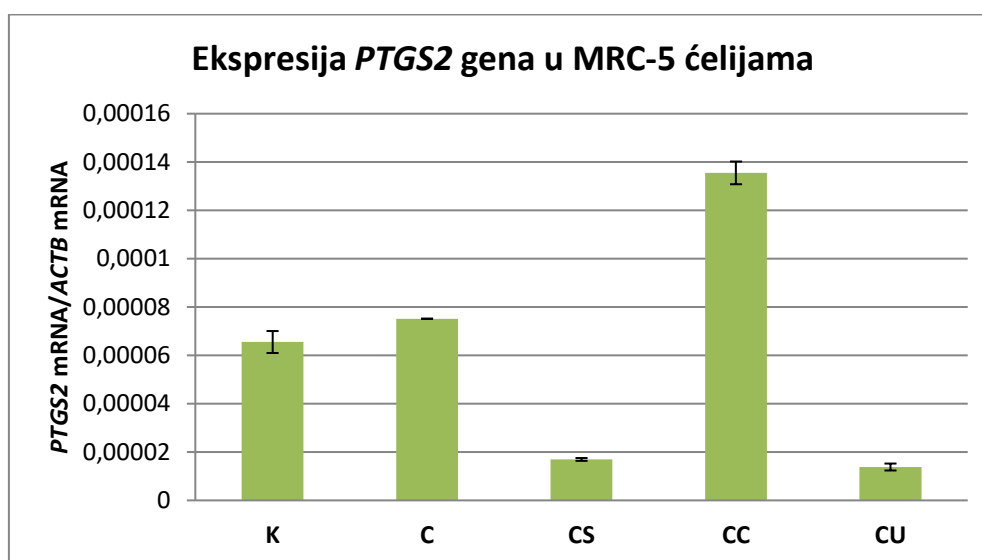
4.4.1.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu proces inflamacije u MRC-5 ćelijskoj liniji

Analizirajući profil relativne ekspresije *PTGS2* gena u MRC-5 ćelijama (tabela 4.42. i grafikon 4.42), zapaža se da je tretman celekoksibom doveo do statistički značajnog povećanja ekspresije ovog gena ($p=0,019$ vs. K), ali je dodatak prirodnih supstanci silibinina i UDCA (grupe CS i CU) izazvao smanjenu ekspresiju *PTGS2* gena i to uz visoku statističku

značajnost ($p < 0,001$ vs. K, C). Povećanje ekspresije ovog gena zabeleženo je u grupi CC, visoko statistički značajno ($p < 0,001$ vs. K, C).

Tabela 4.42. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|--|---|---|---|
| <i>PTGS2</i> | $6,55 \times 10^{-5} \pm 4,54 \times 10^{-6}$ | $7,51 \times 10^{-5} \pm 2,09 \times 10^{-19}$ | $1,69 \times 10^{-5} \pm 5,87 \times 10^{-7}$ | $1,35 \times 10^{-4} \pm 4,70 \times 10^{-6}$ | $1,38 \times 10^{-5} \pm 1,43 \times 10^{-6}$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CC |

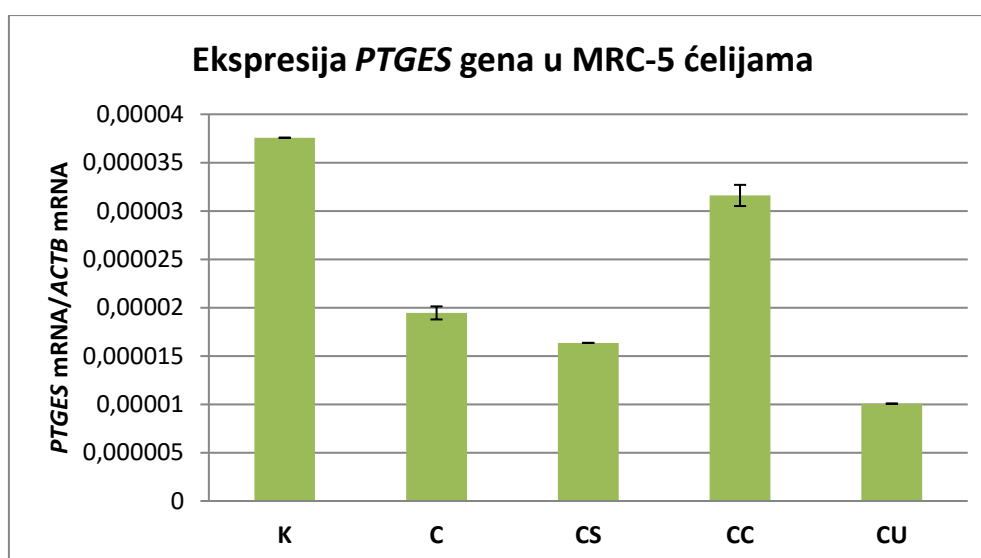


Grafikon 4.42. Relativna ekspresija mRNA za *PTGS2* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.43. i na grafikonu 4.43. prikazane su vrednosti relativne ekspresije *PTGES* gena u normalnim MRC-5 ćelijama. U poređenju sa kontrolnom, netretiranom grupom, u svim tretiranim grupama (C, CS, CC i CU) došlo je do visoko statistički značajnog ($p < 0,001$) smanjenja ekspresije *PTGES* gena. Silibinin i UDCA pokazali su sinergističko dejstvo sa celekoksibom jer, u odnosu na C grupu, u grupama CS i CU zabeležena je smanjena ekspresija ovog gena ($p < 0,001$), dok je kotretman sa CDCA (CC) doveo do povećanja ekspresije, u poređenju sa C grupom ($p < 0,001$).

Tabela 4.43. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|--|---|----------------------------------|---|--|
| <i>PTGES</i> | $3,76 \times 10^{-5} \pm 1,17 \times 10^{-19}$ | $1,95 \times 10^{-5} \pm 6,74 \times 10^{-7}$ | $1,64 \times 10^{-5} \pm 0,0000$ | $3,16 \times 10^{-5} \pm 1,10 \times 10^{-6}$ | $1,01 \times 10^{-5} \pm 5,75 \times 10^{-20}$ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |

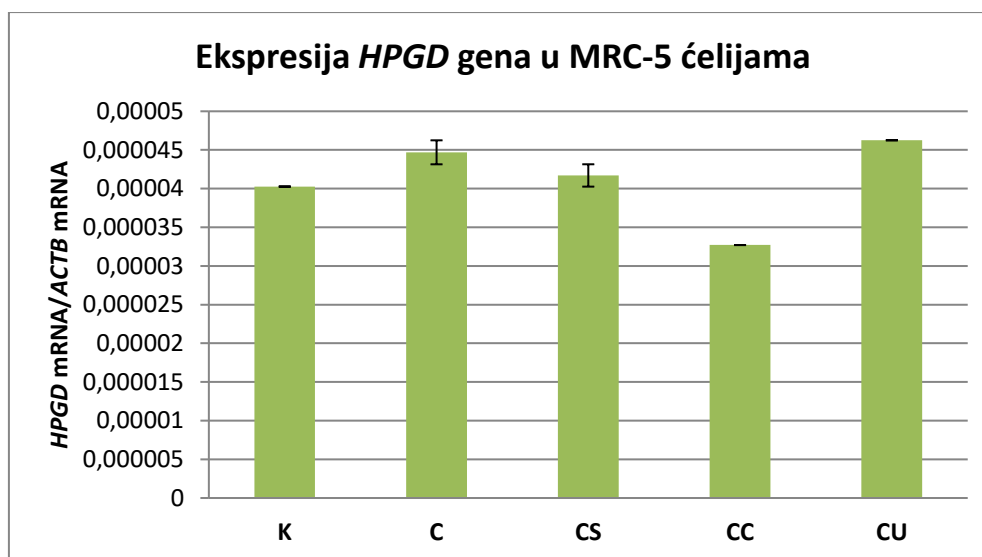


Grafikon 4.43. Relativna ekspresija mRNA za *PTGES* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U MRC-5 ćelijama tretman celekoksibom izazvao je povećanu ekspresiju *HPGD* gena ($p=0,001$ vs. K). Jedino je kotretman sa UDCA doprineo dodatnom povećanju ekspresije ovog tumor-supresorskog gena, u odnosu na sâm celekoksib, ali to povećanje nije bilo statistički značajno. Kotretman sa drugom žučnom kiselinom, CDCA, izazvao je smanjenje ekspresije *HPGD* ($p<0,001$ vs. K, C). Dodatak silibinina celekoksibu smanjio je ekspresiju ovog gena ($p=0,020$ vs. C), ali se u CS grupi i dalje zadržala povećana *HPGD* ekspresija u poređenju sa rezultatom dobijenim u kontrolnoj grupi. Rezultati su prikazani u tabeli 4.44. i na grafikonu 4.44.

Tabela 4.44. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|--|---|---|--|--|
| <i>HPGD</i> | $4,03 \times 10^{-5} \pm 1,12 \times 10^{-19}$ | $4,47 \times 10^{-5} \pm 1,55 \times 10^{-6}$ | $4,17 \times 10^{-5} \pm 1,45 \times 10^{-6}$ | $3,27 \times 10^{-5} \pm 5,97 \times 10^{-20}$ | $4,63 \times 10^{-5} \pm 5,87 \times 10^{-20}$ |
| p<0,05 | vs. C, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CC, CU | vs. K, CC | vs. CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| p<0,001 | vs. CC, CU | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |

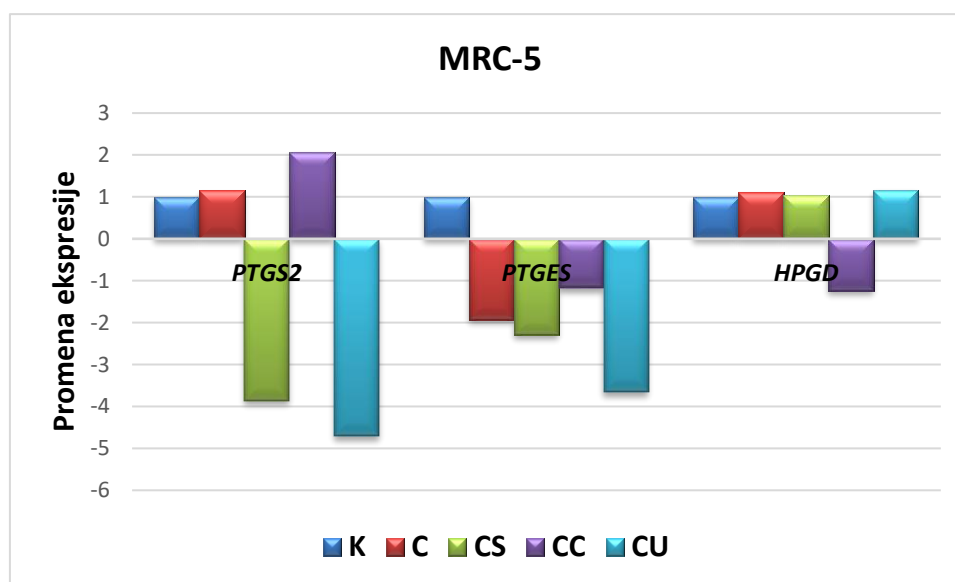


Grafikon 4.44. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za opisane gene, koji su uključeni u proces inflamacije i regulaciju COX-2-zavisnih signalnih puteva, u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.45. i na grafikonu 4.45.

Tabela 4.45. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>PTGS2</i> | | <i>PTGES</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,15 ± 0,06 | 1 | 0,52 ± 0,04 | 1 | 1,11 ± 0,09 | 1 |
| CS | 0,26 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 | 0,44 ± 0,00 | 0,84 ± 0,00 | 1,04 ± 0,04 | 0,93 ± 0,03 |
| CC | 2,08 ± 0,16 | 1,81 ± 0,14 | 0,84 ± 0,07 | 1,63 ± 0,13 | 0,81 ± 0,04 | 0,73 ± 0,04 |
| CU | 0,21 ± 0,03 | 0,18 ± 0,03 | 0,27 ± 0,05 | 0,53 ± 0,10 | 1,17 ± 0,23 | 1,06 ± 0,20 |



Grafikon 4.45. Promene ekspresije mRNA za *PTGS2*, *PTGES* i *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije

U A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama ispitivana je relativna ekspresija gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije, nakon tretmana celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama. U ovom delu eksperimenta, ispitivane su ekspresije sledećih gena: *TP53* tumor-supresora, koji kodira sintezu p53 proteina, važnog činioca u zaustavljanju ćelijskog ciklusa i iniciranju procesa apoptoze, ukoliko dođe do oštećenja ćelije, *BCL2* antiapoptotskog gena, *BAX* proapoptotskog gena, *NFκB*, koji kodira sintezu transkripcionog faktora NF-κB, čija konstantna aktivacija dovodi do rezistencije na apoptozu, i *PTEN* tumor-supresorskog gena.

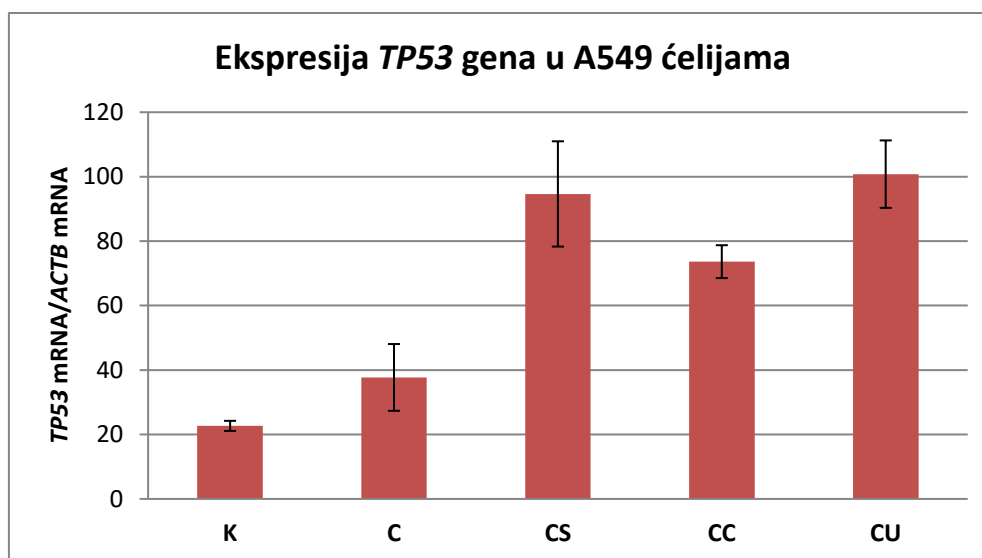
Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija analiziranog gena veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

4.4.2.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u A549 ćelijskoj liniji

Analizom relativne ekspresije *TP53* gena u A549 ćelijskoj liniji (tabela 4.46. i grafikon 4.46), uočava se da je celekoksib izazvao povećan nivo mRNA za *TP53*, u odnosu na netretiranu grupu, ali bez statističke značajnosti. Kotretmani sa silibininom, CDCA i UDCA ispoljili su sinergističko dejstvo sa celekoksibom i doprineli daljem povećanju *TP53* ekspresije, uz visoku statističku značajnost. Najveća ekspresija *TP53* gena postignuta je u CU grupi.

Tabela 4.46. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>TP53</i> | 22,6637 ± 1,5700 | 37,7063 ± 10,3552 | 94,6417 ± 16,3389 | 73,6345 ± 5,1009 | 100,7890 ± 10,4651 |
| p<0,05 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,01 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,001 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, C | vs. K | vs. K, C |

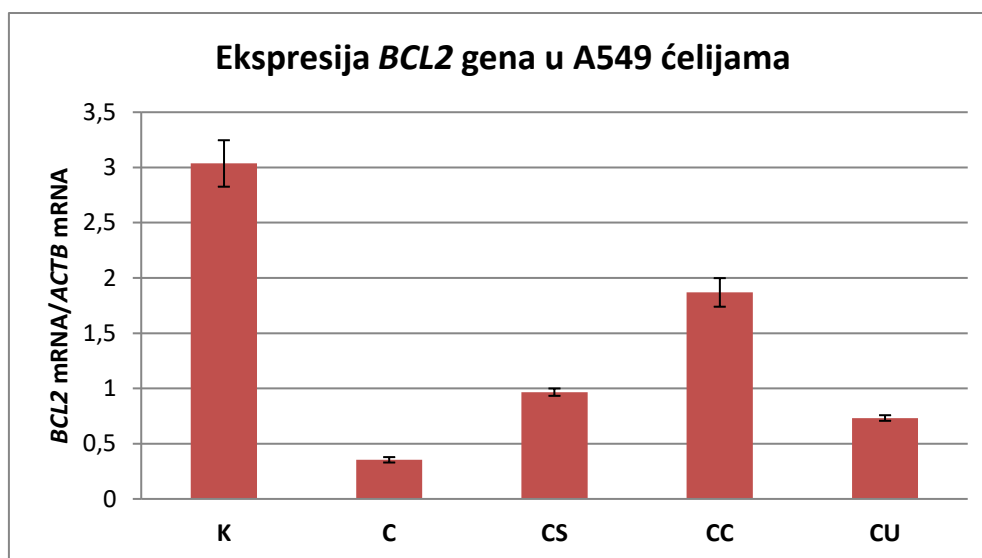


Grafikon 4.46. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.47. i na grafikonu 4.47. prikazana je relativna ekspresija antiapoptotskog gena *BCL2* u A549 ćelijama. Najizraženija negativna ekspresija ovog gena, u odnosu na kontrolnu grupu, izmerena je u grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom ($p < 0,001$ vs. K). Kombinacije celekoksiba sa silibininom i žučnim kiselinama nisu dovele do sinergističkog dejstva sa celekoksibom u pogledu smanjenja ekspresije ovog gena, ali su u tim grupama zabeležene niže vrednosti *BCL2* ekspresije u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$ vs. K). Kada se porede tri grupe kotretmana (CS, CC i CU), kotretman sa hidrofobnom žučnom kiselinom CDCA (CC) najviše je povećao ekspresiju ovog gena u odnosu na sâm celekoksib ($p < 0,001$ vs. C).

Tabela 4.47. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>BCL2</i> | 3,0363 ± 0,2103 | 0,3541 ± 0,0245 | 0,9663 ± 0,0335 | 1,8691 ± 0,1295 | 0,7323 ± 0,0254 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |

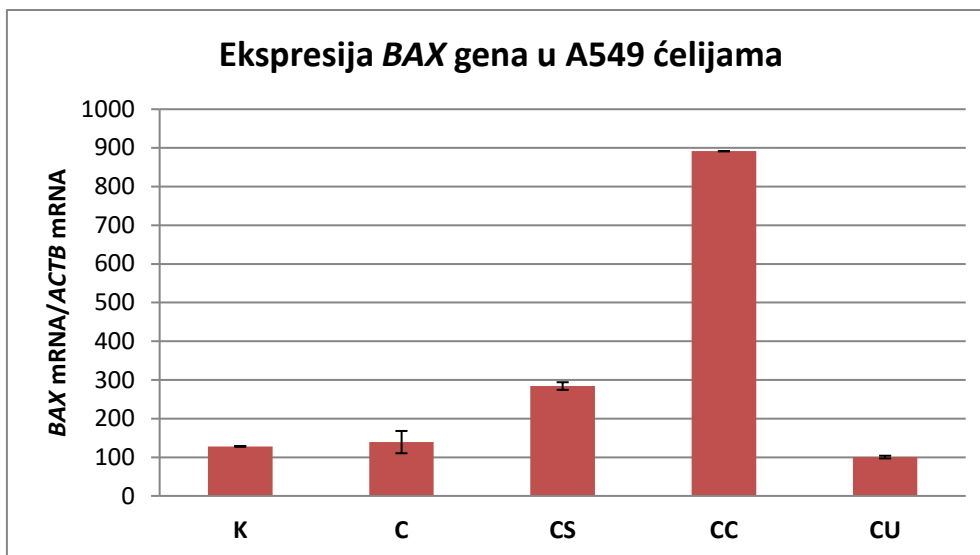


Grafikon 4.47. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije proapoptotskog gena *BAX* prikazane su u tabeli 4.48. i na grafikonu 4.48. Tretiranje ćelija celekoksibom dovelo je do povećanja ekspresije *BAX* gena u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Silibinin i CDCA su pokazali sinergističko dejstvo sa celekoksibom, kako se vidi u grupama CS i CC, u kojima je detektovana visoko statistički značajno povećana ekspresija *BAX* gena ($p < 0,001$ vs. K, C). Najveća ekspresija zabeležena je definitivno u grupi CC. Hidrofilna žučna kiselina UDCA nije pokazala sinergističko dejstvo sa celekoksibom na profil ekspresije ovog gena – u grupi CU zapaža se smanjena ekspresija *BAX* gena u odnosu na grupu K (bez statističke značajnosti) i u odnosu na grupu C ($p = 0,038$ vs. C).

Tabela 4.48. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| <i>BAX</i> | 128,0000 ± 0,0000 | 139,1715 ± 28,7846 | 284,1635 ± 9,8469 | 891,4438 ± 1,76x10 ⁻¹² | 100,4670 ± 3,4814 |
| $p < 0,05$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |



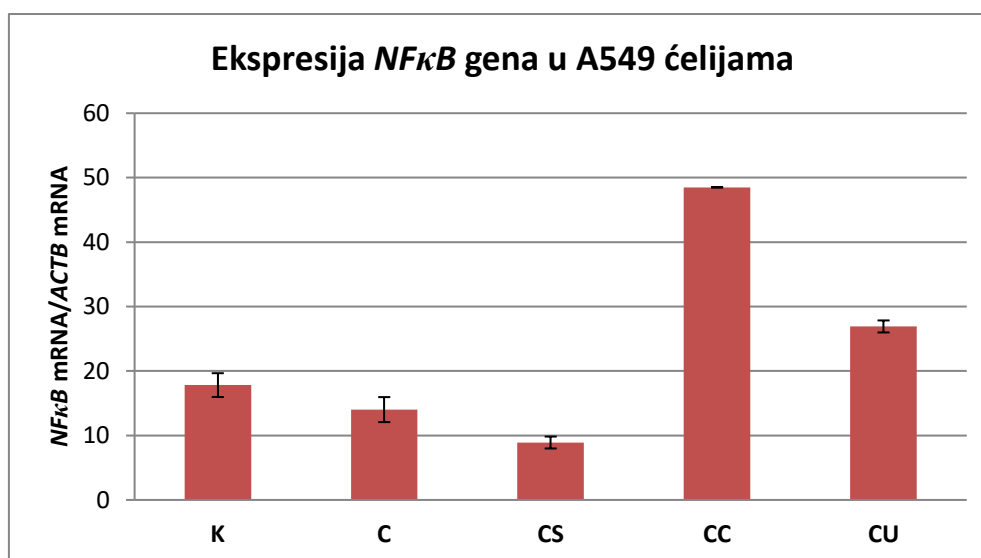
Grafikon 4.48. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u A549 ćelijskoj liniji.

Računanjem odnosa mRNA *BAX/BCL2* u A549 ćelijama, dobijaju se vrednosti 42,16 (K), 393,03 (C), 294,07 (CS), 476,94 (CC) i 137,19 (CU), što ukazuje da je, u poređenju sa kontrolnom grupom, u svim tretiranim grupama odnos količina proapoptotskog i antiapoptotskog gena usmeravao A549 ćelije ka apoptozi. Sinergističko proapoptotsko dejstvo sa celekoksibom uočava se pri dodatku CDCA.

U tabeli 4.49. i na grafikonu 4.49. predstavljena je relativna ekspresija *NFκB* gena u A549 ćelijskoj liniji. Tretman ćelija celekoksibom doveo je do negativne regulacije *NFκB* ekspresije, statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ($p=0,037$ vs. K). Tretman ćelija sa kombinacijom celekoksiba i silibinina (CS) prouzrokovao je dalje smanjenje ekspresije ovog gena ($p<0,001$ vs. K, $p<0,01$ vs. C). Dodatak žučnih kiselina celekoksibu (CC i CU) antagonizovao je uticaj celekoksiba na negativnu regulaciju genske ekspresije *NFκB*, i to povećanje genske ekspresije je bilo visoko statistički značajno ($p<0,001$ vs. K, C), pri čemu je uticaj bio najizraženiji u grupi CC.

Tabela 4.49. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>NFκB</i> | 17,8171 ± 1,8500 | 14,0182 ± 1,9387 | 8,9086 ± 0,9250 | 48,5029 ± 0,0000 | 26,9195 ± 0,9328 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. CS, CC, CU | vs. CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |

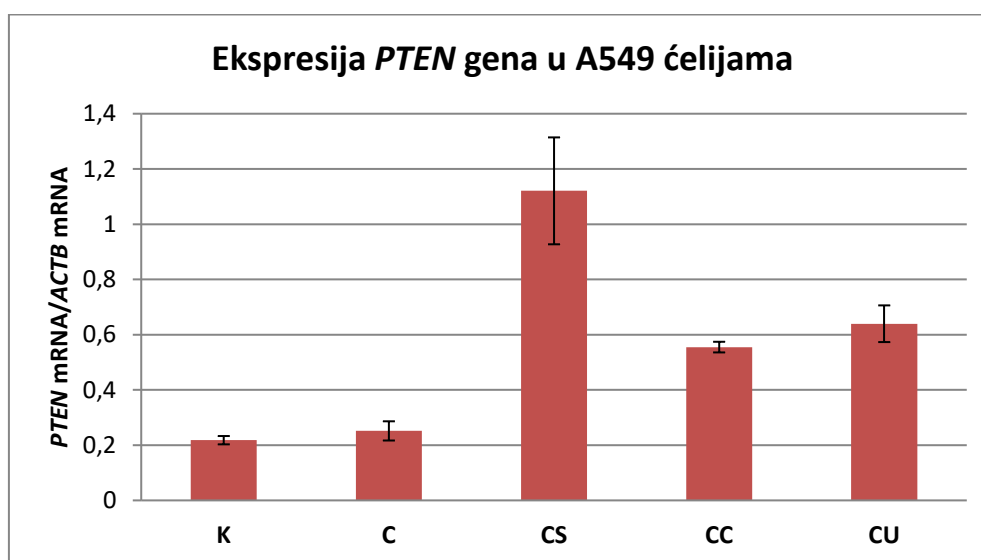


Grafikon 4.49. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.50. i na grafikonu 4.50. prikazana je relativna ekspresija *PTEN* gena. Tretman A549 ćelija celekoksibom doveo je do blagog povećanja *PTEN* ekspresije, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatak silibinina celekoksibu izazvao je dalje povećanje ekspresije *PTEN* gena i to uz visoku statističku značajnost ($p < 0,001$ vs. K, C). Od svih ispitivanih grupa, upravo je u CS grupi zabeležena najveća ekspresija ovog gena. Tretman ćelija kombinacijom celekoksiba i žučnih kiselina takođe je doveo do povećanja relativne ekspresije ovog gena u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi (CC, CU $p < 0,01$ vs. K) i u poređenju sa celekoksib grupom (CC $p = 0,017$ vs. C; CU $p < 0,01$ vs. C). Kada se uporede uticaji dve žučne kiseline, veća ekspresija postignuta je u grupi CU.

Tabela 4.50. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>PTEN</i> | 0,2180 ± 0,0151 | 0,2516 ± 0,0348 | 1,1207 ± 0,1935 | 0,5550 ± 0,0192 | 0,6396 ± 0,0664 |
| p<0,05 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| p<0,01 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, C, CS |
| p<0,001 | vs. CS | vs. CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS | vs. CS |



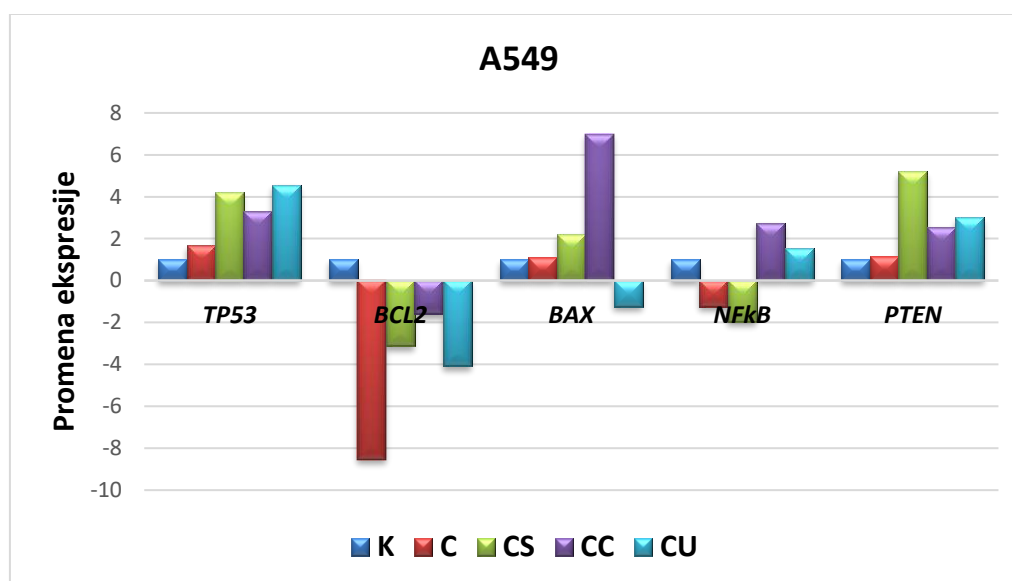
Grafikon 4.50. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene koji su uključeni u procese apoptoze i proliferacije u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.51. i na grafikonu 4.51.

Tabela 4.51. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFκB* i *PTEN* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>TP53</i> | | <i>BCL2</i> | | <i>BAX</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,69 ± 0,46 | 1 | 0,12 ± 0,01 | 1 | 1,10 ± 0,22 | 1 |
| CS | 4,23 ± 0,88 | 2,61 ± 0,54 | 0,32 ± 0,01 | 2,73 ± 0,09 | 2,23 ± 0,17 | 2,08 ± 0,16 |
| CC | 3,29 ± 0,51 | 2,02 ± 0,31 | 0,62 ± 0,10 | 5,34 ± 0,82 | 7,00 ± 0,68 | 6,53 ± 0,64 |
| CU | 4,56 ± 1,04 | 2,81 ± 0,64 | 0,25 ± 0,04 | 2,10 ± 0,36 | 0,80 ± 0,14 | 0,74 ± 0,13 |

| Grupa | <i>NFκB</i> | | <i>PTEN</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,79 ± 0,11 | 1 | 1,16 ± 0,16 | 1 |
| CS | 0,51 ± 0,07 | 0,64 ± 0,09 | 5,21 ± 1,08 | 4,54 ± 0,94 |
| CC | 2,75 ± 0,27 | 3,50 ± 0,34 | 2,56 ± 0,20 | 2,23 ± 0,17 |
| CU | 1,54 ± 0,26 | 1,96 ± 0,34 | 3,01 ± 0,69 | 2,62 ± 0,60 |



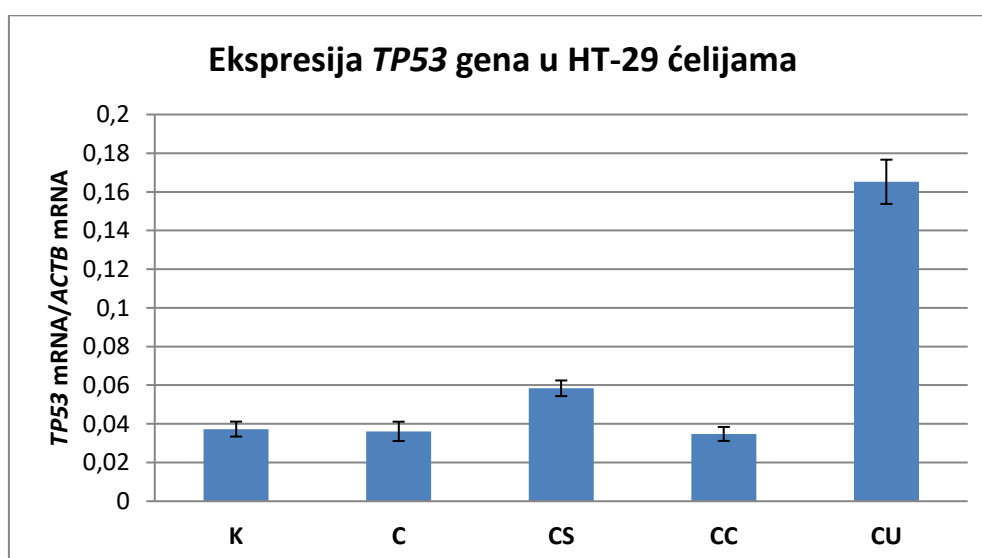
Grafikon 4.51. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFκB* i *PTEN* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.2.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.52. i na grafikonu 4.52. uočava se da u grupama K, C i CC međusobno nema značajnih razlika u pogledu vrednosti relativne ekspresije *TP53* gena u HT-29 ćelijama. Kotretman celekoksiba sa silibininom doveo je do statistički značajno povećane genske ekspresije ($p < 0,05$), u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj i celekoksib grupi. Rezultat najveće *TP53* ekspresije postignut je kotretmanom celekoksiba i UDCA i to visoko statistički značajno ($p < 0,001$ vs. K, C, CS i CC).

Tabela 4.52. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| <i>TP53</i> | 0,0373 ± 0,0039 | 0,0361 ± 0,0050 | 0,0584 ± 0,0040 | 0,0348 ± 0,0036 | 0,1652 ± 0,0114 |
| $p < 0,05$ | vs. CS, CU | vs. CS, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CU | vs. CU | vs. CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |



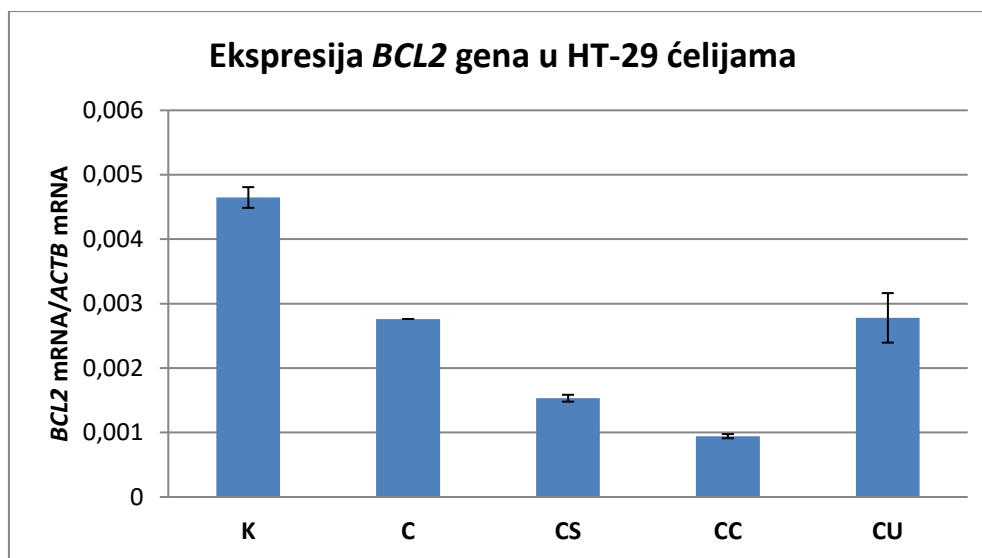
Grafikon 4.52. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u HT-29 ćelijskoj liniji.

U svim tretiranim grupama HT-29 ćelija (C, CS, CC i CU) došlo je smanjenja relativne ekspresije *BCL2* gena, visoko statistički značajno u odnosu na netretiranu grupu

($p < 0,001$ vs. K). Dodatak silibinina i CDCA celekoksibu doprineo je daljem smanjenju ekspresije ovog gena ($p < 0,001$ vs. C), a dodatak UDCA praktično nije promenio ekspresiju *BCL2* u odnosu na sâm celekoksib. Profil *BCL2* genske ekspresije predstavljen je u tabeli 4.53. u na grafikonu 4.53.

Tabela 4.53. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>BCL2</i> | 0,0046 ± 0,0002 | 0,0027 ± 0,0000 | 0,0015 ± 5,31x10 ⁻⁵ | 0,0009 ± 3,27x10 ⁻⁵ | 0,0028 ± 3,84x10 ⁻⁴ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. K, CS, CC |

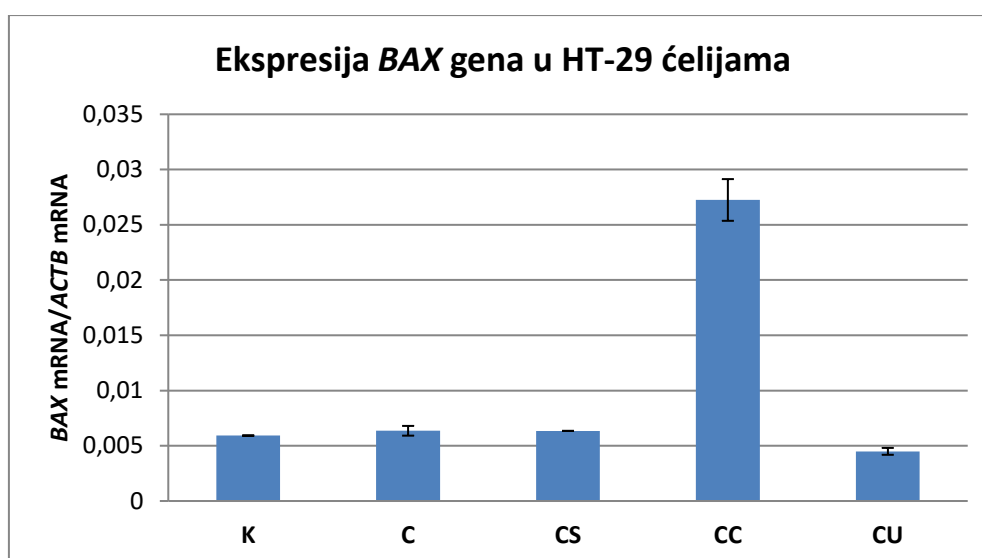


Grafikon 4.53. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u HT-29 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.54. i na grafikonu 4.54. prikazana je relativna ekspresija *BAX* gena u HT-29 ćelijama. Između kontrolne grupe, grupe tretirane celekoksibom i grupe tretirane kombinacijom celekoksiba i silibinina nema značajne razlike u pogledu vrednosti *BAX* ekspresije. Dodatak UDCA celekoksibu izazvao je negativnu ekspresiju, u odnosu na kontrolnu grupu i sâm celekoksib, ali bez statističke značajnosti. Najveća ekspresija ovog gena postignuta je kotretmanom celekoksiba sa CDCA ($p < 0,001$ vs. K, C, CS, CU).

Tabela 4.54. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>BAX</i> | $0,0059 \pm 5,39 \times 10^{-18}$ | $0,0064 \pm 0,0004$ | $0,0064 \pm 0,0000$ | $0,0272 \pm 0,0019$ | $0,0045 \pm 0,0003$ |
| p<0,05 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| p<0,01 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| p<0,001 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |



Grafikon 4.54. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u HT-29 ćelijskoj liniji.

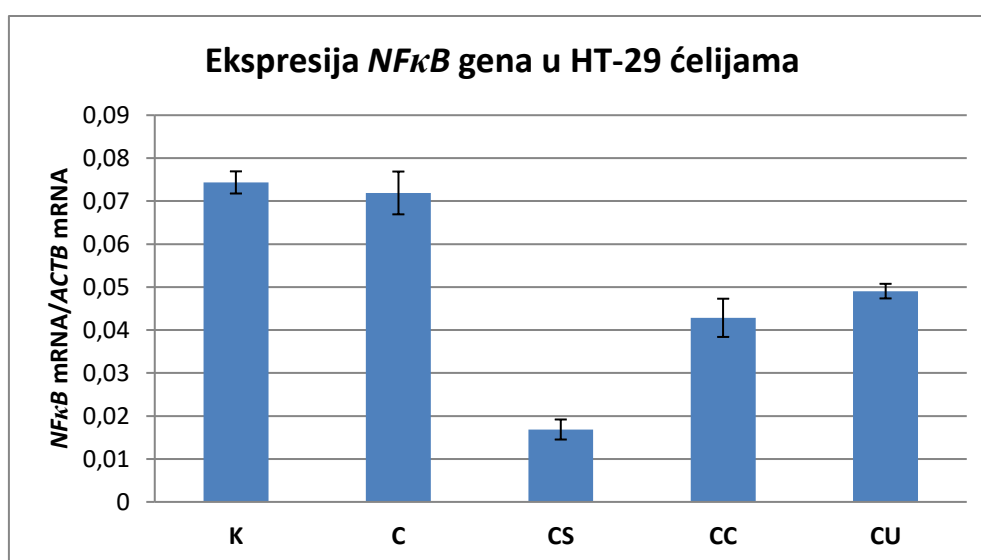
Računanjem odnosa mRNA *BAX/BCL2* u HT-29 ćelijama, dobijaju se vrednosti 1,28 (K), 2,37 (C), 4,27 (CS), 30,22 (CC) i 1,61 (CU), što ukazuje da je, u poređenju sa kontrolnom grupom, u svim tretiranim grupama odnos količina proapoptotskog i antiapoptotskog gena usmeravao HT-29 ćelije ka apoptozi. Sinergističko proapoptotsko dejstvo sa celekoksibom uočava se pri dodatku silibinina i CDCA.

Upoređivajući ekspresiju *NFκB* gena u eksperimentalnim grupama HT-29 ćelijske linije (tabela 4.55. i grafikon 4.55), zapaža se da je celekoksib izazvao blago sniženje ekspresije ovog gena u odnosu na netretiranu, kontrolnu grupu, ali bez statističke značajnosti. Kotretmani celekoksiba sa silibininom i žučnim kiselinama (CS, CC i CU) doprineli su

daljem smanjenju *NFκB* genske ekspresije i to visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na K i C grupe. Najveće smanjenje ekspresije postignuto je u CS grupi.

Tabela 4.55. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>NFκB</i> | 0,0744 ± 0,0026 | 0,0719 ± 0,0050 | 0,0168 ± 0,0023 | 0,0428 ± 0,0044 | 0,0491 ± 0,0017 |
| $p < 0,05$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |

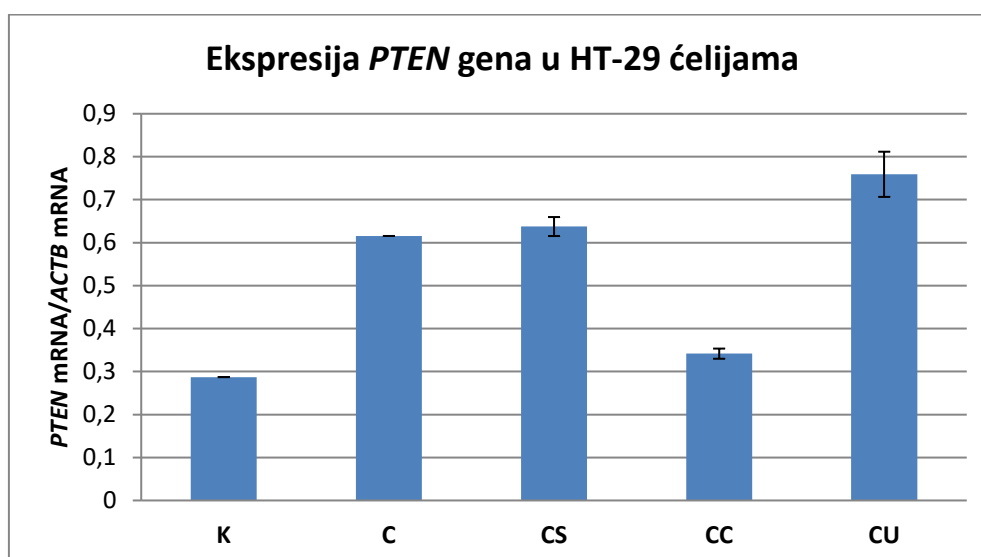


Grafikon 4.55. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije tumor-supresora *PTEN* u HT-29 ćelijskoj liniji prikazane su u tabeli 4.56. i na grafikonu 4.56. Tretiranje ćelija celekoksibom dovelo je do porasta *PTEN* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Dodatak silibinina dodatno je povećalo *PTEN* gensku ekspresiju ($p < 0,001$ vs. K), ali bez statističke značajnosti u odnosu na ekspresiju gena u celekoksib grupi. U grupi CC uočava se povećana ekspresija ovog gena u odnosu na kontrolu (bez statističke značajnosti), ali smanjena ekspresija u odnosu na sâm celekoksib ($p < 0,001$ vs. C). Najveća vrednost *PTEN* ekspresije zabeležena je u CU grupi ($p < 0,001$ vs. K, C).

Tabela 4.56. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| <i>PTEN</i> | 0,2872 ± 5,77x10 ⁻¹⁶ | 0,6156 ± 1,15x10 ⁻¹⁵ | 0,6375 ± 0,0221 | 0,3416 ± 0,0118 | 0,7591 ± 0,0526 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CC |



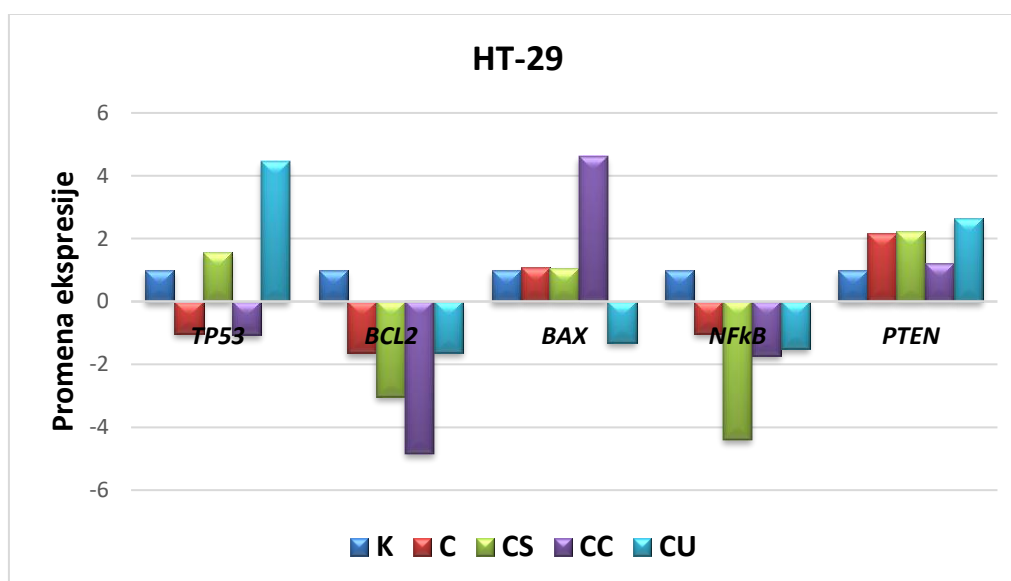
Grafikon 4.56. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene koji su uključeni u procese apoptoze i proliferacije u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.57. i na grafikonu 4.57.

Tabela 4.57. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFκB* i *PTEN* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>TP53</i> | | <i>BCL2</i> | | <i>BAX</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,98 ± 0,13 | 1 | 0,61 ± 0,12 | 1 | 1,08 ± 0,17 | 1 |
| CS | 1,57 ± 0,11 | 1,63 ± 0,11 | 0,33 ± 0,01 | 0,56 ± 0,02 | 1,07 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |
| CC | 0,94 ± 0,10 | 0,97 ± 0,10 | 0,21 ± 0,04 | 0,35 ± 0,06 | 4,62 ± 0,50 | 4,31 ± 0,47 |
| CU | 4,45 ± 0,31 | 4,61 ± 0,32 | 0,61 ± 0,13 | 1,02 ± 0,22 | 0,77 ± 0,12 | 0,72 ± 0,11 |

| Grupa | <i>NFκB</i> | | <i>PTEN</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,98 ± 0,15 | 1 | 2,18 ± 0,42 | 1 |
| CS | 0,23 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03 | 2,22 ± 0,08 | 1,04 ± 0,04 |
| CC | 0,58 ± 0,06 | 0,60 ± 0,06 | 1,21 ± 0,21 | 0,56 ± 0,10 |
| CU | 0,66 ± 0,05 | 0,69 ± 0,05 | 2,65 ± 0,18 | 1,23 ± 0,09 |



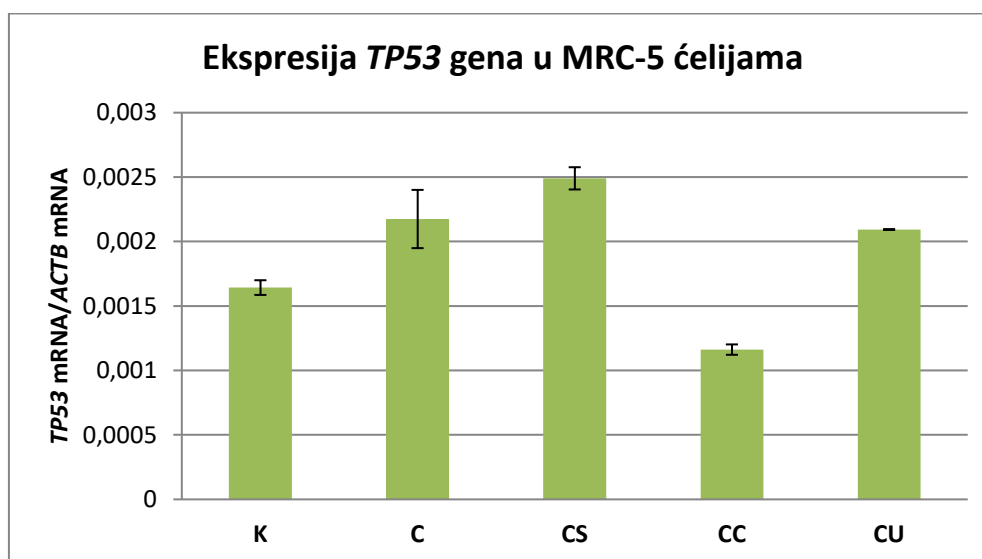
Grafikon 4.57. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFκB* i *PTEN* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.2.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese apoptoze i proliferacije u MRC-5 ćelijskoj liniji

Tretman MRC-5 ćelija celekoksibom izazvao je povećanje relativne ekspresije *TP53* gena, visoko statistički značajno ($p=0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Silibinin je ispoljio sinergističko dejstvo sa celekoksibom u profilu povećanja *TP53* ekspresije ($p<0,001$ vs. K; $p=0,040$ vs. C). UDCA nije pokazala sinergističko dejstvo sa celekoksibom, ali je u CU grupi postignuta povećana ekspresija u odnosu na ekspresiju u kontrolnoj grupi ($p=0,004$ vs. K). Kotretman sa CDCA smanjio je *TP53* gensku ekspresiju ($p=0,003$ vs. K; $p<0,001$ vs. C). Rezultati su prikazani u tabeli 4.58. i na grafikonu 4.58.

Tabela 4.58. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| <i>TP53</i> | $0,0016 \pm 5,69 \times 10^{-5}$ | $0,0022 \pm 0,0002$ | $0,0025 \pm 8,63 \times 10^{-5}$ | $0,0012 \pm 4,03 \times 10^{-5}$ | $0,0021 \pm 0,0000$ |
| $p<0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p<0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p<0,001$ | vs. CS | vs. CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. CC |

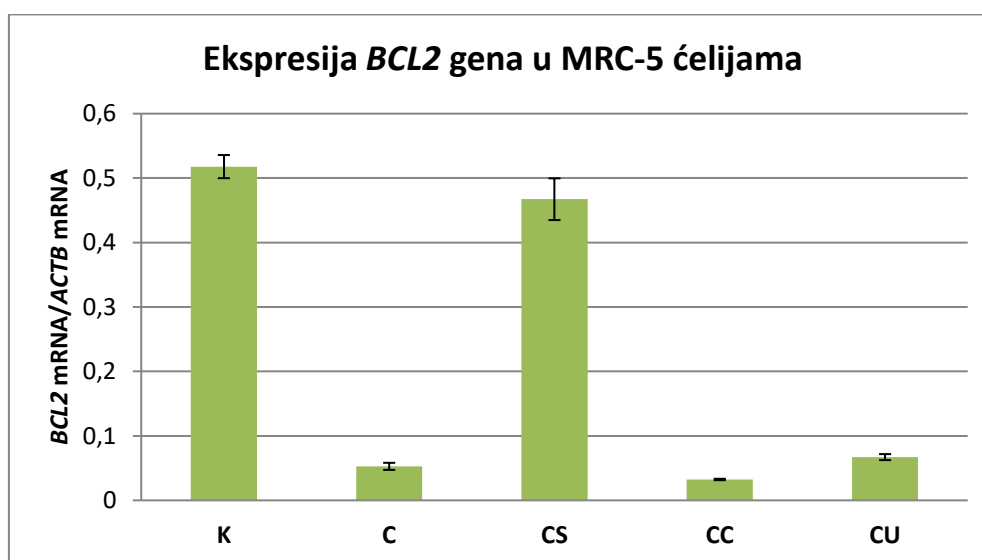


Grafikon 4.58. Relativna ekspresija mRNA za *TP53* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.59. i na grafikonu 4.59. predstavljeni su rezultati ispitivanja relativne ekspresije *BCL2* gena u MRC-5 ćelijskoj liniji. U celekoksib grupi došlo je do smanjenja *BCL2* ekspresije približno deset puta u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,001$). U grupi tretiranoj kombinacijom celekoksiba i silibinina uočava se smanjena ekspresija ovog gena u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnoj grupi ($p = 0,028$ vs. K), ali povećana ekspresija u odnosu na celekoksib grupu ($p < 0,001$ vs. C). Kada se pogleda uticaj žučnih kiselina, opaža se da su CDCA i UDCA izazvale smanjenu *BCL2* ekspresiju u odnosu na kontrolu ($p < 0,001$ vs. K). U poređenju sa grupom ćelija tretiranom samo celekoksibom, CDCA je dovela do smanjene *BCL2* ekspresije, a UDCA do povećane ekspresije, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.59. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>BCL2</i> | 0,5178 ± 0,0179 | 0,0527 ± 0,0055 | 0,4673 ± 0,0324 | 0,0324 ± 0,0011 | 0,0671 ± 0,0046 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, C, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, CS |
| $p < 0,01$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CS | vs. C, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, CS |
| $p < 0,001$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CS | vs. C, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, CS |



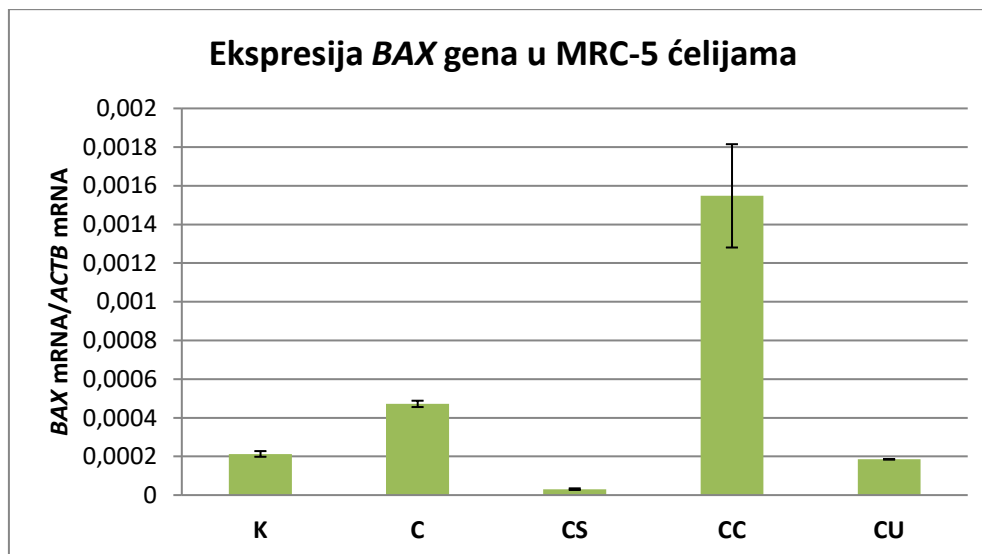
Grafikon 4.59. Relativna ekspresija mRNA za *BCL2* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.60. i na grafikonu 4.60. predstavljen je profil relativne ekspresije *BAX* gena. U celekoksib grupi zapaža se povećana *BAX* ekspresija, u poređenju sa kontrolnom grupom,

ali bez statističke značajnosti. Najveća *BAX* ekspresija postignuta je grupi CC ($p < 0,001$ vs. K, C). U CS i CU grupi postignuta je snižena ekspresija u odnosu na K grupu, bez statističke značajnosti. Kada se uporede sa C grupom, u CS grupi bila je statistički značajno ($p = 0,008$) snižena *BAX* ekspresija, dok je u CU grupi ostvarena smanjena ekspresija, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.60. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|---|---|---------------------|--|
| <i>BAX</i> | $2,13 \times 10^{-4} \pm 1,47 \times 10^{-5}$ | $4,72 \times 10^{-4} \pm 1,64 \times 10^{-5}$ | $3,07 \times 10^{-5} \pm 4,25 \times 10^{-6}$ | $0,0015 \pm 0,0003$ | $1,85 \times 10^{-4} \pm 5,83 \times 10^{-19}$ |
| $p < 0,05$ | vs. CC | vs. CS, CC | vs. C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| $p < 0,01$ | vs. CC | vs. CS, CC | vs. C, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| $p < 0,001$ | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |



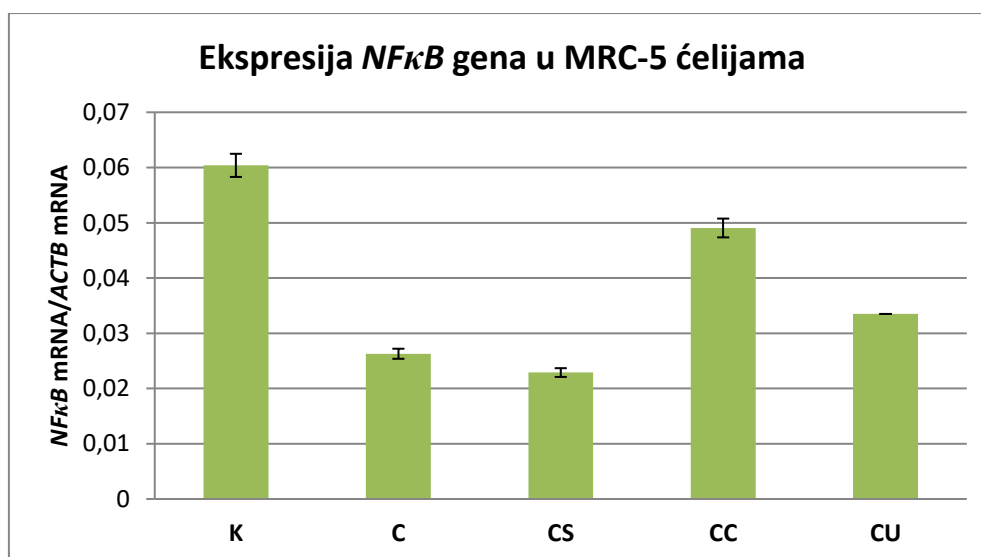
Grafikon 4.60. Relativna ekspresija mRNA za *BAX* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Računanjem odnosa mRNA *BAX/BCL2* u MRC-5 ćelijama, dobijaju se vrednosti $4,11 \times 10^{-4}$ (K), 9×10^{-3} (C), $6,57 \times 10^{-5}$ (CS), $4,63 \times 10^{-2}$ (CC) i $2,80 \times 10^{-3}$ (CU), što ukazuje da je, u poređenju sa kontrolnom grupom, u C, CC i CU eksperimentalnim grupama odnos količina proapoptotskog i antiapoptotskog gena usmeravao MRC-5 ćelije ka apoptozi. Sinergističko proapoptotsko dejstvo sa celekoksibom uočava se pri dodatku žučnih kiselina.

Analizirajući *NFκB* gensku ekspresiju u MRC-5 ćelijama (tabela 4.61. i grafikon 4.61), uočava se da je tretman celekoksibom doveo do smanjenja *NFκB* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$ vs. K). Kotretman sa silibininom izazvao je dalje smanjenje ekspresije ovog gena ($p < 0,001$ vs. K), bez statističke značajnosti u poređenju sa samim celekoksibom. Obe žučne kiseline su doprinele povećanoj *NFκB* ekspresiji u odnosu na celekoksib grupu ($p < 0,001$), ali smanjenoj ekspresiji u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi ($p < 0,001$).

Tabela 4.61. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| <i>NFκB</i> | 0,0604 ± 0,0021 | 0,0263 ± 0,0009 | 0,0229 ± 0,0008 | 0,0491 ± 0,0017 | 0,0335 ± 0,0000 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |

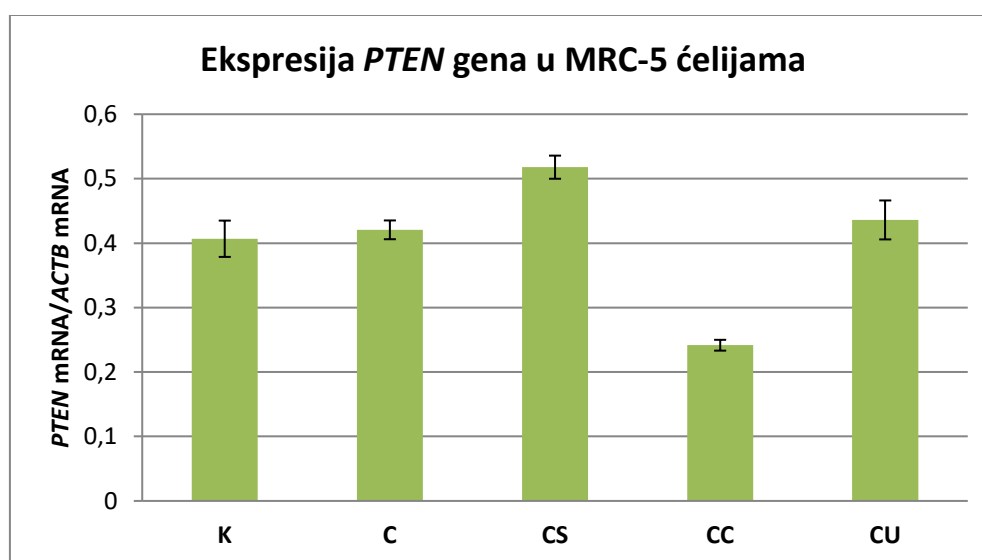


Grafikon 4.61. Relativna ekspresija mRNA za *NFκB* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U MRC-5 ćelijskoj liniji, tretman celekoksibom doveo je do neznatnog povećanja ekspresije *PTEN* tumor-supresora u poređenju sa netretiranom grupom. Silibinin je pokazao sinergističko dejstvo sa celekoksibom i upravo je u CS grupi bila prisutna najveća *PTEN* ekspresija ($p < 0,001$ vs. K; $p = 0,002$ vs. C). Takođe, u CU grupi zapaža se blago povećana ekspresija *PTEN* gena, ali bez statističke značajnosti u odnosu na K i C grupu. Jedino je u CC grupi detektovana snižena ekspresija ovog gena ($p < 0,001$ vs. K, C), kao što je i prikazano u tabeli 4.62. i na grafikonu 4.62.

Tabela 4.62. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| <i>PTEN</i> | 0,4068 ± 0,0282 | 0,4206 ± 0,0146 | 0,5178 ± 0,0179 | 0,2416 ± 0,0084 | 0,4360 ± 0,0302 |
| $p < 0,05$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC | vs. CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |



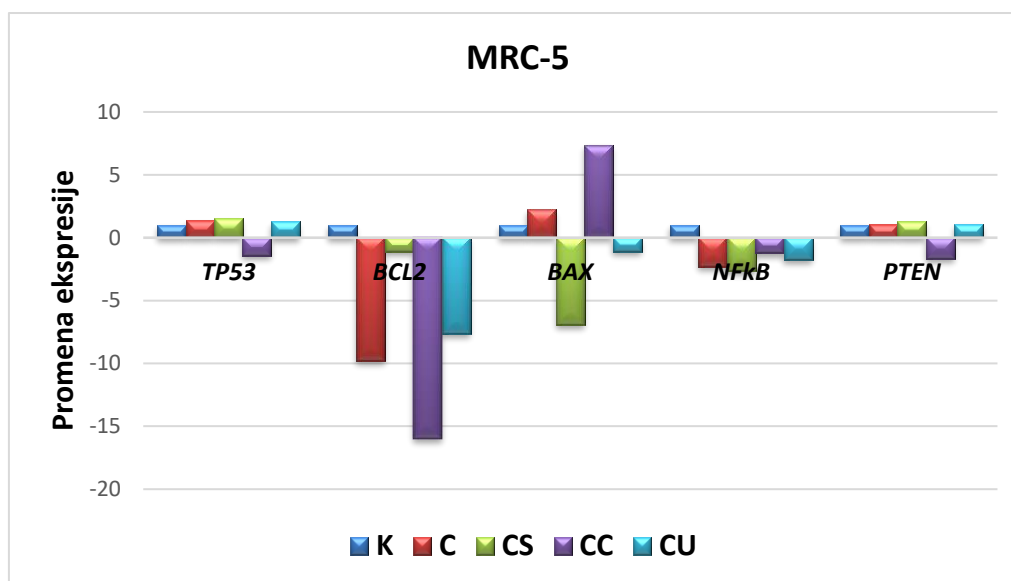
Grafikon 4.62. Relativna ekspresija mRNA za *PTEN* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene koji su uključeni u procese apoptoze i proliferacije u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.63. i na grafikonu 4.63.

Tabela 4.63. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFκB* i *PTEN* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>TP53</i> | | <i>BCL2</i> | | <i>BAX</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,33 ± 0,19 | 1 | 0,10 ± 0,01 | 1 | 2,23 ± 0,17 | 1 |
| CS | 1,52 ± 0,05 | 1,15 ± 0,04 | 0,90 ± 0,06 | 8,90 ± 0,62 | 0,14 ± 0,02 | 0,07 ± 0,01 |
| CC | 0,71 ± 0,05 | 0,54 ± 0,04 | 0,06 ± 0,00 | 0,62 ± 0,02 | 7,37 ± 1,53 | 3,32 ± 0,69 |
| CU | 1,30 ± 0,25 | 0,98 ± 0,19 | 0,13 ± 0,02 | 1,29 ± 0,20 | 0,89 ± 0,17 | 0,40 ± 0,08 |

| Grupa | <i>NFκB</i> | | <i>PTEN</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,44 ± 0,03 | 1 | 1,04 ± 0,08 | 1 |
| CS | 0,38 ± 0,01 | 0,87 ± 0,03 | 1,28 ± 0,04 | 1,23 ± 0,04 |
| CC | 0,81 ± 0,03 | 1,87 ± 0,06 | 0,59 ± 0,02 | 0,57 ± 0,02 |
| CU | 0,57 ± 0,11 | 1,30 ± 0,25 | 1,08 ± 0,17 | 1,05 ± 0,16 |



Grafikon 4.63. Promene ekspresije mRNA za *TP53*, *BCL2*, *BAX*, *NFkB* i *PTEN* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.3. Analiza ekspresije gena koji reguliše procese transporta

U malignim (A549 i HT-29) i normalnim (MRC-5) ćeljama, tretiranim celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama, ispitivana je relativna ekspresija gena *ABCC1* (*ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1*), koji kodira sintezu MRP1 (*Multidrug Resistance-Associated Protein 1*) transportnog proteina. MRP1 je uključen u transport brojnih supstanci kroz ćelijske membrane. Ćelije kancera sa povećanom MRP1 ekspresijom pokazuju rezistenciju na veliki broj antitumorskih agenasa.

Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija ispitivanog gena veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

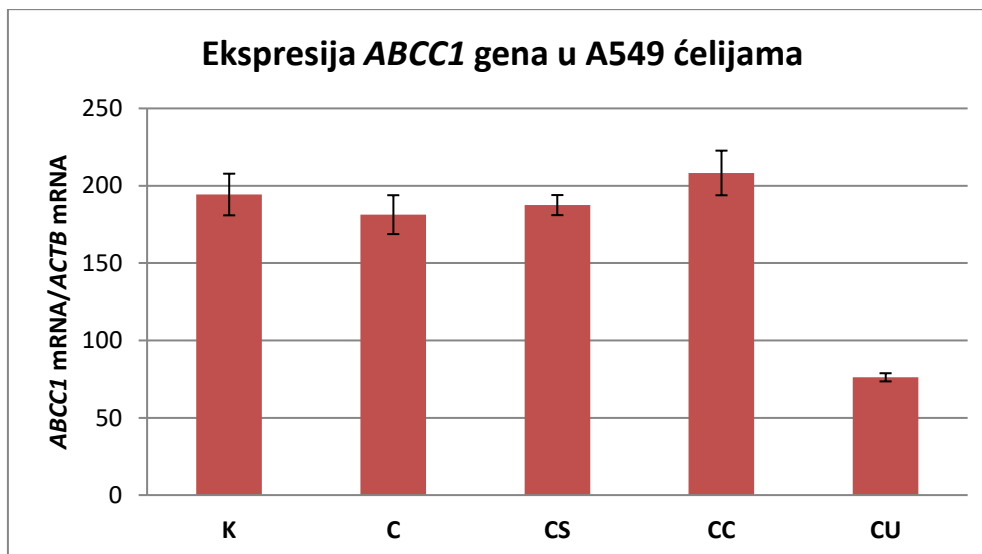
4.4.3.1. Analiza ekspresije gena koji reguliše procese transporta u A549 ćelijskoj liniji

Analizirajući relativnu ekspresiju gena *ABCC1* u A549 ćelijama (tabela 4.64. i grafikon 4.64) uočava se da je u grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom i u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i silibinina došlo do smanjenja *ABCC1* ekspresije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Između C i CS grupe nema statistički

značajne razlike u pogledu ekspresije ovog gena, iako se u CS grupi uočava nešto veća ekspresija u odnosu na C grupu. Kotretman sa CDCA je doveo do povećanja *ABCC1* genske ekspresije, takođe bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu i celekoksib grupu. Jedino je kotretman sa UDCA izazvao visoko statistički značajno ($p < 0,001$) smanjenu *ABCC1* ekspresiju u poređenju sa K i C grupom.

Tabela 4.64. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>ABCC1</i> | 194,3226 ± 13,4613 | 181,3094 ± 12,5599 | 187,4780 ± 6,4965 | 208,2698 ± 14,4275 | 76,1397 ± 2,6384 |
| $p < 0,05$ | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |

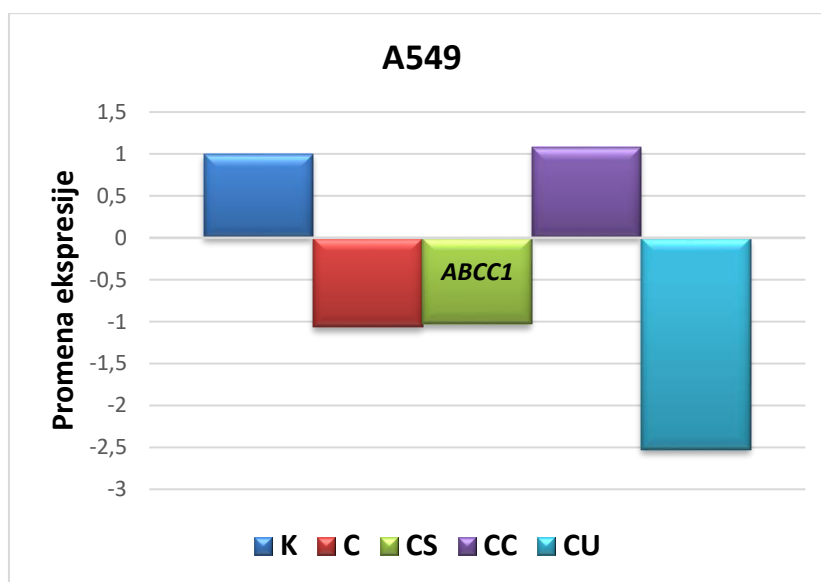


Grafikon 4.64. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za *ABCC1* gen u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.65. i na grafikonu 4.65.

Tabela 4.65. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>ABCC1</i> | |
|-------|--------------|-------------|
| | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / |
| C | 0,94 ± 0,06 | 1 |
| CS | 0,97 ± 0,03 | 1,04 ± 0,04 |
| CC | 1,07 ± 0,07 | 1,15 ± 0,08 |
| CU | 0,40 ± 0,05 | 0,42 ± 0,05 |



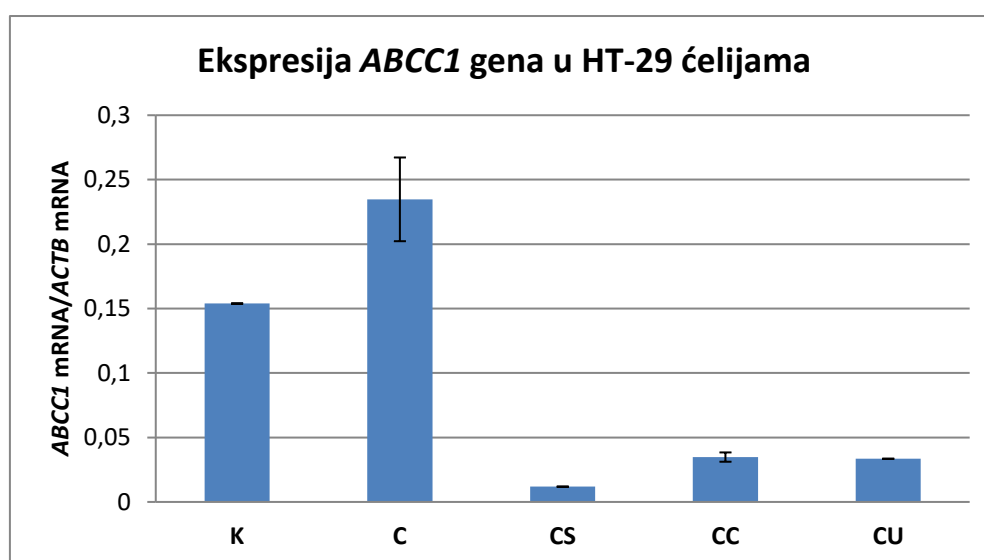
Grafikon 4.65. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.3.2. Analiza ekspresije gena koji reguliše procese transporta u HT-29 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.66. i na grafikonu 4.66. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u HT-29 ćelijama. U grupi ćelija tretiranim samo celekoksibom došlo je do povećane *ABCC1* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na netretiranu grupu. Dodatak silibinina i žučnih kiselina izazvao je smanjenje ekspresije ovog gena, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa genskom ekspresijom u kontrolnoj i celekoksib grupi. Najveće smanjenje ekspresije zabeleženo je u CS grupi.

Tabela 4.66. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>ABCC1</i> | $0,1539 \pm 5,77 \times 10^{-16}$ | $0,2347 \pm 0,0325$ | $0,0118 \pm 0,0000$ | $0,0348 \pm 0,0036$ | $0,0335 \pm 6,11 \times 10^{-17}$ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |

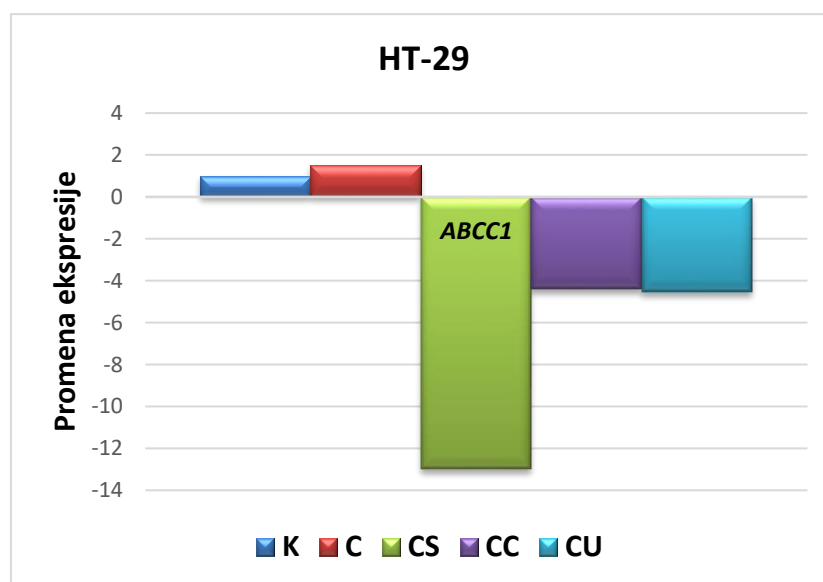


Grafikon 4.66. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za *ABCC1* gen u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.67. i na grafikonu 4.67.

Tabela 4.67. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>ABCC1</i> | |
|-------|--------------|-------------|
| | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / |
| C | 1,53 ± 0,21 | 1 |
| CS | 0,08 ± 0,00 | 0,05 ± 0,00 |
| CC | 0,23 ± 0,02 | 0,15 ± 0,02 |
| CU | 0,22 ± 0,02 | 0,14 ± 0,01 |



Grafikon 4.67. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

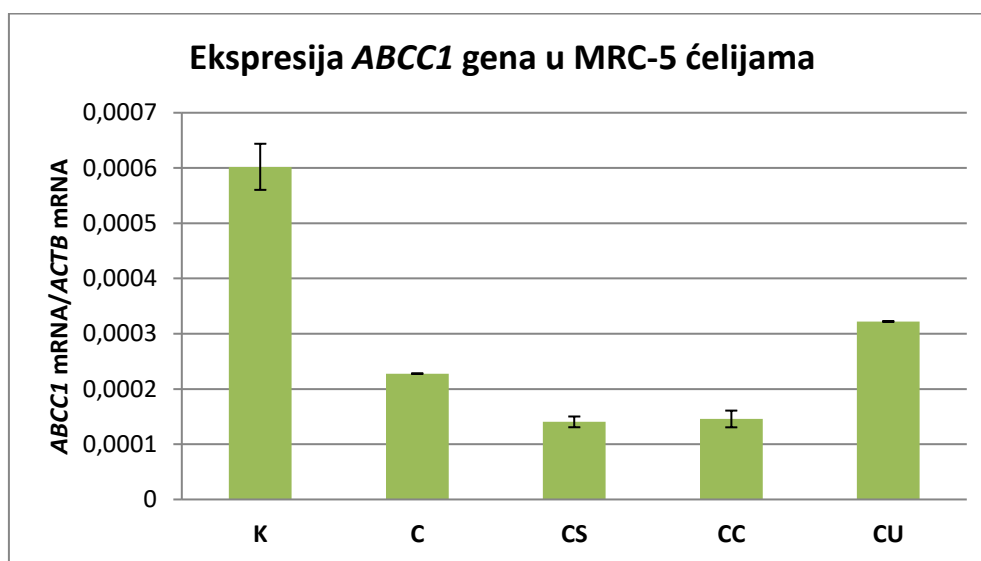
4.4.3.3. Analiza ekspresije gena koji reguliše procese transporta u MRC-5 ćelijskoj liniji

U MRC-5 ćelijama tretman celekoksibom doveo je do smanjene ekspresije *ABCC1* gena ($p < 0,001$ vs. K). Sinergističko dejstvo sa celekoksibom postigao je kotretman sa silibininom, a takođe i kotretman sa CDCA, pri kojima je došlo do daljeg smanjenja *ABCC1* genske ekspresije ($p < 0,001$ vs. K; $p < 0,01$ vs. C). Dodatak UDCA celekoksibu, naprotiv, pokazao je antagonističko dejstvo sa celekoksibom, izazivajući povećanu *ABCC1* ekspresiju u

odnosu na sâm celekoksib ($p=0,002$), ali i dalje smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolnu grupu ćelija ($p<0,001$). Rezultati su prikazani u tabeli 4.68. i na grafikonu 4.68.

Tabela 4.68. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|--|---|---|--|
| <i>ABCC1</i> | $6,02 \times 10^{-4} \pm 4,17 \times 10^{-5}$ | $2,28 \times 10^{-4} \pm 5,83 \times 10^{-19}$ | $1,40 \times 10^{-4} \pm 9,73 \times 10^{-6}$ | $1,46 \times 10^{-4} \pm 1,51 \times 10^{-5}$ | $3,22 \times 10^{-4} \pm 9,76 \times 10^{-19}$ |
| $p<0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p<0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p<0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, CS, CC |

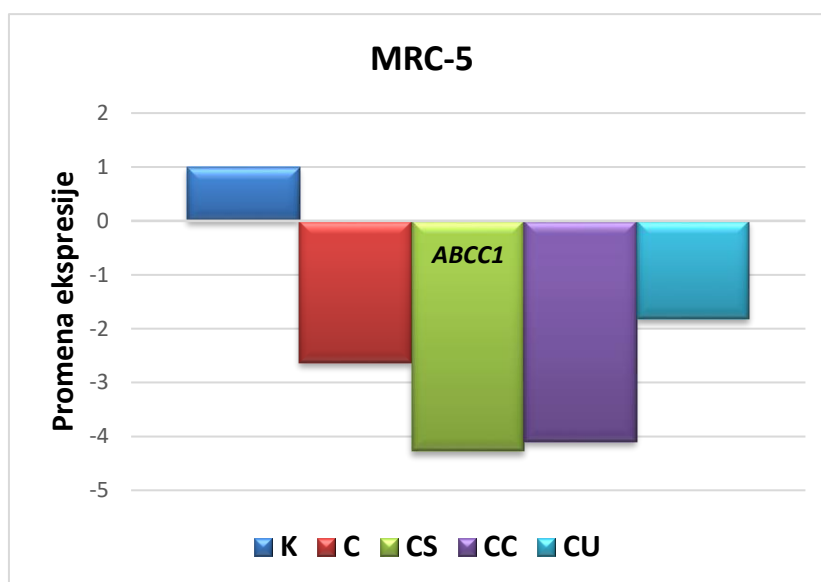


Grafikon 4.68. Relativna ekspresija mRNA za *ABCC1* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za *ABCC1* gen u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.69. i na grafikonu 4.69.

Tabela 4.69. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>ABCC1</i> | |
|-------|--------------|-------------|
| | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / |
| C | 0,38 ± 0,02 | 1 |
| CS | 0,23 ± 0,02 | 0,62 ± 0,04 |
| CC | 0,24 ± 0,03 | 0,64 ± 0,09 |
| CU | 0,55 ± 0,11 | 1,44 ± 0,28 |



Grafikon 4.69. Promena ekspresije mRNA za *ABCC1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.4. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja

U narednom delu eksperimenta, ispitivana je relativna ekspresija gena koji su uključeni u procese invazije i metastaziranja. Naime, u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama, koje su tokom 48 časova tretirane celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom i žučnim kiselinama, ispitivana je ekspresija *CDHI* gena, značajnog tumorsupresora, koji kodira sintezu E-kadherina. U pitanju je epitelni marker, zadužen za integritet ćelija, njihov oblik i međusobni kontakt. Takođe, ispitivana je ekspresija gena *MMP2* i *MMP9*, koji kodiraju sintezu matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, enzima iz porodice cink-zavisnih proteaza, čija se ključna uloga ogleda u razgradnji ekstracelularnog matriksa, promociji tumorske invazije i procesa metastaziranja.

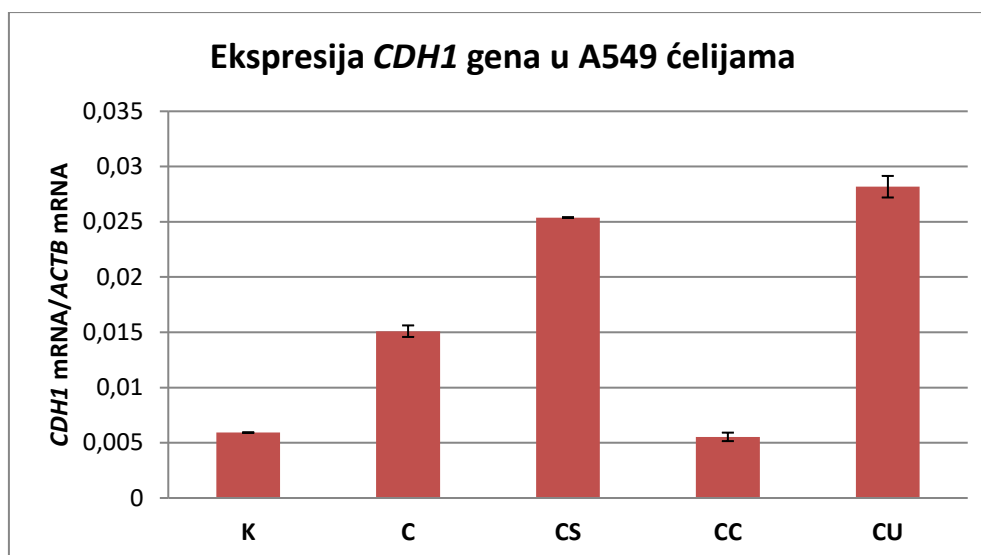
Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija ispitivanog gena veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

4.4.4.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u A549 ćelijskoj liniji

U tabeli 4.70. i na grafikonu 4.70. predstavljena je relativna ekspresija tumorsupresora *CDHI* u A549 ćelijama. Inkubacija ćelija celekoksibom izazvala je povećanu *CDHI* ekspresiju, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na netretiranu grupu ćelija. Dalje povećanje ekspresije ovog gena i sinergističko dejstvo sa celekoksibom postignuto je kotretmanom sa silibininom i UDCA ($p < 0,001$ vs. K, C). Najveća *CDHI* ekspresija uočava se u CU eksperimentalnoj grupi. Kotretman sa CDCA prouzrokovao je smanjenu ekspresiju ovog gena ($p < 0,001$ vs. C), praktično do nivoa genske ekspresije koji je prisutan u kontroli.

Tabela 4.70. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>CDH1</i> | 0,0059 ± 1,15x10 ⁻¹⁷ | 0,0151 ± 5,23x10 ⁻⁴ | 0,0254 ± 5,76x10 ⁻¹⁷ | 0,0055 ± 3,83x10 ⁻⁴ | 0,0282 ± 9,76x10 ⁻⁴ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |



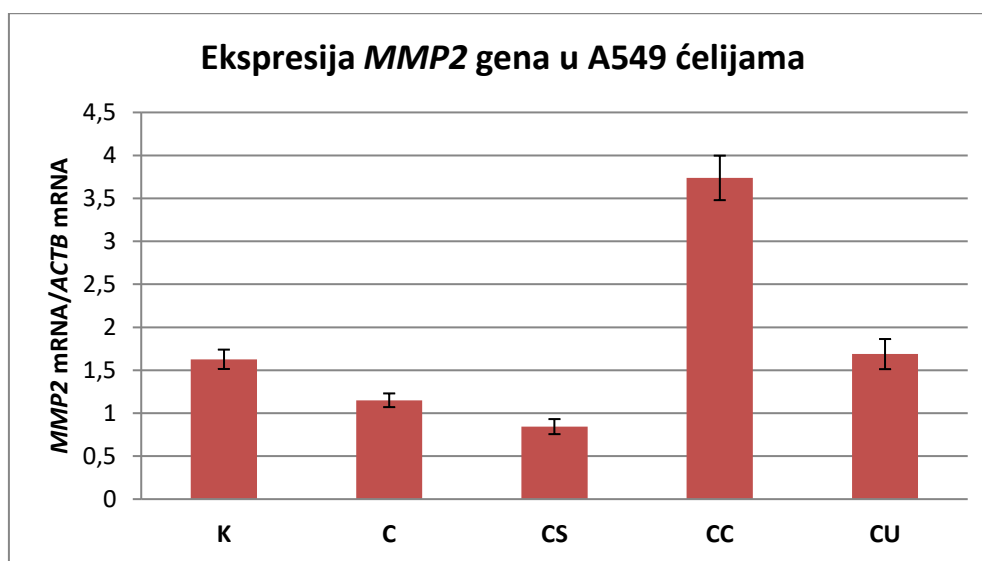
Grafikon 4.70. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u A549 ćelijskoj liniji.

Profili relativne ekspresije gena za matriksne metaloproteinaze *MMP2* i *MMP9* u A549 ćelijama predstavljeni su u tabelama 4.71. i 4.72. i na grafikonima 4.71. i 4.72. U poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi, tretman ćelija celekoksibom doveo je do smanjene ekspresije *MMP2* ($p=0,027$ vs. K) i *MMP9* ($p<0,001$ vs. K). Kotretman sa silibininom doveo je do daljeg smanjenja ekspresije oba gena, bez statističke značajnosti u odnosu na grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, ali visoko statistički značajno ($p<0,001$) u odnosu na kontrolu. CDCA je doprinela povećanoj ekspresiji *MMP2* i *MMP9* ($p<0,001$ vs. K, C). Analizirajući profile ekspresije ovih gena u grupi ćelija tretiranim kombinacijom celekoksiba i UDCA, uočava se da je u toj grupi došlo do povećanja ekspresije *MMP2*, statistički značajno ($p=0,013$) u odnosu na celekoksib grupu, pri čemu je vrednost relativne

ekspresije bila približno jednaka ekspresiji gena u kontrolnoj grupi. UDCA je, takođe, izazvala povećanje ekspresije *MMP9*, visoko statistički značajno ($p < 0,001$), ako se poredi sa celekoksib grupom.

Tabela 4.71. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

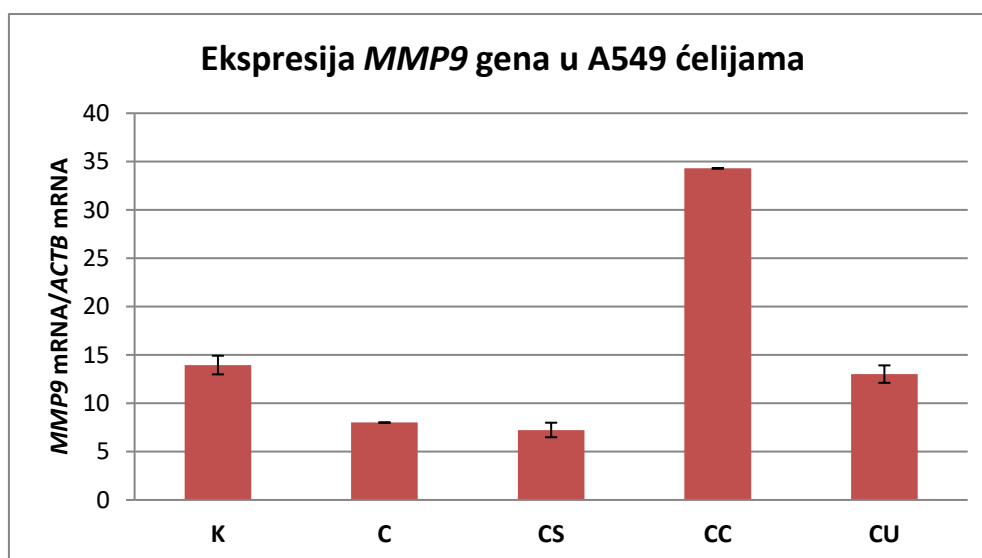
| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>MMP2</i> | 1,6271 ± 0,1127 | 1,1505 ± 0,0797 | 0,8439 ± 0,0876 | 3,7381 ± 0,2589 | 1,6879 ± 0,1752 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CS, CC | vs. CC | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC | vs. CC | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. CS, CC |



Grafikon 4.71. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u A549 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.72. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|------------------|
| <i>MMP9</i> | 13,9511 ± 0,9664 | 8,0000 ± 0,0000 | 7,2360 ± 0,7513 | 34,2967 ± 5,74x10 ⁻¹⁴ | 13,0169 ± 0,9017 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |

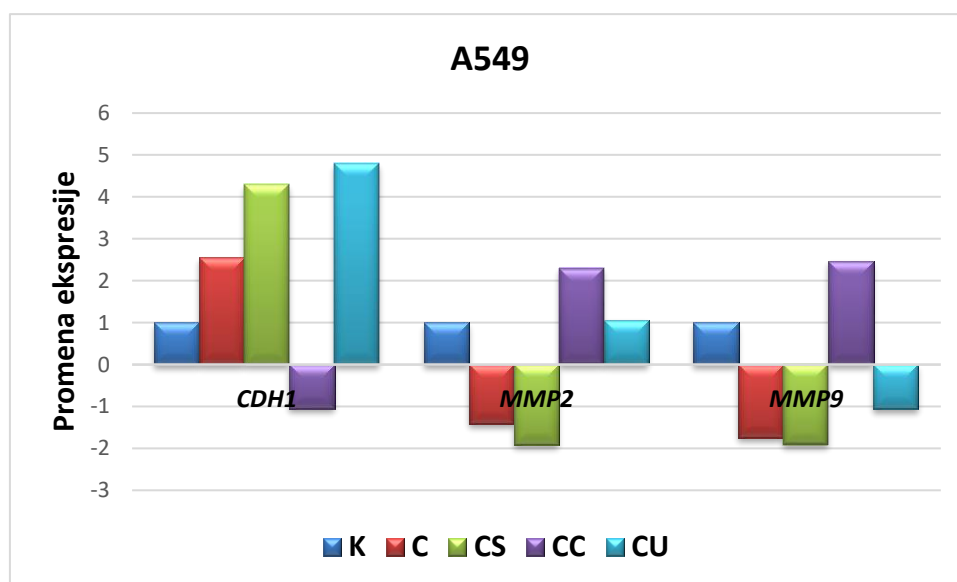


Grafikon 4.72. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene uključene u procese invazije i metastaziranja u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.73. i na grafikonu 4.73.

Tabela 4.73. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>CDH1</i> | | <i>MMP2</i> | | <i>MMP9</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 2,55 ± 0,09 | 1 | 0,71 ± 0,05 | 1 | 0,57 ± 0,00 | 1 |
| CS | 4,29 ± 0,21 | 1,68 ± 0,08 | 0,52 ± 0,07 | 0,74 ± 0,10 | 0,52 ± 0,07 | 0,91 ± 0,13 |
| CC | 0,94 ± 0,14 | 0,37 ± 0,06 | 2,30 ± 0,16 | 3,26 ± 0,23 | 2,47 ± 0,24 | 4,31 ± 0,42 |
| CU | 4,79 ± 0,60 | 1,88 ± 0,23 | 1,06 ± 0,24 | 1,50 ± 0,34 | 0,94 ± 0,10 | 1,63 ± 0,18 |



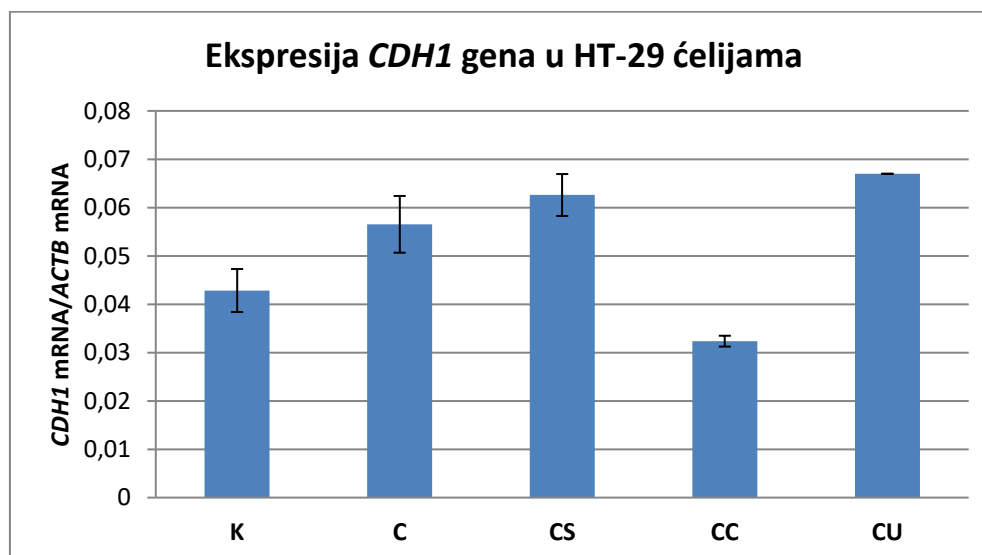
Grafikon 4.73. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.4.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u HT-29 ćelijskoj liniji

Ekspresija *CDH1* gena bila je pozitivno regulisana u grupi ćelija tretiranoj celekoksibom ($p < 0,01$ vs. K). Sinergističko dejstvo sa celekoksibom i dalje povećanje ekspresije ovog gena postignuto je kotretmanom sa silibininom i sa UDCA ($p < 0,001$ vs. K). Kotretman sa CDCA izazvao je smanjenje *CDH1* ekspresije ($p < 0,05$ vs. K; $p < 0,001$ vs. C). Ovi rezultati relativne ekspresije *CDH1* gena u HT-29 ćelijskoj liniji prikazani su u tabeli 4.74. i na grafikonu 4.74.

Tabela 4.74. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>CDH1</i> | $0,0428 \pm 0,0044$ | $0,0565 \pm 0,0059$ | $0,0626 \pm 0,0043$ | $0,0324 \pm 0,0011$ | $0,0670 \pm 1,76 \times 10^{-16}$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CU | vs. CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |



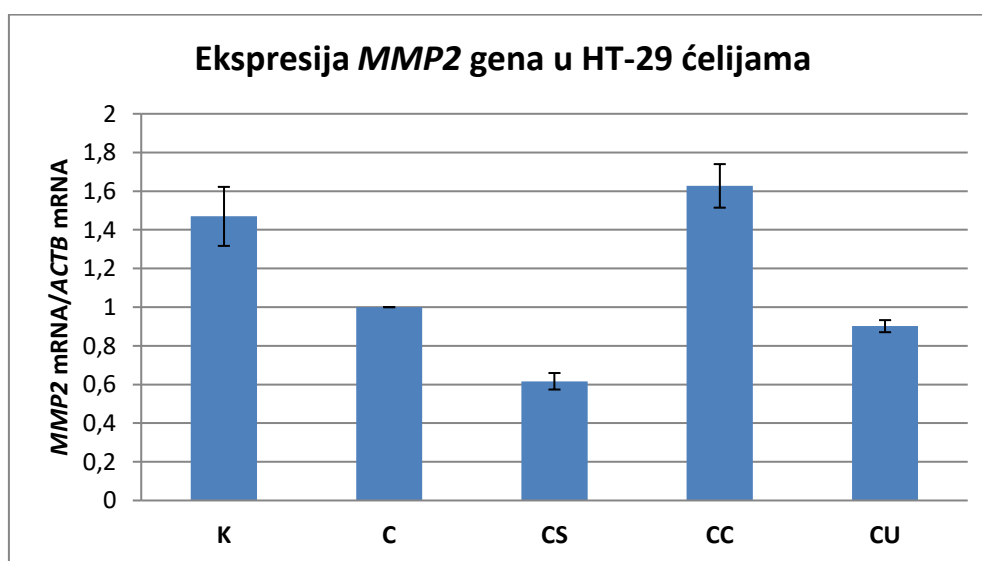
Grafikon 4.74. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije *MMP2* i *MMP9* gena u HT-29 ćelijskoj liniji prikazane su u tabelama 4.75. i 4.76, kao i na grafikonima 4.75. i 4.76. Ekspresija *MMP2* je, generalno,

bila viša u odnosu na *MMP9* gen, ali je uticaj celekoksiba, silibinina i žučnih kiselina na oba gena bio sličan. Tretman HT-29 ćelija celekoksibom doveo je do smanjenja ekspresije *MMP2* gena ($p < 0,001$ vs. K) i *MMP9* gena ($p < 0,05$ vs. K). Kotretman sa silibininom izazvao je dalje smanjenje ekspresije oba gena, *MMP2* ($p < 0,001$ vs. K) i *MMP9* ($p < 0,05$ vs. K). Takođe, kotretman sa UDCA je doveo do smanjenja ekspresije oba gena, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi. Silibinin je imao izraženiji uticaj na smanjenje ekspresije *MMP2* gena, dok je UDCA ispoljila izraženiji učinak na smanjenje *MMP9* ekspresije. CDCA je doprinela porastu ekspresije *MMP2* i *MMP9*, bez statističke značajnosti u poređenju sa K grupom, ali visoko statistički značajno u poređenju sa C grupom.

Tabela 4.75. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

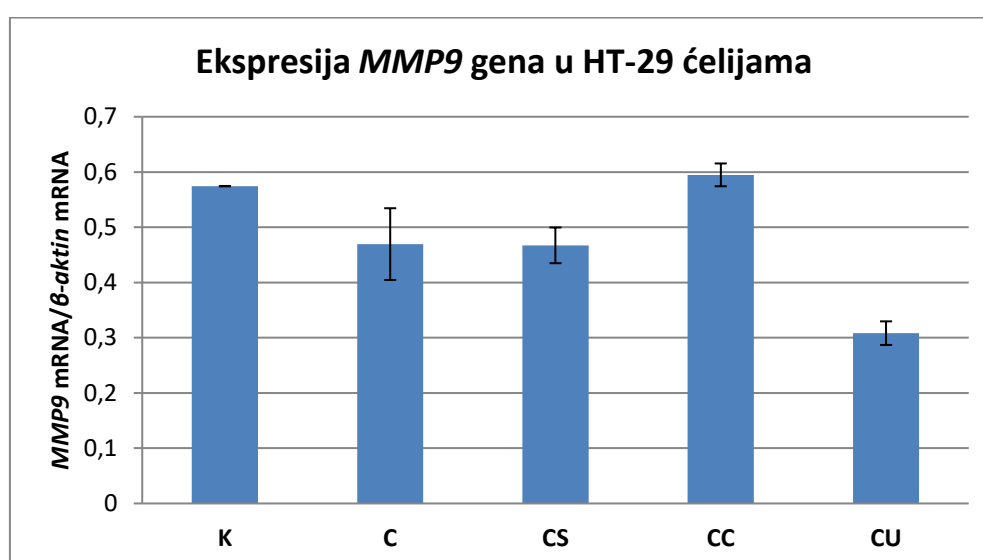
| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>MMP2</i> | 1,4694 ± 0,1526 | 1,0000 ± 0,0000 | 0,6166 ± 0,0427 | 1,6271 ± 0,1127 | 0,9016 ± 0,0312 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. K, CC |



Grafikon 4.75. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.76. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>MMP9</i> | $0,5743 \pm 5,77 \times 10^{-16}$ | $0,4695 \pm 0,0649$ | $0,4673 \pm 0,0324$ | $0,5948 \pm 0,0206$ | $0,3083 \pm 0,0214$ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | vs. CC, CU | vs. CC, CU | vs. C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. CU | / | / | vs. CU | vs. K, CC |

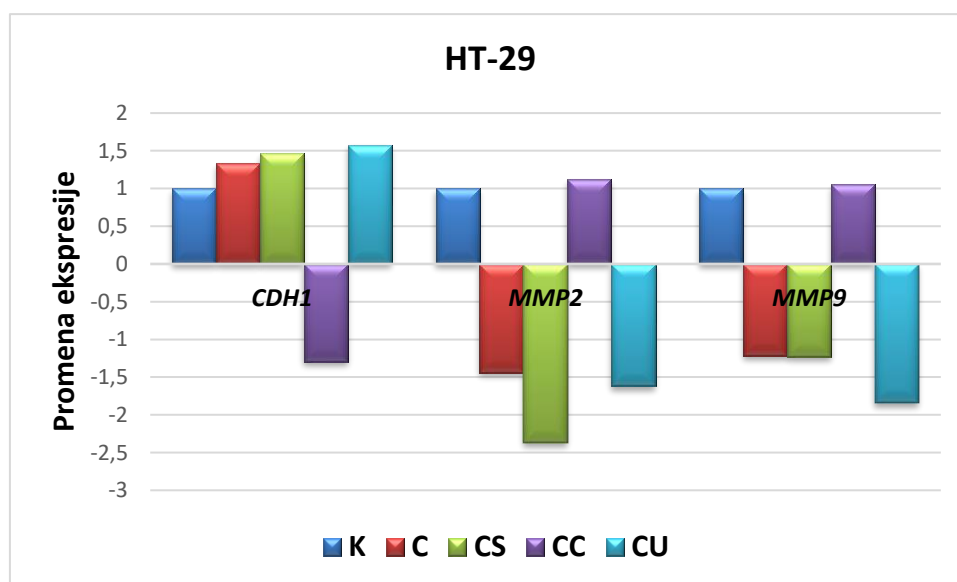


Grafikon 4.76. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene uključene u procese invazije i metastaziranja u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.77. i na grafikonu 4.77.

Tabela 4.77. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>CDH1</i> | | <i>MMP2</i> | | <i>MMP9</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,33 ± 0,19 | 1 | 0,70 ± 0,13 | 1 | 0,82 ± 0,11 | 1 |
| CS | 1,47 ± 0,10 | 1,11 ± 0,08 | 0,42 ± 0,03 | 0,62 ± 0,04 | 0,81 ± 0,06 | 1,00 ± 0,07 |
| CC | 0,77 ± 0,13 | 0,58 ± 0,10 | 1,12 ± 0,12 | 1,63 ± 0,18 | 1,05 ± 0,18 | 1,29 ± 0,22 |
| CU | 1,58 ± 0,15 | 1,19 ± 0,12 | 0,62 ± 0,05 | 0,90 ± 0,07 | 0,54 ± 0,08 | 0,67 ± 0,10 |



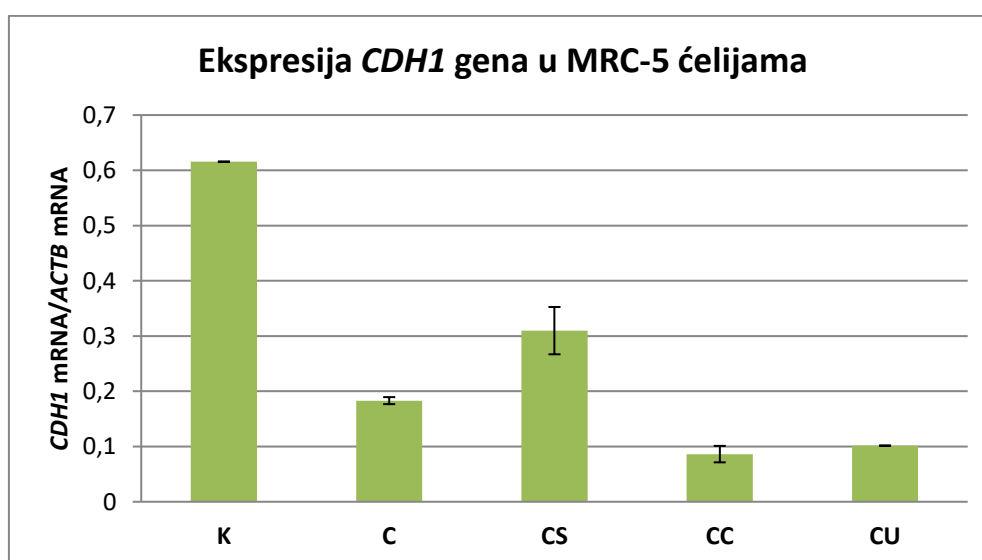
Grafikon 4.77. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.4.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu procese invazije i metastaziranja u MRC-5 ćelijskoj liniji

U svim tretiranim grupama MRC-5 ćelija (C, CS, CC i CU) došlo je do smanjenja *CDH1* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na ekspresiju *CDH1* gena u netretiranoj grupi, pri čemu je to smanjenje bilo najizraženije u CC grupi. U poređenju sa celekoksib grupom, tretman ćelija kombinacijom celekoksiba i silibinina doveo je do povećanja ekspresije ovog gena ($p < 0,001$ vs. C), dok su obe žučne kiseline doprinele daljem smanjenju ekspresije ($p < 0,01$ vs. C). Rezultati su prikazani u tabeli 4.78. i na grafikonu 4.78.

Tabela 4.78. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>CDH1</i> | $0,6156 \pm 1,52 \times 10^{-15}$ | $0,1831 \pm 0,0063$ | $0,3098 \pm 0,0428$ | $0,0862 \pm 0,0149$ | $0,1015 \pm 5,77 \times 10^{-16}$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, C, CC, CU | vs. K, CS | vs. K, CS |

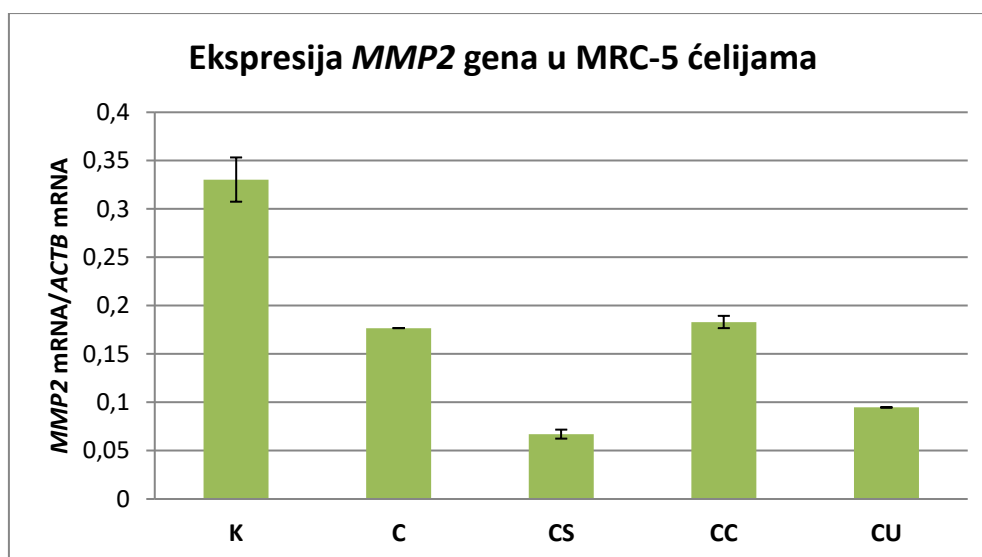


Grafikon 4.78. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.79. i na grafikonu 4.79. prikazana je relativna ekspresija *MMP2* gena u MRC-5 ćelijama. U svim tretiranim grupama došlo je do smanjenja *MMP2* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa *MMP2* ekspresijom u netretiranoj, kontrolnoj grupi. Najizraženije smanjenje opaža se u CS grupi. Kada se uporede rezultati dobijeni u tretiranim grupama u odnosu na C grupu, uočava se da su u C i CC grupi detektovane približno slične vrednosti relativne ekspresije, dok su u CS i CU grupi zabeležene snižene vrednosti ($p < 0,001$ vs. C).

Tabela 4.79. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>MMP2</i> | $0,3304 \pm 0,0229$ | $0,1768 \pm 0,0000$ | $0,0671 \pm 0,0046$ | $0,1831 \pm 0,0063$ | $0,0947 \pm 0,0000$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CC |



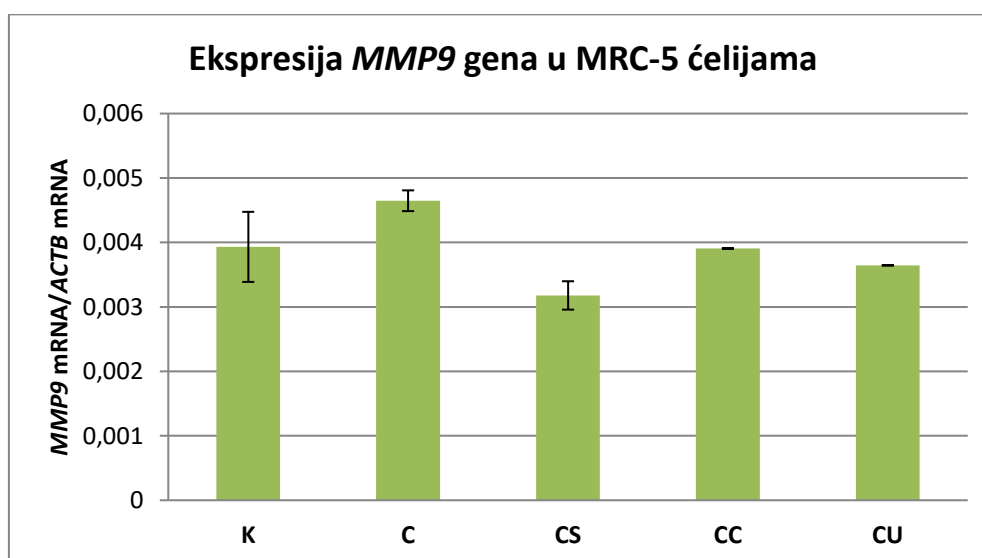
Grafikon 4.79. Relativna ekspresija mRNA za *MMP2* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije *MMP9* gena u MRC-5 ćelijskoj liniji bile su niže u poređenju sa vrednostima *MMP2* relativne ekspresije. Takođe, i profili ekspresije se razlikuju. Inkubacija ćelija celekoksibom doprinela je nešto višoj *MMP9* ekspresiji u odnosu na

kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Kotretmani sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama doveli su do smanjene ekspresije u odnosu na tretman samo celekoksibom, uz statističku značajnost, što se vidi u tabeli 4.80. i na grafikonu 4.80. Najniža ekspresija *MMP9* gena zabeležena je u CS grupi.

Tabela 4.80. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|
| <i>MMP9</i> | 0,0039 ± 0,0005 | 0,0046 ± 0,0002 | 0,0032 ± 0,0002 | 0,0039 ± 0,0000 | 0,0036 ± 1,15x10 ⁻¹⁷ |
| p<0,05 | vs. CS | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. C | vs. C |
| p<0,01 | / | vs. CS, CU | vs. C | / | vs. C |
| p<0,001 | / | vs. CS | vs. C | / | / |

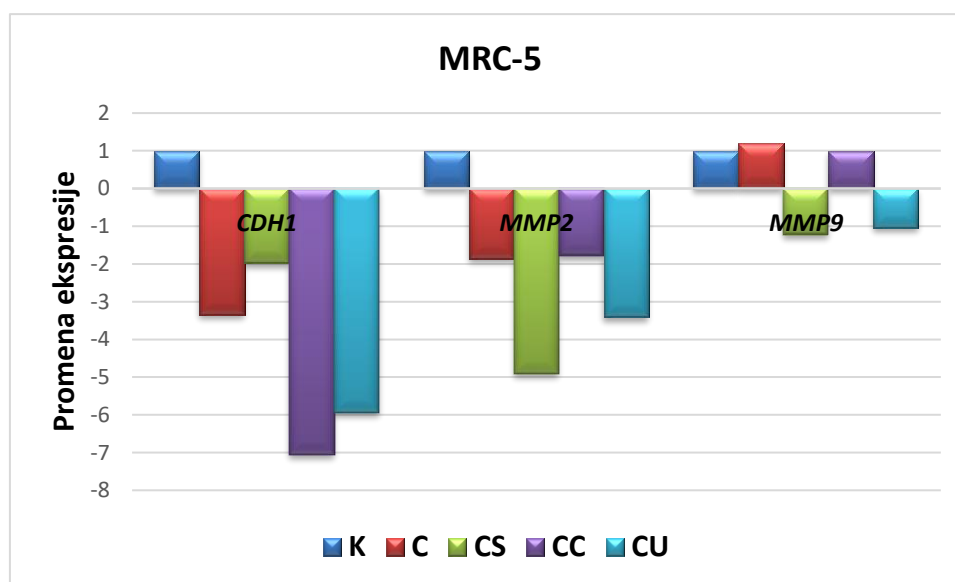


Grafikon 4.80. Relativna ekspresija mRNA za *MMP9* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene uključene u procese invazije i metastaziranja u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.81. i na grafikonu 4.81.

Tabela 4.81. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>CDH1</i> | | <i>MMP2</i> | | <i>MMP9</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,30 ± 0,02 | 1 | 0,54 ± 0,03 | 1 | 1,19 ± 0,09 | 1 |
| CS | 0,50 ± 0,07 | 1,70 ± 0,23 | 0,20 ± 0,01 | 0,38 ± 0,03 | 0,81 ± 0,06 | 0,68 ± 0,05 |
| CC | 0,14 ± 0,03 | 0,48 ± 0,10 | 0,56 ± 0,02 | 1,04 ± 0,04 | 1,00 ± 0,05 | 0,84 ± 0,04 |
| CU | 0,17 ± 0,03 | 0,57 ± 0,11 | 0,29 ± 0,06 | 0,55 ± 0,11 | 0,95 ± 0,18 | 0,80 ± 0,15 |



Grafikon 4.81. Promene ekspresije mRNA za *CDH1*, *MMP2* i *MMP9* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.5. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina

Kao što je navedeno, farnezoid X receptor (FXR) predstavlja nuklearni receptor posredstvom kog žučne kiseline sprovode svoje funkcije. Deo svojih uloga FXR sprovodi pomoću drugog nuklearnog receptora, SHP proteina, koji poseduje ulogu transkripcionog represora. U A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama ispitivana je relativna ekspresija *FXR* i *SHP* gena, nakon tretmana celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama.

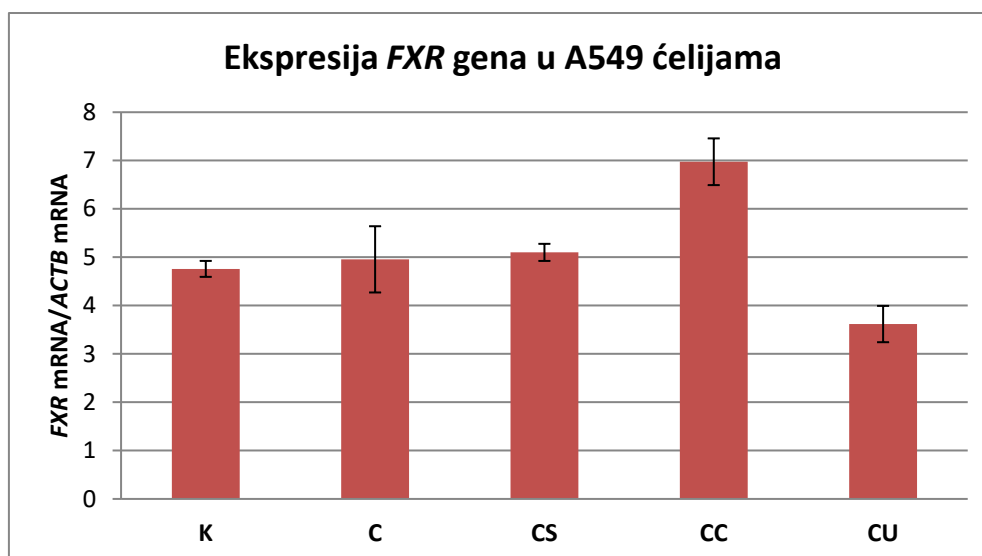
Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija ispitivanog gena veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

4.4.5.1. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u A549 ćelijama

Primena samog celekoksiba na A549 ćelijskoj liniji, kao i kombinacije celekoksiba i silibinina dovela je do neznatno povećane ekspresije *FXR* gena u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnoj grupi, ali bez statističke značajnosti. Inkubacija ćelija sa kombinacijom celekoksiba i CDCA izazvala je visoko statistički značajno povećanu ekspresiju ovog gena ($p < 0,001$ vs. K; $p < 0,01$ vs. C), dok je koinkubacija sa UDCA dovela do smanjene ekspresije *FXR* u odnosu na kontrolu, bez statističke značajnosti, ali statistički značajno ($p = 0,021$) u odnosu na sâm celekoksib. Kada se upoređi ekspresija *FXR* među grupama kotretiranim različitim žučnim kiselinama, uočava se visoka statistička značajnost ($p < 0,001$) između grupa CC i CU. Rezultati su prikazani u tabeli 4.82. i na grafikonu 4.82.

Tabela 4.82. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>FXR</i> | 4,7587 ± 0,1649 | 4,9562 ± 0,6854 | 5,1003 ± 0,1767 | 6,9756 ± 0,4832 | 3,6180 ± 0,3757 |
| $p < 0,05$ | vs. CC | vs. CC, CU | vs. CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| $p < 0,001$ | vs. CC | / | / | vs. K, CU | vs. CC |

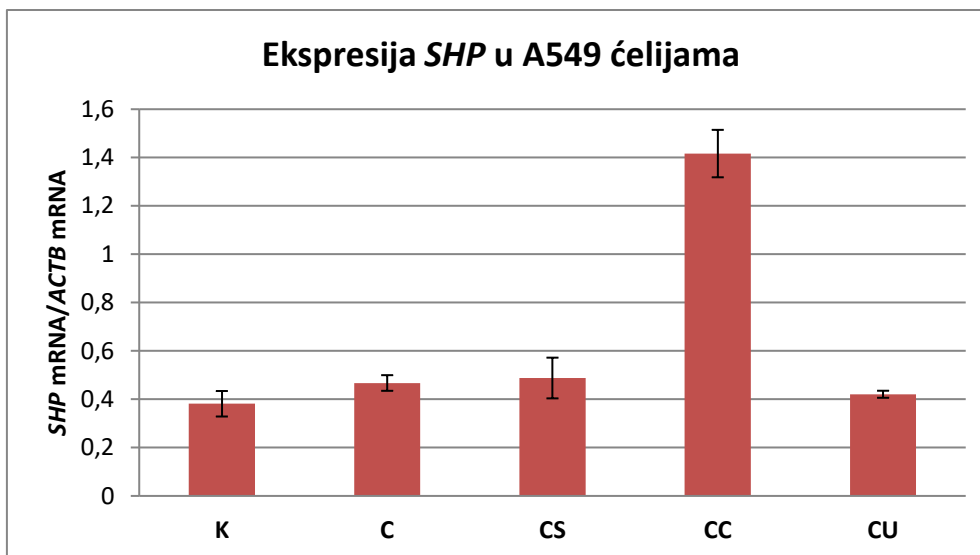


Grafikon 4.82. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u A549 ćelijskoj liniji.

Kao što se može uočiti u tabeli 4.83. i na grafikonu 4.83, profil ekspresije *SHP* gena po eksperimentalnim grupama A549 ćelija je bio sličan kao i za *FXR* gen. Kada se analiziraju razlike među grupama CC i CU, uočava se da je CDCA doprinela visoko statistički značajnom porastu ekspresije *SHP* gena ($p < 0,001$ vs. K, C), dok je UDCA izazvala pozitivnu ekspresiju u poređenju sa ekspresijom gena u kontroli, a blago nižu ekspresiju u odnosu na C grupu, u oba slučaja bez statističke značajnosti.

Tabela 4.83. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| <i>SHP</i> | 0,3814 ± 0,0527 | 0,4673 ± 0,0324 | 0,4878 ± 0,0842 | 1,4165 ± 0,0981 | 0,4206 ± 0,0146 |
| $p < 0,05$ | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| $p < 0,01$ | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| $p < 0,001$ | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |

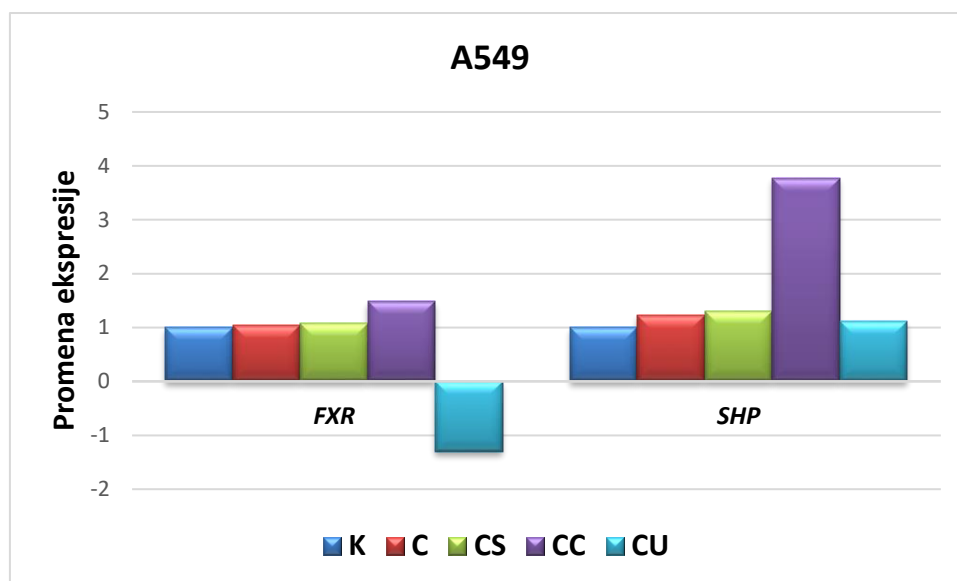


Grafikon 4.83. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za opisane gene koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.84. i na grafikonu 4.84.

Tabela 4.84. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>FXR</i> | | <i>SHP</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,05 ± 0,14 | 1 | 1,23 ± 0,09 | 1 |
| CS | 1,07 ± 0,08 | 1,04 ± 0,08 | 1,30 ± 0,27 | 1,06 ± 0,22 |
| CC | 1,48 ± 0,23 | 1,43 ± 0,22 | 3,78 ± 0,58 | 3,07 ± 0,47 |
| CU | 0,76 ± 0,08 | 0,74 ± 0,08 | 1,12 ± 0,14 | 0,91 ± 0,11 |



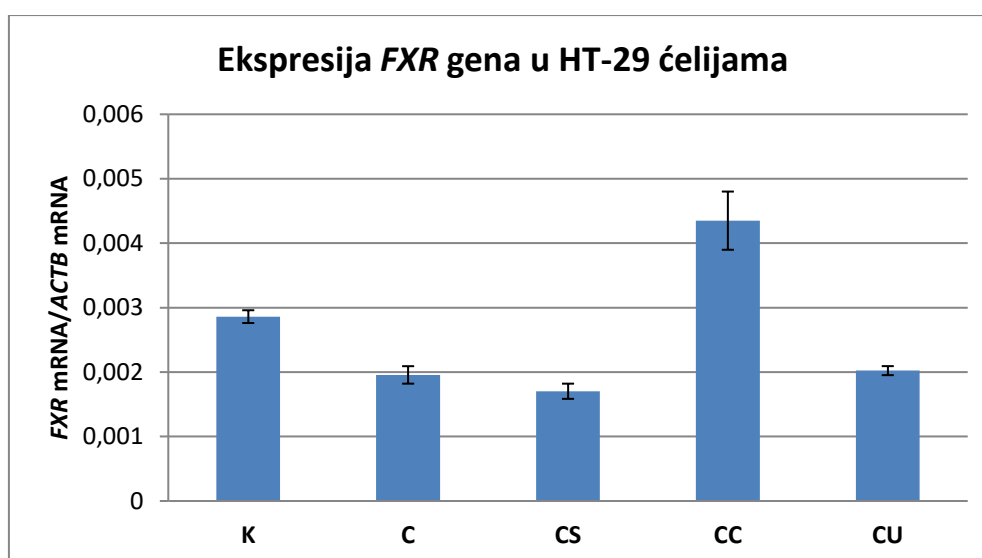
Grafikon 4.84. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.5.2. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u HT-29 ćelijama

U tabeli 4.85. i na grafikonu 4.85. prikazana je relativna ekspresija *FXR* gena u HT-29 ćelijskoj liniji. U odnosu na kontrolu, u eksperimentalnim grupama C i CU došlo je do visoko statistički značajnog smanjenja *FXR* ekspresije ($p < 0,01$ vs. K). U grupi CS uočava se najniža *FXR* ekspresija ($p < 0,001$ vs. K). Povećanje ekspresije ovog gena detektovano je u grupi tretiranoj kombinacijom celekoksiba i CDCA i to visoko statistički značajno ($p < 0,001$ vs. K, C).

Tabela 4.85. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>FXR</i> | $0,0029 \pm 9,91 \times 10^{-5}$ | $0,0019 \pm 0,0001$ | $0,0017 \pm 0,0001$ | $0,0043 \pm 0,0005$ | $0,0020 \pm 7,01 \times 10^{-5}$ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |
| p<0,001 | vs. CS, CC | vs. CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |

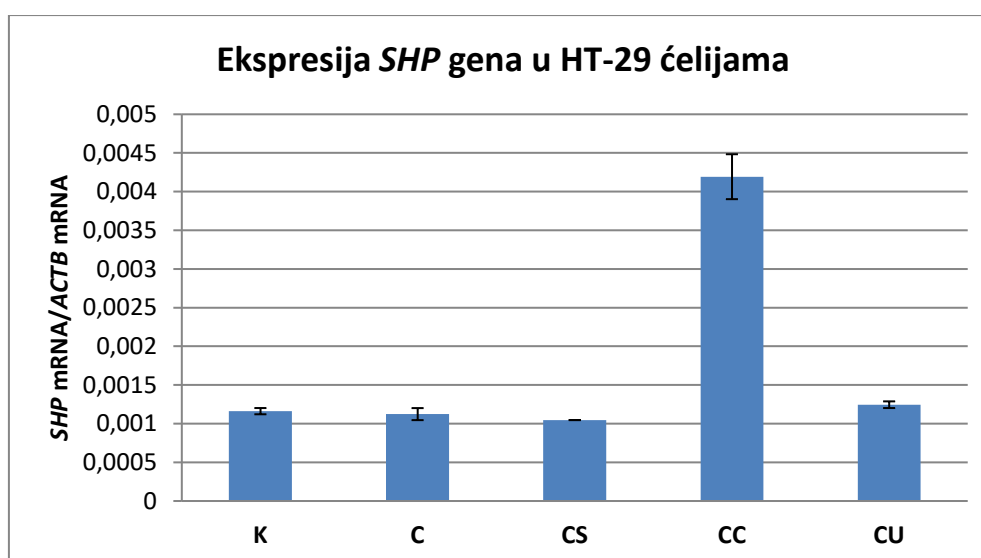


Grafikon 4.85. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Analizom profila relativne ekspresije *SHP* gena u HT-29 ćelijskoj liniji uočava se da je jedino u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i CDCA došlo do povećanja *SHP* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na druge eksperimentalne grupe ćelija. U ostalim grupama nije došlo do značajne promene ekspresije u poređenju sa ekspresijom gena u kontroli, kao što se i može videti u tabeli 4.86. i na grafikonu 4.86.

Tabela 4.86. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|--------------------------------|
| <i>SHP</i> | 0,0012 ± 4,03x10 ⁻⁵ | 0,0011 ± 7,78x10 ⁻⁵ | 0,0010 ± 0,0000 | 0,0042 ± 0,0003 | 0,0013 ± 4,31x10 ⁻⁵ |
| p<0,05 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| p<0,01 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |
| p<0,001 | vs. CC | vs. CC | vs. CC | vs. K, C, CS, CU | vs. CC |

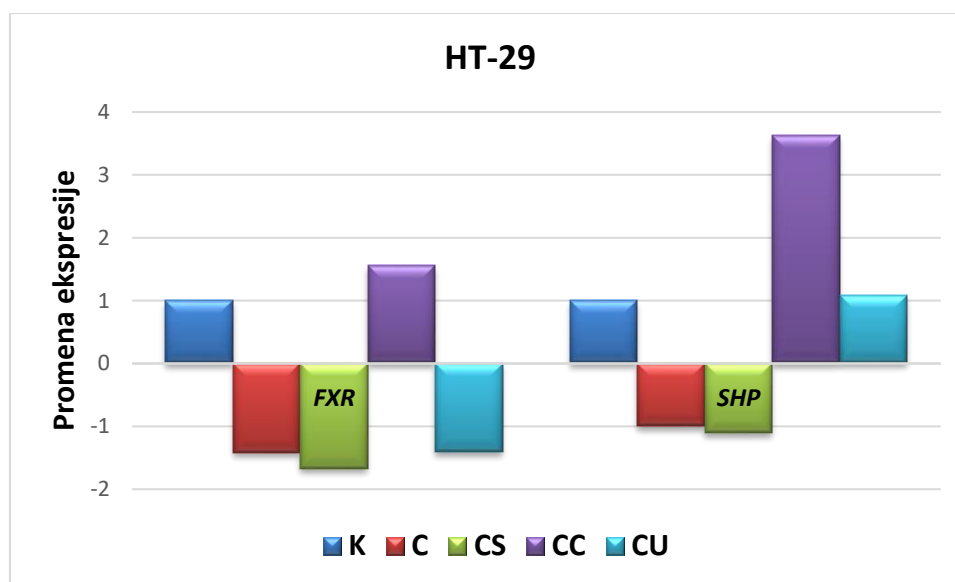


Grafikon 4.86. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za opisane gene koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.87. i na grafikonu 4.87.

Tabela 4.87. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>FXR</i> | | <i>SHP</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,70 ± 0,17 | 1 | 0,99 ± 0,24 | 1 |
| CS | 0,60 ± 0,04 | 0,87 ± 0,06 | 0,90 ± 0,00 | 0,93 ± 0,00 |
| CC | 1,56 ± 0,36 | 2,28 ± 0,52 | 3,63 ± 0,40 | 3,75 ± 0,41 |
| CU | 0,71 ± 0,05 | 1,04 ± 0,08 | 1,08 ± 0,13 | 1,12 ± 0,14 |



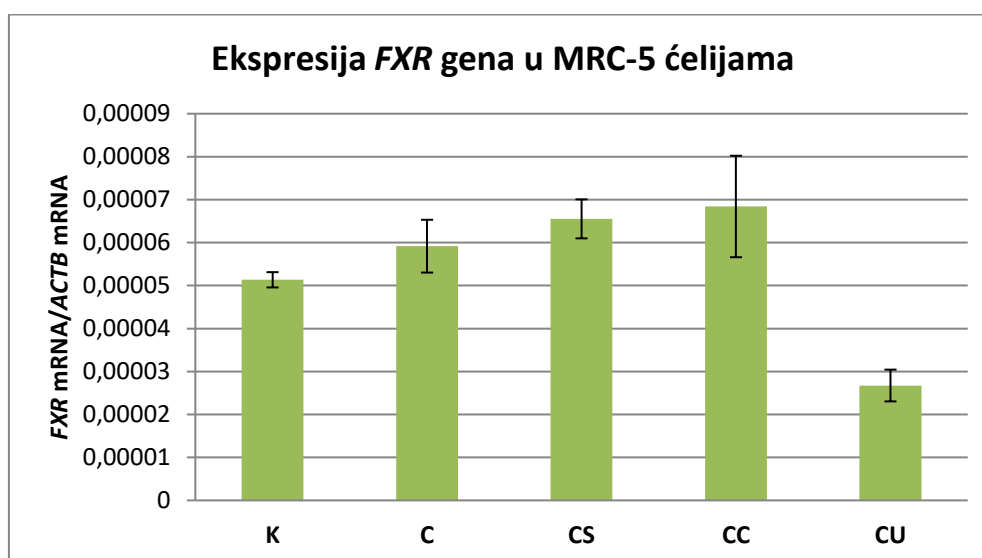
Grafikon 4.87. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.5.3. Analiza ekspresije gena koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u MRC-5 ćelijama

Kao što se može videti u tabeli 4.88. i na grafikonu 4.88. jedino je u grupi MRC-5 ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i UDCA došlo do visoko statistički značajnog smanjenja ekspresije *FXR* gena u odnosu na kontrolu ($p < 0,01$) i u odnosu na sve ostale tretirane grupe ($p < 0,001$). CDCA je doprinela povećanoj ekspresiji, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj i celekoksib grupi.

Tabela 4.88. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|---|---|---|---|
| <i>FXR</i> | $5,13 \times 10^{-5} \pm 1,78 \times 10^{-6}$ | $5,92 \times 10^{-5} \pm 6,14 \times 10^{-6}$ | $6,55 \times 10^{-5} \pm 4,54 \times 10^{-6}$ | $6,84 \times 10^{-5} \pm 1,18 \times 10^{-5}$ | $2,67 \times 10^{-5} \pm 3,70 \times 10^{-6}$ |
| p<0,05 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | / | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. C, CS, CC |

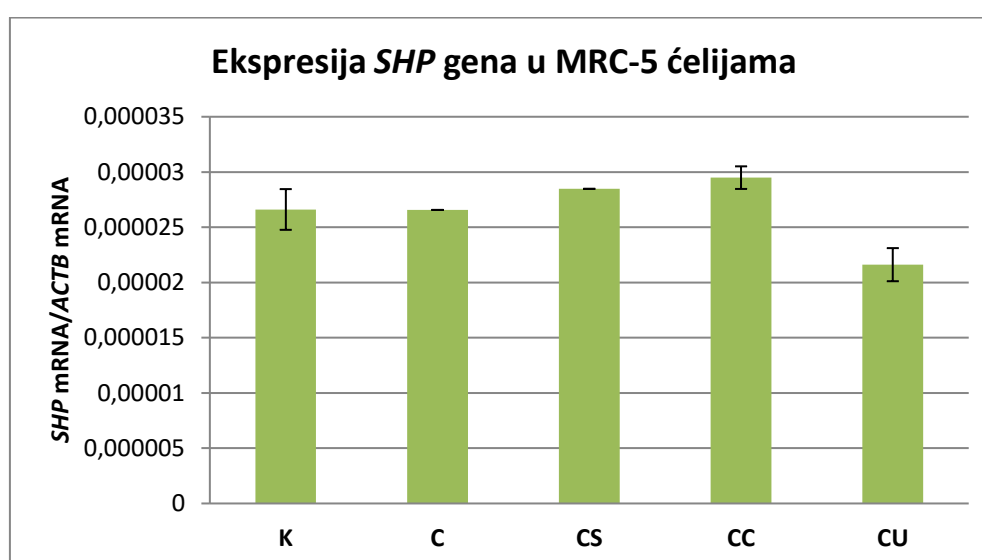


Grafikon 4.88. Relativna ekspresija mRNA za *FXR* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Profil relativne ekspresije *SHP* gena u MRC-5 ćelijama (tabela 4.89. i grafikon 4.89) veoma je sličan profilu ekspresije *FXR* gena. I u ovom slučaju jedino je u CU grupi detektovano visoko statistički značajno smanjenje ekspresije (p<0,01 vs. K, C; p<0,001 vs. CS, CC). U CC grupi se zapaža blago povećana ekspresija, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa K i C grupom.

Tabela 4.89. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|--|----------------------------------|---|---|
| <i>SHP</i> | $2,66 \times 10^{-5} \pm 1,84 \times 10^{-6}$ | $2,65 \times 10^{-5} \pm 9,99 \times 10^{-20}$ | $2,85 \times 10^{-5} \pm 0,0000$ | $2,95 \times 10^{-5} \pm 1,02 \times 10^{-6}$ | $2,16 \times 10^{-5} \pm 1,50 \times 10^{-6}$ |
| p<0,05 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,001 | / | / | vs. CU | vs. CU | vs. CS, CC |

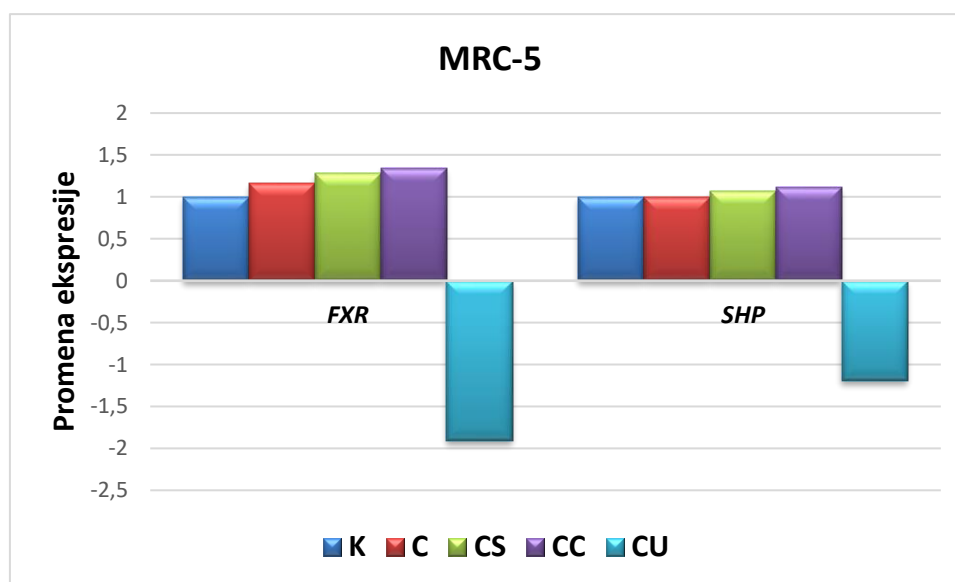


Grafikon 4.89. Relativna ekspresija mRNA za *SHP* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za opisane gene koji regulišu homeostazu žučnih kiselina u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.90. i na grafikonu 4.90.

Tabela 4.90. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>FXR</i> | | <i>SHP</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,16 ± 0,16 | 1 | 1,00 ± 0,05 | 1 |
| CS | 1,28 ± 0,09 | 1,11 ± 0,08 | 1,07 ± 0,00 | 1,07 ± 0,00 |
| CC | 1,35 ± 0,28 | 1,17 ± 0,24 | 1,11 ± 0,09 | 1,11 ± 0,09 |
| CU | 0,52 ± 0,07 | 0,45 ± 0,06 | 0,84 ± 0,21 | 0,84 ± 0,21 |



Grafikon 4.90. Promene ekspresije mRNA za *FXR* i *SHP* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.6. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane

U A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama, koje su tokom 48 časova tretirane celekoksibom, samim ili u kombinaciji sa silibininom i žučnim kiselinama, ispitivana je ekspresija gena koji kodiraju sintezu enzima antioksidativne zaštite: *SOD* (superoksid dismutaza), *CAT* (katalaza) i *GST* (glutation-S-transferaza).

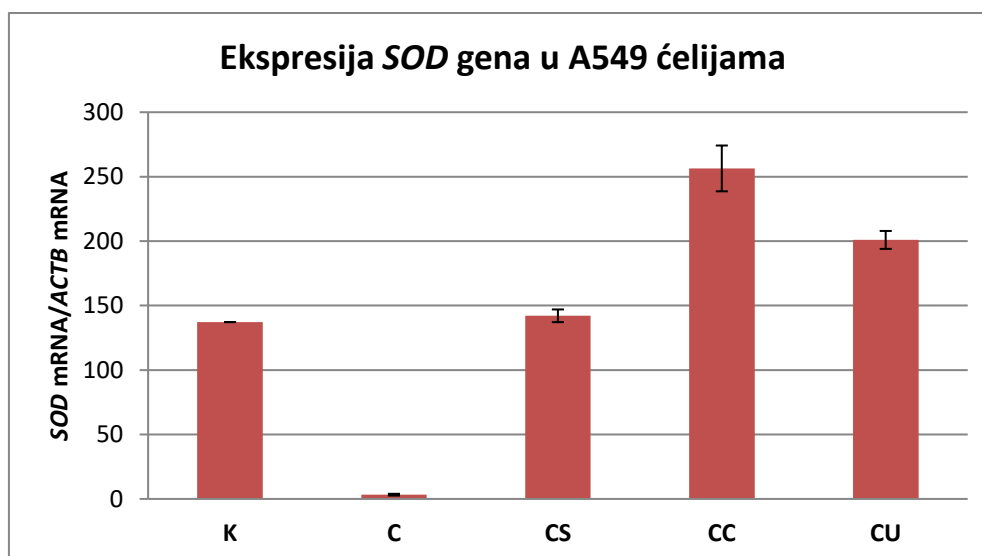
Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija ispitivanog gena veća ili manja u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

4.4.6.1. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u A549 ćelijama

U tabeli 4.91. i na grafikonu 4.91. prikazane su relativne ekspresije mRNA za antioksidativni enzim superoksid dismutazu (*SOD*) u A549 ćelijskoj liniji. Tretman celekoksibom je doveo do značajnog smanjenja ekspresije *SOD* gena, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu, dok se u grupama tretiranim kombinacijama celekoksiba sa silibininom i žučnim kiselinama može uočiti porast ekspresije ovog gena u poređenju sa ekspresijom u kontrolnoj grupi – ta ekspresija je u grupi CS bila bez statističke značajnosti, a u grupama CC i CU visoko statistički značajno povećana ($p < 0,001$ vs. K). Najveća ekspresija registruje se u CC eksperimentalnoj grupi.

Tabela 4.91. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| <i>SOD</i> | 137,1870 ± 0,0000 | 3,2960 ± 0,6817 | 142,0818 ± 4,9234 | 256,4101 ± 17,7623 | 200,9340 ± 6,9628 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |

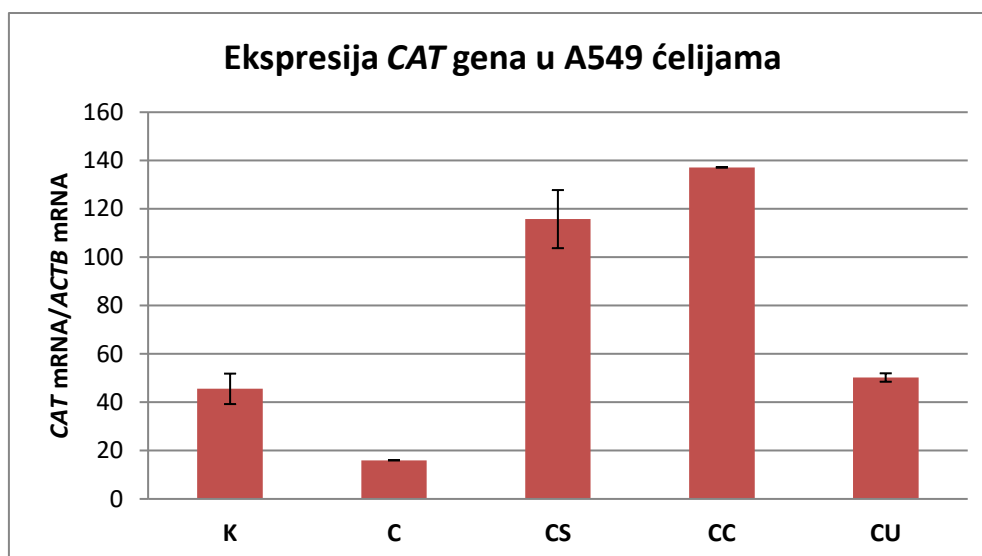


Grafikon 4.91. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u A549 ćelijskoj liniji.

Profil relativne ekspresije *CAT* gena u A549 ćelijama bio je sličan profilu *SOD* ekspresije. Celekoksib je doprineo smanjenju ekspresije *CAT* ($p < 0,01$ vs. K), dok su kombinacije celekoksiba sa silibininom i žučnim kiselinama povećale ekspresiju ovog gena – u grupi CU bez statističke značajnosti, a u grupama CS i CC visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa ekspresijom u kontrolnoj grupi. I u ovom slučaju, najveća ekspresija uočava se u CC grupi, kao što se može videti u tabeli 4.92. i na grafikonu 4.92.

Tabela 4.92. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------|
| <i>CAT</i> | 45,5452 ± 6,2988 | 16,0000 ± 0,0000 | 115,7761 ± 12,0212 | 137,1870 ± 5,74x10 ⁻¹³ | 50,2335 ± 1,7407 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. CS, CC | vs. CS, CC, CU | vs. K, C, CU | vs. K, C, CU | vs. C, CS, CC |

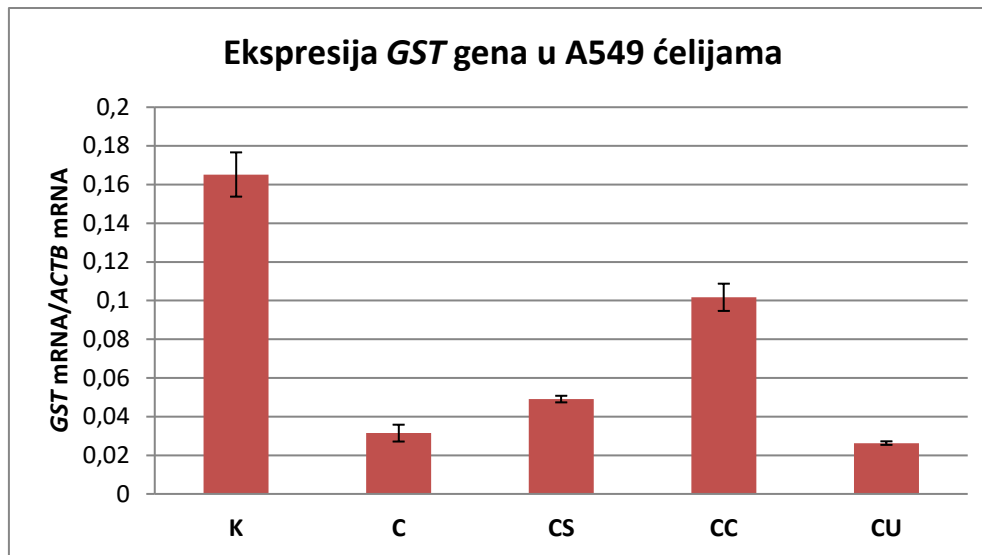


Grafikon 4.92. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u A549 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.93. i grafikon 4.93. prikazuju relativne ekspresije *GST* gena u A549 ćelijama. U svim tretiranim grupama ćelija primećuje se smanjena *GST* ekspresija, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa profilom genske ekspresije u netretiranoj, kontrolnoj grupi ćelija. U odnosu na celekoksib grupu, u grupi kotretiranoj sa CDCA detektovana je najveća *GST* ekspresija, visoko statistički značajna ($p < 0,001$ vs. C).

Tabela 4.93. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>GST</i> | $0,1652 \pm 0,0114$ | $0,0314 \pm 0,0043$ | $0,0491 \pm 0,0017$ | $0,1017 \pm 0,0070$ | $0,0263 \pm 0,0009$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CC | vs. K, CC | vs. K, C, CS, CU | vs. K, CC |

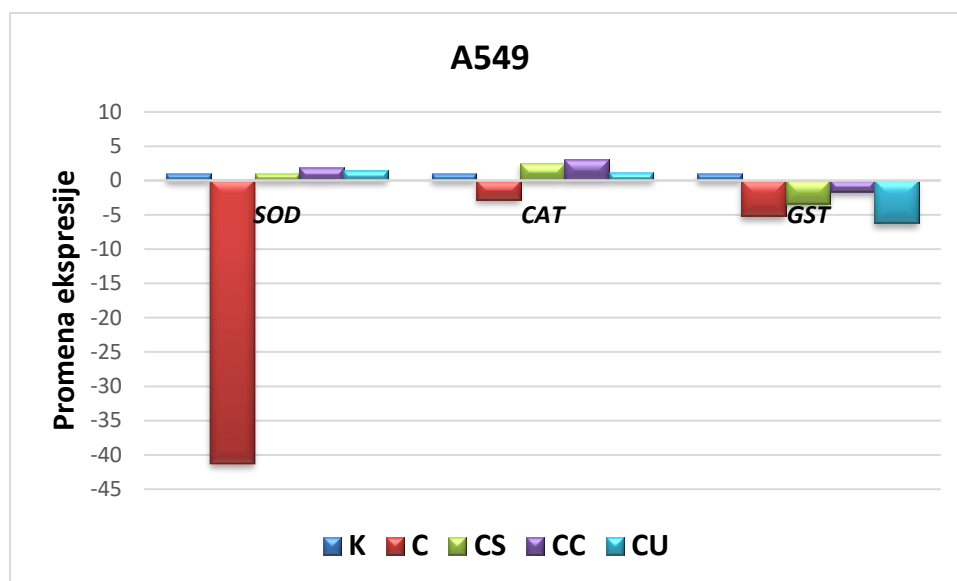


Grafikon 4.93. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *SOD*, *CAT* i *GST*, koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima, u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.94. i na grafikonu 4.94.

Tabela 4.94. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>SOD</i> | | <i>CAT</i> | | <i>GST</i> | |
|-------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 0,02 ± 0,01 | 1 | 0,35 ± 0,00 | 1 | 0,19 ± 0,03 | 1 |
| CS | 1,04 ± 0,08 | 43,84 ± 3,39 | 2,58 ± 0,37 | 7,28 ± 1,03 | 0,30 ± 0,02 | 1,57 ± 0,12 |
| CC | 1,87 ± 0,13 | 78,98 ± 5,47 | 3,05 ± 0,30 | 8,62 ± 0,84 | 0,62 ± 0,04 | 3,26 ± 0,23 |
| CU | 1,49 ± 0,25 | 62,75 ± 10,77 | 1,12 ± 0,14 | 3,16 ± 0,39 | 0,16 ± 0,02 | 0,85 ± 0,11 |



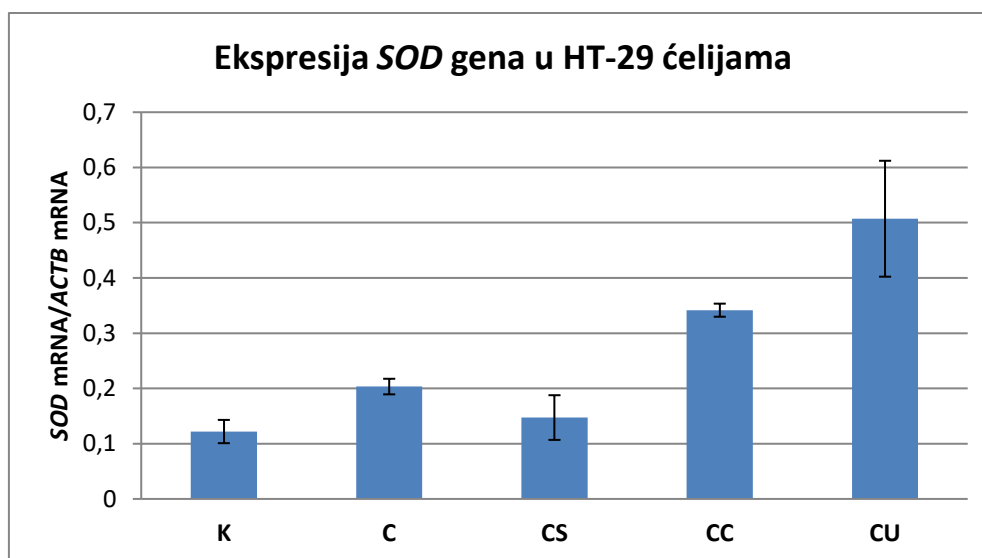
Grafikon 4.94. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.6.2. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u HT-29 ćelijama

U tabeli 4.95. i na grafikonu 4.95. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *SOD* u HT-29 ćelijskoj liniji. U svim tretiranim grupama zabeležena je povećana ekspresija *SOD* gena u poređenju sa netretiranom, kontrolnom grupom, uz visoku statističku značajnost u CC ($p < 0,01$) i CU ($p < 0,001$) eksperimentalnim grupama. Najveća ekspresija uočava se u CU grupi.

Tabela 4.95. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>SOD</i> | $0,1219 \pm 0,0210$ | $0,2034 \pm 0,0141$ | $0,1473 \pm 0,0404$ | $0,3416 \pm 0,0118$ | $0,5072 \pm 0,1049$ |
| $p < 0,05$ | vs. CC, CU | vs. CU | vs. CC, CU | vs. K, CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. CC, CU | vs. CU | vs. CC, CU | vs. K, CS | vs. K, C, CS |
| $p < 0,001$ | vs. CU | vs. CU | vs. CU | / | vs. K, C, CS |

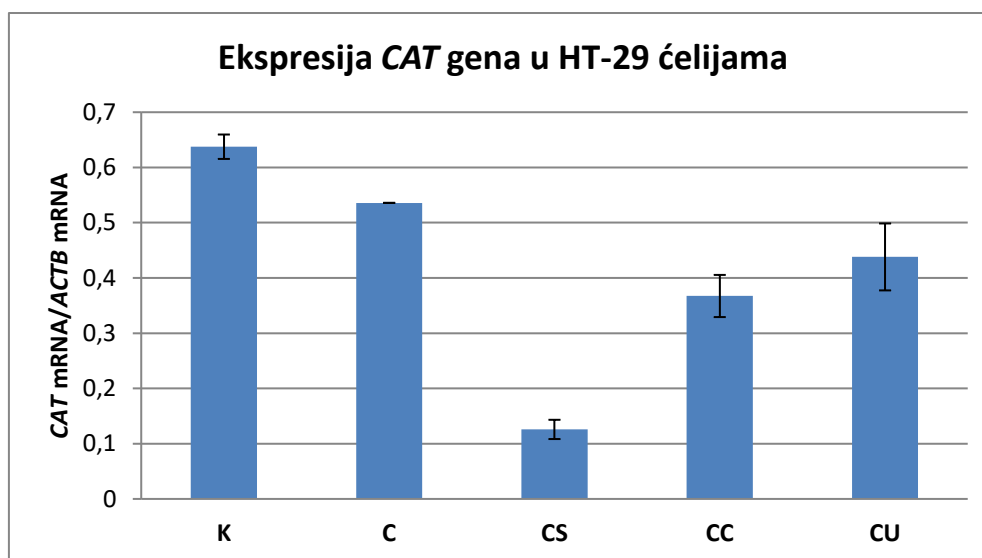


Grafikon 4.95. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti relativne ekspresije mRNA za *CAT* prikazane su u tabeli 4.96. i na grafikonu 4.96. U poređenju sa netretiranom, kontrolnom grupom, u svim tretiranim grupama došlo je do smanjenja *CAT* ekspresije, koje je u C grupi bilo statistički značajno ($p=0,030$), a u ostalim grupama (CS, CC i CU) visoko statistički značajno ($p<0,001$). Najveće smanjenje *CAT* ekspresije zapaža se u CS eksperimentalnoj grupi.

Tabela 4.96. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>CAT</i> | $0,6375 \pm 0,0221$ | $0,5359 \pm 1,15 \times 10^{-15}$ | $0,1258 \pm 0,0174$ | $0,3673 \pm 0,0381$ | $0,4381 \pm 0,0606$ |
| $p<0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CS, CC, CU | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, C, CS |
| $p<0,01$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, CS |
| $p<0,001$ | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC | vs. K, C, CC, CU | vs. K, C, CS | vs. K, CS |

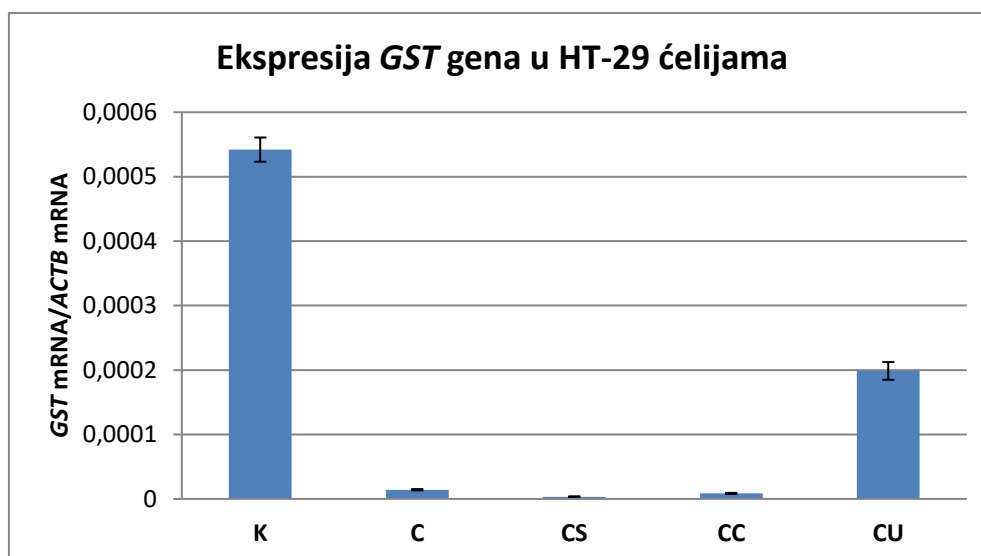


Grafikon 4.96. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u HT-29 ćelijskoj liniji.

U svim tretiranim grupama HT-29 ćelija došlo je do visoko statistički značajnog ($p < 0,001$) pada nivoa ekspresije *GST* gena u poređenju sa ekspresijom u kontrolnoj, netretiranoj grupi. Najniži nivo ekspresije zabeležen je u CS grupi. Rezultati su prikazani u tabeli 4.97. i na grafikonu 4.97.

Tabela 4.97. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|---|---|---|---|
| <i>GST</i> | $5,42 \times 10^{-4} \pm 1,88 \times 10^{-5}$ | $1,43 \times 10^{-5} \pm 9,88 \times 10^{-7}$ | $3,18 \times 10^{-6} \pm 8,73 \times 10^{-7}$ | $8,50 \times 10^{-6} \pm 8,82 \times 10^{-7}$ | $1,99 \times 10^{-4} \pm 1,38 \times 10^{-5}$ |
| $p < 0,05$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, C, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CS, CC, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K, C, CS, CC |

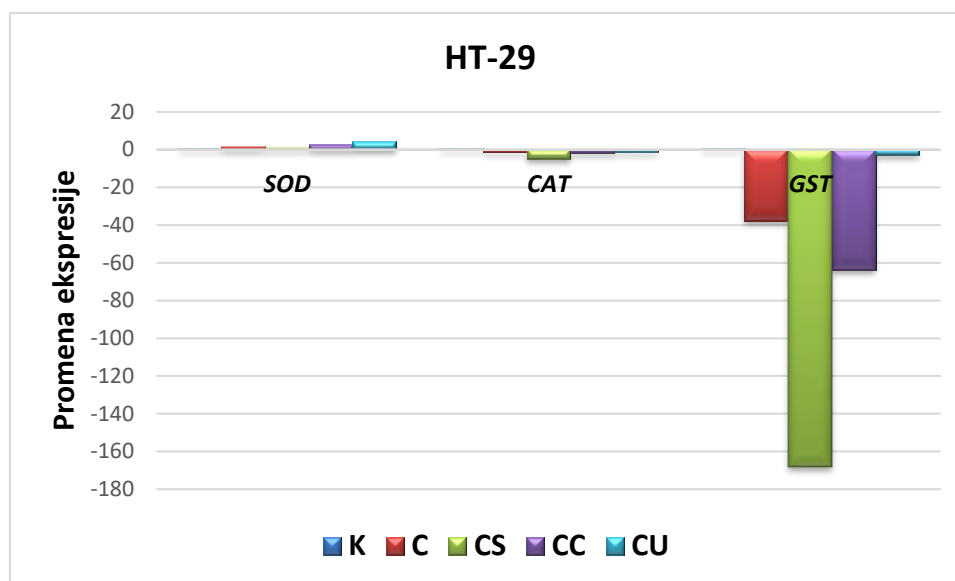


Grafikon 4.97. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *SOD*, *CAT* i *GST*, koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima, u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.98. i na grafikonu 4.98.

Tabela 4.98. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>SOD</i> | | <i>CAT</i> | | <i>GST</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,73 ± 0,42 | 1 | 0,86 ± 0,17 | 1 | 0,03 ± 0,00 | 1 |
| CS | 1,24 ± 0,33 | 0,73 ± 0,20 | 0,20 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03 | 0,01 ± 0,00 | 0,23 ± 0,06 |
| CC | 2,85 ± 0,35 | 1,69 ± 0,21 | 0,59 ± 0,13 | 0,70 ± 0,16 | 0,02 ± 0,00 | 0,60 ± 0,06 |
| CU | 4,31 ± 1,20 | 2,56 ± 0,71 | 0,70 ± 0,15 | 0,83 ± 0,18 | 0,37 ± 0,06 | 14,10 ± 2,17 |



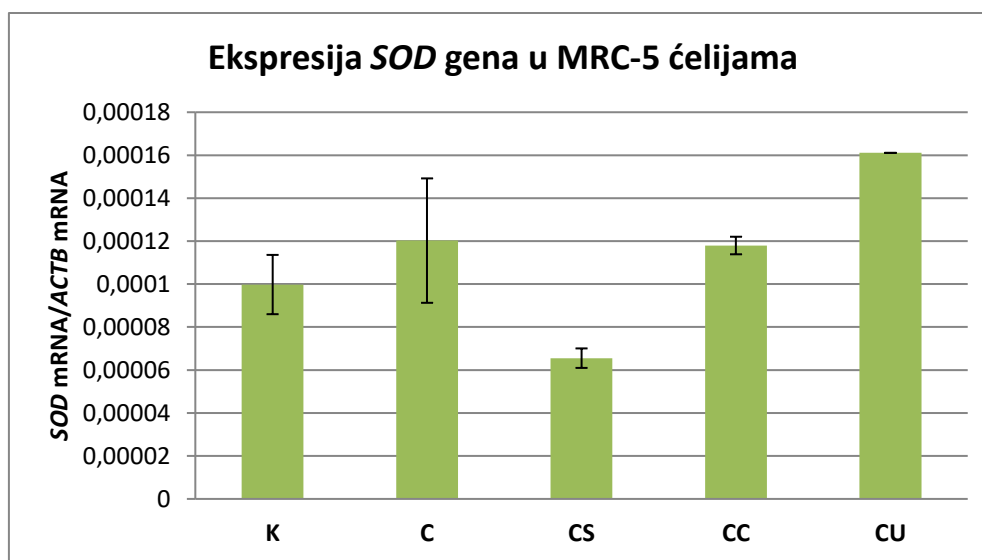
Grafikon 4.98. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.4.6.3. Analiza ekspresije gena antioksidativne odbrane u MRC-5 ćelijama

U tabeli 4.99. i na grafikonu 4.99. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *SOD* u MRC-5 ćelijskoj liniji. U eksperimentalnim grupama tretiranim celekoksibom, kombinacijom celekoksiba i CDCA, kao i kombinacijom celekoksiba i UDCA, došlo je do povećanja *SOD* ekspresije u odnosu na kontrolu, ali je to povećanje bilo visoko statistički značajno ($p=0,003$) samo u CU grupi. Ako se CC i CU grupe uporede sa C grupom, može se uočiti da je u CC grupi zabeležena praktično ista *SOD* ekspresija kao u C grupi, a u CU grupi statistički značajno povećana ekspresija ovog gena ($p=0,040$). Kombinacija celekoksiba i silibinina izazvala je smanjenje *SOD* ekspresije, bez statističke značajnosti u odnosu na ekspresiju gena u kontrolnoj grupi, ali visoko statistički značajno ($p=0,007$) u poređenju sa grupom ćelija koja je tretirana samo celekoksibom.

Tabela 4.99. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|---|---|---|--|
| <i>SOD</i> | $9,98 \times 10^{-5} \pm 1,38 \times 10^{-5}$ | $1,20 \times 10^{-4} \pm 2,90 \times 10^{-5}$ | $6,55 \times 10^{-5} \pm 4,54 \times 10^{-6}$ | $1,18 \times 10^{-4} \pm 4,09 \times 10^{-6}$ | $1,61 \times 10^{-4} \pm 5,63 \times 10^{-19}$ |
| p<0,05 | vs. CU | vs. CS, CU | vs. C, CC, CU | vs. CS, CU | vs. K, C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | vs. CS | vs. C, CC, CU | vs. CS | vs. K, CS |
| p<0,001 | / | / | vs. CU | / | vs. CS |

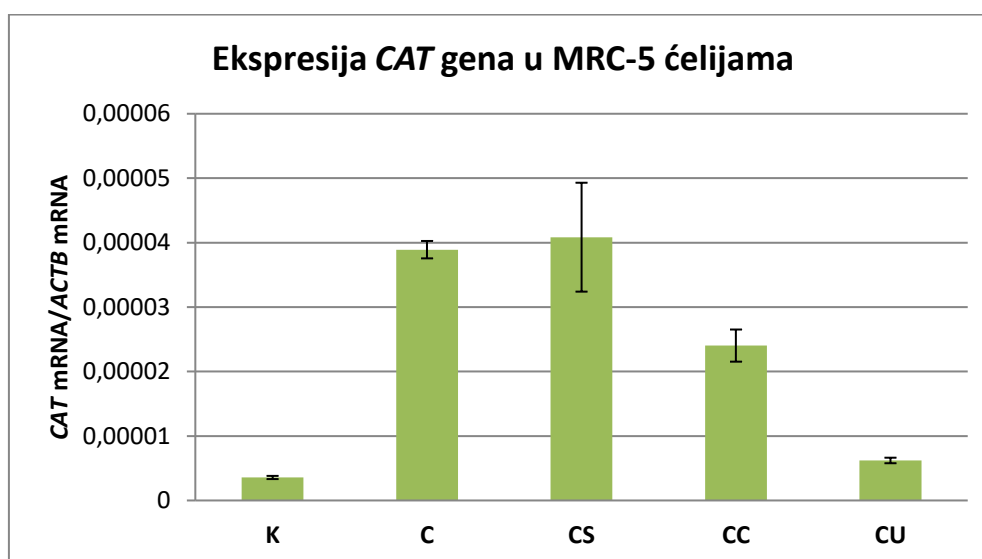


Grafikon 4.99. Relativna ekspresija mRNA za *SOD* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U svim tretiranim grupama MRC-5 ćelija došlo je do povećanja ekspresije *CAT* gena, u poređenju sa kontrolom, i to povećanje je bilo visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u grupama C, CS i CC, dok u grupi CU nije opisana statistička značajnost. Najveća ekspresija uočava se u CS grupi. U poređenju sa celekoksib grupom, dodatak silibinina doprineo je blagom povećanju *CAT* ekspresije, bez statističke značajnosti, dok su žučne kiseline doprinele visoko statistički značajnom smanjenju *CAT* ekspresije – CDCA ($p < 0,01$ vs. C) i UDCA ($p < 0,001$ vs. C). Rezultati ovog ispitivanja prikazani su u tabeli 4.100. i na grafikonu 4.100.

Tabela 4.100. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|---|---|---|---|---|
| <i>CAT</i> | $3,56 \times 10^{-6} \pm 2,47 \times 10^{-7}$ | $3,89 \times 10^{-5} \pm 1,35 \times 10^{-6}$ | $4,09 \times 10^{-5} \pm 8,45 \times 10^{-6}$ | $2,40 \times 10^{-5} \pm 2,50 \times 10^{-6}$ | $6,21 \times 10^{-6} \pm 4,30 \times 10^{-7}$ |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC | vs. K, CC, CU | vs. K, CC, CU | vs. K, C, CS, CU | vs. C, CS, CC |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC | vs. K, CU | vs. K, CU | vs. K | vs. C, CS |

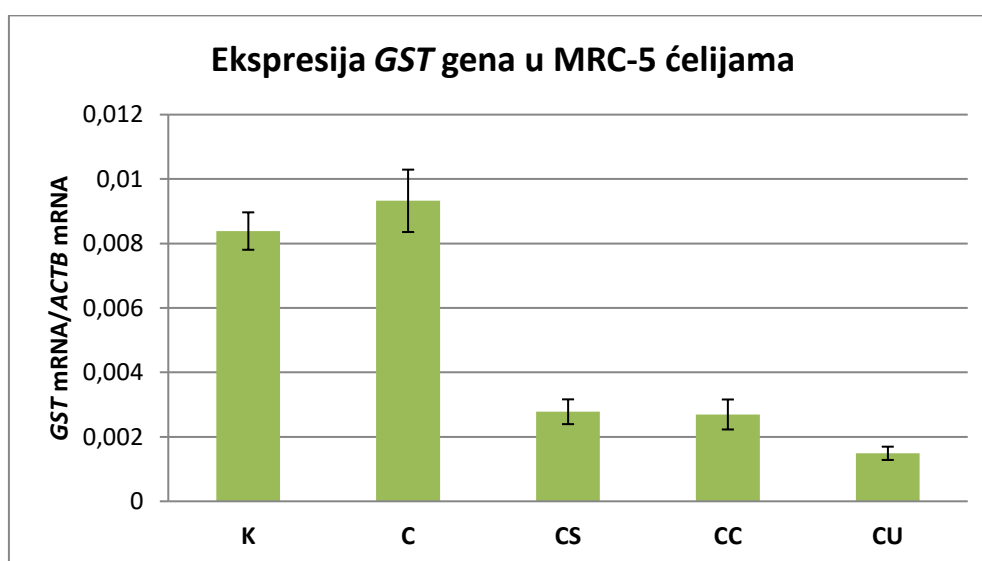


Grafikon 4.100. Relativna ekspresija mRNA za *CAT* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U MRC-5 ćelijskoj liniji celekoksib je izazvao pozitivnu ekspresiju *GST* gena u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Dodatak silibinina i žučnih kiselina celekoksibu doprineo je smanjenju ekspresije ovog gena, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj i celekoksib grupi. Najniža ekspresija zabeležena je u CU grupi, kao što se može videti u tabeli 4.101. i na grafikonu 4.101.

Tabela 4.101. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Relativna ekspresija gena | K | C | CS | CC | CU |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>GST</i> | 0,0084 ± 5,81x10 ⁻⁴ | 0,0093 ± 9,68x10 ⁻⁴ | 0,0028 ± 3,84x10 ⁻⁴ | 0,0027 ± 4,65x10 ⁻⁴ | 0,0015 ± 2,06x10 ⁻⁴ |
| p<0,05 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,01 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,001 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |

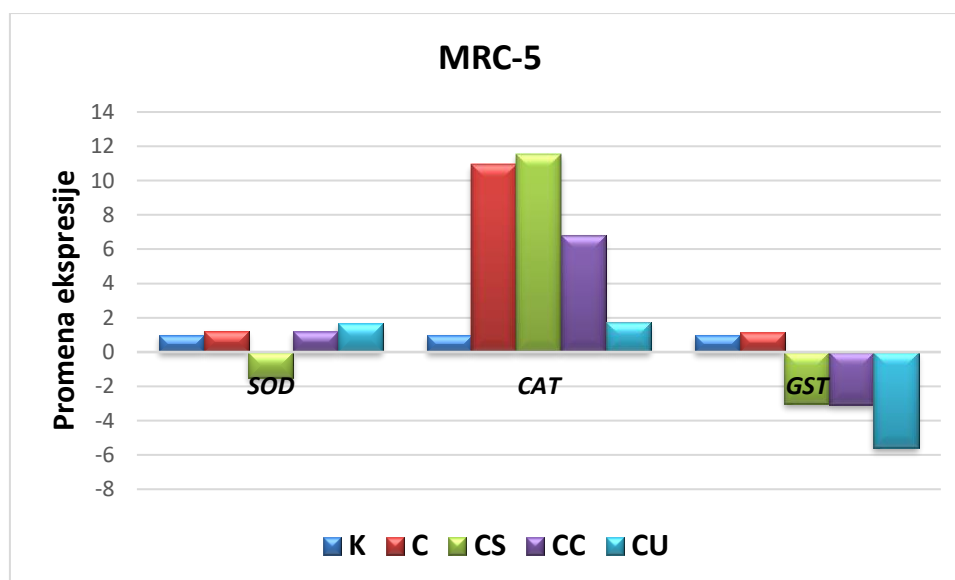


Grafikon 4.101. Relativna ekspresija mRNA za *GST* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *SOD*, *CAT* i *GST*, koji kodiraju sintezu antioksidativnih enzima, u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom, prikazane su u tabeli 4.102. i na grafikonu 4.102.

Tabela 4.102. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo celekoksibom.

| Grupa | <i>SOD</i> | | <i>CAT</i> | | <i>GST</i> | |
|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C | vs. K | vs. C |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| C | 1,24 ± 0,34 | 1 | 10,93 ± 0,38 | 1 | 1,12 ± 0,16 | 1 |
| CS | 0,66 ± 0,05 | 0,56 ± 0,04 | 11,56 ± 2,37 | 1,06 ± 0,22 | 0,33 ± 0,05 | 0,30 ± 0,04 |
| CC | 1,19 ± 0,09 | 1,00 ± 0,08 | 6,80 ± 0,96 | 0,62 ± 0,09 | 0,32 ± 0,07 | 0,29 ± 0,06 |
| CU | 1,66 ± 0,32 | 1,39 ± 0,27 | 1,76 ± 0,27 | 0,16 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 0,16 ± 0,02 |



Grafikon 4.102. Promene ekspresije mRNA za *SOD*, *CAT* i *GST* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.5. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim decitabinom

Pomoću qRT-PCR metode, ispitivana je ekspresija gena, odnosno određivana je količina mRNA ciljanih gena, u odnosu na *ACTB* referentni gen, u svim eksperimentalnim grupama A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskih linija tretiranim decitabinom. Na osnovu prethodno prikazanih rezultata *in vitro* studija, koje su izvođene u svrhu odabira koncentracija ispitivanih supstanci, vršen je tretman ćelija decitabinom (5-aza-2'-deoksicitidinom) i kombinacijama decitabina i silibinina, odnosno decitabina i žučnih kiselina (CDCA i UDCA), sa ciljem ispitivanja potencijalnog sinergističkog antitumorskog dejstva. Ćelije su, tokom 48 časova, tretirane decitabinom u koncentraciji od 1 μ M, samim (grupa D) ili u kombinaciji sa silibininom koncentracije 25 μ M (grupa DS), u kombinaciji sa CDCA koncentracije 15 μ M (grupa DC) ili u kombinaciji sa UDCA koncentracije 25 μ M (grupa DU). Ove koncentracije su odabrane kao klinički relevantne, a kojima je postignuta prihvatljiva IC₂₆₋₃₉ za sve tri ćelijske linije. U negativnu kontrolnu grupu dodat je samo DMSO rastvarač (grupa K). Ispitivani su geni koji su uključeni u epigenetske događaje značajne u razvoju i terapiji karcinoma, a to su geni kodiraju sintezu epigenetskih enzima DNK metiltransferaza (*DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B*), transkripcioni represor *ZEB1*, kao i tumor-supresorski geni *CDH1* i *HPGD*.

Komparativnom Ct metodom izračunate su promene genske ekspresije (*fold change*), koje prikazuju koliko je puta relativna ekspresija analiziranog gena veća ili manja u odnosu na ekspresiju datog gena u kontrolnoj grupi ili grupi ćelija tretiranoj samo decitabinom.

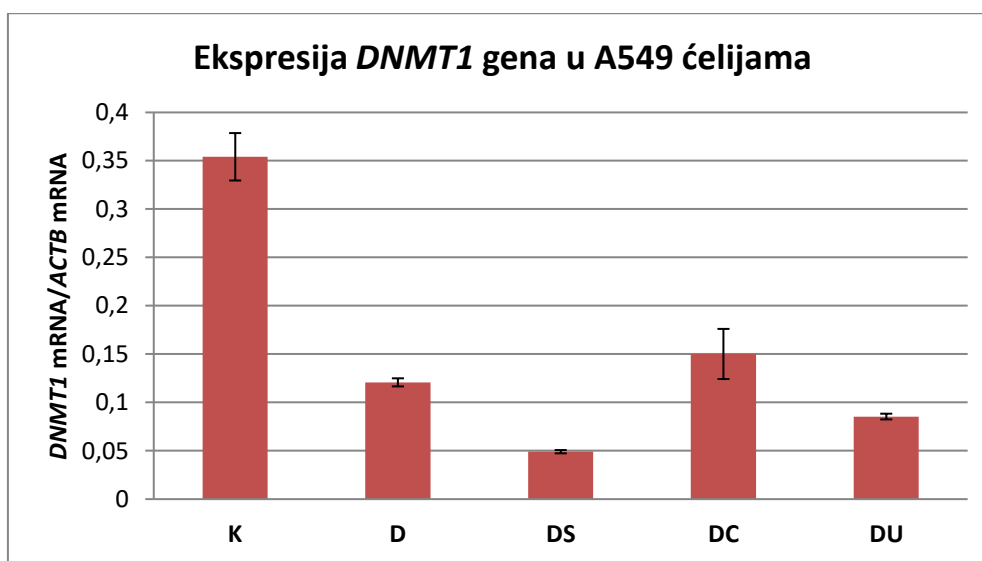
4.5.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom

U tabeli 4.103. i na grafikonu 4.103. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u A549 ćelijskoj liniji. U svim tretiranim eksperimentalnim grupama ćelija došlo je do visoko statistički značajnog ($p < 0,001$) smanjenja ekspresije *DNMT1* gena, u poređenju sa genskom ekspresijom u netretiranoj, kontrolnoj grupi. Najizraženije smanjenje ekspresije ovog gena zabeleženo je u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom decitabina i silibinina. U poređenju sa decitabin grupom, u ćelijama tretiranim kombinacijom decitabina i silibinina registruje se dalje smanjenje *DNMT1* ekspresije, visoko statistički značajno ($p = 0,002$ vs. D), a takođe, dalje smanjenje ekspresije vidi se u grupi tretiranoj kombinacijom decitabina i

UDCA, ali bez statističke značajnosti. CDCA je, naprotiv, doprinela blagom povećanju *DNMT1* ekspresije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na ekspresiju gena u decitabin grupi.

Tabela 4.103. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>DNMT1</i> | 0,3541 ± 0,0245 | 0,1208 ± 0,0042 | 0,0491 ± 0,0017 | 0,1501 ± 0,0259 | 0,0854 ± 0,0030 |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS | vs. K, D, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS | vs. K, D, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,001 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K, DC | vs. K, DS | vs. K |

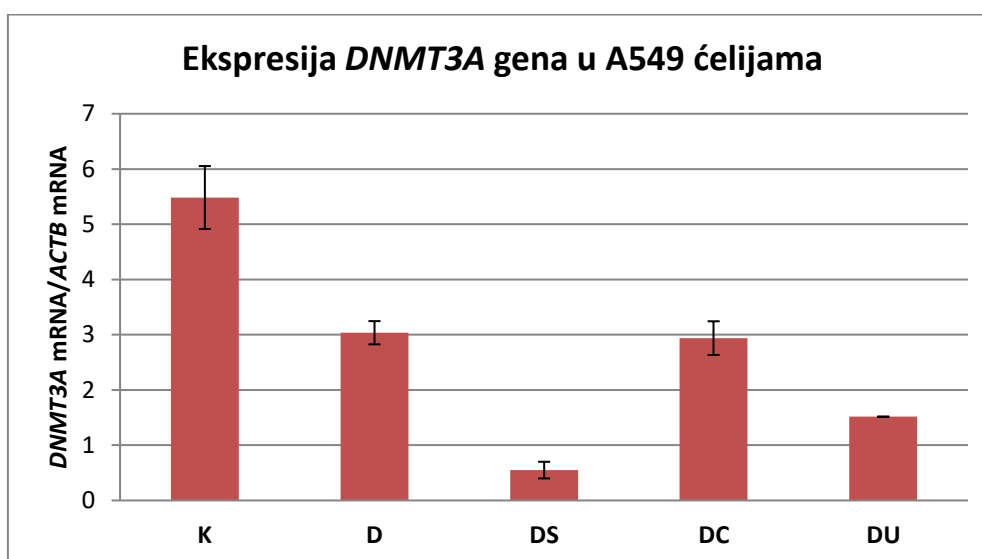


Grafikon 4.103. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u A549 ćelijskoj liniji.

U svim tretiranim grupama došlo je do smanjenja ekspresije *DNMT3A* gena, visoko statistički značajno ($p < 0,001$), u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi. Kao i u slučaju ekspresije *DNMT1* gena, najniža *DNMT3A* ekspresija zabeležena je u DS grupi, približno deset puta manja u odnosu na ekspresiju gena u kontroli. U poređenju sa decitabin grupom, dodatak silibinina i žučnih kiselina izazvao je dalje smanjenje *DNMT3A* ekspresije – u grupi DC bez statističke značajnosti, a u grupama DS i DU visoko statistički značajno ($p < 0,001$). Rezultati su prikazani u tabeli 4.104. i na grafikonu 4.104.

Tabela 4.104. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| <i>DNMT3A</i> | 5,4839 ± 0,5694 | 3,0363 ± 0,2103 | 0,5497 ± 0,1510 | 2,9387 ± 0,3051 | 1,5157 ± 0,0000 |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,001 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC | vs. K, DS | vs. K, D |

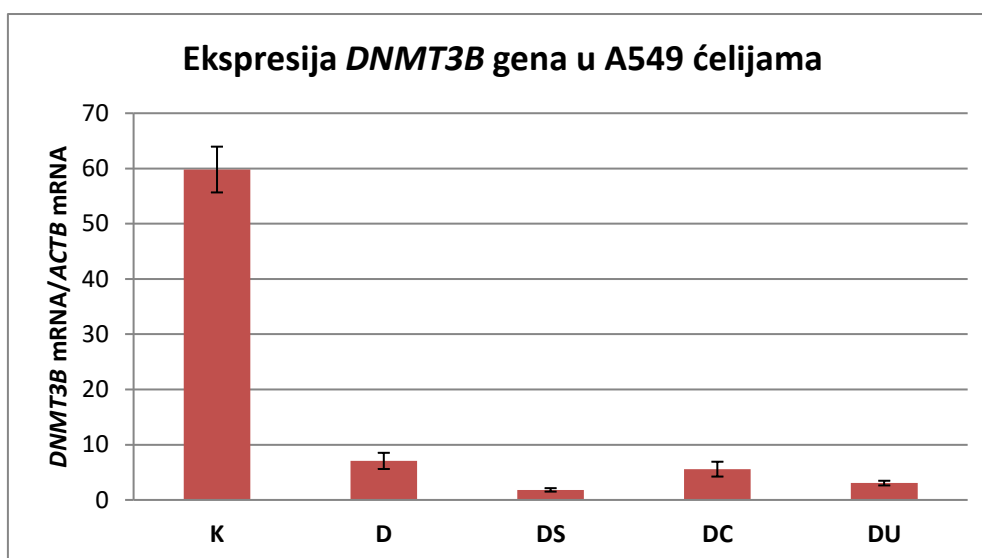


Grafikon 4.104. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u A549 ćelijskoj liniji.

Kao u slučajevima *DNMT1* i *DNMT3A* gena, u tretiranim grupama A549 ćelija došlo je do visoko statistički značajnog ($p < 0,001$) smanjenja *DNMT3B* ekspresije, u odnosu na netretiranu, kontrolnu grupu. Kotretman decitabinom i silibininom, odnosno decitabinom i žučnim kiselinama izazvao je dalje smanjenje *DNMT3B* ekspresije u poređenju sa profilom genske ekspresije u grupi ćelija koja je tretirana samo decitabinom, ali bez statističke značajnosti. Najniža ekspresija *DNMT3B* gena zabeležena je u DS grupi, kao i u slučaju *DNMT1* i *DNMT3A* gena. Rezultati su predstavljeni u tabeli 4.105. i na grafikonu 4.105.

Tabela 4.105. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>DNMT3B</i> | 59,8098 ± 4,1432 | 7,0651 ± 1,4613 | 1,8206 ± 0,3143 | 5,5719 ± 1,3419 | 3,0509 ± 0,4219 |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,001 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |

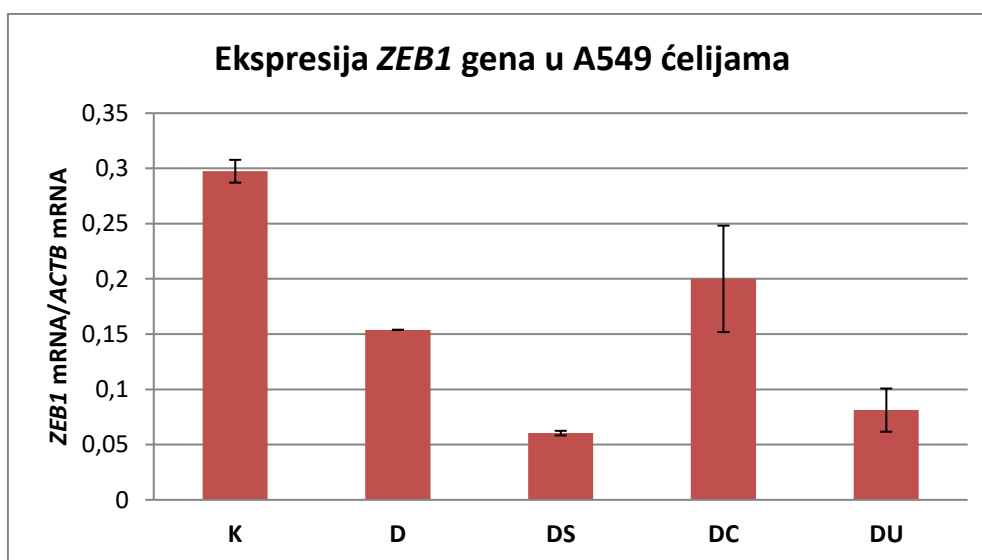


Grafikon 4.105. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u A549 ćelijskoj liniji.

Kao što se vidi u tabeli 4.106. i na grafikonu 4.106, tretman A549 ćelija decitabinom, kao i kombinacijom decitabina sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama, doveo je do visoko statistički značajnog smanjenja relativne ekspresije mRNA za *ZEB1*, u poređenju sa kontrolnom grupom (D, DS, DU p<0,001 vs. K; DC p<0,01 vs. K). Silibinin je doprineo najvećem smanjenju *ZEB1* ekspresije i to smanjenje je bilo visoko statistički značajno (p=0,005), u poređenju sa ekspresijom u ćelijama tretiranim samo decitabinom. Takođe, UDCA je izazvala statistički značajno dalje smanjenje *ZEB1* ekspresije (p=0,024), u poređenju sa uticajem samog decitabina, dok je CDCA doprinela povećanju ekspresije ovog gena, u poređenju sa decitabinom, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.106. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>ZEB1</i> | 0,2974 ± 0,0103 | 0,1539 ± 0,0000 | 0,0604 ± 0,0021 | 0,2000 ± 0,0482 | 0,0812 ± 0,0196 |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS | vs. K, D, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,001 | vs. D, DS, DU | vs. K | vs. K, DC | vs. DS, DU | vs. K, DC |

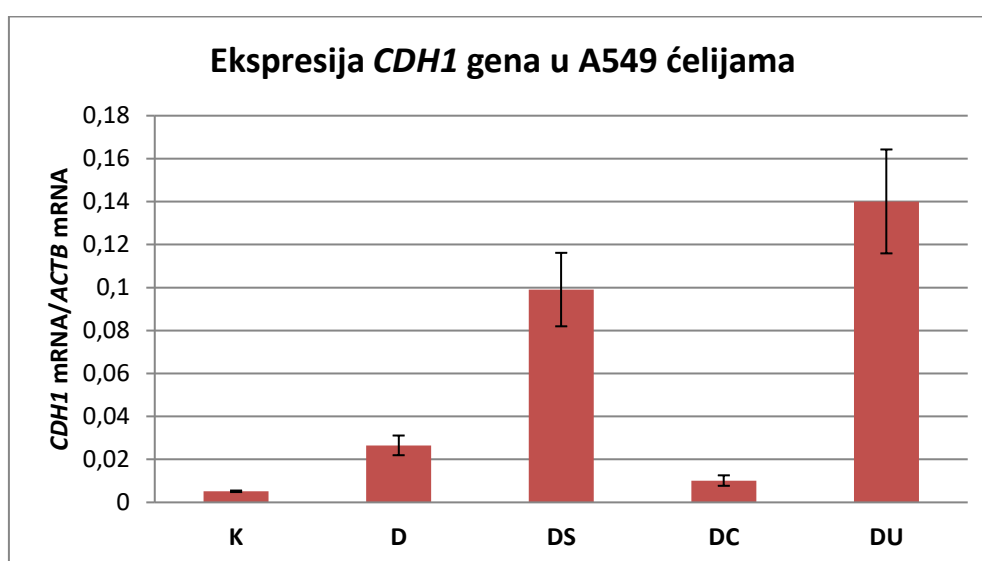


Grafikon 4.106. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.107. i na grafikonu 4.107. predstavljena je relativna ekspresija *CDHI* gena u A549 ćelijama. Decitabin je izazvao povećanje *CDHI* ekspresije u poređenju sa kontrolom, ali bez statističke značajnosti. Dodatak silibinina i UDCA decitabinu izazvao je dalje povećanje ekspresije ovog gena i to povećanje je bilo visoko statistički značajno ($p < 0,001$), u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj, ali i decitabin grupi. Najviša genska ekspresija zapaža se u DU grupi. U grupi ćelija tretiranoj kombinacijom decitabina i CDCA uočava se blago povećana *CDHI* ekspresija u odnosu na kontrolu, ali smanjena ekspresija u poređenju sa grupom tretiranom samo decitabinom, u oba slučaja bez statističke značajnosti.

Tabela 4.107. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| <i>CDH1</i> | 0,0052 ± 0,0004 | 0,0265 ± 0,0046 | 0,0991 ± 0,0171 | 0,0101 ± 0,0024 | 0,1401 ± 0,0242 |
| p<0,05 | vs. DS, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DC, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| p<0,01 | vs. DS, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DC | vs. DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,001 | vs. DS, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DC | vs. DS, DU | vs. K, D, DC |

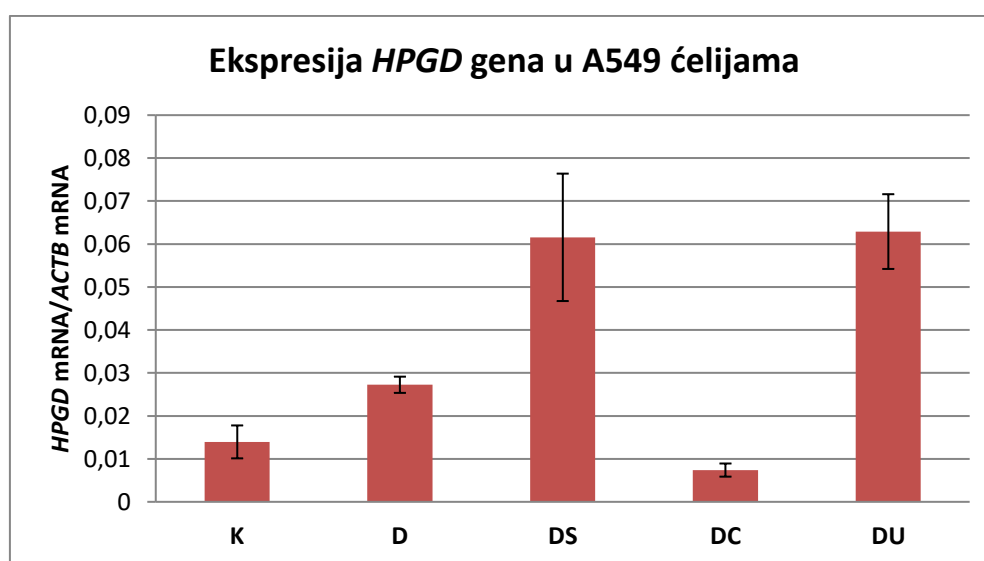


Grafikon 4.107. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.108. i na grafikonu 4.108. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji. Inkubacija ćelija decitabinom izazvala je povećanu *HPGD* ekspresiju u poređenju sa kontrolnom grupom, ali bez statističke značajnosti. Kombinacija decitabina sa silibininom i UDCA doprinela je daljem povećanju *HPGD* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolu. To povećanje je, takođe, bilo visoko statistički značajno ($p < 0,01$) u poređenju sa grupom ćelija koja je tretirana samo decitabinom. Kao u rezultatima genske ekspresije *CDH1* gena, najviša ekspresija i ovog tumor supresorskog gena uočava se u DU grupi. Naprotiv, kotretman ćelija decitabinom i CDCA doveo je do smanjene *HPGD* ekspresije, bez statističke značajnosti u poređenju sa K i D grupama.

Tabela 4.108. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>HPGD</i> | 0,0139 ± 0,0038 | 0,0272 ± 0,0019 | 0,0616 ± 0,0148 | 0,0074 ± 0,0015 | 0,0629 ± 0,0087 |
| p<0,05 | vs. DS, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DC | vs. DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,01 | vs. DS, DU | vs. DS, DU | vs. K, D, DC | vs. DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,001 | vs. DS, DU | / | vs. K, DC | vs. DS, DU | vs. K, DC |



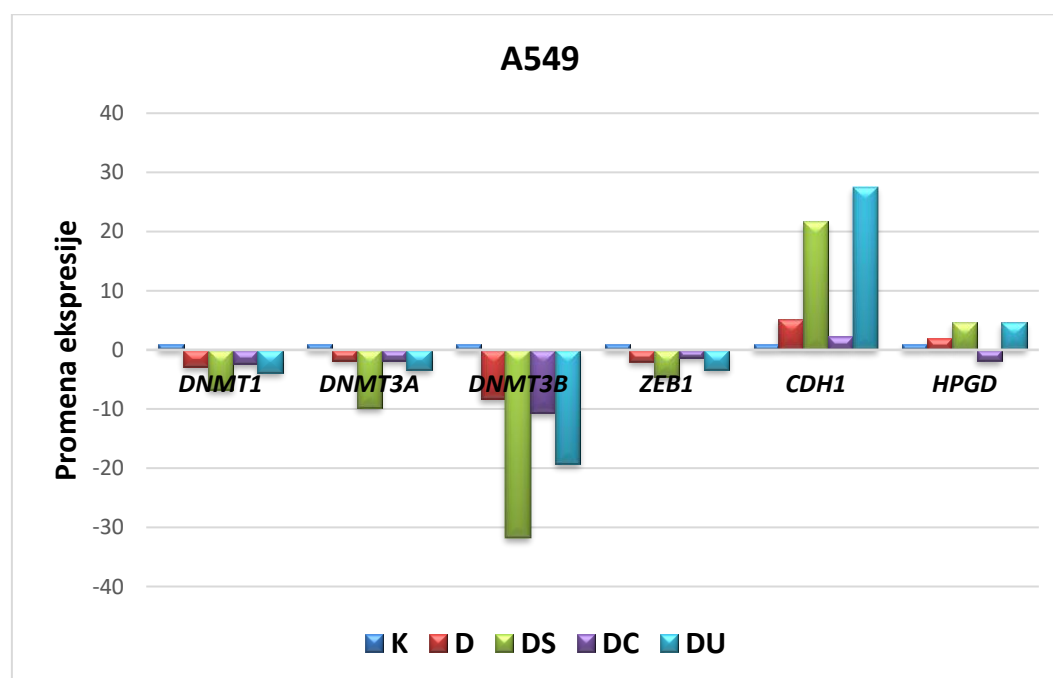
Grafikon 4.108. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo decitabinom, prikazane su u tabeli 4.109. i na grafikonu 4.109.

Tabela 4.109. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo decitabinom.

| Grupa | <i>DNMT1</i> | | <i>DNMT3A</i> | | <i>DNMT3B</i> | |
|-------|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 0,34 ± 0,04 | 1 | 0,56 ± 0,09 | 1 | 0,12 ± 0,03 | 1 |
| DS | 0,15 ± 0,05 | 0,43 ± 0,15 | 0,10 ± 0,03 | 0,18 ± 0,05 | 0,03 ± 0,01 | 0,27 ± 0,08 |
| DC | 0,43 ± 0,11 | 1,27 ± 0,31 | 0,56 ± 0,15 | 1,00 ± 0,27 | 0,09 ± 0,02 | 0,81 ± 0,19 |
| DU | 0,25 ± 0,08 | 0,74 ± 0,23 | 0,29 ± 0,08 | 0,52 ± 0,15 | 0,05 ± 0,01 | 0,45 ± 0,10 |

| Grupa | <i>ZEB1</i> | | <i>CDH1</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 0,52 ± 0,05 | 1 | 5,26 ± 1,30 | 1 | 2,02 ± 0,31 | 1 |
| DS | 0,22 ± 0,08 | 0,42 ± 0,15 | 21,75 ± 10,54 | 4,27 ± 2,07 | 4,61 ± 1,26 | 2,31 ± 0,63 |
| DC | 0,76 ± 0,38 | 1,47 ± 0,73 | 2,22 ± 1,10 | 0,44 ± 0,22 | 0,55 ± 0,13 | 0,28 ± 0,07 |
| DU | 0,30 ± 0,14 | 0,58 ± 0,27 | 27,51 ± 5,71 | 5,40 ± 1,12 | 4,71 ± 1,02 | 2,35 ± 0,51 |



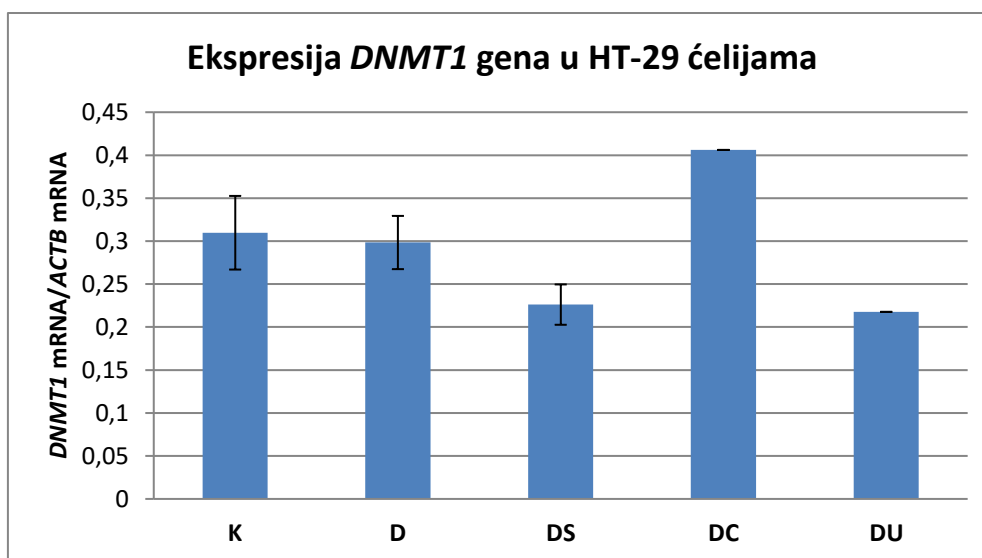
Grafikon 4.109. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.5.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom

U tabeli 4.110. i na grafikonu 4.110. prikazana je relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u HT-29 ćelijskoj liniji. Tretman ćelija decitabinom doveo je do blagog sniženja *DNMT1* ekspresije, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Dodatak silibinina decitabinu izazvao je dalje smanjenje ekspresije ovog gena i to smanjenje je bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu ($p=0,018$) i decitabin grupu ($p=0,041$). UDCA je doprinela još većem smanjenju ekspresije *DNMT1* gena ($p=0,009$ vs. K; $p=0,022$ vs. D). Naprotiv, CDCA je izazvala povećanu *DNMT1* ekspresiju, visoko statistički značajno u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi ($p=0,007$) i grupi ćelija tretiranoj samo decitabinom ($p=0,003$).

Tabela 4.110. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
| <i>DNMT1</i> | 0,3098 ± 0,0428 | 0,2984 ± 0,0310 | 0,2261 ± 0,0235 | 0,4061 ± 5,77x10 ⁻¹⁶ | 0,2176 ± 0,0000 |
| p<0,05 | vs. DS, DC, DU | vs. DS, DC, DU | vs. K, D, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, D, DC |
| p<0,01 | vs. DC, DU | vs. DC | vs. DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,001 | / | / | vs. DC | vs. DS, DU | vs. DC |

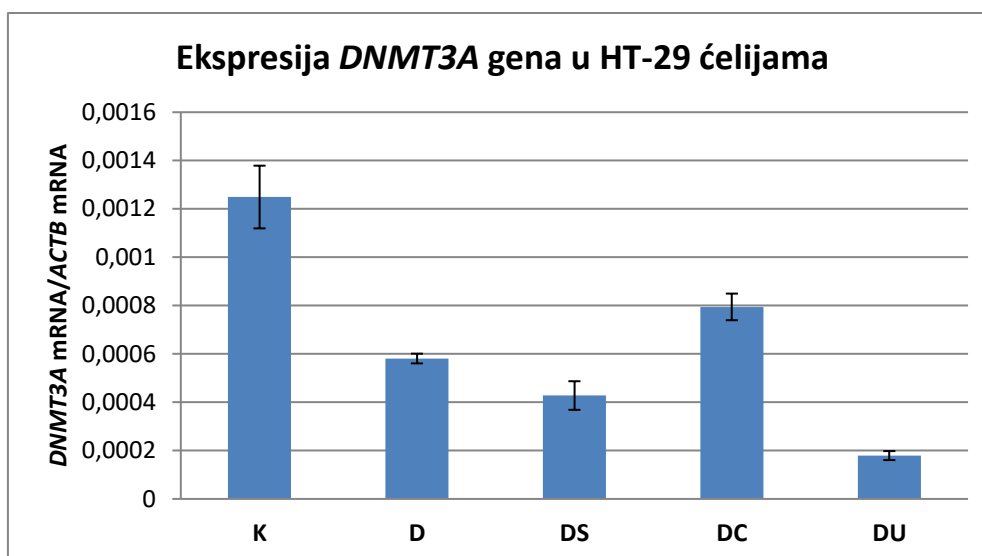


Grafikon 4.110. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u HT-29 ćelijskoj liniji.

U HT-29 ćelijama primena demetilacionog agensa decitabina, kao i kombinacije decitabina sa silibininom, odnosno sa žučnim kiselinama, izazvala je smanjenje ekspresije *DNMT3A* gena, i to smanjenje je u svim eksperimentalnim grupama bilo visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa netretiranom, kontrolnom grupom. Najizraženije smanjenje ekspresije uočava se u DU grupi. U odnosu na grupu ćelija tretiranu samo decitabinom, kombinacija sa silibininom doprinela je daljem smanjenju *DNMT3A* ekspresije, ali bez statističke značajnosti, dok je kombinacija sa UDCA izazvala visoko statistički značajno smanjenje ekspresije ($p < 0,001$). Nasuprot hidrofилne žučne kiseline UDCA, hidrofobna CDCA je prouzrokovala povećanje *DNMT3A* ekspresije ($p = 0,024$ vs. D). Rezultati su prikazani u tabeli 4.111. i na grafikonu 4.111.

Tabela 4.111. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>DNMT3A</i> | 0,0012 ± 0,0001 | 0,0006 ± 2,01x10 ⁻⁵ | 0,0004 ± 5,92x10 ⁻⁵ | 0,0008 ± 5,50x10 ⁻⁵ | 0,0002 ± 1,86x10 ⁻⁵ |
| $p < 0,05$ | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DC, DU | vs. K, DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| $p < 0,01$ | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DU | vs. K, DC, DU | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| $p < 0,001$ | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DU | vs. K, DC | vs. K, DS, DU | vs. K, D, DC |

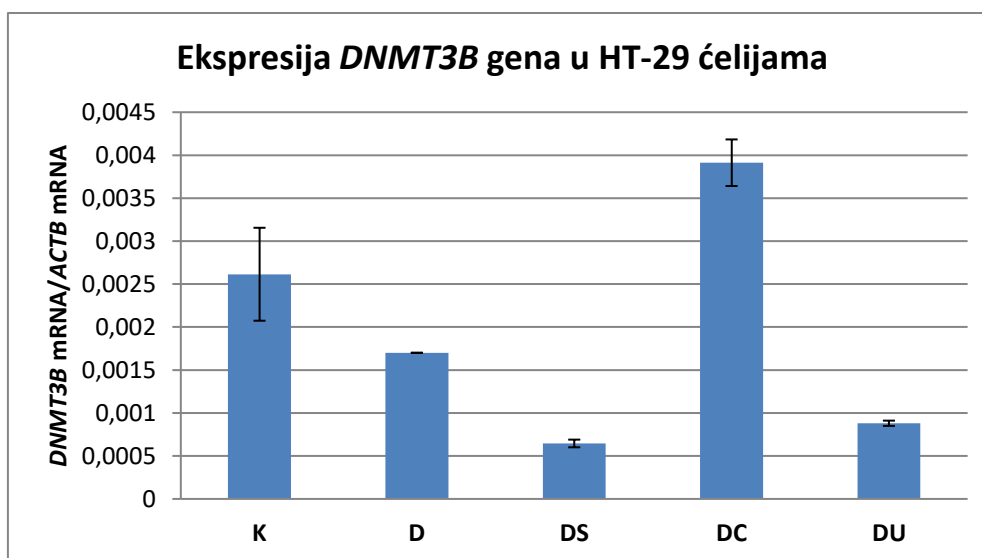


Grafikon 4.111. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Kao što se može videti u tabeli 4.112. i na grafikonu 4.112, decitabin je izazvao statistički značajno smanjenu ekspresiju *DNMT3B* gena ($p=0,014$ vs. K) u HT-29 ćelijama. Zapaža se da je ekspresija *DNMT3B* gena bila visoko statistički značajno smanjena u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom decitabina i silibinina ($p<0,001$ vs. K; $p=0,005$ vs. D). UDCA je, takođe, doprinela daljem smanjenju ekspresije ispitivanog gena, visoko statistički značajno u odnosu na kontrolnu ($p<0,001$) i statistički značajno u odnosu na decitabin grupu ($p=0,027$). Naprotiv, CDCA je izazvala visoko statistički značajno povećanu ekspresiju *DNMT3B* gena u poređenju sa kontrolnom ($p=0,001$) i decitabin grupom ($p<0,001$).

Tabela 4.112. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| <i>DNMT3B</i> | 0,0026 ± 0,0005 | 0,0017 ± 0,0000 | 0,0006 ± 4,47x10 ⁻⁵ | 0,0039 ± 0,0003 | 0,0009 ± 3,05x10 ⁻⁵ |
| $p<0,05$ | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DS, DC, DU | vs. K, D, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, D, DC |
| $p<0,01$ | vs. DS, DC, DU | vs. DS, DC | vs. K, D, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DC |
| $p<0,001$ | vs. DS, DU | vs. DC | vs. K, DC | vs. D, DS, DU | vs. K, DC |

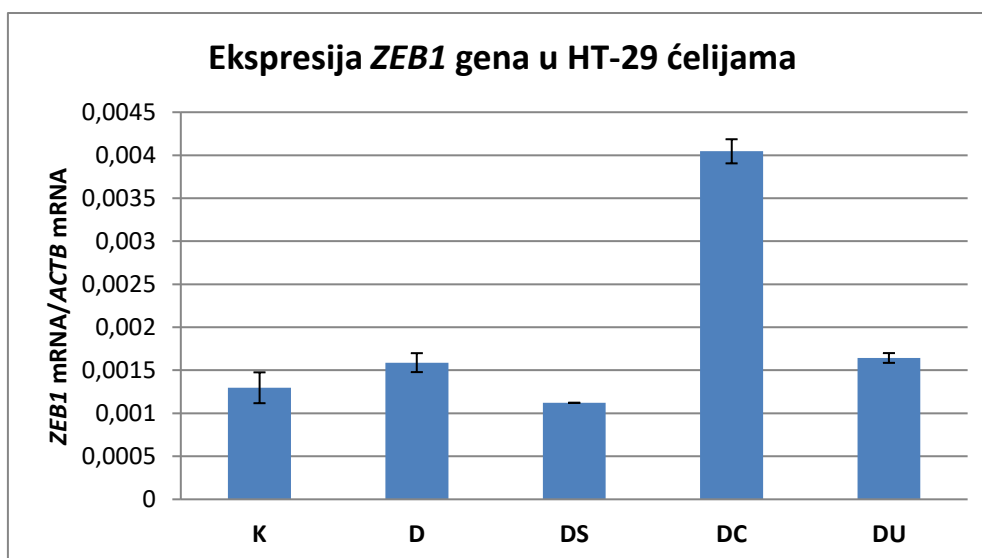


Grafikon 4.112. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u HT-29 ćelijskoj liniji.

U HT-29 ćelijama decitabin je povećao ekspresiju *ZEB1* gena, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa kontrolom. Obe žučne kiseline su doprinele daljem povećanju *ZEB1* ekspresije (DC $p < 0,001$ vs. K, D; DU $p = 0,028$ vs. K). Jedino je u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom decitabina i silibinina došlo do smanjene ekspresije ovog transkripcionog represora, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolnu grupu, ali visoko statistički značajno u odnosu na decitabin grupu ($p = 0,004$). Rezultati relativne ekspresije *ZEB1* gena predstavljeni su u tabeli 4.113. i na grafikonu 4.113.

Tabela 4.113. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------------------|
| <i>ZEB1</i> | 0,0013 ± 0,0002 | 0,0015 ± 0,0001 | 0,0011 ± 0,0000 | 0,0040 ± 0,0001 | 0,0016 ± 5,69x10 ⁻⁵ |
| $p < 0,05$ | vs. DC, DU | vs. DS, DC | vs. D, DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DS, DC |
| $p < 0,01$ | vs. DC | vs. DS, DC | vs. D, DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. DS, DC |
| $p < 0,001$ | vs. DC | vs. DC | vs. DC | vs. K, D, DS, DU | vs. DC |

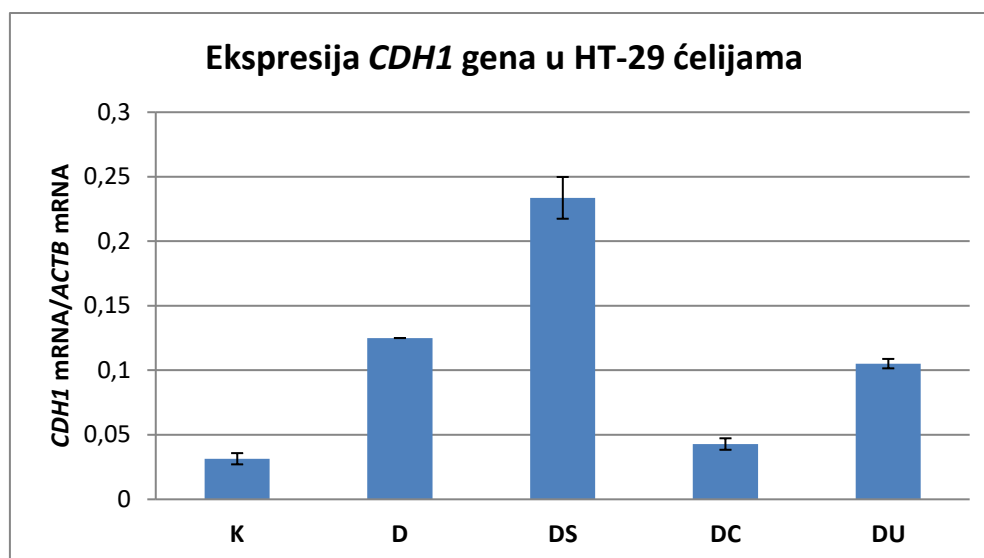


Grafikon 4.113. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Kao što se može videti u tabeli 4.114. i na grafikonu 4.114. decitabin, sâm i u kombinacijama sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama, izazvao je povećanje ekspresije *CDHI* gena u HT-29 ćelijama. To povećanje genske ekspresije je, u odnosu na kontrolu, bilo visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u grupama D, DS i DU. Kada se kotretirane grupe uporede sa grupom ćelija tretiranom samo decitabinom, uočava se da je jedino kotretman sa silibininom doprineo daljem povećanju *CDHI* ekspresije ($p < 0,001$ vs. D) i ujedno je DS grupa sa najvećom *CDHI* ekspresijom. CDCA je izazvala smanjenje ekspresije ($p < 0,001$ vs. D), dok je UDCA takođe izazvala smanjenje ekspresije, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.114. Relativna ekspresija mRNA za *CDHI* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>CDHI</i> | 0,0314 ± 0,0043 | 0,1250 ± 0,0000 | 0,2336 ± 0,0162 | 0,0428 ± 0,0044 | 0,1051 ± 0,0036 |
| $p < 0,05$ | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC | vs. K, D, DC, DU | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC |
| $p < 0,01$ | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC | vs. K, D, DC, DU | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC |
| $p < 0,001$ | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC | vs. K, D, DC, DU | vs. D, DS, DU | vs. K, DS, DC |

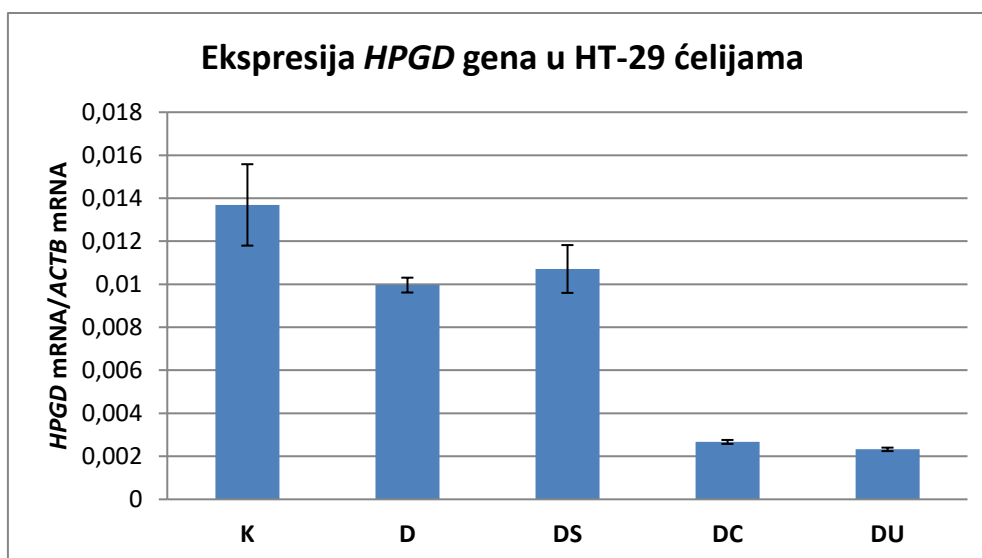


Grafikon 4.114. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.115. i grafikon 4.115. prikazuju relativnu ekspresiju mRNA za *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji. U poređenju sa kontrolom, decitabin je izazvao visoko statistički značajno smanjenje ekspresije tumor-supresorskog gena *HPGD* ($p=0,007$). Dalje smanjenje ekspresije ovog gena prouzrokovao je kotretman sa žučnim kiselinama i to smanjenje je bilo visoko statistički značajno ($p<0,001$) u odnosu na kontrolnu i decitabin grupu. Tretman ćelija kombinacijom decitabina i silibinina izazvao je statistički značajno ($p=0,028$) smanjenje ekspresije u poređenju sa kontrolom, ali ta vrednost relativne genske ekspresije bila je neznatno viša u poređenju sa decitabin grupom, bez statističke značajnosti.

Tabela 4.115. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>HPGD</i> | $0,0137 \pm 0,0019$ | $0,0099 \pm 0,0003$ | $0,0107 \pm 0,0011$ | $0,0027 \pm 9,25 \times 10^{-5}$ | $0,0023 \pm 8,05 \times 10^{-5}$ |
| $p<0,05$ | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DC, DU | vs. K, DC, DU | vs. K, D, DS | vs. K, D, DS |
| $p<0,01$ | vs. D, DC, DU | vs. K, DC, DU | vs. DC, DU | vs. K, D, DS | vs. K, D, DS |
| $p<0,001$ | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. K, D, DS | vs. K, D, DS |



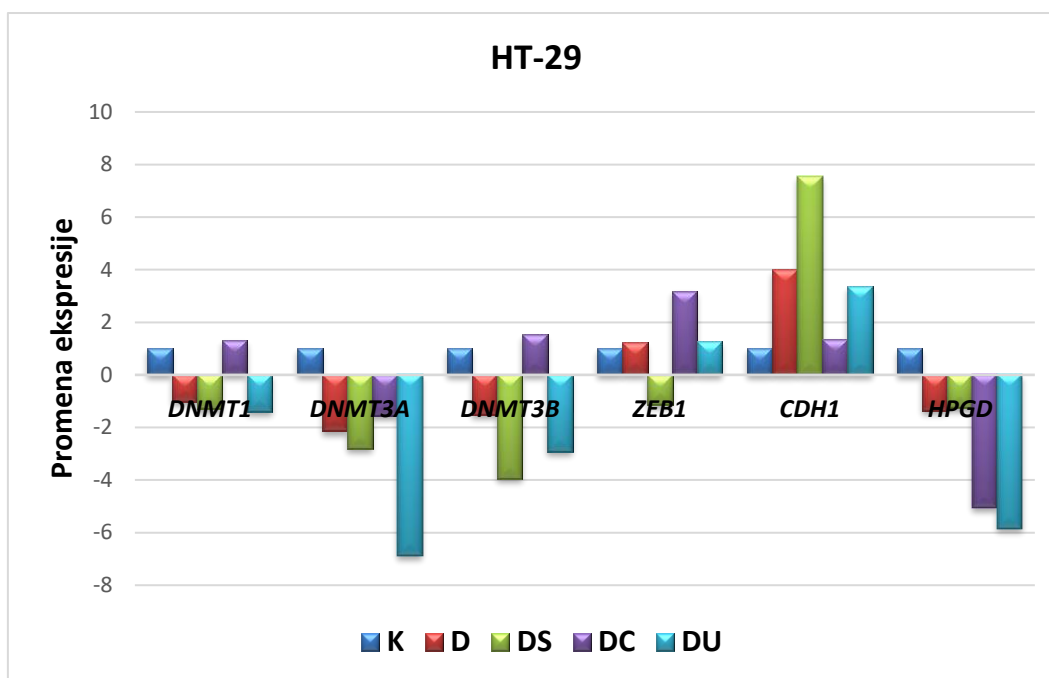
Grafikon 4.115. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo decitabinom, prikazane su u tabeli 4.116. i na grafikonu 4.116.

Tabela 4.116. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo decitabinom.

| Grupa | <i>DNMT1</i> | | <i>DNMT3A</i> | | <i>DNMT3B</i> | |
|-------|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 0,98 ± 0,14 | 1 | 0,47 ± 0,02 | 1 | 0,66 ± 0,03 | 1 |
| DS | 0,76 ± 0,21 | 0,79 ± 0,21 | 0,36 ± 0,11 | 0,77 ± 0,23 | 0,25 ± 0,04 | 0,38 ± 0,06 |
| DC | 1,33 ± 0,19 | 1,38 ± 0,20 | 0,64 ± 0,07 | 1,37 ± 0,15 | 1,52 ± 0,17 | 2,31 ± 0,25 |
| DU | 0,71 ± 0,03 | 0,73 ± 0,04 | 0,15 ± 0,02 | 0,31 ± 0,04 | 0,34 ± 0,03 | 0,52 ± 0,04 |

| Grupa | <i>ZEB1</i> | | <i>CDH1</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 1,24 ± 0,14 | 1 | 4,00 ± 0,20 | 1 | 0,73 ± 0,03 | 1 |
| DS | 0,89 ± 0,17 | 0,72 ± 0,14 | 7,55 ± 1,16 | 1,89 ± 0,29 | 0,79 ± 0,11 | 1,08 ± 0,15 |
| DC | 3,19 ± 0,55 | 2,59 ± 0,44 | 1,37 ± 0,14 | 0,34 ± 0,04 | 0,20 ± 0,02 | 0,27 ± 0,04 |
| DU | 1,28 ± 0,10 | 1,04 ± 0,08 | 3,37 ± 0,26 | 0,84 ± 0,07 | 0,17 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 |



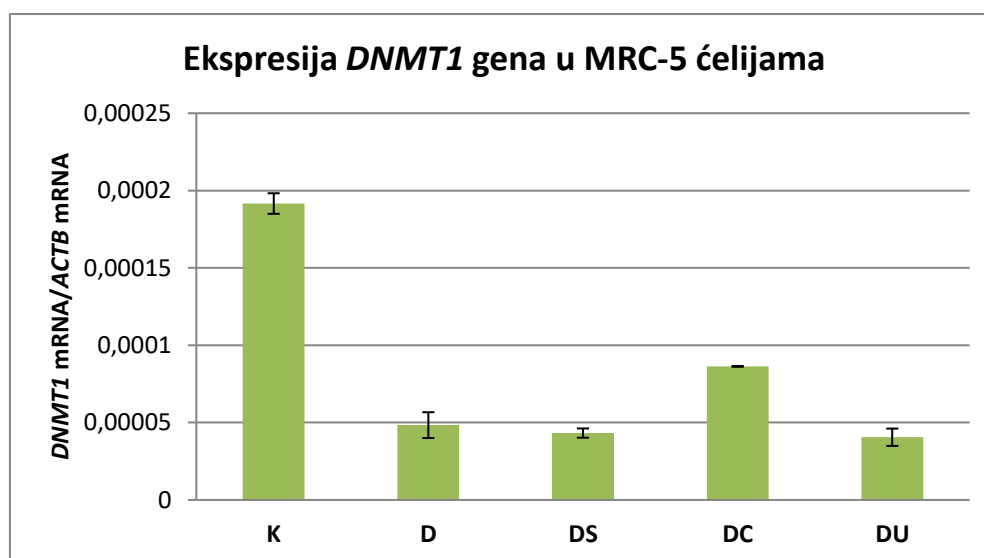
Grafikon 4.116. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.5.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na ekspresiju gena u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj decitabinom

U tabeli 4.117. i na grafikonu 4.117. prikazana je ekspresija *DNMT1* gena u MRC-5 ćelijama. Svi tretmani su doveli do smanjene *DNMT1* ekspresije, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom ćelija. Najveće smanjenje genske ekspresije uočava se u DU eksperimentalnoj grupi ćelija. Silibinin i UDCA su doprineli daljem smanjenju *DNMT1* ekspresije u odnosu na sâm decitabin, ali bez statističke značajnosti, dok je CDCA povećala gensku ekspresiju, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa ekspresijom gena u grupi ćelija tretiranoj samo decitabinom.

Tabela 4.117. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|---|---|---|--|---|
| <i>DNMT1</i> | $1,92 \times 10^{-4} \pm 6,64 \times 10^{-6}$ | $4,84 \times 10^{-5} \pm 8,35 \times 10^{-6}$ | $4,32 \times 10^{-5} \pm 2,99 \times 10^{-6}$ | $8,63 \times 10^{-5} \pm 5,29 \times 10^{-20}$ | $4,05 \times 10^{-5} \pm 5,60 \times 10^{-6}$ |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DC | vs. K, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DC | vs. K, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,001 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K, DC | vs. K, DC | vs. K, D, DS, DU | vs. K, DC |

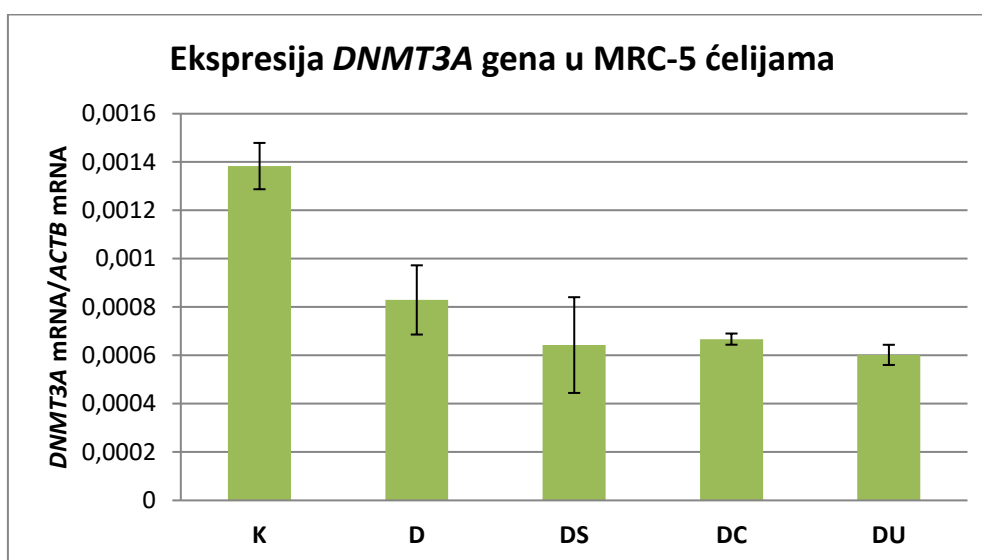


Grafikon 4.117. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT1* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U MRC-5 ćelijskoj liniji, decitabin, sâm ili u kombinaciji sa silibininom i žučnim kiselinama, doveo je do smanjene ekspresije *DNMT3A* gena i to smanjenje je bilo visoko statistički značajno u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi ćelija (D p<0,01 vs. K; DS, DC i DU p<0,001 vs. K). Kao i za prethodno opisanu ekspresiju *DNMT1* gena, u DU grupi se uočava najniža ekspresija *DNMT3A* gena. Silibinin i žučne kiseline su doprinele daljem smanjenju *DNMT3A* ekspresije, u poređenju sa genskom ekspresijom u grupi ćelija koja je tretirana samo decitabinom, ali bez statističke značajnosti. Rezultati su predstavljeni u tabeli 4.118. i na grafikonu 4.118.

Tabela 4.118. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------------------------|--|--|--|--|
| <i>DNMT3A</i> | 0,0014 ± 9,58x10 ⁻⁵ | 8,29x10 ⁻⁴ ± 1,43x10 ⁻⁴ | 6,43x10 ⁻⁴ ± 1,98x10 ⁻⁴ | 6,67x10 ⁻⁴ ± 2,31x10 ⁻⁵ | 6,02x10 ⁻⁴ ± 4,17x10 ⁻⁵ |
| p<0,05 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,01 | vs. D, DS, DC, DU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,001 | vs. DS, DC, DU | / | vs. K | vs. K | vs. K |

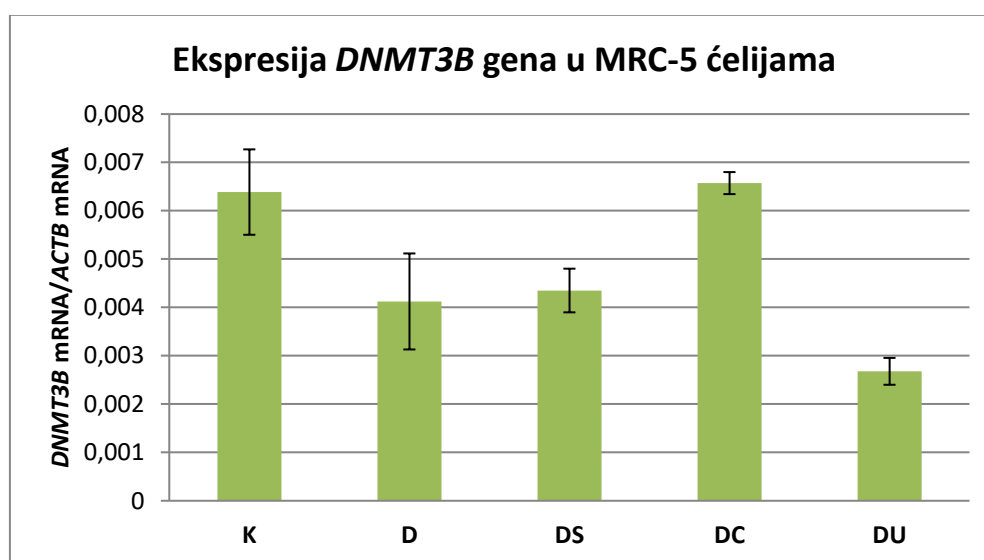


Grafikon 4.118. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3A* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.119. i na grafikonu 4.119. prikazana je relativna ekspresija *DNMT3B* gena u MRC-5 ćelijskoj liniji. U poređenju sa kontrolnom grupom, decitabin je izazvao statistički značajno smanjenje *DNMT3B* ekspresije (p=0,011). Dodatak silibinina decitabinu prouzrokovao je blago povećanje *DNMT3B* ekspresije, u poređenju sa delovanjem decitabina, bez statističke značajnosti, ali je u DS grupi ta ekspresija bila statistički značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom (p=0,021). U DU grupi je zabeležena najniža ekspresija (p<0,001 vs. K), dok se u DC grupi uočava najviša *DNMT3B* ekspresija (p=0,007 vs. D).

Tabela 4.119. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>DNMT3B</i> | 0,0064 ± 0,0009 | 0,0041 ± 0,0010 | 0,0043 ± 0,0005 | 0,0066 ± 0,0002 | 0,0027 ± 0,0003 |
| p<0,05 | vs. D, DS, DU | vs. K, DC | vs. K, DC | vs. D, DS, DU | vs. K, DC |
| p<0,01 | vs. DU | vs. DC | / | vs. D, DU | vs. K, DC |
| p<0,001 | vs. DU | / | / | vs. DU | vs. K, DC |

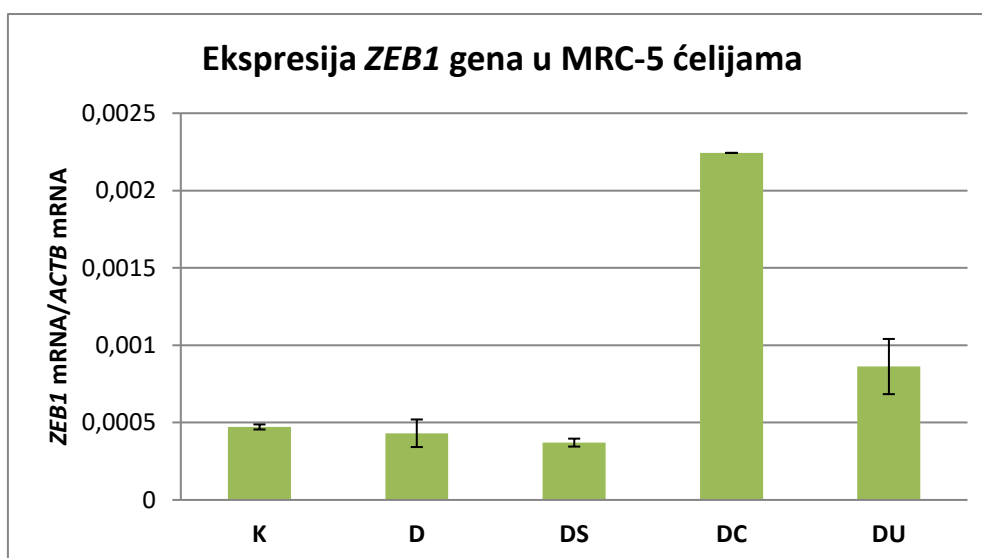


Grafikon 4.119. Relativna ekspresija mRNA za *DNMT3B* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Kao što se može videti u tabeli 4.120. i na grafikonu 4.120, tretman MRC-5 ćelija decitabinom, kao i kombinacijom decitabina i silibinina, doveo je do smanjene ekspresije transkripcionog represora *ZEB1*, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa ekspresijom gena u kontrolnoj grupi ćelija. U DS grupi se uočava nešto niža *ZEB1* ekspresija u poređenju sa D grupom, takođe bez statističke značajnosti. Obe žučne kiseline su doprinele povećanoj ekspresiji ovog gena i to povećanje je bilo visoko statistički značajno (DC p<0,001 vs. K, D; DU p<0,01 vs. K, D).

Tabela 4.120. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|---|---|---|-----------------------------------|---|
| <i>ZEB1</i> | $4,72 \times 10^{-4} \pm 1,64 \times 10^{-5}$ | $4,31 \times 10^{-4} \pm 8,92 \times 10^{-5}$ | $3,71 \times 10^{-4} \pm 2,57 \times 10^{-5}$ | $0,0022 \pm 5,76 \times 10^{-18}$ | $8,62 \times 10^{-4} \pm 1,78 \times 10^{-4}$ |
| p<0,05 | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| p<0,01 | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. K, D, DS, DC |
| p<0,001 | vs. DC | vs. DC | vs. DC, DU | vs. K, D, DS, DU | vs. DS, DC |

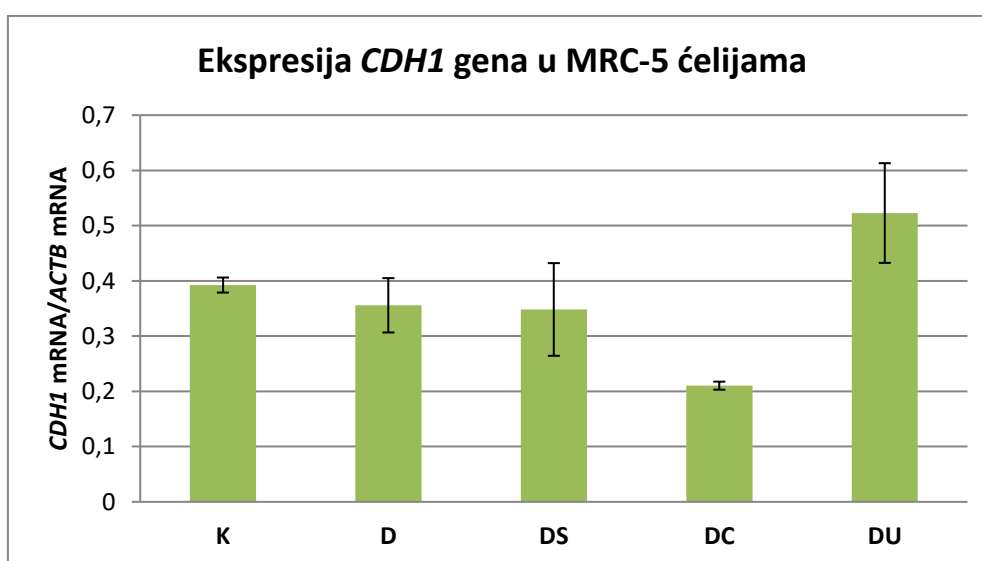


Grafikon 4.120. Relativna ekspresija mRNA za *ZEB1* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U poređenju sa netretiranom grupom MRC-5 ćelija, tretman MRC-5 ćelija decitabinom, kao i kombinacijom decitabina i silibinina, odnosno decitabina i CDCA, doveo je do smanjenja ekspresije *CDHI* gena, pri čemu je to smanjenje bilo statistički značajno jedino u DC grupi (p=0,025 vs. K). Kotretman sa UDCA je jedini doveo do povećanja ekspresije ovog tumor-supresorskog gena (p=0,041 vs. D). Rezultati su prikazani u tabeli 4.121. i na grafikonu 4.121.

Tabela 4.121. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>CDH1</i> | 0,3924 ± 0,0136 | 0,3558 ± 0,0492 | 0,3482 ± 0,0839 | 0,2103 ± 0,0073 | 0,5228 ± 0,0903 |
| p<0,05 | vs. DC | vs. DU | vs. DU | vs. K, DU | vs. D, DS, DC |
| p<0,01 | / | / | / | vs. DU | vs. DC |
| p<0,001 | / | / | / | vs. DU | vs. DC |

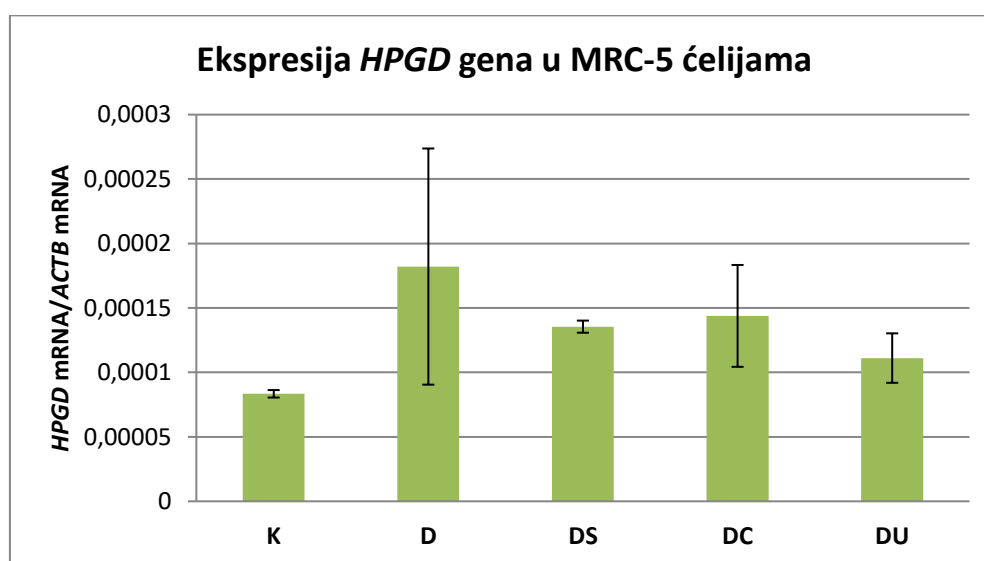


Grafikon 4.121. Relativna ekspresija mRNA za *CDH1* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.122. i na grafikonu 4.122. prikazana je relativna ekspresija *HPGD* gena u MRC-5 ćelijama. U poređenju sa kontrolnom grupom, ekspresija *HPGD* gena bila je povećana u svim tretiranim eksperimentalnim grupama, ali bez statističke značajnosti. Najveća ekspresija ovog tumor-supresorskog gena uočava se u grupi ćelija tretiranoj decitabinom. Dodatak silibinina, odnosno žučnih kiselina decitabinu, izazvao je smanjenje genske ekspresije u poređenju sa delovanjem samog decitabina, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 4.122. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU).

| Relativna ekspresija gena | K | D | DS | DC | DU |
|---------------------------|---|---|---|---|---|
| <i>HPGD</i> | $8,34 \times 10^{-5} \pm 2,89 \times 10^{-6}$ | $1,82 \times 10^{-4} \pm 9,16 \times 10^{-5}$ | $1,35 \times 10^{-4} \pm 4,70 \times 10^{-6}$ | $1,44 \times 10^{-4} \pm 3,95 \times 10^{-5}$ | $1,11 \times 10^{-4} \pm 1,92 \times 10^{-5}$ |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |



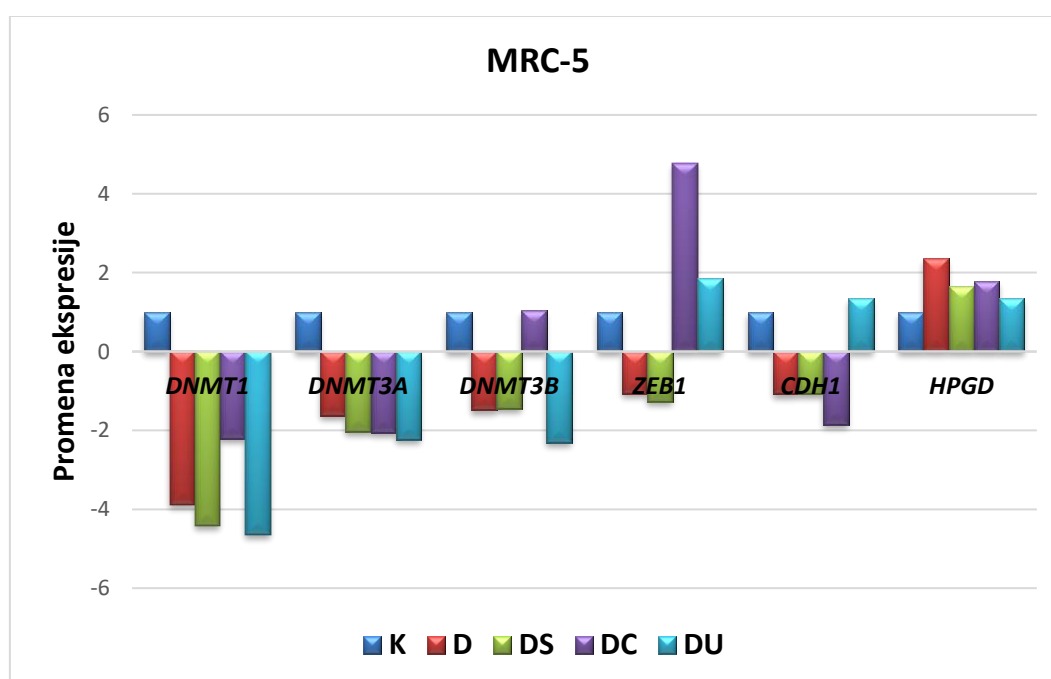
Grafikon 4.122. Relativna ekspresija mRNA za *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Vrednosti promene ekspresije (*fold change*) za gene *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na kontrolnu grupu ili grupu ćelija tretiranu samo decitabinom, prikazane su u tabeli 4.123. i na grafikonu 4.123.

Tabela 4.123. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija i grupu ćelija tretiranu samo decitabinom.

| Grupa | <i>DNMT1</i> | | <i>DNMT3A</i> | | <i>DNMT3B</i> | |
|-------|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 0,26 ± 0,06 | 1 | 0,61 ± 0,15 | 1 | 0,67 ± 0,21 | 1 |
| DS | 0,23 ± 0,02 | 0,91 ± 0,10 | 0,49 ± 0,20 | 0,83 ± 0,33 | 0,69 ± 0,07 | 1,08 ± 0,11 |
| DC | 0,45 ± 0,04 | 1,81 ± 0,18 | 0,48 ± 0,04 | 0,82 ± 0,06 | 1,04 ± 0,08 | 1,63 ± 0,13 |
| DU | 0,22 ± 0,05 | 0,86 ± 0,19 | 0,45 ± 0,11 | 0,76 ± 0,18 | 0,43 ± 0,10 | 0,68 ± 0,15 |

| Grupa | <i>ZEB1</i> | | <i>CDH1</i> | | <i>HPGD</i> | |
|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D | vs. K | vs. D |
| K | 1 | / | 1 | / | 1 | / |
| D | 0,94 ± 0,26 | 1 | 0,92 ± 0,20 | 1 | 2,36 ± 1,26 | 1 |
| DS | 0,79 ± 0,09 | 0,88 ± 0,10 | 0,93 ± 0,32 | 1,03 ± 0,36 | 1,65 ± 0,28 | 0,82 ± 0,14 |
| DC | 4,78 ± 0,47 | 5,30 ± 0,52 | 0,54 ± 0,07 | 0,60 ± 0,07 | 1,79 ± 0,61 | 0,89 ± 0,30 |
| DU | 1,84 ± 0,38 | 2,04 ± 0,42 | 1,35 ± 0,28 | 1,50 ± 0,31 | 1,35 ± 0,28 | 0,67 ± 0,14 |



Grafikon 4.123. Promene ekspresije mRNA za *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *ZEB1*, *CDH1* i *HPGD* u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana decitabinom (D), decitabinom i silibininom (DS), decitabinom i CDCA (DC) i decitabinom i UDCA (DU), izraženo komparativnom Ct metodom, u odnosu na kontrolnu grupu ćelija.

4.6. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom

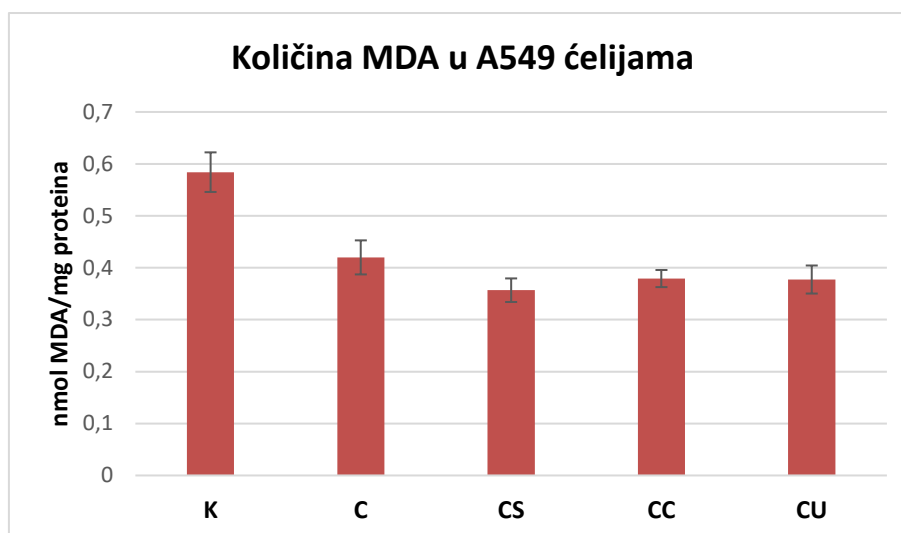
Za potrebe ovog dela eksperimenta, ćelije su, tokom 48 časova, tretirane celekoksibom u koncentraciji od 25 μ M, samim (grupa C) ili u kombinaciji sa silibininom koncentracije 25 μ M (grupa CS), u kombinaciji sa CDCA koncentracije 15 μ M (grupa CC) ili u kombinaciji sa UDCA koncentracije 25 μ M (grupa CU). Ove koncentracije su odabrane kao klinički dostižne i kojima je postignuta prihvatljiva IC₁₈₋₄₂ za sve tri ćelijske linije. U negativnu kontrolnu grupu dodat je samo DMSO rastvarač (grupa K). Određivana je koncentracija malondialdehida (MDA) kao pokazatelja lipidne peroksidacije.

4.6.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

Rezultati određivanja koncentracije MDA u A549 ćelijskoj liniji prikazani su u tabeli 4.124. i na grafikonu 4.124. U svim tretiranim grupama došlo je do smanjenja intenziteta lipidne peroksidacije koje je bilo visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa rezultatom dobijenim u netretiranoj, kontrolnoj grupi A549 ćelija. Dodatak silibinina, odnosno žučnih kiselina, celekoksibu smanjio je koncentraciju stvorenog MDA, u poređenju sa koncentracijom u grupi tretiranoj samo celekoksibom, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Tabela 4.124. Intenzitet lipidne peroksidacije u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Količina MDA (nmol MDA/mg proteina) | 0,58 ± 0,04 | 0,42 ± 0,03 | 0,36 ± 0,02 | 0,38 ± 0,02 | 0,37 ± 0,03 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,01 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,001 | vs. C, CS, CC, CU | vs. K | vs. K | vs. K | vs. K |



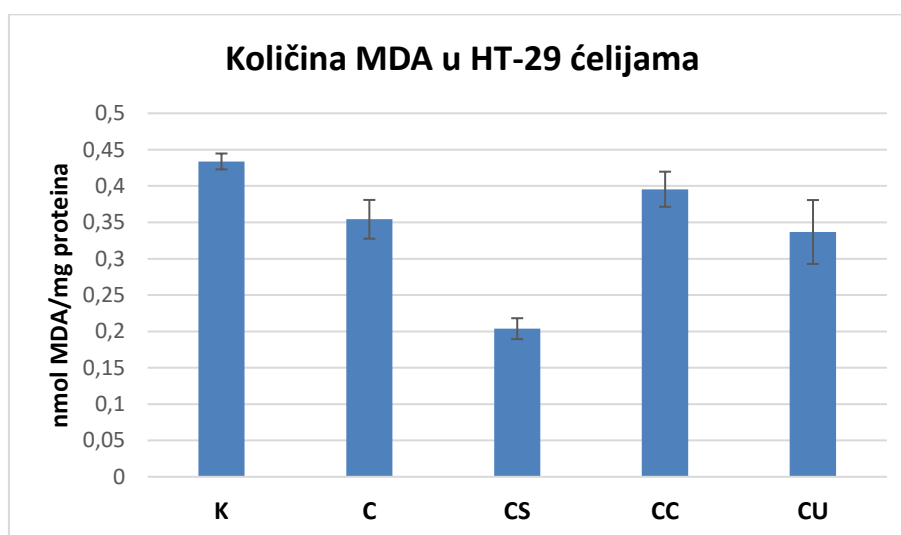
Grafikon 4.124. Intenzitet lipidne peroksidacije u A549 ćelijskoj liniji.

4.6.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

U tabeli 4.125. i na grafikonu 4.125. predstavljena je koncentracija stvorenog MDA u HT-29 ćelijama. Tretman ćelija celekoksibom izazvao je statistički značajno ($p=0,028$) smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije u poređenju sa rezultatom dobijenim u kontrolnoj grupi. Dodatak silibinina celekoksibu doprineo je daljem smanjenju intenziteta lipidne peroksidacije i to smanjenje je bilo visoko statistički značajno ($p<0,001$) u poređenju sa K i C grupom. Takođe, kotretman sa UDCA izazvao je dalje smanjenje koncentracije MDA ($p<0,01$ vs. K). CDCA je doprinela smanjenju koncentracije MDA u poređenju sa K grupom, a povećanje u poređenju sa C grupom, ali ti rezultati nisu bili statistički značajni.

Tabela 4.125. Intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Količina MDA (nmol MDA/mg proteina) | 0,43 ± 0,01 | 0,35 ± 0,03 | 0,20 ± 0,01 | 0,40 ± 0,02 | 0,34 ± 0,04 |
| p<0,05 | vs. C, CS, CU | vs. K, CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS | vs. K, CS |
| p<0,01 | vs. CS, CU | vs. CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS | vs. K, CS |
| p<0,001 | vs. CS | vs. CS | vs. K, C, CC, CU | vs. CS | vs. CS |



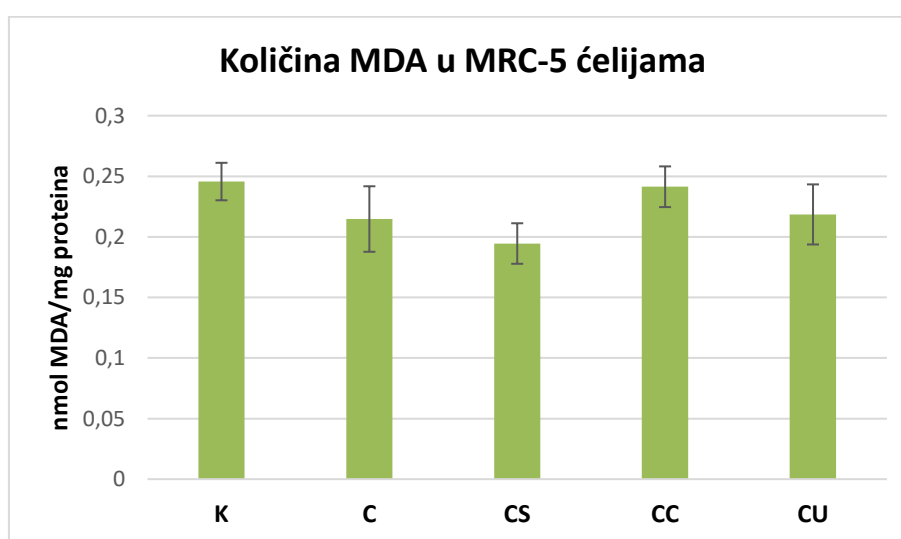
Grafikon 4.125. Intenzitet lipidne peroksidacije u HT-29 ćelijskoj liniji.

4.6.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na intenzitet lipidne peroksidacije u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

U MRC-5 ćelijskoj liniji, celekoksib, sâm i u kombinacijama sa silibininom i žučnim kiselinama, izazvao je smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno u poređenju sa intenzitetom lipidne peroksidacije u kontrolnoj grupi. U poređenju sa uticajem samog celekoksiba, silibinin je doprineo daljem smanjenju koncentracije MDA, a žučne kiseline povećanju intenziteta lipidne peroksidacije, bez statističke značajnosti. Rezultati su prikazani u tabeli 4.126. i na grafikonu 4.126.

Tabela 4.126. Intenzitet lipidne peroksidacije u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Količina MDA (nmol MDA/mg proteina) | 0,25 ± 0,02 | 0,21 ± 0,03 | 0,19 ± 0,02 | 0,24 ± 0,02 | 0,22 ± 0,02 |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |



Grafikon 4.126. Intenzitet lipidne peroksidacije u MRC-5 ćelijskoj liniji.

4.7. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskim linijama tretiranim celekoksibom

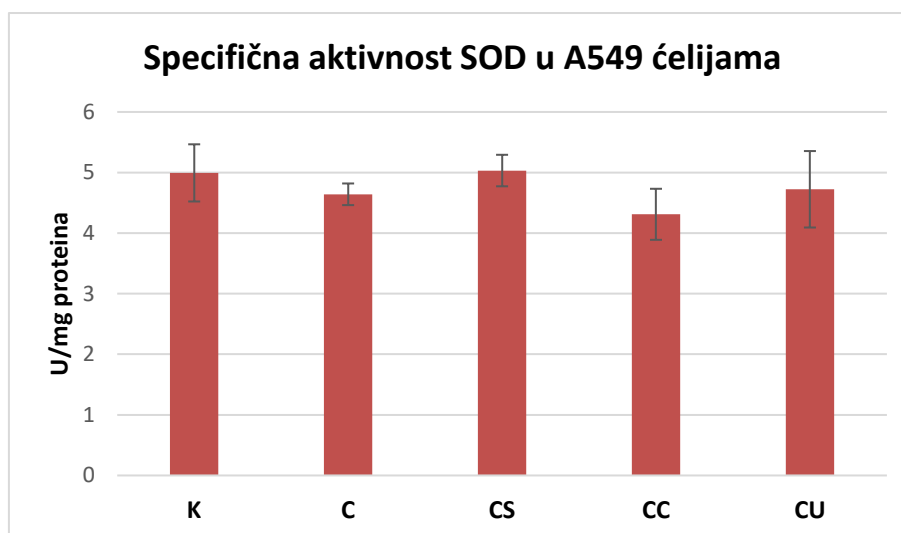
U cilju ispitivanja specifične aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-S-transferaze (GST) i glutation peroksidaze (GPx), ćelijske linije (A549, HT-29 i MRC-5) su, tokom 48 časova, tretirane celekoksibom u koncentraciji od 25 μ M, samim (grupa C) ili u kombinaciji sa silibininom koncentracije 25 μ M (grupa CS), u kombinaciji sa CDCA koncentracije 15 μ M (grupa CC) ili u kombinaciji sa UDCA koncentracije 25 μ M (grupa CU). Ovim koncentracijama je postignuta prihvatljiva IC₁₈₋₄₂ za sve tri ispitivane ćelijske linije. U negativnu kontrolnu grupu dodat je samo DMSO rastvarač (grupa K).

4.7.1. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u A549 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti SOD u A549 ćelijskoj liniji prikazani su u tabeli 4.127. i na grafikonu 4.127. U grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom došlo je do blagog smanjenja SOD aktivnosti. Dalji, neznatni, pad aktivnosti ovog enzima uočava se u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i CDCA. Naprotiv, u poređenju sa rezultatima dobijenim u celekoksib grupi, trend blagog povećanja SOD aktivnosti zapaža se u grupama kotretiranim silibininom, odnosno UDCA. Među eksperimentalnim grupama nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti SOD.

Tabela 4.127. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost SOD (U/mg proteina) | 4,99 ± 0,47 | 4,64 ± 0,18 | 5,03 ± 0,26 | 4,31 ± 0,42 | 4,72 ± 0,63 |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

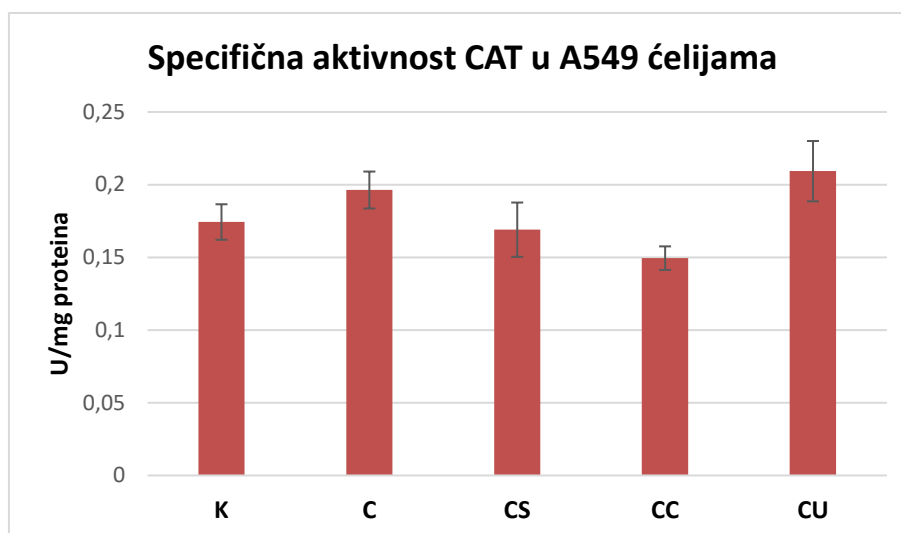


Grafikon 4.127. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.128. i na grafikonu 4.128. prikazana je specifična aktivnost CAT u A549 ćelijama. U svim eksperimentalnim grupama aktivnost CAT je bilo izuzetno niska. Jedino je u grupi ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i CDCA zabeležena statistički značajno ($p=0,024$) niža aktivnost ovog enzima u poređenju sa enzimskom aktivnosti u celekoksib grupi. Silibinin je, takođe, izazvao blago smanjenje aktivnosti CAT, ali bez statističke značajnosti u poređenju sa C grupom. UDCA je, naprotiv, dovela do neznatnog povećanja aktivnosti ovog enzima, takođe bez statističke značajnosti u odnosu na C grupu.

Tabela 4.128. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost CAT (U/mg proteina) | 0,17 ± 0,01 | 0,20 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | 0,15 ± 0,01 | 0,21 ± 0,02 |
| p<0,05 | / | vs. CC | / | vs. C, CU | vs. CC |
| p<0,01 | / | / | / | vs. CU | vs. CC |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

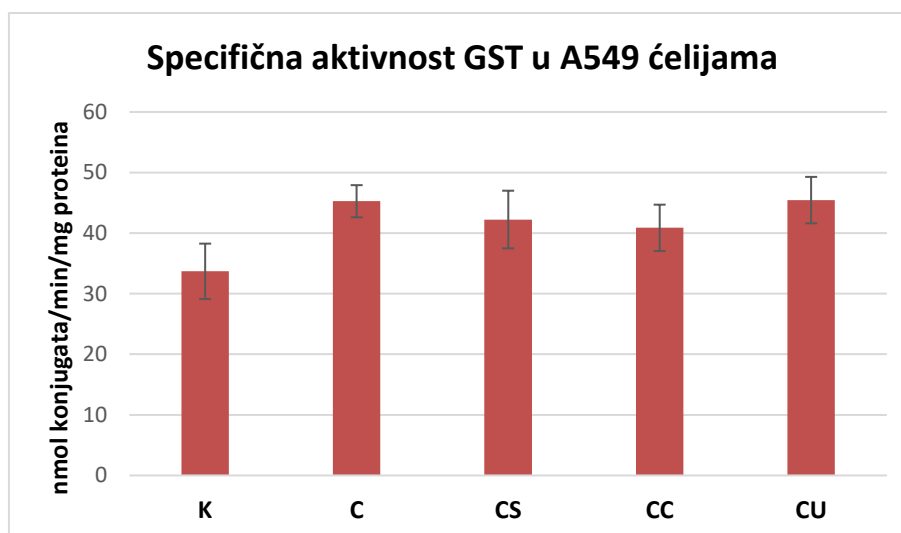


Grafikon 4.128. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u A549 ćelijskoj liniji.

U tabeli 4.129. i na grafikonu 4.129. prikazane su vrednosti specifične aktivnosti enzima GST u A549 ćelijskoj liniji. U svim tretiranim grupama ćelija uočava se povećana aktivnost ovog enzima, u poređenju sa aktivnosti u kontrolnoj grupi, pri čemu je to povećanje bilo statistički značajno u grupama C ($p=0,034$) i CU ($p=0,031$), u kojima je izmerena međusobno približno jednaka enzimaska aktivnost. Dodatak silibinina i CDCA celekoksibu (grupe CS i CC) izazvao je smanjenje aktivnosti GST, u odnosu na učinak samog celekoksiba, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Tabela 4.129. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Aktivnost GST (nmol konjugata/min/mg proteina) | 33,69 ± 4,58 | 45,26 ± 2,66 | 42,24 ± 4,76 | 40,87 ± 3,82 | 45,45 ± 3,83 |
| p<0,05 | vs. C, CU | vs. K | / | / | vs. K |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

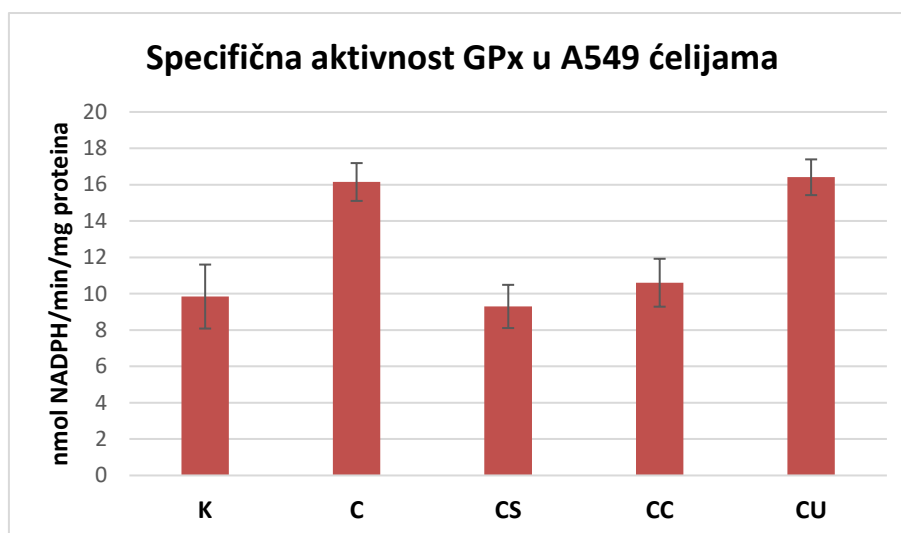


Grafikon 4.129. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u A549 ćelijskoj liniji.

Tretiranje A549 ćelija celekoksibom izazvalo je visoko statistički značajno ($p < 0,001$) povećanje specifične aktivnosti enzima GPx, u poređenju sa rezultatima dobijenim u kontrolnoj grupi. Približno iste vrednosti enzimske aktivnosti dobijene su u grupi ćelija koja je tretirana kombinacijom celekoksiba i UDCA ($p < 0,001$ vs. K). U grupi ćelija tretiranoj celekoksibom i silibininom izmerena je najniža GPx aktivnost ($p < 0,001$ vs. C). Ćelije koje su izlagane dejstvu celekoksiba i CDCA pokazale su višu aktivnost ovog enzima u poređenju sa netretiranim, kontrolnim ćelijama, ali nižu aktivnost u odnosu na ćelije tretirane samo celekoksibom i to smanjenje aktivnosti je bilo visoko statistički značajno ($p = 0,003$ vs. C). U tabeli 4.130. i na grafikonu 4.130. prikazani su rezultati ovog eksperimenta.

Tabela 4.130. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u A549 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Aktivnost GPx (nmol NADPH/min/mg proteina) | 9,84 ± 1,76 | 16,15 ± 1,04 | 9,30 ± 1,19 | 10,60 ± 1,32 | 16,41 ± 0,98 |
| $p < 0,05$ | vs. C, CU | vs. K, CS, CC | vs. C, CU | vs. C, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,01$ | vs. C, CU | vs. K, CS, CC | vs. C, CU | vs. C, CU | vs. K, CS, CC |
| $p < 0,001$ | vs. C, CU | vs. K, CS | vs. C, CU | / | vs. K, CS |



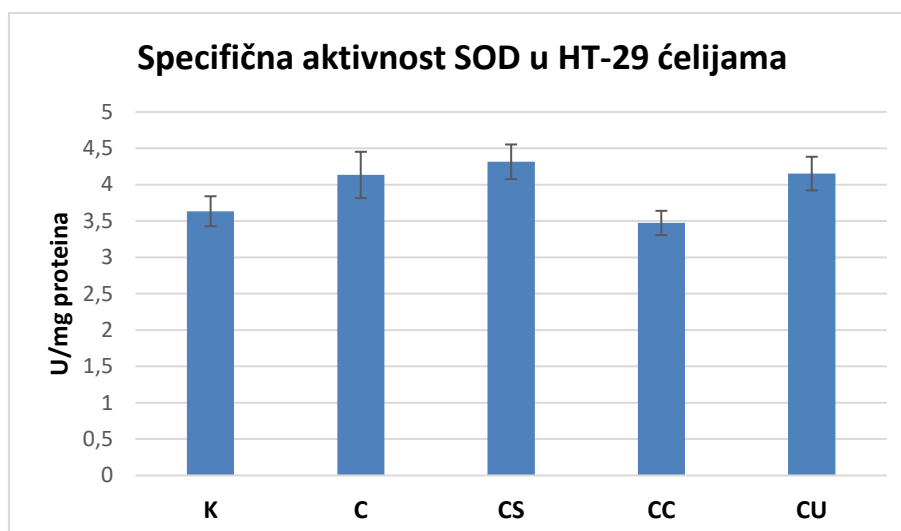
Grafikon 4.130. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u A549 ćelijskoj liniji.

4.7.2. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u HT-29 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

Rezultati ispitivanja specifične aktivnosti SOD u HT-29 ćelijskoj liniji predstavljeni su u tabeli 4.131. i na grafikonu 4.131. Celekoksib je povećao aktivnost SOD, ali to povećanje nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Veoma slični rezultati aktivnosti ovog enzima dobijeni su u CU grupi. Najveća aktivnost SOD dobijena je u grupi CS i taj rezultat je bio statistički značajan ($p=0,036$) u poređenju sa rezultatom u kontrolnoj grupi. Naprotiv, u CC grupi aktivnost SOD je bila najniža ($p=0,042$ vs. C).

Tabela 4.131. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost SOD (U/mg proteina) | 3,63 ± 0,21 | 4,13 ± 0,32 | 4,31 ± 0,24 | 3,47 ± 0,17 | 4,15 ± 0,23 |
| p<0,05 | vs. CS | vs. CC | vs. K, CC | vs. C, CS, CU | vs. CC |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

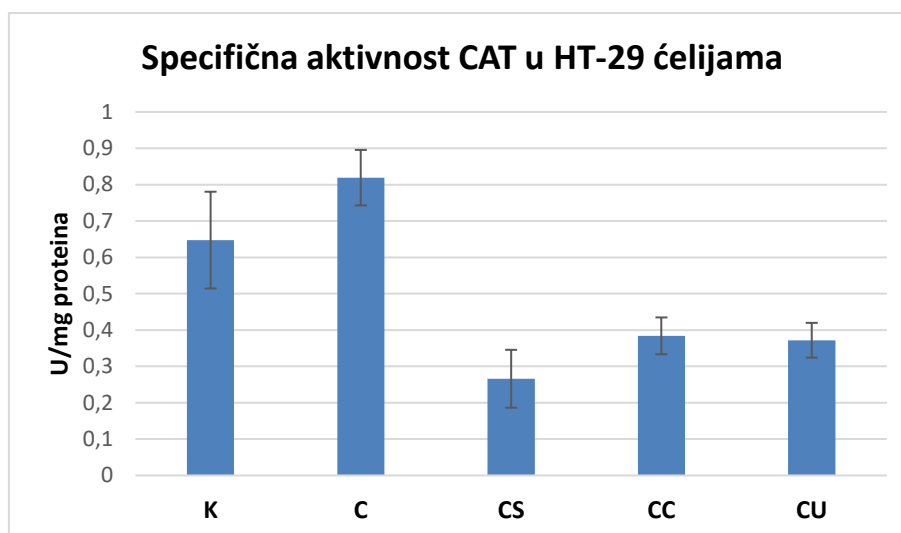


Grafikon 4.131. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u HT-29 ćelijskoj liniji.

Specifična aktivnost CAT u HT-29 ćelijama je bila generalno niska, kao što se i može videti u tabeli 4.132. i na grafikonu 4.132. Celekoksib je izazvao povećanje aktivnosti ovog enzima, ali to povećanje nije bilo statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Dodatak silibinina i žučnih kiselina celekoksibu izazvao je smanjenje aktivnosti CAT, visoko statistički značajno ($p < 0,001$) u poređenju sa dejstvom samog celekoksiba. Najniža aktivnost zabeležena je u CS grupi HT-29 ćelija.

Tabela 4.132. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost CAT (U/mg proteina) | 0,65 ± 0,13 | 0,82 ± 0,08 | 0,27 ± 0,08 | 0,38 ± 0,05 | 0,37 ± 0,05 |
| p<0,05 | vs. CS, CC, CU | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. K, C | vs. K, C |
| p<0,01 | vs. CS | vs. CS, CC, CU | vs. K, C | vs. C | vs. C |
| p<0,001 | / | vs. CS, CC, CU | vs. C | vs. C | vs. C |

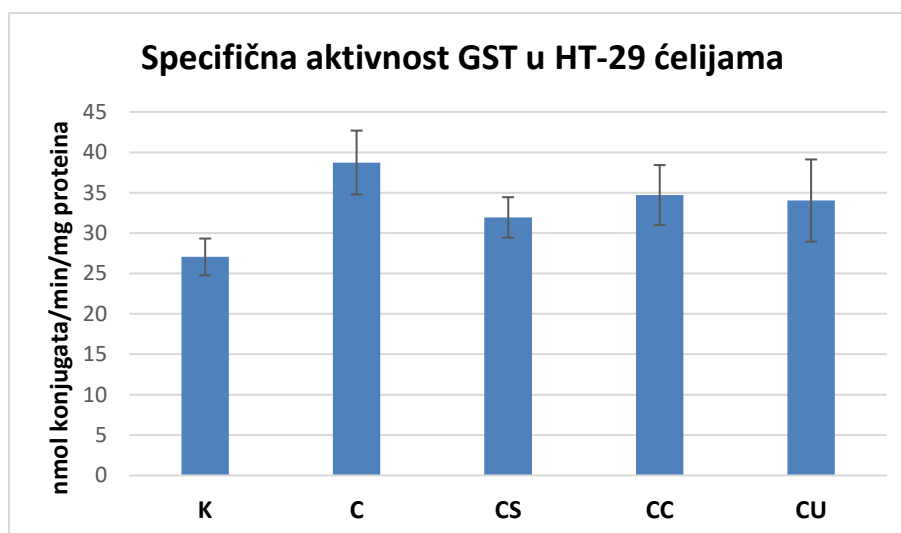


Grafikon 4.132. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u HT-29 ćelijskoj liniji.

Tabela 4.133. i grafikon 4.133. prikazuju rezultate specifične aktivnosti GST u HT-29 ćelijskoj liniji. U grupi ćelija tretiranoj samo celekoksibom došlo je do statistički značajnog ($p=0,019$) porasta aktivnosti GST u poređenju sa aktivnosti u kontrolnoj grupi ćelija. Kombinacije celekoksiba sa silibininom i žučnim kiselinama doprinele su smanjenju aktivnosti ovog enzima u odnosu na uticaj samog celekoksiba, ali ta aktivnost je i dalje bila povišena u poređenju sa kontrolnom grupom. U grupama CS, CC i CU nije utvrđena statistička značajnost.

Tabela 4.133. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Aktivnost GST (nmol konjugata/min/mg proteina) | 27,05 ± 2,28 | 38,73 ± 3,96 | 31,94 ± 2,51 | 34,71 ± 3,71 | 34,03 ± 5,09 |
| p<0,05 | vs. C | vs. K | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

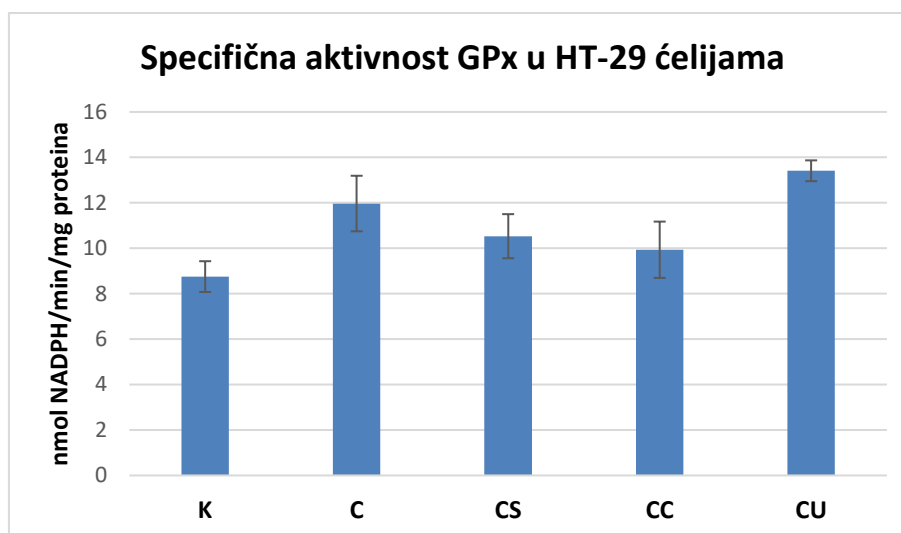


Grafikon 4.133. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u HT-29 ćelijskoj liniji.

Inkubacija HT-29 ćelija celekoksibom izazvala je statistički značajno ($p=0,015$) povećanje aktivnosti GPx u poređenju sa kontrolom. Trend daljeg rasta aktivnosti ovog enzima uočava se u grupi ćelija koja je tretirana kombinacijom celekoksiba i UDCA, i to visoko statistički značajno ($p=0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu. Silibinin i CDCA su smanjili aktivnost GPx u poređenju sa uticajem samog celekokoksiba, ali ta aktivnost je bila viša u odnosu na kontrolnu grupu, bez statističkih značajnosti. Rezultati su prikazani u tabeli 4.134. i na grafikonu 4.134.

Tabela 4.134. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u HT-29 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Aktivnost GPx (nmol NADPH/min/mg proteina) | 8,75 ± 0,68 | 11,97 ± 1,22 | 10,53 ± 0,97 | 9,93 ± 1,24 | 13,41 ± 0,46 |
| p<0,05 | vs. C, CU | vs. K | vs. CU | vs. CU | vs. K, CS, CC |
| p<0,01 | vs. CU | / | / | vs. CU | vs. K, CC |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |



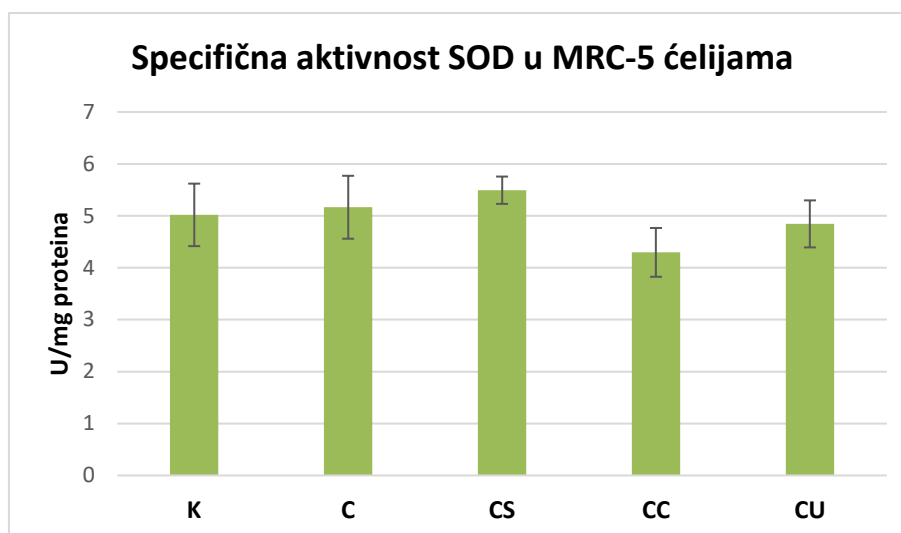
Grafikon 4.134. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u HT-29 ćelijskoj liniji.

4.7.3. Uticaj silibinina i žučnih kiselina na aktivnost antioksidativnih enzima u MRC-5 ćelijskoj liniji tretiranoj celekoksibom

U tabeli 4.135. i na grafikonu 4.135. prikazani su rezultati ispitivanja specifične aktivnosti SOD u MRC-5 ćelijskoj liniji. Između ispitivanih grupa nisu utvrđene statistički značajne razlike. Ipak, može se zapaziti da je tretman ćelija celekoksibom izazvao blago povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu, a da je dodatak silibinina doprineo daljem porastu aktivnosti ovog enzima. Naprotiv, u grupama ćelija tretiranim kombinacijom celekoksiba i žučnih kiselina došlo je do smanjenja aktivnosti SOD, u poređenju sa kontrolnom i celekoksib grupom.

Tabela 4.135. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost SOD (U/mg proteina) | 5,02 ± 0,60 | 5,16 ± 0,61 | 5,49 ± 0,26 | 4,30 ± 0,47 | 4,84 ± 0,45 |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

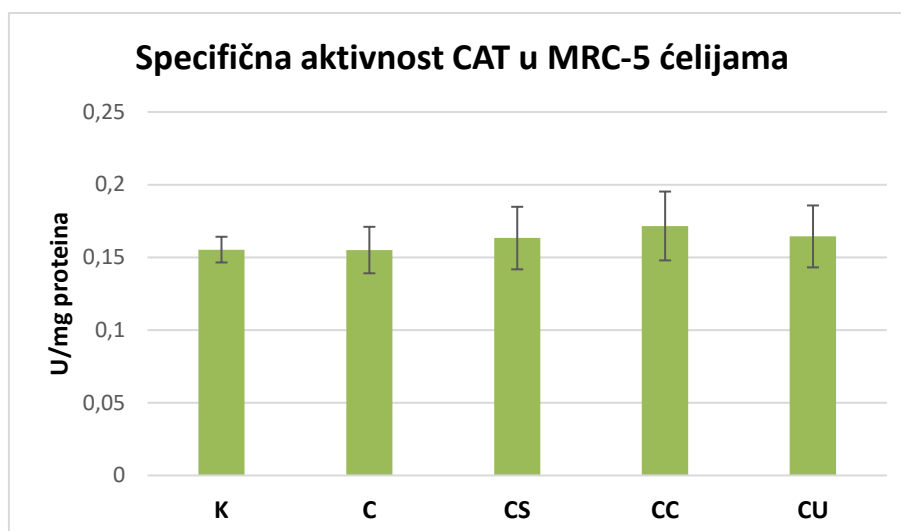


Grafikon 4.135. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Kao i za prethodno opisane A549 i HT-29 ćelijske kulture, u MRC-5 ćelijama izmerena je niska aktivnost CAT, što se i može videti u rezultatima prikazanim u tabeli 4.136. i na grafikonu 4.136. Među eksperimentalnim grupama ćelija nisu utvrđene statistički značajne razlike. Celekoksib nije promenio aktivnost katalaze u poređenju sa rezultatom dobijenim u kontrolnoj grupi. Neznatno povećane aktivnosti opažaju se u grupama tretiranim kombinacijom celekoksiba i silibinina, odnosno celekoksiba i žučnih kiselina.

Tabela 4.136. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktivnost CAT (U/mg proteina) | 0,15 ± 0,60 | 0,15 ± 0,61 | 0,16 ± 0,26 | 0,17 ± 0,47 | 0,16 ± 0,45 |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

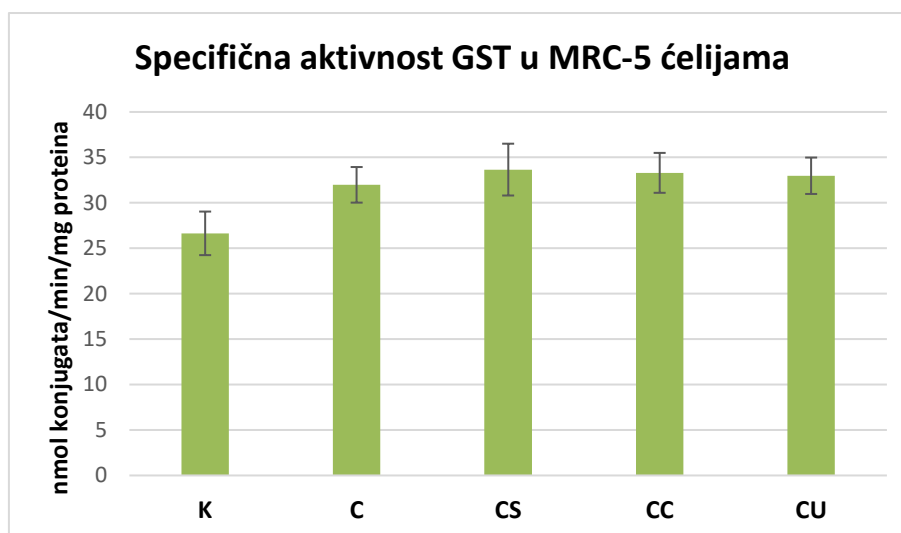


Grafikon 4.136. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Kao što se može videti u tabeli 4.137. i na grafikonu 4.137, tretman MRC-5 ćelija celekoksibom izazvao je povećanje aktivnosti GST, bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Kotretman sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama, doprineo je daljem porastu aktivnosti ovog enzima i taj porast je bio statistički značajan ($p < 0,05$) u poređenju sa rezultatom dobijenim u kontrolnoj grupi ćelija.

Tabela 4.137. Specifična aktivnost glutathion-S-transferaze (GST) u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Aktivnost GST (nmol konjugata/min/mg proteina) | 26,64 ± 2,40 | 31,98 ± 1,96 | 33,66 ± 2,85 | 33,30 ± 0,47 | 32,98 ± 0,45 |
| p<0,05 | vs. CS, CC, CU | / | vs. K | vs. K | vs. K |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |

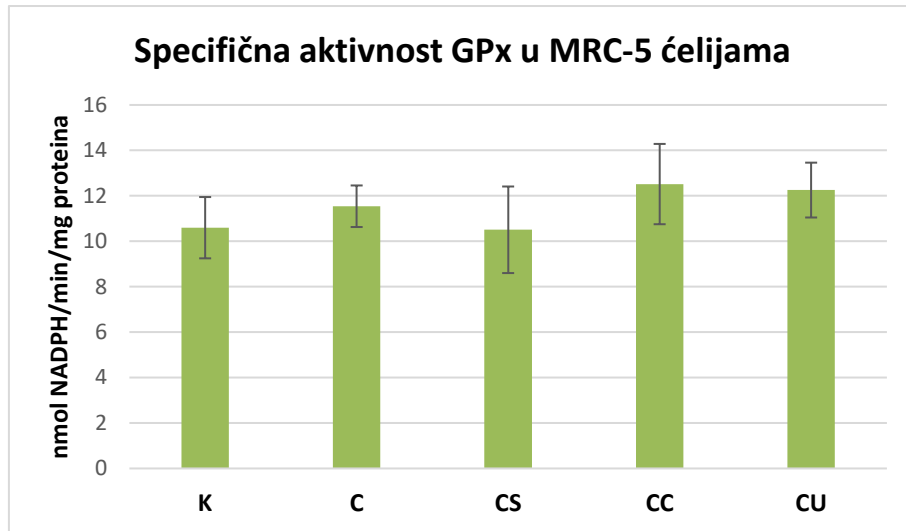


Grafikon 4.137. Specifična aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u MRC-5 ćelijskoj liniji.

Inkubacija MRC-5 ćelija celekoksibom dovela je do porasta aktivnosti GPx, a kotretman sa žučnim kiselinama izazvao je dalji rast aktivnosti GPx. Naprotiv, kotretman sa silibininom doprineo je smanjenju aktivnosti ovog enzima, u odnosu na kontrolnu i celekoksib grupu. U svim grupama nije utvrđena statistička značajnost. Rezultati ovog dela istraživanja prikazani su u tabeli 4.138. i na grafikonu 4.138.

Tabela 4.138. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u MRC-5 ćelijskoj liniji nakon tretmana celekoksibom (C), celekoksibom i silibininom (CS), celekoksibom i CDCA (CC) i celekoksibom i UDCA (CU).

| Grupa | K | C | CS | CC | CU |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Aktivnost GPx (nmol NADPH/min/mg proteina) | 10,60 ± 1,35 | 11,54 ± 0,91 | 10,51 ± 1,91 | 12,52 ± 1,77 | 12,25 ± 1,21 |
| p<0,05 | / | / | / | / | / |
| p<0,01 | / | / | / | / | / |
| p<0,001 | / | / | / | / | / |



Grafikon 4.138. Specifična aktivnost glutation peroksidaze (GPx) u MRC-5 ćelijskoj liniji.

5. DISKUSIJA

Karcinom pluća i kolorektalni karcinom predstavljaju heterogene bolesti multifaktorijalne etiologije i kompleksne patogeneze. Uprkos velikom napretku savremene onkologije u dijagnostici i lečenju bolesnika obolelih od karcinoma pluća, odnosno kolona, epidemiološki podaci projekta GLOBOCAN 2020 ukazuju da ovi karcinomi pripadaju grupi najčešće dijagnostikovanih malignih bolesti u ljudskoj populaciji [1].

Nova saznanja u proučavanju biohemije i molekularne genetike malignih ćelija doprinela su razvoju novih terapijskih strategija u lečenju karcinoma pluća i kolona. Inovativne metode i tehnologije izučavanja genoma kancerskih ćelija identifikovale su nove biomarkere u tumorskom tkivu i krvi obolelih, a koji obuhvataju širok spektar molekula, uključujući gene, cirkulišuću tumorsku DNA, različite RNA, transkripcione faktore, receptore, ligande, hormone i enzime. Otkrića ovih biomarkera i njihovih uloga u kancerogenezi unela su veliku revoluciju u područje onkologije s obzirom na činjenicu da se tumorski biomarkeri danas koriste u prognozi toka bolesti (prognostički značaj) i odabiru adekvatnog terapijskog modaliteta za pacijenta u čijem tumoru je opisano prisustvo ili odsustvo određenog biomarkera (prediktivni značaj). Danas je u lečenju karcinoma pluća i debelog creva prisutna strategija tzv. precizne medicine i individualizovanog terapijskog pristupa, u kojem je lečenje prilagođeno individualnim kliničkim karakteristikama svakog pacijenta i bazira se na ispitanom molekularnom profilu njegovog tumora. U lečenju karcinoma pluća i kolona dostupni su hirurški pristupi, radioterapija (zračenje), hemioterapija (citostatici), ali i novi lekovi iz grupe imunoterapije i ciljane, *target* terapije, koja deluje na određenu metu, odnosno na tumorski biomarker detektovan u tumoru pacijenta, a koji je značajan u procesu rasta, deobe i preživljavanja malignih ćelija [273].

Međutim, i pored velikih saznanja i doprinosa nauke u dijagnostici, klasifikaciji i lečenju obolelih, karcinom pluća je i dalje vodeći uzrok smrtnosti usled maligniteta, dok se kolorektalni karcinom nalazi na drugom mestu po mortalitetu [1]. Karcinomi pluća i debelog creva najčešće se otkriju kada je bolest u uznapređovalom i metastatskom stadijumu, kada su šanse za dugotrajno preživljavanje i izlečenje svedene na minimum. Takođe, veliki problem u lečenju predstavlja pojava recidiva bolesti, uz pojavu novih metastaza i rezistencije na lekove [274].

Ovi podaci ukazuju na veliku potrebu za daljim proučavanjem biohemijskih procesa u malignim tumorima i otkrićima novih tumorskih biomarkera i terapijskih opcija koje bi se koristile u prevenciji i lečenju, kako pojedinačno, u monoterapiji, tako i u kombinovanim pristupima sa radio, hemio, ciljanom i imunoterapijom.

Saznanja o povezanosti procesa inflamacije i kancerogeneze postoje više od jednog veka. Smatra se da hronična inflamacija doprinosi razvoju više od 15% maligniteta u svetu. Zapaljenski signali različite etiologije na ekstrinzičan način učestvuju u svim fazama kancerogeneze u plućima i kolonu. Osim toga, značajan je i intrinzičan mehanizam zapaljenja u kojem maligne ćelije produkuju medijatore zapaljenja i stvaraju inflamatorno okruženje što doprinosi progresiji neoplastičnog procesa. Oba mehanizma rezultuju u aktivaciji faktora transkripcije, poput STAT3, NF- κ B i HIF-1, u zapaljenskim ćelijama, ćelijama strome i malignim ćelijama, a koji aktiviraju transkripciju gena zaduženih za proliferaciju i preživljavanje malignih ćelija. Proinflamatorni enzimi iz porodice ciklooksigenaza (COX) predstavljaju krucijalan činilac povezanosti hronične inflamacije i patogeneze malignih tumora [275, 276].

Ciklooksigenazni put započinje oslobađanjem arahidonske kiseline iz fosfolipida ćelijskih membrana pod dejstvom enzima PLA2 i COX-zavisnim metabolizmom arahidonske kiseline, pri čemu nastaje PGH2. Ovaj prostaglandin podleže dejstvu različitih tkivno-specifičnih izomeraza i sintaza koje produkuju bioaktivne lipidne komponente tzv. prostanoide, kojima pripadaju TxA2 i različiti prostaglandini. Dokazano je postojanje dva COX izoenzima, COX-1 i COX-2. Ekspresija COX-1 ostaje konstantna u većini ćelija tokom fizioloških i patoloških procesa. Konstitutivna enzimska COX-1 aktivnost je značajna za održavanje integriteta gastrične mukoze, bubrežne i trombocitne funkcije. COX-2 predstavlja inducibilan izoenzim čija je ekspresija u većini ćelija i tkiva veoma niska, ali se povećava u stanjima akutne i hronične inflamacije. Sinteza i aktivnost izoenzima COX-2 biva podstaknuta različitim faktorima rasta, citokinima, hemokinima i toksinima, ali i drugim fizičkim, hemijskim i biološkim faktorima. Povećana ekspresija COX-2 i njegovog najvažnijeg produkta PGE2 detektovana je u premalignim lezijama i malignim tumorima različitih lokalizacija. Osim enzima COX, tri različite sintaze su zadužene za sintezu PGE2: cPGES, mPGES-1 i mPGES-2. U procesima inflamacije i kancerogeneze najveću katalitičku aktivnost pokazuje mPGES-1, čija je povećana ekspresija zapažena u tumorima pluća, kolona, dojke, prostate, želuca, pankreasa, cerviksa, jajnika, glave i vrata. Svoje uloge PGE2 ispoljava aktivacijom membranskih, G-protein-povezanih receptora, EP1-4, koji aktiviraju različite

nishodne ćelijske signalne puteve. Opisana je povezanost EP receptora sa ključnim događajima u kancerogenezi, poput aktivacije aberantne DNA metilacije, proliferacije, angiogeneze, invazije, migracije, inhibicije apoptoze i supresije antitumorskog imunološkog odgovora. Posle vezivanja za receptore, PGE₂ podleže razgradnji, koja je katalizovana enzimom 15-PGDH, do neaktivnog metabolita 15-keto-PGE₂. Inhibicija COX-2-PGE₂-EP signalnih kaskada postiže se primenom lekova iz grupe neselektivnih i selektivnih NSAID. Osim u terapiji bola i zapaljenskih procesa, ovi lekovi su zadobili pažnju i savremene onkologije [275].

U radu Wang i sar. pokazano je da PGE₂ pokreće aktivaciju receptora EGFR i EGFR-zavisnih signalnih puteva. Utvrđeno je da PGE₂ može da aktivira PI3K/AKT i RAS/RAF/MEK/ERK signalne puteve koji su značajni za ćelijsku proliferaciju, invaziju i metastaziranje. Takođe, otkriveno je da PGE₂ poseduje svojstvo aktivacije APC/β-katenin/TCF signalnog puta i različitih nuklearnih receptora koji deluju kao faktori transkripcije, što stvara uslove za preživljavanje i proliferaciju tumorskih ćelija, kao i za rezistenciju na apoptozu. Poznato je da su ovi signalni putevi veoma značajni u razvoju i progresiji karcinoma pluća i kolona. Konstitutivna aktivacija ovih mehanizama može, pozitivnom povratnom spregom, da aktivira transkripciju *PTGS2* gena i time da amplifikuje količine COX-2 izoenzima [277].

Polazeći od poražavajućih epidemioloških činjenica, uz podatke da su adenokarcinomi pluća i kolona najzastupljeniji subtipovi ovih neoplazmi, kao i da su komponente navedenih ćelijskih signalnih puteva u fokusu onkološke dijagnostike i terapije, cilj ove doktorske disertacije bio je da se upravo na *in vitro* modelima adenokarcinoma pluća i kolona ispita značaj izoenzima COX-2 i njegove inhibicije u putevima koji su važni za inicijaciju, promociju i progresiju malignog procesa. Cilj je bio da se definiše uloga enzima COX-2 u procesima proliferacije, apoptoze, ćelijskog transporta, invazije, metastaziranja i antioksidativne odbrane.

Hemoprevencija predstavlja važnu oblast za zdravu populaciju u kojoj su definisani elementi pozitivne porodične anamneze za nastanak nekog karcinoma i za osobe koje su u visokorizičnoj grupi za nastanak malignog oboljenja, iz bilo kog razloga. Neselektivni i selektivni COX inhibitori jesu agensi koji imaju potencijal u prevenciji, ali i u terapiji malignih bolesti. Kroz veliki broj populacionih i kliničkih studija ustanovljeno je da redovna i višegodišnja upotreba (duže od 10 do 15 godina) različitih lekova iz grupe NSAID smanjuje relativni rizik od razvoja kolorektalnog karcinoma za 40-50%. Upotreba NSAID dovodi i do

regresije premalignih adenoma u osoba sa sindromom FAP [277]. Nekoliko studija pokazalo je da višegodišnja primena niskih doza aspirina, neselektivnog COX inhibitora, smanjuje rizik od pojave polipa u debelom crevu, ali i incidenciju i mortalitet od kolorektalnog karcinoma [278]. Studija Jiang Y i sar. prikazala je protektivno dejstvo aspirina u riziku za nastanak karcinoma pluća, pogotovo skvamoznog karcinoma pluća kod muškaraca [279]. Međutim, dugotrajna upotreba neselektivnih NSAIL u hemoprevenciji prilično je kontroverzna jer je povezana sa neželjenim reakcijama, prvenstveno sa pojavom gastroduodenalnih ulkusa i hemoragijskih događaja u gastrointestinalnom traktu, a koji su povezani sa inhibicijom izoenzima COX-1 u želudačnoj mukozi i trombocitima [277].

S obzirom na to da je povećana produkcija prostaglandina uzrokovana povećanom ekspresijom COX-2 izoenzima, koji ima ulogu u razvoju mnogih tumora epitelnog porekla, u koje spadaju tumori pluća i debelog creva, cilj našeg rada bio je ispitivanje antitumorskog dejstva celekoksiba, selektivnog COX-2 inhibitora iz grupe koksiba, koji je praktično jedini dostupan selektivni COX-2 inhibitor na tržištu.

U decembru 1999. godine FDA je odobrila upotrebu celekoksiba u prevenciji nastanka kolorektalnih polipa kod pacijenata sa sindromom FAP. Uprkos znatno ređim hemoragijskim reakcijama, prolongirana upotreba većih doza koksiba povezana je sa povećanom incidencijom neželjenih trombotičkih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja. Mehanizmi ovih neželjenih reakcija zasnivaju se na inhibiciji vaskularnog COX-2 i sledstvene proizvodnje kardioprotektivnog, vazodilatatornog i vazoprotektivnog prostaciklina PGI₂, što stvara poremećaj ravnoteže PGI₂-TxA₂, u korist povećanja TxA₂ [277].

Zbog navedenih činjenica, cilj *in vitro* studije ove doktorske disertacije bio je da se na modelima malignih ćelija upotrebe koncentracije celekoksiba manje od dobijenih IC₅₀ vrednosti, kao i da se ispituju antikancerska dejstva celekoksiba, primenjenog pojedinačno ili u kombinacijama sa prirodnim supstancama, silibininom i žučnim kiselinama, sa svrhom utvrđivanja potencijalnih sinergističkih antikancerskih efekata.

Silibinin (silibin), koji, u hemijskom pogledu, predstavlja smešu dva diastereoizomera, silibinina A i silibinina B u ekvimolarnim odnosima, najvažniji je bioaktivni flavonolignan izolovan iz semena biljke *Silybum marianum*. Silibinin je komponenta standardizovanog suvog ekstrakta silimarina koji, osim silibinina, sadrži i druge flavonolignane, flavonoide i masne kiseline. Vekovima su poznata hepatoprotektivna dejstva silimarina, uz dobru podnošljivost njegovih suplemenata kod ljudi [280]. Brojne *in vitro* i *in vivo* prekliničke studije opisale su različite mehanizme antiinflamatornih, antioksidativnih i antitumorskih

dejtava silibinina, što je i probudilo naše interesovanje da ispitamo dejstva ove fitohemikalije na malignim ćelijama pluća i kolona.

Osim silibinina, u ovom istraživanju ispitivali smo i žučne kiseline koje predstavljaju važne i nedovoljno istražene signalne molekule. Odabrali smo jednu hidrofobnu, primarnu žučnu kiselinu – henodeoksiholnu kiselinu (CDCA, 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -holanska kiselina), koja se sintetiše u jetri čoveka, i jednu hidrofilnu, sekundarnu žučnu kiselinu – ursodeoksiholnu kiselinu (UDCA, 3 α ,7 β -dihidroksi-5 β -holanska kiselina), koja nastaje u crevima. UDCA čini manje od 4% ukupnih žučnih kiselina žuči i fecesa. Ova žučna kiselina ima važnu primenu u terapiji primarne bilijarne ciroze i holelitijaze, odnosno u rastvaranju manjih holesterolskih žučnih kamenaca, ali dokazano je i da poboljšava funkciju jetre u holestatskoj bolesti. Upotreba oralnih preparata UDCA pokazala je relativno dobru podnošljivost kod ljudi. Po hemijskoj strukturi, UDCA je zapravo 7 β -epimer CDCA. Epimerizacija se dešava zahvaljujući enzimima crevne mikrobiote kroz dve sekvencijalne reakcije: prvo dolazi do oksidacije 7 α -hidroksilne grupe u strukturi CDCA, uz katalizu enzimom 7 α -hidroksisteroid dehidrogenaza, a zatim dolazi do stereospecifične redukcije nastalog 7-keto derivata, uz pomoć enzima 7 β -hidroksisteroid dehidrogenaze, čime nastaje 7 β -OH epimer CDCA, odnosno UDCA [281]. Uprkos samo jednoj razlici u bočnoj grupi steroidnog prstena, naučna istraživanja su pokazala različite, vrlo često suprotne mehanizme dejstava CDCA i UDCA, što nas je navelo da ispitamo antiinflamatorna i antineoplastična svojstva ovih žučnih kiselina, u kombinaciji sa celekoksibom.

U cilju odabira adekvatne koncentracije celekoksiba i ispitivanja uticaja COX-2 inhibicije, u istraživanju ove doktorske disertacije, sve tri ćelijske linije (A549, HT-29 i MRC-5) tretirane su rastućim koncentracijama celekoksiba (10-200 μ M), tokom 48 časova. Utvrđen je koncentracijski-zavisani porast inhibicije ćelijske vijabilnosti, što ukazuje na značaj COX-2 izoenzima u preživljavanju i proliferaciji ćelija. Dobijene vrednosti koncentracija ovog selektivnog COX-2 inhibitora koje izazivaju 50% inhibicije ćelijskog rasta (IC₅₀) iznosile su 95,24 μ M (A549), 74,97 μ M (HT-29) i 105,19 μ M (MRC-5). Uočavamo da su maligne ćelije bile osetljivije na COX-2 inhibiciju, u odnosu na normalne ćelije, što upućuje na posebnu važnost COX-2 izoenzima u proliferaciji malignih ćelija. Za dalji tretman ćelija, u cilju ispitivanja genske ekspresije i biohemijskih pokazatelja oksidativnog stresa, odabrana je koncentracija celekoksiba 25 μ M, kojom se postiže manja IC od IC₅₀ vrednosti, tačnije IC₃₃ (A549), IC₃₄ (HT-29) i IC₂₂ (MRC-5). Analizirajući dostupnu naučnu literaturu, primećuje se da su za različite ćelijske linije dobijene različite IC₅₀ vrednosti, što se opisuje ćelijski-

zavisnom osetljivošću na dejstvo ovog selektivnog COX-2 inhibitora. U jednoj *in vitro* studiji predstavljene su IC₅₀ vrednosti za celekoksib, kojim su različite humane maligne ćelijske linije tretirane tokom 24 časova: 37,2 µM ćelije karcinoma cerviksa uterusa (HeLa), 15,4 µM ćelije karcinoma kolona (HCT116), 17,8 µM ćelije hepatocelularnog karcinoma (HepG2), 15,4 µM ćelije karcinoma dojke (MCF-7) i 11,7 µM za ćelije glioblastoma (U251) [282]. Rezultati eksperimenata pokazuju da se čak i za iste ćelijske linije dobijaju različiti rezultati IC₅₀ vrednosti. Ovu činjenicu možemo objasniti drugačijim uslovima održavanja i tretmana ćelija, hemijskim oblikom ispitivane supstance, vremenom inkubacije i drugačijim metodama ispitivanja citotoksičnosti. Tako je, na primer, u jednoj studiji na A549 ćelijama IC₅₀ vrednost za 48-časovni tretman celekoksibom iznosila 163,4 µM [283], dok je u drugoj studiji tretman A549 ćelija celekoksibom trajao 4 časa i izračunata IC₅₀ vrednost iznosila je 25,5 µM [284]. U jednoj kliničkoj studiji proučavanja farmakokinetike celekoksiba pokazano je da je oralna primena kapsula celekoksiba u pojedinačnoj dozi od 400 mg nakon 2,5 časa dostigla maksimalne koncentracije u krvnoj plazmi, koje su iznosile 611 ng/mL, što je analogno koncentraciji 1602 µmol/L [285]. Dakle, primenjena koncentracija u našoj *in vitro* studiji je bila oko 60 puta manja, što je u potpunosti klinički prihvatljivo.

Tretman ćelija rastućim koncentracijama silibinina (10-500 µM), u trajanju od 48 časova, pokazao je koncentracijski-zavisan porast citotoksičnosti. Izračunate IC₅₀ vrednosti iznosile su 210,12 µM (A549), 274,01 µM (HT-29) i 432,65 µM (MRC-5). U studiji Akhtar R i sar. ispitivana je citotoksičnost silibinina prema HT-29 ćelijskoj liniji, u vremenskom periodu trajanja tretmana 24, 48 i 72 časova. Rezultati su pokazali da je sa porastom vremena inkubacije opadala IC₅₀ vrednost, tako da je u 48-časovnom tretmanu ćelija MTT test pokazao IC₅₀ vrednost 110 µg/mL, što je, prema molekularnoj masi silibinina, analogno koncentraciji od 228,01 µM [286]. Naše vrednosti dobijene za maligne ćelije približne su rezultatima prikazanim u navedenoj studiji. Kao i u slučaju celekoksiba, IC₅₀ vrednosti variraju u odnosu na tip ćelijske kulture, vreme inkubacije i metodologiju rada. U našoj studiji primećeno je da su maligne ćelije pokazale veću osetljivost na dejstvo silibinina u poređenju sa normalnim ćelijama. Ovakvi rezultati su usklađeni sa rezultatima jednog *in vitro* istraživanja u kojem su maligne ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7) bile osetljivije na dejstvo silibinina (IC₅₀ 15,77 µg/mL) u poređenju sa normalnim humanim endotelnim ćelijama (HUVEC), kod kojih je IC₅₀ iznosila 387,42 µg/mL [287]. Za dalji tretman A549, HT-29 i MRC-5 ćelijskih kultura u našoj studiji odabrana je koncentracija silibinina 25 µM, u kombinaciji sa celekoksibom, jer se u kombinovanom tretmanu te koncentracije postigla prihvatljiva citotoksičnost za sve tri

ćelijske linije: IC₃₂ (A549), IC₃₇ (HT-29) i IC₄₂ (MRC-5). U pilot studiji Hoh C i sar. [288], koja je uključila 12 pacijenata obolelih od kolorektalnog karcinoma, ispitivana je koncentracija silibinina u krvi i tkivu debelog creva, nakon oralne upotrebe preparata silibinina, u dozi od 360, 720 ili 1440 mg silibinina dnevno (podeljeno u tri jednake doze), tokom 7 dana pre uzorkovanja krvi i biopsije tkiva. Primena silibinina nije prouzrokovala neželjene reakcije kod pacijenata. Metoda tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC) potvrdila je da je pri dozi od 720 mg koncentracija silibinina u tkivu kolorektalnog karcinoma iznosila u proseku 121 µM, što je više od koncentracije primenjene u našoj *in vitro* studiji. Ovi podaci opravdavaju upotrebu silibinina u koncentraciji od 25 µM, koja se smatra potpuno farmakološki dostižnom i klinički relevantnom.

Naše ispitivanje dejstva žučnih kiselina (u rasponu koncentracija 10-500 µM), na vijabilnost sve tri ćelijske linije, pokazalo je da CDCA ispoljava izraženije citotoksično dejstvo, u poređenju sa UDCA. IC₅₀ vrednosti za CDCA iznosile su 152,51 µM (A549), 96,29 µM (HT-29) i 117,13 µM (MRC-5), dok su za UDCA iznosile 260,01 µM (A549), 292,08 µM (HT-29) i 523,92 µM (MRC-5). Iz ovih rezultata, možemo da zaključimo da su maligne ćelije osetljivije na dejstvo UDCA, u odnosu na normalne ćelije, a osetljivost normalnih ćelija prema CDCA nalazi se između osetljivosti malignih ćelija pluća i kolona. U našim rezultatima, vidimo i da je CDCA pokazala veću citotoksičnost, u poređenju sa UDCA, što je bilo i očekivano ako uzmemo u obzir saznanja da je hidrofobnost glavna determinanta koja određuje citotoksičnu aktivnost žučnih kiselina. Hidrofobnost žučnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa, njihovog strukturnog položaja i orijentacije, ali i od prisustva amidne funkcionalne grupe na poziciji C-24, i, u tom smislu, CDCA je hidrofobnija u odnosu na UDCA. Poznato je da je retencija hidrofobnih žučnih kiselina, poput CDCA i DCA, u patološkim stanjima, kao što je holestaza, odgovorna za oštećenje hepatocita i njihovu apoptozu, odnosno nekrozu. Hidrofobne žučne kiseline pokazuju deterdžentska i solubilizaciona svojstva prema lipidnim komponentama ćelijskih membrana, što predstavlja mehanizam kojim hidrofobne žučne kiseline remete membransku strukturu i funkciju. Sa porastom koncentracije i hidrofobnosti žučnih kiselina raste i njihova sposobnost vezivanja za ćelijske membrane. Kada se dostigne određeni prag, odnosno kritična micelarna koncentracija, koja zavisi od vrste žučne kiseline i građe membrane, žučne kiseline počinju da formiraju otvore na ćelijskim membranama, što dereguliše strukturalni i funkcionalni integritet membrana. Takođe, vezuju se za različite komponente membrana, aktivirajući signalne mehanizme. Aktiviraju protein kinazu C (PKC) i oslobađanje arahidonske kiseline iz

ćelijskih membrana, što dalje aktivira enzime ciklooksigenaze i lipooksigenaze, vodeći do stvaranja proinflatornih medijatora i ROS. Akumulacija proinflatornih citokina i ROS uzrokuje izmenu strukture ćelijskih proteina, lipida i nukleinskih kiselina, uz inhibiciju funkcije enzima za DNA popravku. Ovi mehanizmi dovode do ćelijske smrti, pri čemu se smatra da su niže koncentracije hidrofobnih žučnih kiselina odgovorne za apoptozu, a više koncentracije za nekrozu. Naprotiv, UDCA, kao hidrofilna kiselina, ispoljava citoprotektivno dejstvo na ćelijskom i molekularnom nivou, mehanizmima koji još uvek nisu utvrđeni. Smatra se da se UDCA direktno inkorporira u nepolaran domen fosfolipidnog dvosloja ćelijskih membrana, čime ga stabilizuje [289, 290]. Za kotretman sa celekoksibom i dalje eksperimente u našem istraživanju odabrali smo koncentraciju CDCA 15 μM kojom se, u kombinaciji sa celekoksibom, postiže prihvatljiva citotoksičnost u rasponu od 18 do 30% za sve tri ćelijske linije. Takođe, odabrana je koncentracija UDCA koja je iznosila 25 μM , koja je u kotretmanu sa celekoksibom proizvela optimalnu citotoksičnost od 22 do 30% u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama. Ove koncentracije su klinički opravdane i dostižne jer serumski nivoi žučnih kiselina u ljudskom organizmu variraju u rasponu od 0,3 μM do 3 mM [291, 292], što je znatno više od primenjenih koncentracija u našem istraživanju. Preporučena doza UDCA u terapiji primarne bilijarne ciroze je 15-20 mg/kg telesne mase, što, preračunato preko relativne molekulske mase, iznosi 38-51 μM . Dakle, koncentracija UDCA primenjena u našoj studiji (25 μM) odgovara približno 49-66% standardne terapijske doze, što potvrđuje kliničku prihvatljivost koncentracije koju smo upotrebili za tretman ćelija [293].

U tumorima pluća i kolona, osim povećanih nivoa COX-2 i PGE₂, primećena je smanjena ekspresija ili potpuni gubitak enzimske aktivnosti 15-PGDH, što rezultuje u agresivnijem fenotipu malignih ćelija, zbog čega se 15-PGDH naziva tumor-supresorom. Veliko, neistraženo polje jeste način modulacije enzima mPGES-1 i 15-PGDH, kao i receptora EP od strane COX-2 inhibitora [277].

U našoj studiji, fokusirali smo se na ispitivanje modulacije ekspresije enzima koji su uključeni u metabolizam PGE₂. Takođe, ispitivali smo ekspresiju NF- κ B transkripcionog faktora, čija je uloga u inflamaciji potvrđena.

Naime, NF- κ B predstavlja proinflatorni faktor transkripcije čija je konstitutivna aktivacija detektovana u mnogim tumorima, uključujući tumore pluća i kolona. NF- κ B čini grupu različitih homo i heterodimera izgrađenih iz pet subjedinica: p50, p52, p65 (RelA), RelB i c-Rel, pri čemu su najzastupljeniji dimeri izgrađeni iz p50 i p65 jedinica. Aktivnost NF- κ B je veoma slaba u citosolu ćelija s obzirom na njegovu sekvencijaciju, odnosno formiran

kompleks NF- κ B i inhibitornih proteina iz grupe I κ B. Inflamatorni signali, poput dejstva citokina TNF- α , aktiviraju enzime I κ B kinaze (IKK) koji fosforilišu I κ B proteine, čime ih usmeravaju na degradaciju u sistemu ubikvitin-proteazom, samim tim oslobađajući i aktivirajući NF- κ B. Translokacija NF- κ B u ćelijsko jedro izaziva aktivaciju transkripcije i translacije širokog spektra gena sa proinflamatornom, antiapoptotskom, proliferativnom, invazivnom i angiogenetskom ulogom. Konstitutivna NF- κ B aktivacija značajan je činilac u hemorezistenciji malignih ćelija [294].

U studiji Friedrich M i sar. ispitivan je uticaj kalcitriola, aktivnog oblika vitamina D, i celekoksiba na rast humanih ćelijskih kultura karcinoma dojke, a ispitivana je i količina mRNA i proteina za COX-2. Nakon 72 časova, celekoksib, primenjen u koncentraciji od 10 μ M, inhibisao je rast MCF-7 (67,8%) i MDA-MB-231 (88,4%) ćelija. Kotretman ćelija kombinacijom 10 μ M celekoksiba i 10 μ M kalcitriola pokazao je izraženiji citotoksičan učinak. Takođe, ova kombinacija, tokom trajanja eksperimenta u periodu od 24 časova, delovala je sinergistički u pogledu smanjenja količine mRNA i proteina za COX-2, u poređenju sa uticajem samo celekoksiba, što je ispitano qRT-PCR i Western blot metodama [295]. U jednoj studiji, dve humane ćelijske linije adenokarcinoma pluća, A549 (*wild type EGFR*) i HCC827 (*delE746-A750 EGFR*), tokom 48 časova tretirane su gefitinibom koncentracije 40 μ M, celekoksibom 80 μ M, kao i njihovom kombinacijom – gefitinib 40 μ M i celekoksib 80 μ M. Western blot metoda je pokazala da u obe ćelijske linije gefitinib nije pokazao uticaj na nivo COX-2 proteina, za razliku od celekoksiba koji je smanjio nivo COX-2. Kombinovana primena ova dva agensa delovala je sinergistički i izazvala je statistički značajno smanjenje količine COX-2 u obe ćelijske linije karcinoma pluća, s tim da je to dejstvo bilo izraženije u HCC827 ćelijama [283]. U našoj studiji, u želji da iz šireg ugla ispitamo COX-2-zavisne mehanizme, ispitivali smo dejstvo celekoksiba koncentracije 25 μ M na količine mRNA za COX-2 (*PTGS2*), mPGES-1 (*PTGES*), 15-PGDH (*HPGD*) i NF- κ B (*NF κ B*) u humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća (A549), kolona (HT-29) i fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5). U ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona qRT-PCR analiza je pokazala da je celekoksib smanjio ekspresiju gena koji su uključeni u sintezu COX-2 i PGE2 (*PTGS2* i *PTGES*), a povećao je ekspresiju gena zaduženog za katabolizam PGE2 (*HPGD*), pokazujući značajno dejstvo na inhibiciju COX-2/PGE2-zavisnih inflamatornih događaja u malignim ćelijama. Za razliku od malignih ćelija, normalne MRC-5 ćelije su na tretman celekoksibom odgovorile povećanjem ekspresije *PTGS2* gena, ali uz izraženu

smanjenu ekspresiju *PTGES* gena i povećanu ekspresiju *HPGD* gena, čime je pokazano da celekoksib pokazuje i COX-2-nezavisna dejstva.

U ćelijama MDA-MB-231 celekoksib (50 μM) je izazvao smanjenu bazalnu i doksorubicin (1 μM)-indukovanu ekspresiju NF- κB , kao i nuklearnu translokaciju NF- κB p65 subjedinice, dok indometacin, lek iz grupe neselektivnih NSAID, primenjen u istoj koncentraciji, nije ispoljio taj efekat. U našoj studiji, u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona, ali i u normalnim ćelijama, celekoksib, primenjen u dva puta nižoj koncentraciji (25 μM) smanjio je količine mRNA za *NF κB* .

Studija Cho K i sar. ispitivala je uticaj silibinina koncentracije 100 μM na ekspresiju gena za COX-2 i iNOS u MKN-1 humanim ćelijama karcinoma želuca, koje su bile inficirane bakterijom *Helicobacter pylori*. Ova bakterija je prepoznata kao značajan uzročnik zapaljenja želucačne sluznice, odnosno gastritisa i karcinoma želuca, i zapravo je na primeru karcinoma želuca dobro istražena povezanost hronične inflamacije i kancerogeneze. Silibinin je smanjio ekspresiju gena koji kodiraju sintezu dva esencijalna transkripciona faktora, a to su NF- κB i STAT3, kao i njihovu DNA-vezujuću sposobnost i transkripcionu aktivnost. Smatra se da se ekspresija ovih transkripcionih faktora povećava pod dejstvom proinflamatornih signala, kao što su toksini bakterije *H. pylori* i oslobođene ROS. STAT3 se aktivira fosforilacijom tirozina u položaju 705 i to pod uticajem različitih proinflamatornih stimulusa i receptora tirozin kinaza. Kao i u slučaju NF- κB , nuklearna akumulacija fosforilisanog STAT3 aktivira transkripciju brojnih gena koji su zaduženi za inflamatorni odgovor i proliferaciju ćelija. NF- κB i STAT3 se vezuju za promotor *PTGS2* gena i time povećavaju sintezu COX-2 enzima. Takođe, regulišu transkripciju gena za iNOS. Smanjujući ekspresiju NF- κB i STAT3, silibinin je ujedno smanjio količine enzima COX-2 i iNOS, što je bilo potvrđeno qRT-PCR, Western blot i imunocitohemijskom analizom. Ova studija je potvrdila navedene antiinflamatorne efekte silibinina i na *in vivo* modelu *H. pylori*-izazvanog karcinoma želuca u C57BL/6 miševima, u primenjenoj dozi silibinina od 20 do 200 mg/kg. Inhibišući enzime COX-2 i iNOS, koji produkuju proinflamatorne prostaglandine i ROS, silibinin je suprimirao razvoj zapaljenske reakcije [296]. Studija Raina K i sar. istraživala je uticaj silibinina na aktivnost NF- κB u različitim humanim ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma (SW480, HT-29 i LoVo). Silibinin u koncentraciji 50-200 μM je izazvao inhibiciju TNF- α -posredovane aktivacije NF- κB na koncentracijski-zavisan način. Inhibirao je fosforilaciju i degradaciju I κB proteina, a povećao je i njihov nivo, čime je uticao na sekvestraciju NF- κB u citosolu, što je potvrđeno i smanjenjem nuklearnih nivoa p50 i p65 NF- κB subjedinica. Western blot analiza

je pokazala da silibinin koncentracije 100 μM , koji je dodat 2 časa pre izlaganja ćelija kolorektalnog karcinoma dejstvu TNF- α , utiče i na smanjenje nivoa NF- κB nishodnih meta, a to su Bcl-2, COX-2, iNOS, MMP-9 i VEGF proteini. Ovi rezultati su potvrđeni i na *in vivo* modelu [294]. U okviru ispitivanja ove disertacije korišćene su četiri puta niže koncentracije silibinina (25 μM), ali u kombinaciji sa celekoksibom. U odnosu na netretirane maligne ćelije, dodatak silibinina celekoksibu je zadržao smanjenu ekspresiju *PTGS2* i *PTGES* gena i povećanu ekspresiju *HPGD* gena. Značajno sinergističko dejstvo silibinina sa celekoksibom uočava se u pogledu povećanja ekspresije *HPGD* gena u A549 ćelijama, neznatno i u HT-29 ćelijama, i smanjenja ekspresije *PTGS2* gena u HT-29 ćelijama. Međutim, u grupi MRC-5 ćelija tretiranoj kombinacijom celekoksiba i silibinina uočeno je smanjenje ekspresije oba proinflamatorna gena (*PTGS2* i *PTGES*), odnosno niži nivo mRNA za oba gena, u poređenju sa kontrolnom i celekoksib grupom. U ovim ćelijama, u odnosu na netretiranu grupu, zajednički tretman celekoksibom i silibininom povećao je količinu mRNA za tumor-supresor 15-PGDH, ali nije zabeležen njihov sinergizam. Dodatak silibinina celekoksibu u sve tri ćelijske linije izazvao je dalje smanjenje ekspresije proinflamatornog *NF κ B* transkripcionog faktora, što pokazuje njihovo sinergističko dejstvo.

Navedeni rezultati ukazuju na antiinflamatorno dejstvo celekoksiba u malignim ćelijama, uz veliki potencijal sinergističkih antiinflamatornih efekata kotretmana celekoksiba i silibinina.

Studija Tucker ON i sar. ispitivala je uticaj nekonjugovanih i konjugovanih žučnih kiselina na nivo mRNA i proteina za COX-2 u humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pankreasa. Uz pomoć qRT-PCR i Western blot analize uočeno je da hidrofobne žučne kiseline, CDCA i DCA, u opsegu koncentracija 12,5-100 μM , tokom trajanja tretmana 3-12 časova, u malignim ćelijama povećavaju količine izoenzima COX-2. Taj porast je bio koncentracijski i vremenski-zavisan. Konjugovane hidrofobne žučne kiseline su, takođe, izazvale povećanu COX-2 ekspresiju, ali pri većim koncentracijama (200-1200 μM). Enzimski imunoesej je pokazao da, u odnosu na netretirane ćelije, tretman nekonjugovanim hidrofobnim žučnim kiselinama sedam puta povećava količinu sintetisanog PGE₂, dok je taj porast iznosio četiri puta kada su u pitanju konjugovane žučne kiseline. Ni u jednoj eksperimentalnoj grupi nije zabeležen porast izoenzima COX-1 [297]. *In vitro* i *ex vivo* studija je pokazala da nekonjugovane žučne kiseline CDCA i DCA dovode do oslobađanja ROS, aktivacije PI3K/AKT i ERK1/2 signalnih puteva i sledstvene aktivacije transkripcionih faktora CREB i AP-1. Fosforilacija CREB i aktivacija AP-1 izazivaju njihovu translokaciju u

ćelijsko jedro i aktivaciju transkripcije *PTGS2* gena. Utvrđeno je, dakle, da ove žučne kiseline povećavaju COX-2 ekspresiju i dovode do stvaranja Barrettovog ezofagusa, odnosno premalignih promena jednjaka, kao i razvoja adenokarcinoma jednjaka. Ovaj proinflamatorni učinak žučnih kiselina može predstavljati jedno od objašnjenja za mehanizam nastanka Barrettove metaplazije kod gastroezofagusne refluksne bolesti (GERB), ali i za nastanak karcinoma jednjaka [298]. Nasuprot opisanim dejstvima hidrofobnih žučnih kiselina, istraživanja su pokazala da hidrofilna UDCA pokazuje antiinflamatorna, antioksidativna i citoprotektivna dejstva, čiji mehanizmi nisu dovoljno istraženi. Pretretman humanih ćelija adenokarcinoma jednjaka (SKGT-4 i OE33) sa UDCA inhibisao je DCA-indukovanu aktivaciju i nuklearnu translokaciju NF- κ B i AP-1, kao i njihovu DNA-vezujuću aktivnost. Takođe, UDCA je izazvala inhibiciju DCA-izazvane povećane COX-2 ekspresije [299].

Osim potvrđenih uloga hidrofobnih žučnih kiselina u razvoju gastrointestinalnih tumora, u fokus istraživanja dospeli su i molekularni mehanizmi kojima mikroaspiracija žučnih kiselina u stanjima GERB može izazvati zapaljenske i neoplastične promene epitela bronhijalnog stabla [300]. Utvrđeno je da pacijenti sa hroničnim plućnim bolestima imaju povećane koncentracije žučnih kiselina u bronhoalveolarnom lavatu. Osim toga, i povećan nivo žučnih kiselina u serumu, s obzirom na njihovu ulogu signalnih molekula, može učestvovati u patogenezi respiratornih bolesti. MTT i CellTiter-Blue eseji pokazali su smanjenje vijabilnosti humane ćelijske linije bronhijalnih epitelnih ćelija (BEAS-2B) tokom 48-časovnog tretmana rastućim koncentracijama CDCA (30-100 μ M). U ovom eksperimentu došlo je do porasta koncentracije proinflamatornih citokina IL-6, IL-8 i faktora stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF) u supernatantu ćelijske kulture, na koncentracijski-zavisani način. Smatra se da se ovakav učinak CDCA bazira na deterdžentskom svojstvu ove hidrofobne žučne kiseline koja izaziva lizu ćelijskih membrana pneumocita tipa II, što oslobađa veliku količinu fosfolipida i može indukovati ciklooksigenazni put i oslobađanje proinflamatornih citokina. Upravo se na dejstvima žučnih kiselina može objasniti tzv. koncept integrisane gastrointestinalne i plućne fiziološke paradigme hroničnih plućnih bolesti, u kojem se navodi da GERB i aspiracija želudačnog sadržaja mogu biti etiološki uzročnici hroničnih bolesti pluća [301].

Iz navedenih mehanizama povezanosti žučnih kiselina i COX-2 signalnih puteva, potekla je ideja našeg istraživanja da ispitamo uticaj žučnih kiselina na dejstvo selektivnog COX-2 inhibitora u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona, ali i u normalnim ćelijama. U našoj studiji korišćene su niže koncentracije žučnih kiselina i to u kombinaciji sa

celekoksibom. CDCA je primenjena u koncentraciji od 15 μM , dok je koncentracija UDCA iznosila 25 μM . Naši rezultati ukazuju da je CDCA ispoljila značajan proinflamatorni efekat u A549 i MRC-5 ćelijama u smislu povećanja ekspresije *PTGS2* i *PTGES*, i smanjenja ekspresije *HPGD* gena, dok je u HT-29 taj proinflamatorni efekat bio uočen, ali manje izražen, osim u uticaju na ekspresiju *HPGD* gena, čiju je ekspresiju CDCA neznatno povećala. Za razliku od CDCA, UDCA je ispoljila potpuno antiinflamatorno dejstvo u A549 i MRC-5 ćelijama. U HT-29 ćelijama UDCA je pokazala sinergističko dejstvo sa celekoksibom na smanjenje ekspresije *PTGS2* gena i povećanje ekspresije *HPGD* gena. Dobijeni rezultati su usklađeni sa literaturnim podacima, u kojima je prikazano da CDCA deluje proinflamatorno na normalne i maligne ćelije, dok UDCA pokazuje suprotna dejstva na metabolizam COX-2 i PGE2.

Tokom 12 dana trajanja *in vivo* studije, koja je uključila 48 pacova, koji su predstavljali model trinitrobenzen sulfonska kiselina-indukovanog kolitisa, životinje su dobijale *per os* pojedinačno silibinin ili UDCA, ili, pak, njihovu kombinaciju. Makroskopski i mikroskopski pregled sluznice creva pokazali su regresiju inflamatornih promena, a došlo je i do smanjenja nivoa proinflamatornih proteina NF- κ B, IL-1 β i TNF- α , što ukazuje na antiinflamatorna dejstva silibinina i UDCA na ovom životinjskom modelu. Najizraženiji antiinflamatorni efekat uočen je u grupi životinja koje su dobijale kombinovani tretman [302]. U BV-2, mišijoj ćelijskoj liniji mikroglije, dodatak UDCA u koncentraciji 50-300 $\mu\text{g/mL}$ (analogno 127-764 μM), u tretmanu koji je trajao 24 časova, Western blot analiza citosolne i nuklearne frakcije otkrila je smanjen nivo fosforilisanog oblika I κ B α i povećanu količinu I κ B α , kao i povećan nivo sekvstriranog i neaktivnog citosolnog NF- κ B, uz smanjenu nuklearnu translokaciju p50 i p65 subjedinic [303]. Tretiranje humane ćelijske linije adenokarcinoma jednjaka (SEG-1) sa CDCA u koncentraciji od 100 μM , u trajanju od 18 časova, izazvalo je porast ekspresije NF- κ B i glikoproteina mucina 2 (MUC2), koji doprinose karcinogenezi jednjaka [304]. U našem istraživanju, u humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća i plućnih fibroblasta obe žučne kiseline su antagonizovale dejstvo celekoksiba i izazvale porast ekspresije *NF κ B*, pri čemu je taj efekat bio izraženiji pri dodatku CDCA. U A549 ćelijama taj porast je bio viši u odnosu na gensku ekspresiju u kontrolnoj i celekoksib grupi, dok se u MRC-5 ćelijama ipak zadržao niži nivo *NF κ B* ekspresije u odnosu na kontrolu. Za razliku od pomenutih ćelijskih linija, u ćelijama adenokarcinoma kolona obe žučne kiseline su ispoljile sinergističko dejstvo sa celekoksibom u pogledu smanjenja ekspresije *NF κ B*. Nije bilo značajne razlike u dejstvu CDCA i UDCA. Ovi rezultati nisu

usaglašeni sa prethodno opisanim našim rezultatima uticaja CDCA i UDCA na COX-2 signalni put. Naši rezultati ukazuju na verovatnoću da je plućno tkivo osetljivije na dejstvo žučnih kiselina na ekspresiju faktora transkripcije *NFκB*. Može se izneti pretpostavka da je za ispitivanje razlika u dejstvima ovih žučnih kiselina potrebno primeniti njihove više koncentracije, kao što je i urađeno u većini publikovanih pretkliničkih studija.

Aktivacija receptora različitih faktora rasta, koji poseduju aktivnost protein tirozin kinaza i koji imaju ulogu u razvoju tumora pluća i debelog creva, rezultuje u autofosforilaciji intracelularnih tirozinskih rezidua, što povlači brojne signalne molekule, kao što je PI3K, koji se svojim SH2 domenom u adaptorskoj subjedinici vezuje sa fosfotirozinske ostatke. Ovo PI3K vezivanje vodi ka alosternoj aktivaciji njegove katalitičke subjedinice i fosforilacije supstrata PIP₂, što produkuje PIP₃. Formirani PIP₃ pokazuje aktivnost drugog glasnika i aktivira različite signalne molekule koji u svojoj strukturi sadrže plekstrin homologne domene, poput kinaze AKT (PKB). Konstitutivna aktivacija PI3K/AKT signalne kaskade odgovorna je za progresiju ćelijskog ciklusa u malignim ćelijama, inhibiciju apoptoze posredstvom inaktivacije proapoptotskih molekula, kao što su Bad i prokaspaza-9, ali i za aktivaciju drugih signalnih puteva, poput RAF/MAPK i mTOR-zavisnih puteva ćelijskog preživljavanja i proliferacije. AKT/PKB aktivira i pomenute IKK, koji, kao što je navedeno, predstavljaju pozitivne NF-κB regulatore. Može se zaključiti da PI3K/AKT signalni put predstavlja atraktivnu terapijsku metu u lečenju karcinoma pluća i kolona. Polazeći od činjenice da je tumor-supresor protein PTEN glavni negativni PI3K/AKT regulator i da je PTEN ekspresija i funkcija izgubljena u velikom procentu malignih tumora koji pokazuju COX-2 pozitivnost [305], cilj istraživanja, koje smo sproveli, bio je usmeren i ka ispitivanju dejstva celekoksiba na ekspresiju *PTEN* gena. Do sada, nisu publikovani rezultati kombinovanja celekoksiba i silibinina, odnosno celekoksiba i žučnih kiselina u oblasti proučavanja ovog tumor-supresora.

Jedna studija je ispitivala uticaj celekoksiba na PTEN ekspresiju u humanim ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma (Huh-7 i SMMC-7721). Western blot analiza proteinske ekspresije utvrdila je da je celekoksib, primenjen u koncentracijama 10, 25 i 50 μM, tokom 24 časova, izazvao povećanje količine PTEN proteina na koncentracijski-zavisan način, što je bilo povezano i sa smanjenjem proliferativnog kapaciteta ćelija hepatocelularnog karcinoma [306]. Istraživanje je pokazalo da celekoksib povećava PTEN ekspresiju posredstvom aktivacije PPARγ receptora [307]. Rezultati koje smo dobili i prikazali jesu usklađeni sa rezultatima pomenutih studija. qRT-PCR analiza pokazala je da je celekoksib, primenjen u

koncentraciji od 25 μM , ali u produženom dejstvu (48 časova) povećao količine mRNA za *PTEN* u sve tri ćelijske linije. Taj uticaj je bio najizraženiji u HT-29 ćelijskoj liniji, u kojoj je detektovana dva puta veća *PTEN* ekspresija u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovi rezultati nam takođe ukazuju da COX-2 ima uticaj na gubitak *PTEN* ekspresije, koji predstavlja rani događaj u kancerogenezi. Povećanjem *PTEN* nivoa uspostavlja se njegova uloga fosfataze koja konvertuje PIP_3 u inaktivan PIP_2 , čime se sprečava aktivacija PI3K/AKT i drugih signalnih puteva u malignim ćelijama.

Rezultati našeg ispitivanja pokazuju da je pretretman malignih i normalnih ćelija silibininom koncentracije 25 μM doprineo daljem povećanju *PTEN* nivoa, odnosno uočava se sinergistički efekat sa celekoksibom. Ako se taj učinak uporedi sa *PTEN* ekspresijom određenoj u ćelijama koje su tretirane samo celekoksibom, najizraženiji sinergistički efekat postignut je u A549 ćelijama. Naime, u tim ćelijama kombinacija celekoksiba i silibinina izazvala je četiri i po puta veću *PTEN* ekspresiju u poređenju sa celekoksib tretmanom. U studiji Jahanafrooz Z i sar. qRT-PCR analiza je utvrdila da silibinin poseduje sposobnost povećanja *PTEN* ekspresije u MCF-7 ćelijama, ali primenjen pojedinačno u koncentraciji od 150 μM tokom 48 časova [308], što potvrđuje i naša zapažanja o potencijalnom pozitivnom dejstvu ovog flavonolignana na *PTEN*.

Do sada, nije objavljeno mnogo naučnih radova na temu uticaja žučnih kiselina na *PTEN* ekspresiju. Na HCT116 ćelijskoj liniji ispitivan je uticaj CA, CDCA, LCA i DCA, primenjenih u koncentraciji od 20 μM , tokom 24 časova, na ekspresiju miR-21 koja ima ulogu negativnog *PTEN* regulatora. U poređenju sa kontrolnim grupama ćelija, primarne žučne kiseline CA i CDCA nisu ispoljile uticaj na ekspresiju ove mikroRNA, za razliku od sekundarnih žučnih kiselina LCA i DCA, pri čemu je uticaj LCA bio najizraženiji u pogledu povećanja nivoa miR-21. U ovom istraživanju nastavljeno je ispitivanje mehanizama uticaja LCA na proliferaciju HCT116 ćelijske kulture. Ustanovljeno je da je povećanje količine miR-21 bilo povezano sa povećanjem aktivnosti transkripcionog faktora AP-1 i ERK1/2 signalnog puta, a rezultovalo je smanjenjem *PTEN* ekspresije, povećanjem aktivnosti PI3K/AKT signalne kaskade i proliferacione sposobnosti malignih ćelija [309]. U našem istraživanju, pretretman A549 ćelija sa CDCA (15 μM) delovao je sinergistički sa celekoksibom i dva puta je povećao *PTEN* ekspresiju, u poređenju sa dejstvom samo celekoksiba. Naprotiv, u HT-29 i MRC-5 ćelijama CDCA je antagonizovala učinak celekoksiba i smanjila količinu mRNA za *PTEN* gen.

In vitro i *in vivo* studija Huang R i sar. izučavala je uticaj UDCA na miR-21/PTEN/AKT/mTOR put u vaskularnim glatkim mišićnim ćelijama. Studija je pokazala da je UDCA inhibirala hiperplaziju vaskularne intime, kao i migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija, što sugerise da je UDCA obećavajući kandidat u terapiji ateroskleroze. U *in vitro* delu ovog istraživanja upotrebene su rastuće koncentracije UDCA (10, 50 i 200 μM) i to u vidu pretretmana koji je trajao 6 časova, nakon čega je usledio 24-časovni tretman ćelija trombocitnim faktorom rasta (PDGF), kao najvažnijim endogenim aktivatorom modulacije i proliferacije glatke muskulature krvnih sudova. Tretman ćelija sa UDCA pokazao je koncentracijski-zavisani porast PTEN ekspresije, potvrđen Western blot metodom [310]. Iako ova studija nije izvedena na modelu malignih ćelija, ukazala nam je da UDCA poseduje potencijal reaktivacije PTEN tumor-supresora. Naši rezultati potvrdili su ova očekivanja jer je pretretman malignih i normalnih ćelija sa UDCA (25 μM) povećao nivo mRNA za *PTEN*. Ako uporedimo sa celekoksibom grupom, ovo sinergističko dejstvo bilo je najizraženije u A549 ćelijama.

Sumiranjem rezultata uticaja žučnih kiselina na *PTEN* ekspresiju, možemo da zaključimo da su u ćelijama adenokarcinoma pluća obe žučne kiseline (CDCA i UDCA) ispoljile sinergističko dejstvo sa celekoksibom. U ćelijama adenokarcinoma kolona i plućnih fibroblasta, takav učinak je pokazala samo UDCA, što nas navodi na potrebe daljeg izučavanja dejstva žučnih kiselina na količine i aktivnost PTEN tumor-supresora, koja mogu biti tkivno-specifična.

Apoptoza predstavlja evolutivno konzerviran mehanizam programirane ćelijske smrti čija se ključna uloga ogleda u održavanju tkivne homeostaze. Takođe, mehanizam dejstva hemioterapijskih agenasa i jonizujućeg zračenja bazira se, između ostalog, i na indukciji apoptoze u malignim ćelijama. Apoptotski ćelijski signalni putevi sprovode se kroz dva glavna apoptotska puta, spoljašnji i unutrašnji put. Jedan od mehanizama odsustva antineoplastičnih dejstava terapijskih strategija jeste zapravo izmena apoptotskih signalnih puteva i pojava rezistencije tumorskih ćelija na apoptozu. S obzirom na činjenicu da su studije potvrdile da je proapoptotska aktivnost lekova iz grupe koksiba ograničena samo na celekoksib, ovaj lek poseduje potencijal za kombinovanje sa standardnim hemio i radioterapijskim protokolima, što je i navelo nas da ispitamo uticaj celekoksiba na proces apoptoze u malignim i normalnim ćelijama. Interesantna činjenica jeste da su istraživanja pokazala da proapoptotska dejstva celekoksiba nisu uvek povezana sa inhibicijom njegovog *target* proteina, enzima COX-2. Derivat celekoksiba, 2,5-dimetilcelekoksib, koji nema COX-

2 inhibitornu aktivnost, pokazuje svojstvo indukcije apoptoze. Pretkliničke studije su utvrdile da celekoksib može da, nezavisno od nivoa ćelijske ekspresije COX-2 proteina, utiče na količine AKT/PKB proteina i njegove „ušodne“ kinaze, 3-fosfoinozimid-zavisne kinaze-1 (PDK-1), ciklina, ciklin-zavisnih kinaza, proteina iz porodice Bcl-2, kao i na količine kalcijum-zavisne ATP-aze sarko/endoplazmatskog retikuluma (SERCA). Međutim, istraživanja su pokazala da su ova *in vitro* COX-2-nezavisna dejstva celekoksiba povezana sa primenom većih koncentracija ovog leka (40-100 μ M). Literaturni podaci ukazuju da celekoksib, nakon produženog izlaganja u ćelijama, pokazuje afinitet akumulacije u ćelijskim membranama [311], što nas je navelo da u našem istraživanju primenimo nižu koncentraciju celekoksiba (25 μ M), tokom 48 časova, pojedinačno ili u kombinacijama sa silibininom, odnosno žučnim kiselinama.

Opisan je uticaj celekoksiba na spoljašnji apoptotski put preko aktivacije proteina FADD i prokaspaze-8, ali i svojstvo izazivanja stresa endoplazmatskog retikuluma. Celekoksib izaziva inhibiciju SERCA ATP-aze u membrani endoplazmatskog retikuluma, što dovodi do brzog porasta intraćelijske koncentracije kalcijuma i pokretanje procesa apoptoze. Međutim, istraživanja pokazuju da celekoksib izaziva apoptozu predominantno posredstvom unutrašnjeg, mitohondrijalnog signalnog puta, pa je i cilj našeg ispitivanja bio da utvrdimo uticaj celekoksiba na ekspresiju gena čiji proteinski produkti pripadaju porodici Bcl-2. S obzirom na to da je funkcija tumor-supresor proteina p53 izgubljena u više od 50% malignih tumora, kao i polazeći od činjenice da p53 ima ulogu transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju više od 500 gena, uključujući i gene koji učestvuju u apoptozi [312], želeli smo da ispitamo uticaj celekoksiba i na ekspresiju *TP53* gena i da utvrdimo da li je ta ekspresija povezana sa promenom genske ekspresije članova Bcl-2 porodice.

Studija Lin XM i sar. izučavala je molekularne mehanizme nastanka rezistencije ćelija karcinoma želuca na cisplatinu. qRT-PCR analiza gena koji kodiraju sintezu antiapoptotskih proteina Bcl-2, Bcl-xL, survivina i XIAP pokazala je da u cisplatin-rezistentnoj ćelijskoj liniji karcinoma želuca SGC-7901/DDP postoji pozitivna korelacija između ekspresije *PTGS2* i *BCL2* gena. Pokazano je da je primena cisplatine dovela do intenzivnog oslobađanja ROS i aktivacije NF- κ B, koji je, kao što je već navedeno, esencijalan transkripcioni faktor u regulaciji *PTGS2* ekspresije. Utvrđeno je da je porast *PTGS2* ekspresije povezan sa povećanom sintezom PGE₂, koji, posredstvom aktivacije EP4 receptora, aktivira ERK1/2 i p38 MAPK signalne puteve, što vodi ka povećanoj transkripciji *BCL2* gena. Ovi događaji su bili inhibirani tretiranjem ćelija celekoksibom koncentracije 30 μ M, tokom 48 časova. U

kliničkim uzorcima karcinoma želuca imunohistohemijska analiza je, takođe, pokazala statistički značajnu korelaciju između COX-2 i Bcl-2 ekspresije. U *in vivo* modelu cisplatin-rezistentnog karcinoma želuca koadministracija cisplatine i celekoksiba značajno je povećala antitumorsku efikasnost cisplatine, uz smanjenje tkivne ekspresije *PTGS2* i *BCL2* gena. Iako je jedan od mehanizama pokretanja apoptoze i terapijskog dejstva cisplatine zapravo izazivanje oksidativnog stresa i povećane produkcije ROS u ćelijama, u ovoj studiji je pokazano da su ROS bile odgovorne za razvijanje antiapoptotskih mehanizama, aktivaciju COX-2 signalizacije i povećanje sinteze Bcl-2 proteina, što potvrđuje dualnu prirodu ROS [313].

Imajući u vidu publikovane naučne rezultate u kojima je potvrđena povezanost COX-2 i antiapoptotskog Bcl-2 proteina, u našoj studiji smo, primenom qRT-PCR metode, ispitivali način modifikacije količine mRNA *BCL2* gena u ćelijama karcinoma pluća i kolona. Takođe, s obzirom na to da se smatra da je Bcl-2-asocirani X protein (Bax) ključan efektor u povećanju permeabilnosti spoljašnje mitohondrijalne membrane i pokretanju unutrašnjeg puta apoptoze [314], u našem istraživanju smo se odlučili i za ispitivanje nivoa mRNA za *BAX* gen. Naši rezultati pokazuju da je u ćelijama adenokarcinoma pluća i normalnih plućnih fibroblasta celekoksib povećao ekspresiju *TP53* gena, kao i ekspresiju proapoptotskog *BAX* gena. U obe ćelijske linije celekoksib je približno deset puta smanjio ekspresiju antiapoptotskog *BCL2* gena. U ćelijskoj liniji adenokarcinoma kolona nije došlo do povećanja *TP53* ekspresije, ali je celekoksib takođe izazvao povećanu *BAX* i smanjenu *BCL2* ekspresiju, samo što je to smanjenje bilo slabije izraženo (približno dva puta manje u odnosu na kontrolnu grupu). Već je navedeno da je celekoksib u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona smanjio *PTGS2* ekspresiju, a povećao je u normalnim ćelijama, što upućuje da u mehanizmima izazivanja apoptoze posreduju i COX-2-nezavisni mehanizmi dejstva celekoksiba. S obzirom na to da je u sve tri ćelijske linije celekoksib izazvao povećanje ekspresije tumor-supresor gena *PTEN*, možemo da pretpostavimo da i *PTEN* doprinosi pokretanju mitohondrijalnog puta apoptoze. Smatra se da u promeni odnosa Bcl-2/Bax proteina, u korist povećanja Bax, značajnu ulogu ima i povećanje *PTEN* nivoa i posledično smanjenje količine ukupnog i fosforilisanog AKT proteina [311]. Naši rezultati upućuju na potrebu daljeg izučavanja mehanizama proapoptotskog dejstva celekoksiba. Celekoksib je u oba tipa malignih ćelija naše studije smanjio ekspresiju *PTGS2* i antiapoptotskog gena *BCL2*, a povećao ekspresiju tumor-supresora *PTEN* i proapoptotskog gena *BAX*. Objavljeni su rezultati koji ukazuju da u ovim događajima važnu ulogu ima interakcija celekoksiba sa β -

katenin signalnim putem. U odsustvu aktivacije WNT, β -katenin biva fosforilisan u citoplazmi, u sklopu Axin kompleksa, kojeg čine APC, kazein kinaza-1 i GSK-3 β . Celekoksib pokazuje dejstvo upravo na nivou ovog kompleksa, odnosno katalizuje GSK-3 β -posredovanu fosforilaciju β -katenina, markirajući ga za proteazomalnu degradaciju, čime se sprečava WNT-zavisna nuklearna translokacija β -katenina, vezivanje za transkripcione faktore iz grupe TCF i izazivanje transkripcije antiapoptotskih gena i gena za COX-2, koji mogu biti pod kontrolom ose WNT/ β -katenin/TCF. Osim toga, povećavajući količine PTEN proteina, celekoksib inhibira AKT signal, koja bi izazvao fosforilaciju i inaktivaciju GSK-3 β , a samim tim i aktivaciju β -katenina. AKT inhibicija je povezana sa aktivacijom proapoptotskog proteina Bad koji inhibiše antiapoptotsku funkciju Bcl-2 proteina. Pored smanjenja ekspresije *BCL2* gena, utvrđeno je da celekoksib pokazuje sposobnost inaktivacije proteina Bcl-2 putem izazivanja posttranslacione modifikacije [311]. S obzirom na naš rezultat koji pokazuje da celekoksib nije povećao *TP53* ekspresiju u ćelijama adenokarcinoma kolona, uz saznanja da je WNT/ β -katenin signalni put aberantno aktiviran u karcinomu kolona, proapoptotsko dejstvo celekoksiba u HT-29 ćelijskoj liniji može da se objasni upravo dejstvom na WNT/ β -katenin. Takođe, ovaj mehanizam dejstva celekoksiba može da doprinese i apoptozi u A549 ćelijskoj liniji. Uloga celekoksiba u regulaciji procesa apoptoze predstavlja značajno, ali neistraženo polje koje treba da pokrene dalja istraživanja, pogotovo u cilju rasvetljenja molekularnih mehanizama kojima celekoksib izaziva apoptozu nezavisno od uticaja na COX-2 ekspresiju. To upućuje na mogućnosti da su za COX-2 inhibiciju i aktivaciju apoptoze odgovorni različiti delovi u strukturi molekula celekoksiba. Ako se uzme u obzir da su neželjena farmakološka dejstva koksiba posledica inhibicije COX-2, buduća istraživanja mogu da se usmere i ka sintezi derivata celekoksiba koji će pokazati slabiju moć inhibicije COX-2, a izraženiju proapoptotsku efikasnost.

U *in vitro* studiji, 24-časovna primena silibinina u koncentracijama 10, 50 i 100 μ M pokazala je antiproliferativno dejstvo, uz povećanje ekspresije p53 i p27 proteina u humanim stelatnim ćelijama jetre (LX-2), pri čemu je to povećanje bilo najizraženije u grupi ćelija tretiranoj rastvorom silibinina koncentracije 100 μ M. Povećanje p53/p27 ekspresije bilo je praćeno smanjenjem količine ukupnog i fosforilisanog AKT proteina [315]. Pretragom dostupne naučne literature, nismo pronašli ni jedan naučni rad koji se bavio proučavanjem uticaja kombinacije celekoksiba i silibinina na apoptozu i tumor-supresor p53. U jednoj studiji ispitivana je ekspresija tumor-supresorskih gena *CDKN1A* i *TP53* u humanim epitelnim ćelijama karcinoma ovarijuma (SKOV-3), nakon tretmana kombinacijom paklitaksela i

silibinina u trajanju od 48 časova. IC_{50} vrednost silibinina u ovom eksperimentu iznosila je 200 μ M, ali je za dalji, kombinovani tretman sa paklitakselom odabrana niža koncentracija od IC_{50} vrednosti, odnosno 25 μ M. Dodatak silibinina paklitakselu pokazao je sinergistički efekat u povećanju ekspresije *CDKN1A* i *TP53* gena i izazivanju antiproliferativnog dejstva na malignim ćelijama [316]. U trima ćelijskim linijama našeg eksperimenta dodatak silibinina (25 μ M) celekoksibu povećao je *TP53* ekspresiju, pri čemu je taj efekat bio najizraženiji u A549 ćelijskoj liniji, u kojoj je dodatak silibinina izazvao dva i po puta veću ekspresiju ovog tumor-supresora, u odnosu na uticaj samog celekoksiba. Posmatrajući sve tri ćelijske linije u našem istraživanju, kombinovana primena celekoksiba i silibinina različito je uticala na proapoptotsko dejstvo celekoksiba. Iako su mehanizmi bili drugačiji, dodatak silibinina celekoksibu u malignim ćelijama ispoljio je proapoptotsko dejstvo jer je u A549 i HT-29 ćelijama i posle dodatka silibinina računanje vrednosti odnosa količina mRNA *BAX/BCL2* pokazivalo veći broj u poređenju sa vrednošću tog odnosa u kontrolnoj grupi, dakle, nastale promene genske ekspresije su i dalje usmeravale maligne ćelije ka apoptozi. U A549 ćelijskoj liniji silibinin je ispoljio sinergističko dejstvo sa celekoksibom u pogledu dupliranja količine mRNA za *BAX*, dok se u HT-29 ćelijama taj sinergizam ogledao u smanjenju *BCL2* ekspresije. U MRC-5 ćelijama nije uočen ni jedan sinergistički proapoptotski efekat istovremene primene celekoksiba i silibinina, u odnosu na tretman ovih ćelija samo celekoksibom. U ovim ćelijama, odnos *BAX/BCL2* pokazivao je manju vrednost u poređenju sa rezultatom dobijenim u kontrolnoj grupi, na osnovu čega može da se iznese zaključak da u normalnim ćelijama silibinin sprečava aktivaciju apoptoze. Brojne pretkliničke studije bavile su se ispitivanjem uticaja silibinina na apoptozu u malignim ćelijama. U MCF-7 i T47D ćelijama silibinin je indukovao apoptozu kroz izazivanje MOMP i povećanje odnosa *BAX/BCL2*. Oligomerizacija Bax proteina na spoljašnjoj membrani mitohondrija dovodi do stvaranja pora za oslobađanje proapoptotskih proteina u citosol, kao što je citohrom c, a zatim dolazi do oligomerizacije Apaf-1, formiranja apoptozoma i aktivacije prokaspaza-9 i 3. Takođe, studije su pokazale da je u nekim malignim ćelijama aktivacija p53 bila ključan faktor u povećanju ekspresije proapoptotskih gena. Postoje pretpostavke da silibinin prvo izaziva autofagiju (lizozomska degradacija dugoživećih organela i ćelijskih komponenti), a zatim apoptozu preko aktivacije ROS/p38 puta i JNK-indukovane p53 aktivacije. Silibinin je pokazao dejstvo i na aktivaciju spoljašnjeg apoptotskog puta, kroz povećanje ekspresije TRAIL liganda, receptora DR4 i DR5 i kaspaza-8 i 10. Ovi rezultati govore o činjenici da silibinin pokazuje kancer-specifična proapoptotska dejstva. Studije su pokazale da silibinin može da zaustavi ćelijski ciklus posredstvom p53 aktivacije, naročito ako su ćelije izložene

silibininu u kraćem vremenskom periodu. Ovaj flavonolignan ima sposobnost povećanja ekspresije p21 i inhibicije formiranja kompleksa Bcl-2 i Bax, omogućujući Bax proteinu da postane slobodan i da učestvuje u apoptozi. Brojne studije su potvrdile i uticaj silibinina na različite mikroRNA putem uticaja na jedarno procesuiranje mikroRNA, njihov prelazak iz jedra u citoplazmu i funkcije u regulaciji procesa apoptoze [220].

U A549 ćelijskoj liniji obe žučne kiseline su delovale sinergistički sa celekoksibom u pogledu povećanja ekspresije *TP53* gena, pri čemu je UDCA pokazala izraženije dejstvo, dok je u HT-29 ćelijskoj liniji samo UDCA delovala sinergistički na povećanje *TP53* ekspresije. Naprotiv, u normalnim ćelijama obe žučne kiseline su smanjile *TP53* ekspresiju.

Ako se pogleda odnos mRNA *BAX/BCL2*, dodatak CDCA u malignim i normalnim ćelijama ispoljio je sinergističko proapoptotsko delovanje sa celekoksibom, i taj efekat je bio najizraženiji u HT-29 ćelijama (približno trinaest puta povećana vrednost *BAX/BCL2* odnosa). UDCA je delovala antagonistički i u malignim i u normalnim ćelijama, što se vidi kroz manju vrednost pomenutog odnosa, u poređenju sa rezultatom dobijenim u celekoksib grupi.

Osim važnih uloga žučnih kiselina u emulgovanju i apsorpciji lipida i liposolubilnih vitamina, regulaciji metabolizma holesterola iz kog nastaju, modulaciji sekrecije pankreasnih enzima, oslobađanju holecistokinina i ispoljavanju antimikrobnog delovanja, žučne kiseline, kao signalni molekuli, regulišu homeostazu intestinalnog epitela. Važne su u održavanju ravnoteže između ćelijske proliferacije i apoptoze intestinalnih epitelnih ćelija, održavajući arhitekturu i funkciju crevnog trakta. Zanimljiv je uticaj stereospecifičnosti u ispoljavanju citotoksičnih efekata. Naime, hidrofobna CDCA (C-7 OH u α konfiguraciji) ispoljava citotoksično dejstvo, dok hidrofilna UDCA (C-7 OH u β konfiguraciji) deluje citoprotektivno. Ova dejstva su prvo uočena na hepatocitima i intestinalnim epitelnim ćelijama, a posle i na drugim tipovima ćelija. CDCA i sekundarne žučne kiseline izazivaju apoptozu na hepatocitima aktivacijom Fas receptora, odnosno preko spoljašnjeg apoptotskog puta, dok u kolonocitima apoptoza biva aktivirana unutrašnjim putem. Žučne kiseline generišu ROS, koje izazivaju Fas translokaciju i oligomerizaciju, sa posledičnom aktivacijom kaspaze-8. Kako je navedeno, ova kaspaza može da aktivira unutrašnji, mitohondrijalni put posredstvom razgradnje proapoptotskog Bid proteina i stvaranjem tBid forme. Hidrofobne žučne kiseline svojim deterdžentskim svojstvima menjaju fizičko-hemijske karakteristike ćelijskih membrana, aktiviraju membranske proteine, kao što su NOX i PLA2, što dovodi do povećane produkcije ROS i RNS, kao i do povećanja permeabilnosti mitohondrijalne membrane, izazivajući gubitak mitohondrijalnog membranskog potencijala i MOMP. Povećano

oslobađanje arahidonske kiseline iz ćelijskih membrana i aktivacija ciklooksigenaznih i lipooksigenaznih puteva neminovno uvodi ćeliju u stanje oksidativnog stresa. Utvrđeno je da arahidonska kiselina može da utiče na povećanu produkciju ROS i RNS posredstvom interakcija sa elektron-transportnim lancem mitohondrija. Dolazi do oslobađanja citohroma c i Smac/Diablo proteina u citosol, formiranja apoptozoma, degradacije Bcl-2, aktivacije Bax i kaspaza-9 i 3. Pojedine studije opisuju način aktiviranja programa apoptoze preko PLC aktivacije, izazivanja stresa endoplazmatskog retikuluma i porasta intracelularnog kalcijuma, što se javlja zajedno sa mitohondrijalnim stresom. Stres endoplazmatskog retikuluma izaziva oslobađanje proapoptotskih članova Bcl-2 porodice iz veze, kompleksa, sa membranom endoplazmatskog retikuluma. U nekim ćelijama oksidativni stres izaziva genotoksična oštećenja sa sledstvenom aktivacijom p53 kao transkripcionog faktora, što vodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili izazivanja apoptoze. Jedno od najintrigantnijih naučnih opažanja jeste činjenica da, osim izazivanja apoptoze, hidrofobne žučne kiseline mogu da aktiviraju kompenzatorne mehanizme ćelijskog preživljavanja posredstvom aktivacije EGFR, MAPK, AKT, β -katenin i NF- κ B signalnih puteva. *In vitro* studije na ćelijskim kulturama nedvosmisleno su dokazale citotoksične efekte i smanjenu ćelijsku vijabilnost usled tretmana ćelija hidrofobnim žučnim kiselinama, ali utvrđeno je da u preostalim, živim ćelijama u kulturi mogu da budu aktivirani putevi ćelijskog preživljavanja. Međutim, to upućuje na veliku mogućnost da se u takvim ćelijama dešavaju promene na DNA u vidu mutacija, aktivacije proto-onkogeni i inaktivacije tumor-supresora, uz hromozomsku nestabilnost, što može biti osnova maligne transformacije. Ishrana bogata zasićenim mastima povezana je sa povećanim nivoom serumskih i crevnih žučnih kiselina i prepoznata je kao etiološki uzročnik različitih karcinoma, a hidrofobne žučne kiseline kao tumor-promoteri. Rezultati studija pokazuju da u konačnom efektu žučnih kiselina uticaj ima vrsta hidrofobne žučne kiseline, primenjena koncentracija, trajanje dejstva i vrsta ćelije. U našem istraživanju, primena relativno niske koncentracije CDCA delovala je sinergistički proapoptotski sa celekoksibom u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama. UDCA je izazvala antiapoptotska dejstva, što je u saglasju sa rezultatima predstavljenim od strane drugih istraživača. Utvrđeno je da su citoprotektivni efekti UDCA zasnovani na smanjenoj produkciji ROS i sprečavanju MOMP, što ukazuje na potencijalnu primenu UDCA u hemoprevenciji karcinoma u visokorizičnoj populaciji [317].

ATP-zavisan transport različitih supstanci kroz ćelijske membrane, nasuprot koncentracijskom gradijentu, primarno se sprovodi putem superporodice ABC transmembranskih proteina. Prvi opisan član ABCC grupe transportera bio je MRP1

transportni protein, čija je sinteza kodirana *ABCC1* genom. MRP1 je uključen u transport brojnih antineoplastičnih agenasa i ksenobiotika, njihovih metabolita, ali i drugih bioaktivnih organskih anjona i signalnih molekula, uključujući glutation, leukotriene i prostaglandine. Povećana MRP1 ekspresija na nivou mRNA i proteina potvrđena je u solidnim i hematološkim malignitetima, i doprinosi eliminaciji hemioterapeutika iz malignih ćelija, čime se smatra prediktorom lošijeg terapijskog odgovora. Takođe, istraživanja su pokazala da je MRP1 transporter direktno uključen u patogenezu inflamatornih, imunoloških, neuroloških, kardiovaskularnih i malignih bolesti [318]. Rezultati studija pokazuju da je u različitim tumorima prisutna pozitivna korelacija između ekspresije COX-2 i MRP1, što predstavlja jedan od mehanizama primarne i stečene rezistencije malignih ćelija na primenu hemioterapijskih agenasa, ali i novih, ciljanih terapijskih strategija. Kao objašnjenje ove povezanosti navode se slični regulatorni mehanizmi za sintezu i funkciju ovih proteina, poput indukcije sinteze oba proteina pod dejstvom TNF- α i LPS. Takođe, kao što je navedeno, prostaglandini su jedni od supstrata za MRP1 [319], što nas je i navelo da ispitamo uticaj celekoksiba na MRP1, odnosno *ABCC1* ekspresiju u malignim ćelijama. MRP1 predstavlja atraktivnu terapijsku metu, a selektivni COX-2 inhibitori obećavajuće lekove koji bi mogli imati pozitivan uticaj na hemiosenzitivnost u kliničko-onkološkoj praksi.

Celekoksib, primenjen u koncentracijama od 20 do 80 μ M, povećao je hemioterapijsku osetljivost humanih malignih ćelija T-ćelijskog limfoma (Jurkat i HuT-78 ćelijske linije) na koncentracijski-zavisan način, posredstvom smanjenja ekspresije transportera MRP1 i P-glikoproteina, što je utvrđeno qRT-PCR i Western blot metodama. Pokazano je da je ovaj uticaj celekoksiba bio posredovan inhibicijom aktivnosti NF- κ B signalnog puta [320]. Slični rezultati dobijeni su u studiji van Wijngaarden J i sar, u kojoj je pokazano da celekoksib povećava intracelularnu akumulaciju doksorubicina i citotoksičnost u ćelijama karcinoma dojke posredstvom NF- κ B inhibicije [321]. 48-časovni tretman humane ćelijske linije osteosarkoma (MG-63) celekoksibom u koncentracijama 50 i 100 μ M pokazao je smanjenu ekspresiju MRP1 proteina i povećanu osetljivost MG-63 ćelija na primenu cisplatin. Dokazano je da je MRP1 smanjenje bilo uzrokovano inhibicijom PI3K/AKT signalnog puta [322]. Celekoksib je smanjio nivo MRP1 u A549 ćelijama, što je bilo praćeno povećanom akumulacijom doksorubicina i sledstvenom citotoksičnošću [323]. U jednoj studiji, koja je ispitivala uticaj celekoksiba na humane ćelijske linije adenokarcinoma kolona (WiDr i COLO-205), celekoksib nije povećao osetljivost kancerskih ćelija na 5-fluorouracil i irinotekan. Naprotiv, povećao je ekspresiju MRP4 i MRP5 transportnih proteina [324].

Navedeni rezultati za maligne ćelije pluća i kolona usklađeni su sa našim rezultatima. U našem istraživanju, u ćelijama adenokarcinoma pluća (A549) celekoksib je smanjio količine mRNA za MRP1, dok je u ćelijama adenokarcinoma kolona (HT-29) povećao MRP1 ekspresiju. Ovo ukazuje na tkivno-specifične mehanizme regulacije ekspresije ovog transportera i drugačiju biohemijsko-molekularnu povezanost COX-2 i MRP1 signalnih puteva u različitim ćelijama. Takođe, ovi rezultati upućuju i na potrebe daljih ispitivanja drugačijih primenjenih koncentracija celekoksiba u *in vitro* studijama.

Jedno istraživanje je ispitivalo uticaj 22 flavonoida na ćelijski transport daunomicina i vinblastina u Panc-1 ćelijama adenokarcinoma pankreasa koje ekspimiraju MRP1. Koncentracija svakog flavonoida iznosila je 100 μ M, a tretman je trajao 2 časa. Utvrđeno je da flavonoidi, među kojima je bio i ekstrakt silimarina, povoljno utiču na intraćelijsku akumulaciju daunomicina i vinblastina, smanjujući nivo MRP1. Produženi, odnosno 24-časovni tretman nije promenio nivo MRP1 u ćelijskim membranama [325]. I druge *in vitro* i *in vivo* studije prikazale su koncentracijski-zavisan, pozitivan uticaj silibinina na akumulaciju različitih citotoksičnih hemioterapeutika u malignim ćelijama i sledstvenu inhibiciju ćelijske proliferacije. Silibinin je pokazao dejstvo i na druge transportne sisteme, kao što su P-glikoprotein, BCRP/ABCG2, MRP2, MRP4 i drugi [326]. U našem eksperimentu, koji je trajao 48 časova, ispitivan je uticaj silibinina koncentracije 25 μ M, ali u kombinaciji sa celekoksibom, na mRNA za *ABCC1* gen. U A549 ćelijama silibinin nije pokazao sinergističko dejstvo sa celekoksibom, ali se u toj grupi ćelija ipak zadržala niža *ABCC1* ekspresija u poređenju sa kontrolnom grupom. U HT-29 ćelijama silibinin je pokazao izraženiji učinak na smanjenje *ABCC1* nivoa, koji su bili ispod nivoa zabeleženih u kontrolnoj i celekoksib grupi. S obzirom na rezultate drugih istraživača, pretpostavljamo da bi naredna ispitivanja trebalo da budu usmerena na primenu viših koncentracija ovog flavonolignana, u kraćem trajanju *in vitro* tretmana.

Žučne kiseline, kao signalni molekuli, putem aktivacije nuklearnih receptora i transkripcionih faktora, mogu da utiču na ekspresiju različitih transportnih proteina, uključujući i ABC transportere. Žučne kiseline pokazuju sposobnost uticaja i na druge mehanizme hemioterapijske rezistencije, kao što je uticaj na enzime aldo-keto reduktaza, koji učestvuju u metabolizmu doksorubicina, čime predstavljaju dobre agense koji simultano mogu da utiču na multiple mehanizme rezistencije malignih ćelija [327]. Takođe, odavno je poznata holeretička uloga UDCA, koja se opisuje uticajem ove žučne kiseline na transportne proteine koji učestvuju u metabolizmu i protoku žuči. UDCA utiče na transkripciju,

translaciju i posttranslacionu modifikaciju različitih transportera, kao i na njihovu integraciju u ćelijske membrane, čime podstiče bilijarnu ekskreciju, što objašnjava antiholestaznu aktivnost UDCA [289]. Jedna od prvih studija ispitala je uticaj žučnih kiselina i njihovih soli na efluks derivata fluoresceina, BCPCF, koji predstavlja supstrat za MRP1. Izlaganje humanih eritrocita žučnim kiselinama, u koncentracijama koje su odgovarale njihovim IC₅₀ vrednostima, trajalo je 60 minuta, na temperaturi 37 °C. Sve žučne kiseline su inhibisale efluks BCPCF supstrata, u sledećem redosledu: monohidroksilne > dihidroksilne > trihidroksilne žučne kiseline, a najizraženiji uticaj zabeležen je u grupi tretiranoj LCA. UDCA, iako hidrofilnog karaktera, ispoljila je MRP1 inhibitorno dejstvo. U ovoj studiji upotrebljena koncentracija CDCA iznosila je 13 μM, a za UDCA 30 μM [328], što je dosta slično primenjenim koncentracijama u našem istraživanju. Naši rezultati pokazuju da je dodatak UDCA povoljno delovao na *ABCC1* ekspresiju u malignim ćelijama pluća i kolona, u kojima je izmerena niža količina mRNA za *ABCC1* gen u poređenju i sa kontrolnom i sa celekoksib grupom, dok je taj povoljan uticaj CDCA bio uočen samo u malignim ćelijama kolona. Ovi podaci ukazuju na važnu ulogu žučnih kiselina u modifikaciji transporta različitih supstrata kroz ćelijske membrane, uključujući i uticaj na ABC transportne sisteme.

EMT predstavlja esencijalan događaj u tumorskoj progresiji, u kojem ćelije gube epitelni, a stiču mezenhimalni fenotip, povećavajući svoju mobilnost i invazivni potencijal. Ovaj događaj olakšava izdvajanje ćelija iz primarnog tumora i diseminaciju na udaljene lokalizacije. Tokom EMT maligne ćelije gube epitelne karakteristike i adhezione molekule, a jedan od njih je E-kadherin. Ovaj kalcijum-zavisan adhezioni protein, kodiran *CDH1* genom, učestvuje u formiranju međućelijskih veza i organizaciji ECM. Smanjena proteinska ekspresija ili potpuni gubitak nivoa i funkcije E-kadherina jeste negativan prognostički faktor i odlika je mnogih karcinoma, pogotovo onih sa agresivnijem karakteristikama [329]. Negativna korelacija između E-kadherina i COX-2 prvi put je opisana u ćelijama NSCLC, u kojima je detektovana povećana ekspresija COX-2 i povećana količina PGE₂, uz veći nivo različitih transkripcionih represora, koji se vezuju za promoter *CDH1* gena i negativno deluju na njegovu transkripciju, a samim tim i na sintezu E-kadherina [330]. U jednoj studiji utvrđeno je da je COX-2 aktivacija bila povezana sa aktivacijom NF-κB i PI3K/AKT signalnih puteva, što je doprinelo izraženijoj ćelijskoj migraciji, smanjenom nivou E-kadherina, ali povećanim količinama mezenhimalnog biomarkera vimentina i matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9. Povećana proteolitička aktivnost enzima MMP prema proteinskim komponentama ECM, ali i prema E-kadherinu, predstavlja važnu odliku EMT

[331]. Nekoliko činitelja utiče na pokretanje procesa EMT *in vitro* i *in vivo*, a pre svega prisustvo ROS, TNF- α i uslovi hipoksije [332], dakle slični faktori koji doprinose povećanoj sintezi i aktivnosti enzima COX-2. Mnogi solidni tumori, uključujući tumore pluća i kolona, ekspresiraju EGFR. Utvrđeno je da COX-2 pokazuje afinitet prema vezivanju za EGFR i učestvuje u formiranju dimera ovog receptora, što je ujedno i važan događaj u aktivaciji intracelularne tirozin kinaze i nishodnih signalnih puteva, među kojima je posebno značajan PI3K/AKT signalni put. COX-2, takođe, inhibira endocitozu i lizozomalnu degradaciju EGFR. Istraživanje je pokazalo da je COX-2/EGFR/PI3K/AKT osa odgovorna za aktivaciju MMP-2, MMP-7 i MMP-9 u ćelijama karcinoma pluća, kao i za rezistenciju na primenu EGFR-TKI [333]. Navedeni podaci ukazuju na potencijal selektivnih COX-2 inhibitora da utiču na modifikaciju ključnih događaja, odnosno biomarkera u EMT, što nas je i navelo da u našoj studiji ispitamo uticaj celekoksiba na činioce EMT u malignim ćelijama pluća i kolona.

Celekoksib, primenjen u koncentraciji 25 μ M, u našoj studiji, izazvao je povećanje količine mRNA *CDH1* gena, a smanjio količine mRNA za obe MMP (*MMP2* i *MMP9*) u A549 i HT-29 ćelijama, u kojima je, kao što je navedeno, smanjio i COX-2 ekspresiju. Zanimljivi su naši rezultati dobijeni u normalnim ćelijama (MRC-5), u kojima je celekoksib smanjio ekspresiju E-kadherina, a već je prikazano da je u ovim ćelijama celekoksib povećao COX-2 ekspresiju, što nam pokazuje obrnutu srazmeru nivoa COX-2 i E-kadherina. S obzirom na to da su MRC-5 ćelije zapravo normalni fibroblasti, u kojima su mehanizmi regulacije ekspresije i funkcije E-kadherina drugačiji nego u epitelnim i malignim ćelijama [334], ovakvi rezultati su i očekivani. Slične rezultate za maligne ćelije prikazali su i drugi istraživači. U studiji Fujii R i sar. celekoksib, primenjen u koncentracijama 25 i 50 μ M, povećao je ekspresiju mRNA i proteina za E-kadherin u ćelijskim linijama karcinoma glave i vrata [330]. *In vivo* studija na životinjskom modelu kolorektalnog karcinoma pokazala je da je celekoksib smanjio koncentracije MMP-2 i MMP-9 u plazmi pacova, a povećao je koncentraciju TIMP-2, koji ima ulogu MMP inhibitora. Smanjena proteinska ekspresija MMP-2 i MMP-9 utvrđena je i imunohistohemijskom analizom tumorskog tkiva kolona pacova [335]. Istraživanje je pokazalo da PGE2 stimuliše sintezu proangiogenog VEGF u humanoj ćelijskoj liniji adenokarcinoma endometrija posredstvom EP2-cAMP-posredovane transaktivacije EGFR i ERK1/2 signalnih puteva, čime je pokazano da COX-2 i PGE2 utiču i na druge činioce u procesu metastaziranja malignih ćelija [336]. Metastatskom potencijalu tumorskih ćelija doprinosi i COX-2-PGE2-posredovana povećana sinteza VEGF i FGF u endotelnim ćelijama krvnih sudova, preko aktivacije ERK2/JNK1 signalizacije, što

stvara uslove za neovaskularizaciju [277]. Ovi podaci upućuju na potrebe dizajna narednih istraživanja uticaja celekoksiba i na druge aspekte procesa invazije i metastaziranja malignih ćelija, kao što su signalni putevi angiogeneze.

Kao što je navedeno, COX-2 ima važnu ulogu u procesu EMT. U kancerskim ćelijama mokraćne bešike silibinin, primenjen u koncentraciji od 50 i 100 μM , tokom 48 časova, smanjio je migraciju i invaziju ćelija, suprimirajući EMT i to mehanizmom koji je uključivao inhibiciju COX-2 enzimske aktivnosti, kao i smanjenjem nivoa N-kadherina, vimentina, Zeb1 i β -katenina, dok su količine E-kadherina bile povećane. Ova dejstva silibinina su postala izraženija kada su ćelije tretirane kombinacijom silibinina i COX-2-specifične male interferirajuće RNA (siCOX-2) [337]. Rezultati za silibinin i markere EMT, u okviru ove doktorske disertacije, u skladu su sa literaturnim podacima. Dodatak silibinina (25 μM) celekoksibu u malignim ćelijama pluća i kolona ispoljio je sinergističko dejstvo sa celekoksibom u pogledu povoljnog uticaja na biomarkere EMT. U A549 i HT-29 ćelijama silibinin je izazvao povećanje količine mRNA za *CDHI* gen i smanjenje količine mRNA za *MMP2* i *MMP9*. S obzirom na činjenicu da je u obe ćelijske linije, u grupama tretiranim celekoksibom i kombinacijom celekoksiba i silibinina uočeno smanjenje ekspresije *PTGS2* i *NF κ B* gena, možemo da iznesemo pretpostavku da je upravo NF- κ B transkripcioni faktor jedan od važnih elemenata povezanosti COX-2 enzima i biomarkera invazivnosti i metastaziranja malignih ćelija. Brojne studije su se bavile proučavanjem mehanizama antiinvazivnog i antimetastatskog dejstva silibinina. U studiji Si L i sar. ispitivan je uticaj silibinina u koncentracijama od 30 do 90 μM na ćelije trostruko negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231), koje pokazuju odlike EMT. Tretman ćelija je trajao 24 časova, a Western blot analiza je pokazala povećanje nivoa epitelnog markera E-kadherina, smanjenje mezenhimalnih markera N-kadherina i vimentina, kao i proteinske ekspresije MMP-2 i MMP-9. Eksperimenti (*wound-healing assay* i *transwell assay*) potvrdili su smanjenje invazivnog i migratornog potencijala ovih malignih ćelija. Utvrđeno je da silibinin utiče na dinamiku mitohondrija, odnosno povećava mitohondrijalnu fuziju, posredstvom povećane ekspresije fuzionih proteina, kao što su mitofuzin-1 i 2, i da je upravo ovaj događaj bio osnova antimigratornog dejstva silibinina u MDA-MB-231 ćelijama [338]. Silibinin, primenjen u koncentraciji od 200 μM , koja je odgovarala njegovoj IC_{50} vrednosti, inhibisao je fosforilaciju STAT3 transkripcionog faktora i ushodne kinaze JAK2, čime je zaustavio nuklearnu STAT3 translokaciju i vezivanje za promotor *MMP2* gena, a samim tim je i smanjio *MMP2* ekspresiju u MDA-MB-231 ćelijama. *In vitro* testovi ispitivanja invazivnosti potvrdili su da je silibinin-

zavisna inhibicija JAK2/STAT3/MMP-2 signalnog puta odgovorna za inhibiciju ćelijske proliferacije, migracije i invazivnog kapaciteta [339]. Putem regulacije WNT/ β -katenin signalnog puta u ćelijama kolona, silibinin je smanjio invazivni i migratorni potencijal malignih ćelija kolona [340], dok je taj antiinvazivni uticaj u ćelijama karcinoma pluća bio posredovan inhibicijom aktivacije i nuklearne translokacije STAT3 faktora [341].

U našem istraživanju, slično dejstvima silibinina, i UDCA je u HT-29 ćelijama ispoljila antiinvazivno dejstvo, delujući sinergistički sa celekoksibom na povećanje *CDH1* ekspresije i smanjenje *MMP2* i *MMP9* ekspresije. U A549 ćelijama antiinvazivno dejstvo sinergističko dejstvo UDCA je uočeno samo u pogledu povećanja *CDH1* genske ekspresije. I rezultati drugih istraživanja pokazali su pozitivan efekat UDCA na suprimiranje EMT. U jednoj studiji [293], ćelije holangiokarcinoma su tretirane rastvorom UDCA koncentracije koja je bila deset puta veća u odnosu na naše eksperimentalne uslove, odnosno iznosila je 250 μ M. UDCA je izazvala povećanje ekspresije E-kadherina, uz smanjenje ekspresije N-kadherina, kao i EMT događaja. Kao glavni mehanizam ovog dejstva UDCA opisan je inhibicioni efekat UDCA na ose EGF/EGFR, EGFR/PI3K/AKT i EGFR/ERK1/2, za koje je utvrđeno da destabilizuju kompleks E-kadherina i β -katenina u malignim ćelijama, kao i međućelijske kontakte. Imajući u vidu činjenicu da su povećana EGFR ekspresija i amplifikacija *EGFR* gena čest događaj u kancerogenezi, antiEGFR dejstvo UDCA ukazuje na potencijalno antimetastatsko dejstvo ove žučne kiseline.

Za razliku od UDCA, hidrofobna CDCA je ispoljila proinvazivna dejstva. U A549 i HT-29 ćelijama dodatak CDCA u potpunosti je antagonizovao antiinvazivni efekat celekoksiba. U obe ćelijske linije, pri dodatku CDCA detektovana je smanjena ekspresija E-kadherina i povećana ekspresija *MMP-2* i *MMP-9*, u poređenju sa rezultatima dobijenim u kontrolnoj i celekoksib grupi. U *in vitro* studiji Kainuma M i sar. ispitivano je dejstvo CDCA na EMT u ćelijama hepatocelularnog karcinoma. Ćelije su, tokom 48 časova, tretirane znatno višom koncentracijom CDCA (100 μ M), u poređenju sa uslovima tretmana u ovoj disertaciji, i zabeležen je uticaj ove žučne kiseline na intenziviranje procesa EMT, kroz povećanje količina N-kadherina, fosforilisane fokalne adhezije kinaze (FAK) i polimerizacije aktina, koji predstavljaju važne faktore u povećanju mobilnosti malignih ćelija. Opisana dejstva CDCA pripisana su aktivaciji FXR receptora u ćelijama hepatocelularnog karcinoma. Ovaj nuklearni receptor ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma žučnih kiselina, ali i u regulaciji celokupnog metabolizma. Publikovani su različiti rezultati koji povezuju FXR sa karcinogenezom, ali još uvek se ne može opisati njegova tačna uloga u malignitetima [342].

Na životinjskom modelu je dokazano da mikroaspiracija hidrofobnih žučnih kiselina (CDCA, DCA i LCA) u stanjima GERB izaziva EMT i fibrozu u alveolarnom plućnom epitelu, u čijoj molekularnoj patogenezi učestvuju TGF- β 1/Smad3 signalni put i FXR [343]. U našem istraživanju CDCA je značajno povećala ekspresiju mRNA za *FXR* i *SHP* u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama, što je bilo i očekivano, jer je CDCA vrlo potentan ligand ovog receptora. Poznato je da *SHP* predstavlja *orphan* receptor, sa funkcijom transkripcionog korepresora, koji pokazuje značaj u regulaciji dejstava FXR i žučnih kiselina [344]. FXR-posredovan proin vazivni efekat CDCA bi svakako trebalo da bude predmet daljih istraživanja, koja bi preciznije definisala ulogu FXR/*SHP* ose u procesu karcinogeneze. Osim toga, neistraženo područje jesu i drugi receptori žučnih kiselina, kao što je TGR5 [243], ali i njihovi agonisti, odnosno antagonisti, koji predstavljaju potencijalne farmakološke agense u terapiji malignih bolesti.

U malignim ćelijama, ekspresija E-kadherina i 15-PGDH, dva značajna tumor-supresor proteina, često je smanjena, odnosno „utišana” epigenetskim mehanizmima [345, 346].

Epigenetika podrazumeva ispitivanje stabilnih, naslednih promena u genskoj ekspresiji, koje su nezavisne od redosleda nukleotida u sekvenci DNA. Epigenetski događaji su reverzibilni procesi, za razliku od mutacija DNA, i uključuju hromozomsko remodelovanje, modifikacije histona, DNA metilacije i nekodirajuće RNA. Jedna od čestih epigenetskih alteracija, koja se javlja u ranim fazama karcinogeneze, jeste regionalna hipermetilacija CpG ostrvaca u promoterskim regionima tumor-supresor gena. Obrazovanje metil-CpG katalizovano je enzimima DNMT. Metilirana DNA može direktno inhibirati transkripciju tako što metilirana mesta stvaraju kondenzovaniji jedarni hromatin i ostaju neprepoznata od strane transkripcionih faktora. Ovaj događaj zaustavlja transkripciju i smanjuje količinu tumor-supresor proteina, odnosno dovodi do epigenetskog „utišavanja” tumor-supresora. Transkripcioni represori, poput *zinc-finger* proteina, predstavljaju važan element u aktiviranju DNMT, a samim tim i u „utišavanju” tumor-supresora [347].

Zeb1, najvažniji član Zeb porodice *zinc-finger* transkripcionih faktora, predstavlja protein kodiran *ZEB1* genom, lociranom na hromozomu 10p11.2. Reguliše transkripciju različitih gena vezujući se za E-promoter DNA sekvence. Sastoji se iz više od 1000 aminokiselina i sadrži dva *zinc-finger* klastera na N- i C-terminalnim krajevima proteinske strukture. Središnji region sadrži tzv. homeodomen, Smad-interreagujući domen i C-terminalni vezujući protein (CtBP)-interreagujući domen. Zeb1 ima ulogu u regulaciji EMT

upravo preko svoje sposobnosti vezivanja za promoterski region gena za E-kadherin, inhibišući njegovu transkripciju i gensku ekspresiju. Zeb1 transkripciona aktivnost se sprovodi pomoću različitih koaktivatora i koinhibitora, u zavisnosti od ciljnog gena i vrste ćelije, odnosno tkiva. Zeb1, kao represor, interreaguje sa kompleksom CtBP i aktivira različite epigenetske mehanizme, kao što su enzimi DNMT, koji, zatim, dovode do smanjenja genske ekspresije [348].

Upravo su ove činjenice bile razlog našeg ispitivanja mogućnosti reaktivacije ekspresije E-kadherina i 15-PGDH uz pomoć epigenetskog agensa 5-aza-2'-deoksicitidina (decitabina), čije dejstvo se zasniva na inhibiciji aktivnosti DNMT. U A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama ispitivali smo demetilacionu aktivnost decitabina, odnosno sposobnost smanjenja ekspresije *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *ZEB1* gena i povećanja ekspresije *CDH1* i *HPGD* gena. Takođe, cilj nam je bio da ispitamo uticaj silibinina i žučnih kiselina na epigenetske događaje u malignim i normalnim ćelijama koje su tretirane decitabinom.

Ćelijske linije su izlagane rastvoru decitabina rastućih koncentracija (0,5-50 μM), u periodu od 48 časova. Decitabin je pokazao koncentracijski-zavisan porast citotoksične aktivnosti u sve tri ćelijske linije. IC_{50} vrednost u A549 ćelijama iznosila je 17,08 μM , a u HT-29 ćelijama 19,53 μM . Istraživanja, koja su se bavila ispitivanjem dejstava decitabina na različitim ćelijskim kulturama, pokazale su dosta drugačije IC_{50} vrednosti u odnosu na naše rezultate. U jednoj studiji [349], HT-29 ćelije su tretirane rastućim koncentracijama decitabina (1-20 μM), tokom 24 i 48 časova. Dobijena IC_{50} vrednost iznosila je 2,5 μM , što je približno osam puta manje u poređenju sa našim rezultatom dobijenim u HT-29 ćelijama. IC_{50} vrednost za decitabin prema A549 ćelijama, u eksperimentu koji je trajao 96 časova, iznosila je 0,49 μM , dok se za ćelijske kulture različitih leukemija IC_{50} vrednost kretala od 0,05 do 100 μM [173]. Ovako različite IC_{50} vrednosti mogu se pojasniti ćelijski-specifičnom osetljivošću na dejstvo demetilacionog agensa, koja zavisi, pre svega, od metilacionog statusa u ćelijama, zatim od različitih uslova trajanja tretmana, kao i metodologije ispitivanja vijabilnosti, odnosno citotoksičnosti.

IC_{50} vrednost decitabina u MRC-5 ćelijama u našem istraživanju bila je 9,54 μM , što ukazuje na veću osetljivost ovih ćelija prema dejstvu decitabina, u odnosu na osetljivost malignih ćelija pluća i kolona. MRC-5 ćelije imaju ograničen životni vek u kulturi i, praktično, ulaze u stanje ćelijskog starenja nakon 20-25 dupliranja svoje populacije. Utvrđeno je da ove ćelije imaju visok stepen metilacionog statusa, zbog čega pokazuju svojstvo veće intrinzične plastičnosti i preživljavanja u *in vitro* uslovima (epigenetsko reprogramiranje).

Visok udeo metilacija promotera gena omogućava ovim ćelijama da duže prežive, čime se može objasniti njihova veća osetljivost na demetilaciono dejstvo [350]. Studije izvedene pre nekoliko decenija, takođe, pokazuju da je stanje hipometiliranosti i smanjenja nivoa 5-metilcitozina uzrok bržeg starenja MRC-5 ćelija u *in vitro* okolnostima. Dakle, aktivacija procesa metilacije je način prilagođavanja ćelija u kulturi i povećanja njihove vijabilnosti [351].

Za dalja ispitivanja dejstava decitabina, u našem eksperimentu, odabrali smo koncentraciju decitabina od 1 μM , kojom se postigla manja citotoksičnost od utvrđenih IC_{50} vrednosti, odnosno IC_{35} (A549), IC_{26} (HT-29) i IC_{39} (MRC-5). Farmakokinetička ispitivanja su pokazala da primena decitabina u standardnim terapijskim dozama postiže maksimalnu plazmatsku koncentraciju u rasponu od 2,35 do 4,70 μM [173], što ukazuje da je koncentracija upotrebljena u našoj studiji klinički relevantna, dostižna i prihvatljiva.

Za kombinovani tretman sa decitabinom, odabrana je koncentracija silibinina 25 μM , kojom se u našim ćelijskim kulturama postigla prihvatljiva IC_{29} - IC_{35} . Takođe, za kotretman sa decitabinom odabrali smo koncentraciju CDCA od 15 μM , koja je pokazivala IC_{28} - IC_{33} , i UDCA koncentracije 25 μM , kojom je postignuta IC u rasponu od IC_{26} do IC_{32} . Kao što se može zaključiti, svaki kombinovani tretman prouzrokovao je citotoksično dejstvo prema manje od 50% ćelija.

Decitabin, primenjen u koncentraciji od 1 μM , smanjio je količine mRNA za sve tri DNMT – *DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B* u malignim i normalnim ćelijskim linijama našeg istraživanja. Ovakvi rezultati su bili i očekivani jer decitabin inhibiše enzimsku aktivnost DNMT. DNMT1 učestvuje u održavanju stanja metiliranosti, tačnije prepoznaje hemimetilirana mesta u strukturi DNA za vreme DNA replikacije i metilira novosintetisane CpG dinukleotide. DNMT3A i DNMT3B predstavljaju *de novo* metiltransferaze koje uspostavljaju DNA metilaciju, ali takođe mogu da vrše transfer metil grupa na hemimetiliranim mestima. Decitabin se u ćelijama metaboliše u svoj aktivan metabolit, 5-aza-2'-deoksicitidin-trifosfat, i inkorporira se u strukturu DNA, odnosno supstituiše citozin u toku DNA replikacije, a, zatim, ireverzibilno vezuje DNMT i „zarobljava“ ih na molekulu DNA, smanjujući *pool* DNMT i inhibišući njihovu enzimsku aktivnost. Za razliku od nanomolarnih koncentracija, mikromolarne koncentracije decitabina uzrokuju oštećenje DNA i citotoksične efekte. Decitabin je odobren od strane internacionalnih regulatornih tela, uključujući FDA, za tretman hematoloških maligniteta. U studijama koje su proučavale dejstvo decitabina u solidnim tumorima korišćene su veće doze decitabina koje su izazivale i izraženije toksične

efekte i neželjena dejstva, zato je i cilj naše *in vitro* studije bio da upotrebimo manju koncentraciju decitabina od utvrđene IC_{50} vrednosti. Jedno istraživanje je pokazalo da decitabin izaziva proteinsku degradaciju sve tri DNMT, i da je ova aktivnost posredovana E3 ligazom, koja se naziva TNF receptor-asocirani faktor 6 (TRAF6). E3 ligaze su zadužene za prepoznavanje specifičnih supstrata i katalizuju njihovu ubikvitinaciju. Analizirana je proteinska sekvenca sva tri DNMT izoenzima i dokazano je da sve tri DNMT sadrže konzervirani TRAF6-vezujući motiv, odnosno TRAF-C domen, što je i pokrenulo istraživanje koje je dokazalo da je upravo TRAF6 ključna E3 ligaza koja upućuje DNMT na ubikvitinaciju i razgradnju u lizozomima. Dakle, osim što utiče na nivoe mRNA za DNMT, pokazano je da decitabin povećava ekspresiju i aktivnost TRAF6, čime utiče na DNMT proteinsku stabilnost, odnosno izaziva njihovu razgradnju i blokira metiltransferaznu aktivnost. Ovo su mehanizmi kojima decitabin pokazuje svoje antitumorsko dejstvo, a nivo ekspresije DNMT predstavlja potencijalan prediktivan biomarker odgovora na demetilacionu terapiju [352].

Pored smanjenja genske ekspresije za sve tri DNMT, decitabin je smanjio količinu mRNA za *ZEB1* u A549 i MRC-5 ćelijskim linijama. Smanjenje *ZEB1* ekspresije može biti još jedan mehanizam smanjenja ekspresije DNMT jer je *Zeb1* aktivnost povezana sa indukcijom DNMT. U studiji Zhang N i sar, decitabin, primenjen u koncentraciji od 10 μ M na ćelijama NSCLC, inhibisao je aberantnu metilaciju gena za miR-200a i miR-200c, za koje se smatra da imaju važnu tumor-supresorsku ulogu, i zaustavio je proces EMT. Ovo dejstvo decitabina bilo je posredovano smanjenjem *ZEB1* i *ZEB2* ekspresije. U ovoj studiji korišćena je deset puta veća koncentracija decitabina u poređenju sa odabranom koncentracijom u našem eksperimentu, ali PC9 ćelije u ovoj studiji bile su prvo tretirane rastvorom TGF- β 1 koncentracije 10 ng/mL, tokom 96 časova. Ovaj multifunkcionalni polipeptidni citokin ima plejotropna dejstva. Može da inhibiše ćelijsku proliferaciju i da inicira ćelijsku diferencijaciju u ranim stadijumima karcinogeneze, ali i da promoviše tumorsku invaziju i EMT u kasnijim stadijumima, što je i pokazano u ovoj studiji, zbog čega su i bile potrebne veće koncentracije decitabina za epigenetsku regulaciju TGF- β 1-izazvanih dejstava. Dokazano je da je TGF- β 1-indukovana EMT u NSCLC zasnovana na povećanoj *ZEB* ekspresiji i sledstvenoj hipermetilaciji promotera za miR-200, odnosno na smanjenoj miR-200 ekspresiji. Tretman TGF- β 1-stimulisanih PC9 ćelija decitabinom smanjio je ekspresiju vimentina, a povećao ekspresiju E-kadherina [353].

Svojstvo decitabina da reaktivira epigenetski „utišane” tumor-supresor gene ispitivano je u *in vitro* i *in vivo* studijama. Studije su dokazale povezanost procesa inflamacije sa epigenetskim događajima. Čelije karcinoma želuca, tretirane proinflamatornim IL-1 β (10 ng/mL), pokazale su smanjenje 15-PGDH na nivou mRNA i proteina. Izlaganje IL-1 β -tretiranih TMK-1 ćelija decitabinu (5 μ M, 72 časova) povećalo je količine mRNA za 15-PGDH i to oko tri puta u poređenju sa količinama detektovanim u kontrolnoj grupi ćelija [354]. Posle stimulacije A549 ćelija rastvorom TGF- β 1 koncentracije 10 ng/mL, metilaciono-specifičan PCR potvrdio je metilaciju promotera gena za E-kadherin. Takođe, došlo je do EMT, što se zaključilo uočavanjem mezenhimalne morfologije ćelija, gubitkom međućelijskih kontakata i intenziviranjem ćelijske migracije. Decitabin, primenjen u koncentraciji od 15 μ M, tokom 48 časova, antagonizovao je dejstvo TGF- β 1 u izazivanju EMT u A549 ćelijama, što se, primenom Western blot metode, uočilo povećanjem ekspresije E-kadherina [355]. Smatra se da je *PGIS* jedan od značajnih tumor-supresora u malignim ćelijama. Genska ekspresija *PGIS* prevashodno je regulisana epigenetskim mehanizmima, odnosno metilacijom promotera *PGIS* gena i modifikacijom histona/remodelovanjem hromatina. qRT-PCR analiza pokazala je da je u ćelijama adenokarcinoma pluća (A549) i skvamoznog karcinoma pluća (SK-MES-1) decitabin, koncentracije 5 μ M, nakon 48 časova trajanja tretmana, reaktivirao „utišan” *PGIS* gen [356]. Naši rezultati pokazuju da je u A549 ćelijama decitabin, primenjen u nižim koncentracijama nego što je to bilo učinjeno u pomenutim istraživanjima, povećao količine mRNA za dva važna tumor-supresor gena, *CDHI* i *HPGD*, dok je u HT-29 ćelijama ovaj efekat uočen samo za *CDHI* gen. Ovi podaci ukazuju na različite mehanizme epigenetske regulacije tumor-supresora u malignim ćelijama pluća u kolona, odnosno upućuju nas na ispitivanje i drugih epigenetskih mehanizama u malignim ćelijama, kao što su enzimi HDAC. U MRC-5 ćelijama decitabin je smanjio ekspresiju *CDHI*, a povećao ekspresiju *HPGD* gena, čime je još jedanput potvrđeno da se regulacija i funkcija E-kadherina razlikuju u normalnim i malignim ćelijama na genetskom i epigenetskom nivou.

Rezultati različitih studija pokazali su da silibinin može da ima ulogu u epigenetskoj kontroli genske ekspresije u malignim ćelijama. Čelijska linija NSCLC (H1299) tretirana je silibininom u opsegu koncentracija 75-100 μ M, u periodu od 24 i 48 časova, što je rezultovalo smanjenjem nivoa enzima HDAC i DNMT. Takođe, ćelijske linije karcinoma kolona (SW480 i SW620) izlagane su dejstvu silibinina koncentracije 300 μ M, u periodu od 24 i 72 časova, sa rezultatom smanjenja HDAC i DNMT ekspresije [357]. U istraživanju ove doktorske disertacije upotrebljena je znatno niža koncentracija silibinina (25 μ M), ali u kombinaciji sa

decitabinom. U A549 ćelijama sva dejstva decitabina bila su izraženija pretretmanom ćelija silibininom. Dakle, u ovim ćelijama silibinin je doprineo daljem smanjenju ekspresije *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *ZEB1* gena i povećanju *CDHI* i *HPGD* ekspresije. U HT-29 ćelijama aditivno dejstvo ovog flavonolignana sa decitabinom zabeleženo je u pogledu smanjenja sve tri *DNMT* i povećanja količine mRNA za *CDHI*. Decitabin nije postigao smanjenje *ZEB1* u HT-29 ćelijama, ali je dodatak silibinina smanjio nivo *ZEB1* i povećao *HPGD* ekspresiju. Naši rezultati su u korelaciji sa rezultatima jedne studije koja je utvrdila da je 48-časovni kombinovani tretman NSCLC ćelija decitabinom, koncentracije 5 μM , i silibininom, primenjenim u rasponu koncentracija 3,75-12,5 μM , smanjio nuklearne količine Zeb1 transkripcionog represora i povećao ekspresiju E-kadherina. Takođe, silibinin je ispoljio identičan efekat u kotretmanu sa HDAC inhibitorom, trihostatinom A, što potvrđuje da silibinin može da utiče na različite epigenetske događaje. Kombinovani tretman silibinina i epigenetskih agenasa izazvao je smanjenje migratornog i invazivnog potencijala NSCLC ćelija [358]. Ovi rezultati otvaraju nove terapijske mogućnosti u primeni nižih doza demetilacionih agenasa, u kombinaciji sa silibininom.

CDCA je ispoljila slabo sinergističko dejstvo sa decitabinom u A549 ćelijama u pogledu smanjenja *DNMT3A* genske ekspresije, dok je sinergizam u smeru daljeg smanjenja *DNMT3B* ekspresije bio nešto izraženiji. Za ostale ispitivane gene, uočen je antagonizam dejstva decitabina dodatkom CDCA. Naprotiv, u HT-29 ćelijama CDCA nije pokazala nijedno poželjno sinergističko dejstvo sa decitabinom. Suprotno dejstvima CDCA, UDCA je u A549 ćelijama ispoljila kompletno aditivno dejstvo sa demetilacionim agensom, dok je u HT-29 taj efekat primećen u pogledu smanjenja ekspresije mRNA za sve tri *DNMT*. Utvrđeno je da tauro-UDCA, u različitim vrstama ćelija, ima ulogu epigenetskog modulatora koji smanjuje nivo DNMT1 i HDAC1, čime učestvuje u epigenetskim događajima koji imaju važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa, apoptoze, diferencijacije, ćelijskog starenja i brojnih metaboličkih puteva. UDCA pokazuje dejstvo na epigenetsko reprogramiranje normalnih i malignih ćelija [359]. U ćelijama holangiokarcinoma, UDCA, primenjena u koncentraciji 250 μM , tokom 24 časova, izazvala je smanjenje količina mRNA za Zeb1 i Slug transkripcione represore, čija ekspresija je bila indukovana dodatkom EGF (50 ng/mL). UDCA je, takođe, prouzrokovala smanjenje nivoa vimentina, N-kadherina i invazivnosti malignih ćelija, a povećala je količine E-kadherina. Ovo antiEMT dejstvo i smanjenje Zeb1 bilo je izraženije u ćelijama koje su tretirane kombinacijom UDCA (250 μM) i gefitiniba (10 nM). Naši rezultati odgovaraju rezultatima ove studije [293], samo što smo upotreбили deset

puta nižu koncentraciju UDCA u kombinaciji sa demetilacionim agensom. *In vitro* izlaganje ćelija Barrettovog jednjaka, u kojima je prisutna displazija, smešom konjugovanih žučnih kiselina (CA, CDCA, DCA), u ukupnoj, konačnoj koncentraciji od 400 μ M, prouzrokovalo je EMT, što se videlo kroz pojavu mezenhimalne morfologije i povećane invazivnosti ćelija. Utvrđeno je da su ove žučne kiseline povećale produkciju i sekreciju VEGF, aktivaciju receptora VEGFR, uz povećanje *ZEB1* i *ZEB2* ekspresije, kao i smanjenje *CDH1* ekspresije. Ovi događaji su opisani i u *in vivo* modelu, u tkivu jednjaka pacova sa indukovanom GERB. Takođe, imunohistohemijska analiza tkiva jednjaka pacijenata sa GERB i premalignim ezofagusnim promenama dokazala je povećanje ekspresije Zeb1 proteina, kao i smanjenje E-kadherina. Ovo značajno istraživanje utvrdilo je značaj Zeb transkripcionih represora u izazivanju EMT u Barrettovom jednjaku, stanju koje predstavlja važan faktor rizika za razvoj adenokarcinoma jednjaka [360].

Era izučavanja uticaja žučnih kiselina na epigenom je počela, sa prvim rezultatima koji ukazuju da UDCA pokazuje najveći potencijal pozitivnih uticaja na regulaciju epigenetskih događaja u malignim ćelijama, sa mogućom i izvesnom terapijskom primenom.

Oksidativni stres predstavlja stanje poremećene ravnoteže između stvaranja ROS/RNS i efikasnosti antioksidativne odbrane [361]. Postoje brojni biomarkeri koji se koriste za bolje razumevanje mehanizama kojima oksidativni stres doprinosi patofiziologiji kancera, a to je MDA, kao produkt lipidne peroksidacije, 8-OHdG, koji nastaje kao posledica oksidativnog oštećenja DNA, i utvrđivanje nivoa antioksidativnih enzima. U cilju određivanja oksidativnog statusa u eksperimentalnim grupama A549, HT-29 i MRC-5 ćelija koje su tretirane celekoksibom u našem istraživanju, ispitivali smo intenzitet lipidne peroksidacije preko generisanog MDA i aktivnosti enzima antioksidativne odbrane: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-S-transferaze (GST) i glutation peroksidaze (GPx).

Najvažniji endogeni izvori ROS i RNS jesu inflamatorne ćelije, peroksisomi i mitohondrije. U elektron-transportnom lancu mitohondrija, koji učestvuje u procesu oksidativne fosforilacije, manje od 5% molekula kiseonika se nepotpuno redukuje i konvertuje u superoksid anjon radikal. I drugi enzimski sistemi stvaraju ROS i RNS, a među njima važnu ulogu imaju enzimi COX. Značajni egzogeni izvori ovih vrsta jesu jonizujuće zračenje, hemioterapeutici, alkohol, brojne hemijske supstance, duvanski dim i infektivni agensi. ROS i RNS u niskim koncentracijama imaju važne fiziološke uloge kao signalni molekuli koji učestvuju u ćelijskom rastu, diferencijaciji i ćelijskoj smrti, ali povećana ROS/RNS produkcija povezana je sa visokom reaktivnošću ovih vrsta prema lipidima,

proteinima i nukleinskim kiselinama, čime oštećuju strukturu i funkciju komponenata ćelije. Učestvuju u svim fazama karcinogeneze, u genetskoj i epigenetskoj aktivaciji proto-onkogeni i inaktivaciji tumor-supresora, ali i u aktivaciji različitih signalnih puteva, sa sledstvenim poremećajem ćelijske homeostaze. Hronična inflamacija je posebno važna u produkciji većih količina ROS i RNS od strane imunih, ali i drugih ćelija koje su zahvaćene inflamatornim procesom, što prevazilazi kapacitet ćelijske antioksidativne odbrane i doprinosi patogenezi neoplastičnog procesa [362]. Zbog toga, cilj nam je bio da ispitamo kako jedan antiinflamatorni agens, selektivni COX-2 inhibitor, celekoksib, utiče na komponente oksidativnog stresa u malignim i normalnim ćelijama.

Prva linija antioksidativne odbrane pripada enzimu SOD, koji učestvuje u prevođenju superoksid anjon radikala u vodonik peroksid. Nastali vodonik peroksid se prevodi u vodu dejstvom CAT i GPx. Enzim GST katalizuje reakciju konjugacije sulfhidrilnih grupa redukovano glutationa sa različitim egzogenim i endogenim supstratima, uključujući hemijske karcinogene i produkte oksidativnog stresa, čime ih prevodi u hidrofилne metabolite, koji se, potom, izlučuju iz organizma [363, 364].

Povećana produkcija MDA je definitivno indikator intenziteta lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa u ćelijama. Utvrđeno je da koncentracija MDA korelira sa stadijumom maligne bolesti. Povećanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane jeste kompenzatorni mehanizam koji štiti ćeliju od oksidativnog stresa. Sa druge strane, niska aktivnost antioksidativnih enzima ukazuje na njihovu potrošnju u stanju intenzivnog stresa, tako da su i podaci o antioksidativnim enzimima u malignim ćelijama i rezultati različitih studija poprilično kontradiktorni. Nekoliko kliničkih studija je publikovalo rezultate kojima je prikazano da su koncentracije MDA bile znatno niže u ćelijama karcinoma želuca i kolona, u poređenju sa MDA nivoom u kontrolnoj grupi. Naprotiv, maligne ćelije su pokazivale veći udeo 8-OHdG. Postoji pretpostavka da je niži nivo MDA povezan sa agresivnošću tumora u smislu da brzoproliferišuće ćelije pokazuju rezistenciju prema lipidnoj peroksidaciji i povećavaju ekspresiju antioksidativnih enzima. Druge studije su objavile potpuno suprotne rezultate, u kojima je prikazan povećan nivo MDA u malignim ćelijama, uz smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima [362]. U studiji koja je uključila 222 pacijenata obolelih od karcinoma pluća i 207 zdravih ispitanika analiziran je nivo 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina u urinu, MDA u krvnoj plazmi, i aktivnost SOD i GPx u eritrocitima. Utvrđeno je da su nivoi 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozina i MDA bili statistički

značajno viši ($p < 0,001$), a aktivnosti enzima statistički niži ($p < 0,001$) kod obolelih od karcinoma pluća, u odnosu na zdrave ispitanike [365].

U našoj studiji, celekoksib (25 μM) je smanjio koncentraciju MDA u A549, HT-29 i MRC-5 ćelijama, što ukazuje da ovaj agens ima potencijal u smanjenju intenziteta lipidne peroksidacije u malignim i normalnim ćelijama. *In vivo* studija na životinjskom modelu kolitisa i IBD ustanovila je da oralna primena celekoksiba smanjuje tkivne nivoe MDA i stepen kolitisa u eksperimentalnim životinjama, dakle, deluje antioksidativno i antiinflamatorno [366]. Studija koja se bavila ispitivanjem inflamacije i procesa ateroskleroze na životinjskim modelima sa hiperholesterolemijom pokazala je da celekoksib pokazuje antioksidativno dejstvo kroz povećanje aktivnosti enzima SOD i GPx u uzorcima krvi životinja [367]. U našem istraživanju, u poređenju sa kontrolnom grupom, celekoksib je povećao aktivnost glutation-zavisnih enzima (GST i GPx) u ispitivanim ćelijskim linijama. Aktivnost CAT se povećala u obe maligne ćelijske kulture, dok je u normalnim ćelijama ostala nepromenjena. U HT-29 i MRC-5 ćelijama aktivnost SOD se povećala, dok se u A549 ćelijama smanjila dodatkom celekoksiba. Naši rezultati ukazuju na antioksidativna dejstva celekoksiba. S obzirom na činjenicu da je odavno poznato da ROS i RNS pokazuju dualne uloge u malignim i normalnim ćelijama, potrebna su dalja ispitivanja ćelijski-specifičnih događaja u oksidativnom stresu. Visok nivo oksidanasa oštećuje ćelijske komponente, uključujući i DNA, vodeći ćeliju ka ćelijskoj smrti, dok niži ROS/RNS nivoi izazivaju epigenetske alteracije i ćelijsko starenje. Odnos oksidanasa i antioksidanasa zavisi od tipa ćelije, aktiviranih signalnih puteva i metaboličkog statusa, odnosno od svih faktora kojima maligne ćelije osiguravaju vlastito preživljavanje i proliferaciju. Strategije usmerene ka ROS/RNS indukciji ili inhibiciji treba da budu pažljivo kontrolisane i detaljno proučene imajući u vidu činjenicu da su pojedini onkološki terapijski pristupi upravo zasnovani na izazivanju oksidativnog stresa u malignim ćelijama [368].

Naši rezultati pokazuju da inhibicija COX-2 enzimske aktivnosti deluje u pravcu smanjenja vijabilnosti malignih ćelija, odnosno inhibicija COX-2 enzimske aktivnosti selektivnim COX-2 inhibitorom, na indirektan način, ukazuje na važnu ulogu izoenzima COX-2 u procesima inflamacije, proliferacije, apoptoze, ćelijskog transporta, invazije, metastaziranja i antioksidativne zaštite.

Istraživanja su prikazala ulogu izoenzima COX-2 u esencijalnim komponentama karcinogeneze, ali i da različiti hemioterapijski agensi i jonizovano zračenje povećavaju ekspresiju COX-2 i PGE2, što može biti jedan od uzroka rezistencije malignih ćelija na

primenjene terapijske protokole. Ovi mehanizmi otvaraju mogućnosti za koncept kombinacije hemioterapijskih i/ili radioterapijskih modaliteta sa COX-2 selektivnim inhibitorima. Ispitivanja su pokazala da PGE2 može da modulira imunološki odgovor, posredstvom inhibicije proliferacije citotoksičnih T limfocita, inhibicije diferencijacije i funkcije dendritičnih ćelija i antitumorske aktivnosti NK ćelija i makrofaga, kao i kroz favorizaciju sinteze imunosupresivnih citokina, poput IL-10, i subpopulacije Th2 limfocita. Ovakvi podaci ukazuju na moguću kombinovanu primenu imunoterapije i COX-2 inhibitora, što svakako predstavlja aktuelno i nedovoljno istraženo područje [277].

Potrebna su dalja ispitivanja izoenzima COX-2 i prostanoida, kao i razvoj novih terapijskih strategija koje bi modifikovale neke od komponenata COX-2-zavisne ćelijske signalizacije. Posebno se nalaze u interesu inhibitori izoenzima mPGES-1 i EP receptora, što otvara mogućnosti i za definisanje novih biomarkera u medicinskoj onkologiji. Veliki potencijal primene selektivnih COX-2 inhibitora u prevenciji i terapiji malignih bolesti dovodi u pitanje i bezbednost njihove primene, sa ciljem ispitivanja efekata manjih koncentracija i doza ovih lekova. Takođe, ciljevi istraživanja treba da budu usmereni i ka dizajnu novih kombinovanih pristupa COX-2 inhibitora sa prirodnim komponentama, koje će sinergistički delovati na COX-2-zavisne ćelijske signalne puteve.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata *in vitro* studije, analiza genske ekspresije i biohemijskih pokazatelja oksidativnog stresa u ćelijama adenokarcinoma pluća (A549), adenokarcinoma kolona (HT-29) i fetalnih plućnih fibroblasta (MRC-5), mogu se izneti sledeći zaključci:

- Celekoksib, selektivni inhibitor enzima COX-2, ispoljava koncentracijski-zavisnu inhibiciju vijabilnosti i proliferacije malignih i normalnih ćelija, odnosno pokazuje koncentracijski-zavisan porast citotoksičnosti prema malignim i normalnim ćelijama, što ukazuje na značaj COX-2 izoenzima u preživljavanju i proliferaciji ćelija. U skladu sa dobijenim IC₅₀ vrednostima, zaključuje se da su maligne ćelije osetljivije na selektivnu COX-2 inhibiciju, u odnosu na normalne ćelije, što upućuje na važnu ulogu COX-2 izoenzima, esencijalne komponente procesa hronične inflamacije, u etiopatogenezi adenokarcinoma pluća i adenokarcinoma kolona.
- Silibinin i žučne kiseline ispoljavaju koncentracijski-zavisan porast citotoksične aktivnosti na malignim i normalnim ćelijama. Ćelije adenokarcinoma pluća i kolona pokazuju veću osetljivost na citotoksično dejstvo silibinina i UDCA, u poređenju sa normalnim ćelijama. Ćelije adenokarcinoma kolona su osetljivije na dejstvo CDCA, u odnosu na normalne ćelije i ćelije adenokarcinoma pluća.
- CDCA pokazuje izraženiju citotoksičnost, u poređenju sa UDCA, i ta činjenica ukazuje da je hidrofobnost glavna determinanta koja određuje citotoksičnu aktivnost žučnih kiselina u malignim i normalnim ćelijama.
- U A549 i HT-29 ćelijama celekoksib smanjuje ekspresiju gena koji su uključeni u sintezu COX-2 i PGE2 (*PTGS2* i *PTGES*), a povećava ekspresiju gena zaduženog za katabolizam PGE2 (*HPGD*), pokazujući značajno dejstvo na inhibiciju COX-2/PGE2-zavisnih inflamatornih događaja u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona. Silibinin pokazuje sinergističko antiinflamatorno dejstvo sa celekoksibom u pogledu povećanja ekspresije *HPGD* gena u A549 i HT-29, i smanjenja ekspresije *PTGS2* gena u HT-29 ćelijama. UDCA ispoljava potpuno antiinflamatorno dejstvo, sinergističko sa celekoksibom u A549 ćelijama, dok se u HT-29 ćelijama taj sinergizam uočava u pogledu smanjenja ekspresije *PTGS2* gena i povećanja ekspresije *HPGD* gena.
- U A549 i HT-29 ćelijama celekoksib smanjuje količine mRNA za *NFκB*. Uzimajući u razmatranje naučne činjenice koje definišu NF-κB kao glavni transkripcioni faktor koji utiče na sintezu i aktivnost COX-2 enzima, može se zaključiti da je NF-κB značajan transkripcioni

faktor koji reguliše COX-2 ekspresiju u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona. U obe maligne ćelijske linije silibinin ispoljava sinergističko dejstvo u smanjenju količine ovog proinflatornog faktora transkripcije, dok su ispitivane žučne kiseline to sinergističko dejstvo ispoljile samo u HT-29 ćelijama.

- Enzim COX-2 može imati ulogu u smanjenju ekspresije p53 i PTEN tumor-supresora. U A549 ćelijama celekoksib povećava ekspresiju *TP53*, a u A549 i HT-29 ćelijama povećava *PTEN* ekspresiju. U obe maligne ćelijske linije dodatak silibinina i UDCA celekoksibu povećava količine mRNA za *TP53* i *PTEN* gene. U A549 ćelijama i CDCA deluje sinergistički sa celekoksibom na nivo ovih tumor-supresora.

- Enzim COX-2 utiče na proces apoptoze u malignim ćelijama. Celekoksib povećava količine mRNA za proapoptotski *BAX* gen, a smanjuje količine mRNA za antiapoptotski *BCL2* gen u A549 i HT-29 ćelijama. Silibinin i žučne kiseline različito deluju na gene uključene u proces apoptoze, ali dodatak silibinina i žučnih kiselina celekoksibu neminovno usmerava maligne ćelije ka apoptozi.

- S obzirom na činjenicu da u A549 ćelijama celekoksib smanjuje ekspresiju *ABCC1* gena, koji kodira sintezu transportnog proteina MRP1, može se zaključiti da enzim COX-2 ima ulogu u povećanju ekspresije ovog transportera u ćelijama adenokarcinoma pluća, čime može da doprinosi hemorezistenciji. Sinergističko dejstvo sa celekoksibom, u pogledu daljeg smanjenja *ABCC1* nivoa u A549, pokazuje UDCA. Celekoksib ne smanjuje *ABCC1* ekspresiju u HT-29 ćelijama, ali dodatak silibinina i žučnih kiselina dovodi do smanjenja *ABCC1* ekspresije, što ukazuje na drugačiju povezanost COX-2 i MRP1 u ćelijama adenokarcinoma kolona.

- COX-2 učestvuje u regulaciji ekspresije gena koji su zaduženi za proces epitelno-mezenhimalne tranzicije u malignim ćelijama, odnosno gena koji imaju ulogu u invaziji i metastaziranju malignih ćelija. Celekoksib povećava količine mRNA za *CDH1*, a smanjuje količine mRNA za *MMP2* i *MMP9* u A549 i HT-29 ćelijama. Silibinin i UDCA pokazuju povoljna dejstva na smanjenje invazivnosti i metastatskog potencijala malignih ćelija s obzirom na sinergistički uticaj sa celekoksibom u pogledu modulacije ekspresije navedenih gena.

- COX-2 može biti u vezi sa regulacijom receptora i homeostaze žučnih kiselina na tkivno-specifičan način. Celekoksib neznatno povećava ekspresije *FXR* i *SHP* u A549 ćelijama, dok iste blago smanjuje u HT-29 ćelijama. CDCA je potentan induktor *FXR* i *SHP* genske ekspresije.

- COX-2-zavisni signalni putevi mogu da imaju ulogu u modifikaciji redoks događaja u malignim i normalnim ćelijama, što je dokazano u ovoj studiji kroz dejstva celekoksiba na intenzitet lipidne peroksidacije i aktivnosti antioksidativnih enzima.
- Celekoksib smanjuje koncentraciju MDA, značajnog produkta lipidne peroksidacije, u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona, ali i u normalnim ćelijama. Dodatak silibinina deluje sinergistički na dalje smanjenje koncentracije MDA u malignim i normalnim ćelijama, dok su dejstva žučnih kiselina tkivno, odnosno ćelijski-specifična.
- Celekoksib ispoljava antioksidativna dejstva i kroz sposobnost povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima. U malignim i normalnim ćelijama, u ovom istraživanju, celekoksib je povećao aktivnost glutation-zavisnih enzima (GST i GPx). Aktivnost CAT se povećala u obe maligne ćelijske kulture, dok je u normalnim ćelijama ostala nepromenjena. U HT-29 i MRC-5 ćelijama aktivnost SOD se povećala, dok se u A549 ćelijama smanjila dodatkom celekoksiba. Silibinin i žučne kiseline moduliraju antioksidativna dejstva celekoksiba na način koji zavisi od vrste enzima i tipa ćelije.
- Ovako heterogena antioksidativna dejstva kombinacija celekoksiba i prirodnih supstanci su očekivana s obzirom na to da ROS i RNS pokazuju dualne i kompleksne uloge u malignim i normalnim ćelijama, što nameće potrebe daljih ispitivanja COX-2-zavisnih, ćelijski-specifičnih događaja u oksidativnom stresu, kao i načina njihove modulacije u malignim tumorima pluća i kolona.
- Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije prikazuju moguće uloge enzima COX-2 u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona, kao i mogućnost modifikacije ekspresije gena koji imaju ulogu u procesima inflamacije, proliferacije, apoptoze, ćelijskog transporta, invazije, metastaziranja i antioksidativne zaštite primenom selektivnog COX-2 inhibitora. Takođe, potvrđena su sinergistička antineoplastična dejstva silibinina i žučnih kiselina sa selektivnim COX-2 inhibitorom, što otvara mogućnosti primene novih kombinovanih farmakoloških strategija u terapiji adenokarcinoma pluća i kolona.
- 5-aza-2'-deoksicitidin (decitabin) izaziva koncentracijski-zavisan porast citotoksične aktivnosti, kao i smanjenje količine mRNA za sva tri enzima DNMT (*DNMT1*, *DNMT3A* i *DNMT3B*) u A549 i HT-29 ćelijama, što govori o važnosti epigenetskih događaja u malignim ćelijama.
- U A549 ćelijama decitabin je smanjio količinu mRNA za transkripcioni represor *ZEB1*, a povećao je količine mRNA za tumor-supresor gene *CDHI* i *HPGD*, što ukazuje da DNMT mogu da aktiviraju Zeb1, koji ima sposobnost vezivanja za promoterske regione tumor-supresor gena, smanjujući njihovu transkripciju. Iz navedenih rezultata, može se

zaključiti da je smanjenje genske ekspresije za sve tri DNMT i Zeb1 u ćelijama adenokarcinoma pluća značajan mehanizam kojim se decitabinom, kao demetilacionim agensom, reaktivira transkripcija epigenetski „utišanih” tumor-supresor gena koji kodiraju sintezu E-kadherina i 15-PGDH.

- U HT-29 ćelijama decitabin nije smanjio količinu mRNA za *ZEB1* i nije povećao količine mRNA za *HPGD*, ali je povećao nivo mRNA za *CDHI* gen.
- Ovim rezultatima može se izneti zaključak da su u ćelijama adenokarcinoma pluća i kolona prisutni različiti mehanizmi epigenetske regulacije tumor-supresora, a zapaža se i važnost daljih ispitivanja drugih epigenetskih mehanizama, kao što su enzimi HDAC, u reaktivaciji epigenetski „utišanih” tumor-supresor gena.
- U obe maligne ćelijske linije silibinin je doprineo smanjenju ekspresije *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* i *ZEB1* gena i povećanju *CDHI* i *HPGD* ekspresije. Dakle, ovaj flavonolignan poseduje izraženu sposobnost modifikacije epigenetskih aspekata kancerogeneze.
- Ako se uporede dejstva žučnih kiselina, definitivno UDCA ima prednost u uticaju na epigenetske događaje u malignim ćelijama. UDCA je u A549 ćelijama ispoljila kompletno aditivno dejstvo sa decitabinom, dok je u HT-29 taj efekat primećen u pogledu smanjenja ekspresije mRNA za sve tri DNMT.
- Ovi rezultati otvaraju nove terapijske mogućnosti u polju epigenetike, tačnije u primeni nižih doza demetilacionih agenasa u kombinaciji sa silibininom i UDCA. Ovo je posebno važno ako se pogledaju rezultati za citotoksičnu aktivnost decitabina u normalnim MRC-5 ćelijama, koji prikazuju da su normalne ćelije osetljivije na dejstvo ovog demetilacionog agensa. Dakle, primena nižih doza decitabina u kombinaciji sa silibininom i UDCA obećava i manju toksičnost prema normalnim ćelijama.
- Rezultati ove doktorske disertacije pružaju osnovu za dalja ispitivanja uloga izoenzima COX-2 i epigenetskih događaja u adenokarcinomu pluća i adenokarcinomu kolona, sa ciljem uvođenja novih COX-2-zavisnih terapijskih strategija i epigenetskih agenasa u kliničko-onkološku praksu, ali i u hemoprevenciju kod visokorizične populacije.

7. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-49.
2. Gangwar SK, Kumar A, Yap KC, Jose S, Parama D, Sethi G, et al. Targeting Nuclear Receptors in Lung Cancer-Novel Therapeutic Prospects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022; 15(5): 624.
3. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol.* 2022; 17(3): 362-87.
4. Sánchez-Ortega M, Carrera AC, Garrido A. Role of NRF2 in Lung Cancer. *Cells.* 2021; 10(8): 1879.
5. Cavic M, Kovacevic T, Zaric B, Stojiljkovic D, Korda NJ, Rancic M, et al. Lung Cancer in Serbia. *J Thorac Oncol.* 2022; 17(7): 867-72.
6. Cantin AM. Cellular response to cigarette smoke and oxidants: adapting to survive. *Proc Am Thorac Soc.* 2010; 7(6): 368-75.
7. Szalontai K, Gémes N, Furák J, Varga T, Neuperger P, Balog JÁ, et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Biomarkers, and Paving the Way to Lung Cancer. *J Clin Med.* 2021; 10(13): 2889.
8. Corrales L, Rosell R, Cardona AF, Martín C, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than tobacco smoking. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 148: 102895.
9. Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Śliwińska-Mossoń M. Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13): 4569.
10. Benusiglio PR, Fallet V, Sanchis-Borja M, Coulet F, Cadranet J. Lung cancer is also a hereditary disease. *Eur Respir Rev.* 2021; 30(162): 210045.
11. Wu KL, Tsai YM, Lien CT, Kuo PL, Hung AJ. The Roles of MicroRNA in Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(7): 1611.
12. Fois SS, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois AG, Cossu A, Palmieri G. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(2): 612.

13. Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2022; 40(6): 586-97.
14. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012; 3(3): 153-73.
15. Vekic B, Dragojevic-Simic V, Jakovljevic M, Pilipovic F, Simic R, Zivic R, et al. Medical Cost of Colorectal Cancer Services in Serbia Between 2014 and 2017: National Data Report. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 526.
16. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients.* 2019; 11(1): 164.
17. Shawki S, Ashburn J, Signs SA, Huang E. Colon Cancer: Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018; 27(2): 269-87.
18. Cheng Y, Ling Z, Li L. The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2020; 11: 615056.
19. Ternes D, Karta J, Tsenkova M, Wilmes P, Haan S, Letellier E. Microbiome in Colorectal Cancer: How to Get from Meta-omics to Mechanism? *Trends Microbiol.* 2020; 28(5): 401-23.
20. Boland PM, Yurgelun MB, Boland CR. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(3): 217-31.
21. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 197.
22. Sakata S, Larson DW. Targeted Therapy for Colorectal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2022; 31(2): 255-64.
23. Motta R, Cabezas-Camarero S, Torres-Mattos C, Riquelme A, Calle A, Figueroa A, et al. Immunotherapy in microsatellite instability metastatic colorectal cancer: Current status and future perspectives. *J Clin Transl Res.* 2021; 7(4): 511-22.
24. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nat Rev Immunol.* 2021; 21(10): 653-67.
25. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C, et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019; 25(12): 1822-32.

26. Liu M, Kalbasi A, Beatty GL. Functio Laesa: Cancer Inflammation and Therapeutic Resistance. *J Oncol Pract.* 2017; 13(3): 173-80.
27. Hou J, Karin M, Sun B. Targeting cancer-promoting inflammation - have anti-inflammatory therapies come of age? *Nat Rev Clin Oncol.* 2021; 18(5): 261-79.
28. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017; 9(6): 7204-18.
29. Tvaroška I, Selvaraj C, Koča J. Selectins-The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules-A Review. *Molecules.* 2020; 25(12): 2835.
30. Zappavigna S, Cossu AM, Grimaldi A, Bocchetti M, Ferraro GA, Nicoletti GF, et al. Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(7): 2605.
31. Mitchell JA, Kirkby NS. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2019; 176(8): 1038-50.
32. Liu R, Xu KP, Tan GS. Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. *Eur J Pharmacol.* 2015; 769: 127-33.
33. Carrossini N, Meireles Da Costa N, Andrade-Barreto E, Sousa VPL, Nicolau-Neto P, Souza-Santos PT, et al. Lipid droplet biogenesis and COX-2 pathway activation are triggered by Barrett's esophagus and adenocarcinoma, but not esophageal squamous cell carcinoma risk factors. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 981.
34. Stachowicz K. Deciphering the mechanisms of regulation of an excitatory synapse via cyclooxygenase-2. A review. *Biochem Pharmacol.* 2021; 192: 114729.
35. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem.* 2007; 50(7): 1425-41.
36. Marnett LJ. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009; 49: 265-90.
37. Kim HS, Kim T, Kim MK, Suh DH, Chung HH, Song YS. Cyclooxygenase-1 and -2: molecular targets for cervical neoplasia. *J Cancer Prev.* 2013; 18(2): 123-34.
38. Oksuz E, Atalar F, Tanırverdi G, Bilir A, Shahzadi A, Yazici Z. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016; 126(2): 271-8.
39. Huang RY, Chen GG. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1815(2): 158-69.

40. Brown JR, DuBois RN. Cyclooxygenase as a target in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(12 Pt 2): 4266-9s.
41. Gong Z, Huang W, Wang B, Liang N, Long S, Li W, et al. Interplay between cyclooxygenase2 and microRNAs in cancer (Review). *Mol Med Rep.* 2021; 23(5): 347.
42. Dovizio M, Alberti S, Guillem-Llobat P, Patrignani P. Role of platelets in inflammation and cancer: novel therapeutic strategies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014; 114(1): 118-27.
43. Smeda M, Kij A, Proniewski B, Matyjaszczyk-Gwarda K, Przyborowski K, Jaształ A, et al. Unexpected effects of long-term treatment with acetylsalicylic acid on late phase of pulmonary metastasis in murine model of orthotopic breast cancer. *PLoS One.* 2020; 15(4): e0230520.
44. Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Expression of thromboxane synthase, TBXAS1 and the thromboxane A2 receptor, TBXA2R, in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol.* 2005; 2: 23.
45. Ekambaram P, Lambiv W, Cazzolli R, Ashton AW, Honn KV. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30(3-4): 397-408.
46. Rucker D, Dhamoon AS. Physiology, Thromboxane A2. 2021 Sep 14. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–*. PMID: 30969639.
47. Lucotti S, Cerutti C, Soyer M, Gil-Bernabé AM, Gomes AL, Allen PD, et al. Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A2. *J Clin Invest.* 2019; 129(5): 1845-62.
48. Huang QC, Huang RY. The cyclooxygenase-2/thromboxane A2 pathway: a bridge from rheumatoid arthritis to lung cancer? *Cancer Lett.* 2014; 354(1): 28-32.
49. Cathcart MC, Gately K, Cummins R, Kay E, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. Examination of thromboxane synthase as a prognostic factor and therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2011; 10: 25.
50. Huang RY, Li MY, Ng CS, Wan IY, Kong AW, Du J, et al. Thromboxane A2 receptor α promotes tumor growth through an autoregulatory feedback pathway. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5(6): 380-90.
51. Rahman MS. Prostacyclin: A major prostaglandin in the regulation of adipose tissue development. *J Cell Physiol.* 2019; 234(4): 3254-62.

52. Cathcart MC, Reynolds JV, O'Byrne KJ, Pidgeon GP. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1805(2): 153-66.
53. Katusic ZS, Santhanam AV, He T. Vascular effects of prostacyclin: does activation of PPAR δ play a role? *Trends Pharmacol Sci*. 2012; 33(10): 559-64.
54. Sasaki Y, Ochiai T, Takamura M, Kondo Y, Yokoyama C, Hara S. Role of prostacyclin synthase in carcinogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2017; 133: 49-52.
55. Geraci MW. Targeting the prostacyclin/peroxisome proliferator-activated receptor gamma axis in lung cancer chemoprevention. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2018; 129: 48-55.
56. Tennis MA, Smith AJ, Dwyer-Nield LD, Keith RL. Intranasal Iloprost Prevents Tumors in a Murine Lung Carcinogenesis Model. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2022; 15(1): 11-6.
57. Sasaki Y, Kamiyama S, Kamiyama A, Matsumoto K, Akatsu M, Nakatani Y, et al. Genetic-deletion of Cyclooxygenase-2 Downstream Prostacyclin Synthase Suppresses Inflammatory Reactions but Facilitates Carcinogenesis, unlike Deletion of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1. *Sci Rep*. 2015; 5: 17376.
58. New ML, White CM, McGonigle P, McArthur DG, Dwyer-Nield LD, Merrick DT, et al. Prostacyclin and EMT Pathway Markers for Monitoring Response to Lung Cancer Chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2018; 11(10): 643-54.
59. Cheng H, Huang H, Guo Z, Chang Y, Li Z. Role of prostaglandin E2 in tissue repair and regeneration. *Theranostics*. 2021; 11(18): 8836-54.
60. Nasrallah R, Hassouneh R, Hébert RL. PGE2, Kidney Disease, and Cardiovascular Risk: Beyond Hypertension and Diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27(3): 666-76.
61. Kochel TJ, Fulton AM. Multiple drug resistance-associated protein 4 (MRP4), prostaglandin transporter (PGT), and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) as determinants of PGE2 levels in cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015; 116-117: 99-103.
62. Wang D, DuBois RN. Role of prostanoids in gastrointestinal cancer. *J Clin Invest*. 2018; 128(7): 2732-42.
63. Brand TM, Iida M, Luthar N, Starr MM, Huppert EJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol*. 2013; 108(3): 370-7.

64. Bazzani L, Donnini S, Finetti F, Christofori G, Ziche M. PGE2/EP3/SRC signaling induces EGFR nuclear translocation and growth through EGFR ligands release in lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2017; 8(19): 31270-87.
65. Yan M, Rerko RM, Platzer P, Dawson D, Willis J, Tong M, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase, a COX-2 oncogene antagonist, is a TGF-beta-induced suppressor of human gastrointestinal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(50): 17468-73.
66. Tong M, Ding Y, Tai HH. Histone deacetylase inhibitors and transforming growth factor-beta induce 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in human lung adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(6): 701-9.
67. Yang L, Amann JM, Kikuchi T, Porta R, Guix M, Gonzalez A, et al. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling elevates 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in non-small-cell lung cancer. *Cancer Res*. 2007; 67(12): 5587-93.
68. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*. 2012; 188(1): 21-8.
69. Ching MM, Reader J, Fulton AM. Eicosanoids in Cancer: Prostaglandin E2 Receptor 4 in Cancer Therapeutics and Immunotherapy. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 819.
70. Wang T, Jing B, Xu D, Liao Y, Song H, Sun B, et al. PTGES/PGE2 signaling links immunosuppression and lung metastasis in Gprc5a-knockout mouse model. *Oncogene*. 2020; 39(15): 3179-94.
71. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu S, Zheng L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology*. 2015; 4(7): e1016700.
72. Ruan D, So SP. Prostaglandin E2 produced by inducible COX-2 and mPGES-1 promoting cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Life Sci*. 2014; 116(1): 43-50.
73. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*. 2013; 23(12): 620-33.
74. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30(1): 87.
75. Komatsu N, Kajiya M, Morimoto S, Motoike S, Yoshii H, Iwata T, et al. Cox2-mediated PGE2 production via p38/JNK-c-fos signaling inhibits cell apoptosis in 3D floating

culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 530(2): 448-54.

76. Semaan J, Pinon A, Rioux B, Hassan L, Limami Y, Pouget C, et al. Resistance to 3-HTMC-Induced Apoptosis Through Activation of PI3K/Akt, MEK/ERK, and p38/COX-2/PGE2 Pathways in Human HT-29 and HCT116 Colorectal Cancer Cells. *J Cell Biochem.* 2016; 117(12): 2875-85.

77. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.

78. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(2): 448.

79. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019; 43(6): 582-92.

80. Sheikh MS, Fornace AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia.* 2000; 14(8): 1509-13.

81. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(6): 362-74.

82. Martin S, Phillips DC, Szekely-Szucs K, Elghazi L, Desmots F, Houghton JA. Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae. *Cancer Res.* 2005; 65(24): 11447-58.

83. Yamanaka Y, Shiraki K, Inoue T, Miyashita K, Fuke H, Yamaguchi Y, et al. COX-2 inhibitors sensitize human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Mol Med.* 2006; 18(1): 41-7.

84. Zhu J, May S, Ulrich C, Stockfleth E, Eberle J. High ROS Production by Celecoxib and Enhanced Sensitivity for Death Ligand-Induced Apoptosis in Cutaneous SCC Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(7): 3622.

85. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019; 20(3): 175-93.

86. Vo TT, Letai A. BH3-only proteins and their effects on cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 687: 49-63.

87. Flores-Romero H, Hohorst L, John M, Albert MC, King LE, Beckmann L, et al. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *EMBO J.* 2022; 41(2): e108690.
88. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58(2): 362-6.
89. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(21): 11280-5.
90. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1585(2-3): 114-25.
91. Zhang T, Li Y, Zhu R, Song P, Wei Y, Liang T, et al. Transcription Factor p53 Suppresses Tumor Growth by Prompting Pyroptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 8746895.
92. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet.* 2016; 5(2): 84-8.
93. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2018; 10(8): 248.
94. Saltos A, Shafique M, Chiappori A. Update on the Biology, Management, and Treatment of Small Cell Lung Cancer (SCLC). *Front Oncol.* 2020; 10: 1074.
95. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci.* 2020; 22(1): 130.
96. Kratz CP, Achatz MI, Brugières L, Frebourg T, Garber JE, Greer MC, et al. Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(11): e38-e45.
97. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016; 6(3): a026104.
98. Wang X, Simpson ER, Brown KA. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. *Cancer Res.* 2015; 75(23): 5001-7.
99. Garg R, Blando JM, Perez CJ, Lal P, Feldman MD, Smyth EM, et al. COX-2 mediates pro-tumorigenic effects of PKC ϵ in prostate cancer. *Oncogene.* 2018; 37(34): 4735-49.

100. Man X, Piao C, Lin X, Kong C, Cui X, Jiang Y. USP13 functions as a tumor suppressor by blocking the NF- κ B-mediated PTEN downregulation in human bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1): 259.
101. Nennig SE, Schank JR. The Role of NF κ B in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol.* 2017; 52(2): 172-9.
102. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005; 446(5): 475-82.
103. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.* 2020; 8(3): 287-97.
104. Liu Z, Jiang Y, Hou Y, Hu Y, Cao X, Tao Y, et al. The I κ B family member Bcl-3 stabilizes c-Myc in colorectal cancer. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5(4): 280-2.
105. Rasmi RR, Sakthivel KM, Guruvayoorappan C. NF- κ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2020; 130: 110569.
106. Gaptulbarova KA, Tsyganov MM, Pevzner AM, Ibragimova MK, Litviakov NV. NF- κ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer. *Exp Oncol.* 2020; 42(4): 263-9.
107. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1): 209.
108. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12: 86.
109. Blakely CM, Pazarentzos E, Olivás V, Asthana S, Yan JJ, Tan I, et al. NF- κ B-activating complex engaged in response to EGFR oncogene inhibition drives tumor cell survival and residual disease in lung cancer. *Cell Rep.* 2015; 11(1): 98-110.
110. Kunnumakkara AB, Shabnam B, Girisa S, Harsha C, Banik K, Devi TB, et al. Inflammation, NF- κ B, and Chronic Diseases: How are They Linked? *Crit Rev Immunol.* 2020; 40(1): 1-39.
111. Pordanjani SM, Hosseinimehr SJ. The Role of NF- κ B Inhibitors in Cell Response to Radiation. *Curr Med Chem.* 2016; 23(34): 3951-63.
112. Ghasemi F, Shafiee M, Banikazemi Z, Pourhanifeh MH, Khanbabaei H, Shamshirian A, et al. Curcumin inhibits NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathol Res Pract.* 2019; 215(10): 152556.

113. Romero-Estrada A, Boto A, González-Christen J, Romero-Estudillo I, Garduño-Ramírez ML, Razo-Hernández RS, et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking Study of 3-Amino and 3-Hydroxy-seco A Derivatives of α -Amyrin and 3-Epilupeol as Inhibitors of COX-2 Activity and NF- κ B Activation. *J Nat Prod.* 2022; 85(4): 787-803.
114. St-Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol.* 2004; 24(5): 1311-24.
115. Chi F, Wu R, Jin X, Jiang M, Zhu X. HER2 induces cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer by upregulating COX-2 expression via MEK/ERK signaling pathway. *Onco Targets Ther.* 2016; 9: 2709-16.
116. Guo Y, Song J, Wang Y, Huang L, Sun L, Zhao J, et al. Concurrent Genetic Alterations and Other Biomarkers Predict Treatment Efficacy of EGFR-TKIs in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *Front Oncol.* 2020; 10: 610923.
117. Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, Tolia M, Tsapakidis K, Galanopoulos M, et al. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann Transl Med.* 2018; 6(8): 145.
118. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012; 487(7407): 330-7.
119. Ugai T, Zhao M, Shimizu T, Akimoto N, Shi S, Takashima Y, et al. Association of PIK3CA mutation and PTEN loss with expression of CD274 (PD-L1) in colorectal carcinoma. *Oncoimmunology.* 2021; 10(1): 1956173.
120. Álvarez-García V, Tawil Y, Wise HM, Leslie NR. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol.* 2019; 59: 66-79.
121. Bononi A, Pinton P. Study of PTEN subcellular localization. *Methods.* 2015; 77-78: 92-103.
122. Gkoutakos A, Sartori G, Falcone I, Piro G, Ciuffreda L, Carbone C, et al. PTEN in Lung Cancer: Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around. *Cancers (Basel).* 2019; 11(8): 1141.
123. Wu JC, Tsai HE, Hsiao YH, Wu JS, Wu CS, Tai MH. Topical MTII Therapy Suppresses Melanoma Through PTEN Upregulation and Cyclooxygenase II Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(2): 681.

124. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol.* 2010; 2010: 215158.
125. Garrido JAMG, Alcantara KMM, Danac JMC, Serrano FEC, Cutiongco-de la Paz EM, Garcia RL. The Novel Phosphatase Domain Mutations Q171R and Y65S Switch PTEN from Tumor Suppressor to Oncogene. *Cells.* 2021; 10(12): 3423.
126. Majumder M, Dunn L, Liu L, Hasan A, Vincent K, Brackstone M, et al. COX-2 induces oncogenic micro RNA miR655 in human breast cancer. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 327.
127. Li W, Zhang T, Guo L, Huang L. Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018; 37(1): 223.
128. Shen H, Zhu F, Liu J, Xu T, Pei D, Wang R, et al. Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2014; 9(7): e103305.
129. Liu B, Qu L, Tao H. Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance. *Cell Biol Int.* 2009; 34(1): 21-5.
130. Dharmapuri G, Doneti R, Philip GH, Kalle AM. Celecoxib sensitizes imatinib-resistant K562 cells to imatinib by inhibiting MRP1-5, ABCA2 and ABCG2 transporters via Wnt and Ras signaling pathways. *Leuk Res.* 2015; 39(7): 696-701.
131. Chen SF, Zhang ZY, Zhang JL. Meloxicam increases intracellular accumulation of doxorubicin via downregulation of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in A549 cells. *Genet Mol Res.* 2015; 14(4): 14548-60.
132. Gupta P, Jani KA, Yang DH, Sadoqi M, Squillante E, Chen ZS. Revisiting the role of nanoparticles as modulators of drug resistance and metabolism in cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016; 12(3): 281-9.
133. Ye Z, Lu Y, Wu T. The impact of ATP-binding cassette transporters on metabolic diseases. *Nutr Metab (Lond).* 2020; 17: 61.
134. Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life.* 2007; 59(12): 752-7.
135. Chen XY, Yang Y, Wang JQ, Wu ZX, Li J, Chen ZS. Overexpression of ABCC1 Confers Drug Resistance to Betulin. *Front Oncol.* 2021; 11: 640656.

136. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol.* 2015; 35 Suppl: S244-S275.
137. Majidpoor J, Mortezaee K. Steps in metastasis: an updated review. *Med Oncol.* 2021; 38(1): 3.
138. Han HJ, Sung JY, Kim SH, Yun UJ, Kim H, Jang EJ, et al. Fibronectin regulates anoikis resistance via cell aggregate formation. *Cancer Lett.* 2021; 508: 59-72.
139. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal.* 2014; 7(344): re8.
140. Pećina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 2003; 3(1): 17.
141. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018; 121: 11-22.
142. Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin Beyond Structure: A Signaling Hub in Colon Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(11): 2756.
143. Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, et al. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(10): 5338-45.
144. Xing RC, Zheng J, Zheng WH, Qin ZP, Liu W, Yao RC. Relevance of E-cadherin expression to EGFR-TKI molecular targeted therapy sensitivity/resistance and its clinical significance. *Genet Mol Res.* 2015; 14(2): 5785-92.
145. Weng CH, Chen LY, Lin YC, Shih JY, Lin YC, Tseng RY, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene.* 2019; 38(4): 455-68.
146. Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol.* 2015; 44-46: 184-90.
147. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(24): 9739.

148. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016; 31(sup1): 177-83.
149. Zakiyanov O, Kalousová M, Zima T, Tesař V. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in kidney disease. *Adv Clin Chem*. 2021; 105: 141-212.
150. Amar S, Smith L, Fields GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017; 1864(11 Pt A): 1940-51.
151. Jiang H, Li H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021; 21(1): 149.
152. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 147: 1-73.
153. Hawinkels LJ, Zuidwijk K, Verspaget HW, de Jonge-Muller ES, van Duijn W, Ferreira V, et al. VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *Eur J Cancer*. 2008; 44(13): 1904-13.
154. Viallard C, Larrivée B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017; 20(4): 409-26.
155. Jana S, Chatterjee K, Ray AK, DasMahapatra P, Swarnakar S. Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity by COX-2-PGE2-pAKT Axis Promotes Angiogenesis in Endometriosis. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0163540.
156. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*. 2018; 14(6): e1007362.
157. Stankov K, Pavlović N, Mikov M. Epigenetic therapy of cancer. *HOPH*. 2014; 1(2): 83-92.
158. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1253: 3-55.
159. Quina AS, Buschbeck M, Di Croce L. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11): 1563-9.
160. Oomen ME, Dekker J. Epigenetic characteristics of the mitotic chromosome in 1D and 3D. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2017; 52(2): 185-204.
161. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. 2012; 150(1): 12-27.

162. Glavaški M, Stankov K. Epigenetics in disease etiopathogenesis. *Genetika*. 2019; 51(3): 975-94.
163. Chao YL, Pecot CV. Targeting Epigenetics in Lung Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2021; 11(6): a038000.
164. Han W, Cui H, Liang J, Su X. Role of MicroRNA-30c in cancer progression. *J Cancer*. 2020; 11(9): 2593-601.
165. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform*. 2019; 20(5): 1836-52.
166. Chaturvedi P, Tyagi SC. Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration. *Int J Cardiol*. 2014; 173(1): 1-11.
167. Lopomo A, Coppedè F. Pharmacoepigenetics and pharmacoepigenomics of gastrointestinal cancers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 12(1): 49-62.
168. Zheng Y, Wang Z, Wei S, Liu Z, Chen G. Epigenetic silencing of chemokine CCL2 represses macrophage infiltration to potentiate tumor development in small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2021; 499: 148-63.
169. Yu G, Wu Y, Wang W, Xu J, Lv X, Cao X, et al. Low-dose decitabine enhances the effect of PD-1 blockade in colorectal cancer with microsatellite stability by re-modulating the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol*. 2019; 16(4): 401-9.
170. Stankov K, Stankov S, Katanic J. Genetic and Epigenetic Drug Targets in Myelodysplastic Syndromes. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(1): 135-69.
171. Stomper J, Rotondo JC, Greve G, Lübbert M. Hypomethylating agents (HMA) for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: mechanisms of resistance and novel HMA-based therapies. *Leukemia*. 2021; 35(7): 1873-89.
172. Diesch J, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Götze KS. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics*. 2016; 8: 71.
173. Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2013; 5(1): 3.
174. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015; 4: 180-3.

175. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
176. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(6): 749-62.
177. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1): 1-40.
178. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2018; 24(40): 4771-8.
179. Konno T, Melo EP, Chambers JE, Avezov E. Intracellular Sources of ROS/H₂O₂ in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. *Cells.* 2021; 10(2): 233.
180. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012; 142: w13659.
181. Halliwell B, Adhikary A, Dingfelder M, Dizdaroglu M. Hydroxyl radical is a significant player in oxidative DNA damage in vivo. *Chem Soc Rev.* 2021; 50(15): 8355-60.
182. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 5080843.
183. Russell TM, Azad MG, Richardson DR. The Relationship of Glutathione-S-Transferase and Multi-Drug Resistance-Related Protein 1 in Nitric Oxide (NO) Transport and Storage. *Molecules.* 2021; 26(19): 5784.
184. Hu YP, Peng YB, Zhang YF, Wang Y, Yu WR, Yao M, et al. Reactive Oxygen Species Mediated Prostaglandin E2 Contributes to Acute Response of Epithelial Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 4123854.
185. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol.* 2013; 64(4): 409-21.
186. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014; 2014: 149185.
187. Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med.* 2018; 23(1): 50.
188. Uchida K. A lipid-derived endogenous inducer of COX-2: a bridge between inflammation and oxidative stress. *Mol Cells.* 2008; 25(3): 347-51.

189. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019; 25: 101084.
190. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(12): 1533-54.
191. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021; 20(9): 689-709.
192. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 344-56.
193. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem.* 2017; 398(10): 1095-108.
194. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid Redox Signal.* 2020; 33(7): 498-516.
195. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* 2016; 95: 27-42.
196. Djukic T, Simic T, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Suvakov S, Coric V, et al. Upregulated glutathione transferase omega-1 correlates with progression of urinary bladder carcinoma. *Redox Rep.* 2017; 22(6): 486-92.
197. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2): 1-12.
198. Minich DM, Brown BI. A Review of Dietary (Phyto)Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients.* 2019; 11(9): 2073.
199. Asantewaa G, Harris IS. Glutathione and its precursors in cancer. *Curr Opin Biotechnol.* 2021; 68: 292-9.
200. Caliri AW, Tommasi S, Besaratinia A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2021; 787: 108365.
201. Bindu S, Mazumder S, Bandyopadhyay U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol.* 2020; 180: 114147.

202. Patrono C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br J Clin Pharmacol*. 2016; 82(4): 957-64.
203. Grosser T, Ricciotti E, FitzGerald GA. The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 2017; 38(8): 733-48.
204. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama JV, Wu Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. *Cancer Manag Res*. 2018; 10: 4653-67.
205. Tołoczko-Iwaniuk N, Dziemiańczyk-Pakiela D, Nowaszewska BK, Celińska-Janowicz K, Milyk W. Celecoxib in Cancer Therapy and Prevention - Review. *Curr Drug Targets*. 2019; 20(3): 302-15.
206. Kast RE. Adding high-dose celecoxib to increase effectiveness of standard glioblastoma chemoradiation. *Ann Pharm Fr*. 2021; 79(5): 481-8.
207. Siu YA, Hao MH, Dixit V, Lai WG. Celecoxib is a substrate of CYP2D6: Impact on celecoxib metabolism in individuals with CYP2C9*3 variants. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018; 33(5): 219-27.
208. Kemp Bohan PM, Mankaney G, Vreeland TJ, Chick RC, Hale DF, Cindass JL, et al. Chemoprevention in familial adenomatous polyposis: past, present and future. *Fam Cancer*. 2021; 20(1): 23-33.
209. Rayar AM, Lagarde N, Ferroud C, Zagury JF, Montes M, Sylla-Iyarreta Veitia M. Update on COX-2 Selective Inhibitors: Chemical Classification, Side Effects and their Use in Cancers and Neuronal Diseases. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17(26): 2935-56.
210. Oniga SD, Pacureanu L, Stoica CI, Palage MD, Crăciun A, Rusu LR, et al. COX Inhibition Profile and Molecular Docking Studies of Some 2-(Trimethoxyphenyl)-Thiazoles. *Molecules*. 2017; 22(9): 1507.
211. Shaker AMM, Abdelall EKA, Abdellatif KRA, Abdel-Rahman HM. Synthesis and biological evaluation of 2-(4-methylsulfonyl phenyl) indole derivatives: multi-target compounds with dual antimicrobial and anti-inflammatory activities. *BMC Chem*. 2020; 14(1): 23.
212. Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2012; 22(4): 310-8.
213. Saxena P, Sharma PK, Purohit P. A journey of celecoxib from pain to cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2020; 147: 106379.

214. Quiñones OG, Pierre MBR. Cutaneous Application of Celecoxib for Inflammatory and Cancer Diseases. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019; 19(1): 5-16.
215. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 2020; 12(2): 457.
216. Ullah A, Munir S, Badshah SL, Khan N, Ghani L, Poulson BG, et al. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*. 2020; 25(22): 5243.
217. AbouZid SF, Ahmed HS, Moawad AS, Owis AI, Chen SN, Nachtergaele A, et al. Chemotaxonomic and biosynthetic relationships between flavonolignans produced by *Silybum marianum* populations. *Fitoterapia*. 2017; 119: 175-84.
218. Antal DS, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, Danciu C, Soica C, et al. Flavonolignans: One Step Further in the Broad-Spectrum Approach of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020; 20(15): 1817-30.
219. Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res*. 2018; 32(11): 2202-13.
220. Jahanafrooz Z, Motamed N, Rinner B, Mokhtarzadeh A, Baradaran B. Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. *Life Sci*. 2018; 213: 236-47.
221. Mengs U, Pohl RT, Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(10): 1964-70.
222. Soleimani V, Delghandi PS, Moallem SA, Karimi G. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review. *Phytother Res*. 2019; 33(6): 1627-38.
223. Bijak M. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017; 22(11): 1942.
224. Esmail N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol*. 2017; 50: 194-201.
225. Prasad RR, Paudel S, Raina K, Agarwal R. Silibinin and non-melanoma skin cancers. *J Tradit Complement Med*. 2020; 10(3): 236-44.

226. Binienda A, Ziolkowska S, Pluciennik E. The Anticancer Properties of Silibinin: Its Molecular Mechanism and Therapeutic Effect in Breast Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020; 20(15): 1787-96.
227. Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Đanić M, Stanimirov B, Al-Salami H, Stankov K, et al. Bile Acids and Their Derivatives as Potential Modifiers of Drug Release and Pharmacokinetic Profiles. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1283.
228. Đanić M, Stanimirov B, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Al-Salami H, Stankov K, et al. Pharmacological Applications of Bile Acids and Their Derivatives in the Treatment of Metabolic Syndrome. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 1382.
229. di Gregorio MC, Cautela J, Galantini L. Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(4): 1780.
230. Shin DJ, Wang L. Bile Acid-Activated Receptors: A Review on FXR and Other Nuclear Receptors. *Handb Exp Pharmacol.* 2019; 256: 51-72.
231. Chiang JYL, Ferrell JM. Bile acid receptors FXR and TGR5 signaling in fatty liver diseases and therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2020; 318(3): 554-73.
232. Panzitt K, Wagner M. FXR in liver physiology: Multiple faces to regulate liver metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2021; 1867(7): 166133.
233. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012; 75(4): 389-98.
234. Jiang L, Zhang H, Xiao D, Wei H, Chen Y. Farnesoid X receptor (FXR): Structures and ligands. *Comput Struct Biotechnol J.* 2021; 19: 2148-59.
235. Keitel V, Dröge C, Häussinger D. Targeting FXR in Cholestasis. *Handb Exp Pharmacol.* 2019; 256: 299-324.
236. McGlone ER, Bloom SR. Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem.* 2019; 56(3): 326-37.
237. Girisa S, Henamayee S, Parama D, Rana V, Dutta U, Kunnumakkara AB. Targeting Farnesoid X receptor (FXR) for developing novel therapeutics against cancer. *Mol Biomed.* 2021; 2(1): 21.
238. Tsai CL, Changchien CY, Chen Y, Lai CR, Chen TM, Chang HH, et al. Survival Benefit of Statin with Anti-Angiogenesis Efficacy in Lung Cancer-Associated Pleural Fluid through FXR Modulation. *Cancers (Basel).* 2022; 14(11): 2765.

239. Stepanov V, Stankov K, Mikov M. The bile acid membrane receptor TGR5: a novel pharmacological target in metabolic, inflammatory and neoplastic disorders. *J Recept Signal Transduct Res.* 2013; 33(4): 213-23.
240. Guo C, Chen WD, Wang YD. TGR5, Not Only a Metabolic Regulator. *Front Physiol.* 2016; 7: 646.
241. Qi Y, Duan G, Wei D, Zhao C, Ma Y. The Bile Acid Membrane Receptor TGR5 in Cancer: Friend or Foe? *Molecules.* 2022; 27(16): 5292.
242. Zhao L, Zhang H, Liu X, Xue S, Chen D, Zou J, et al. TGR5 deficiency activates antitumor immunity in non-small cell lung cancer via restraining M2 macrophage polarization. *Acta Pharm Sin B.* 2022; 12(2): 787-800.
243. Liu X, Chen B, You W, Xue S, Qin H, Jiang H. The membrane bile acid receptor TGR5 drives cell growth and migration via activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2018; 412: 194-207.
244. Guo C, Su J, Li Z, Xiao R, Wen J, Li Y, et al. The G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) suppresses gastric cancer cell proliferation and migration through antagonizing STAT3 signaling pathway. *Oncotarget.* 2015; 6(33): 34402-13.
245. Pavlovic N, Stanimirov B, Mikov M. Bile Acids as Novel Pharmacological Agents: The Interplay Between Gene Polymorphisms, Epigenetic Factors and Drug Response. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(1): 187-215.
246. A549 [Internet]. ATCC; c.2021 [citirano 2021 Avgust 5]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185>.
247. HT-29 [Internet]. ATCC; c.2021 [citirano 2021 Avgust 5]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/htb-38>.
248. MRC-5 [Internet]. ATCC; c.2021 [citirano 2021 Avgust 5]. Dostupno na: <https://www.atcc.org/products/ccl-171>.
249. Stark DM, Shopsis C, Borenfreund E, Babich H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Food Chem Toxicol.* 1986; 24(6/7): 449-55.
250. Jandt U, Platas Barradas O, Pörtner R, Zeng AP. Mammalian cell culture synchronization under physiological conditions and population dynamic simulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(10): 4311-9.

251. Bogdanović G, Raletić-Savić J, Marković N. In vitro assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay. *Arch Oncol*. 1994; 2: 181-4.
252. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015; 111: A3.B.1-A3.B.3.
253. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
254. Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol*. 2017; 41(6): 919-25.
255. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*. 1984; 22: 27-55.
256. Vrtačnik P, Kos Š, Bustin SA, Marc J, Ostanek B. Influence of trypsinization and alternative procedures for cell preparation before RNA extraction on RNA integrity. *Anal Biochem*. 2014; 463: 38-44.
257. Absolutely RNA Miniprep Kit Instruction Manual [Internet]. Agilent Technologies; c.2021 [citirano 2021 Avgust 10]. Dostupno na: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/400800.pdf>.
258. Sukumaran S. Concentration determination of nucleic acids and proteins using the micro-volume BioSpec-nano-spectrophotometer. *J Vis Exp*. 2011; (48): 2699.
259. Stankov K, Borisev I, Kojic V, Rutonjski L, Bogdanovic G. Modification of antioxidative and antiapoptotic genes expression in irradiated K562 cells upon fullereneol C60(OH)24 nanoparticle treatment. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013; 13(1): 105-13.
260. Stankov K, Bogdanovic G, Kojic V, Stankov S, Jojic N, Popovic L, et al. Expression analysis of genes involved in epigenetic regulation and apoptosis in human malignant haematopoietic cell lines treated with 5-azacytidine. *J BUON*. 2011; 16(1): 116-22.
261. Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide [Internet]. Agilent Technologies; c.2021 [citirano 2021 Avgust 10]. Dostupno na: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G293890034_RNA6000Nano_KG.pdf.

262. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006; 7: 3.
263. AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit Instruction Manual [Internet]. Agilent Technologies; c.2021 [citirano 2021 Avgust 10]. Dostupno na: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/600559.pdf>.
264. Universal SYBR Green Quantitative PCR Protocol [Internet]. Sigma-Aldrich; c.2021 [citirano 2021 Avgust 11]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en/technical-documents/protocol/genomics/qpcr/sybr-green-qpcr>.
265. Power SYBR Green PCR Master Mix [Internet]. ThermoFisher Scientific; c.2021 [citirano 2021 Avgust 11]. Dostupno na: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368577#/4368577>.
266. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6): 1101-8.
267. Lovrien R, Matulis D. Assays for total protein. *Curr Protoc Microbiol.* 2005; Appendix 3: Appendix 3A.
268. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res.* 2010; 44(10): 1098-124.
269. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22): 6049-55.
270. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974.
271. Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. New York: Grune & Stratton; 1984.
272. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1): 158-69.
273. Hristova VA, Chan DW. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond. *Exper`t Rev Proteomics.* 2019; 16(2): 93-103.
274. Hage Chehade A, Abdallah N, Marion JM, Oueidat M, Chauvet P. Lung and colon cancer classification using medical imaging: a feature engineering approach. *Phys Eng Sci Med.* 2022; 45(3): 729-46.

275. Ye Y, Wang X, Jeschke U, von Schönfeldt V. COX-2-PGE2-EPs in gynecological cancers. *Arch Gynecol Obstet.* 2020; 301(6): 1365-75.
276. Rajagopal C, Lankadasari MB, Aranjani JM, Harikumar KB. Targeting oncogenic transcription factors by polyphenols: A novel approach for cancer therapy. *Pharmacol Res.* 2018; 130: 273-91.
277. Wang D, Dubois RN. Prostaglandins and cancer. *Gut.* 2006; 55(1): 115-22.
278. Singh Ranger G. The role of aspirin in colorectal cancer chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016; 104: 87-90.
279. Jiang Y, Su Z, Li C, Wang R, Wen Y, Liang H, et al. Association between the use of aspirin and risk of lung cancer: results from pooled cohorts and Mendelian randomization analyses. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021; 147(1): 139-51.
280. Ting H, Deep G, Agarwal R. Molecular mechanisms of silibinin-mediated cancer chemoprevention with major emphasis on prostate cancer. *AAPS J.* 2013; 15(3): 707-16.
281. Lepercq P, Gérard P, Béguet F, Raibaud P, Grill JP, Relano P, et al. Epimerization of chenodeoxycholic acid to ursodeoxycholic acid by *Clostridium baratii* isolated from human feces. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 235(1): 65-72.
282. El-Awady RA, Saleh EM, Ezz M, Elsayed AM. Interaction of celecoxib with different anti-cancer drugs is antagonistic in breast but not in other cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 255(3): 271-86.
283. Li N, Li H, Su F, Li J, Ma X, Gong P. Relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and serum cyclooxygenase-2 Level, and the synergistic effect of celecoxib and gefitinib on EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(8): 9010-20.
284. Zhang H, Li Z, Wang K. Combining sorafenib with celecoxib synergistically inhibits tumor growth of non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 2014; 31(4): 1954-60.
285. Pal A, Shenoy S, Gautam A, Munjal S, Niu J, Gopalakrishnan M, et al. Pharmacokinetics of DFN-15, a Novel Oral Solution of Celecoxib, Versus Celecoxib 400-mg Capsules: A Randomized Crossover Study in Fasting Healthy Volunteers. *Clin Drug Investig.* 2017; 37(10): 937-46.
286. Akhtar R, Ali M, Mahmood S, Sanyal SN. Anti-proliferative action of silibinin on human colon adenomatous cancer HT-29 cells. *Nutr Hosp.* 2014; 29(2): 388-92.

287. Entezari M, Mokhtari MJ, Hashemi M. Evaluation of Silibinin on the Viability of MCF-7 Human Breast Adenocarcinoma and HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) cell lines. *Adv Stud Biol.* 2011; 3(6): 283-8.
288. Hoh C, Boocock D, Marczylo T, Singh R, Berry DP, Dennison AR, et al. Pilot study of oral silibinin, a putative chemopreventive agent, in colorectal cancer patients: silibinin levels in plasma, colorectum, and liver and their pharmacodynamic consequences. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(9): 2944-50.
289. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(14): 1677-89.
290. Zeng H, Umar S, Rust B, Lazarova D, Bordonaro M. Secondary Bile Acids and Short Chain Fatty Acids in the Colon: A Focus on Colonic Microbiome, Cell Proliferation, Inflammation, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(5): 1214.
291. Staels B, Fonseca VA. Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care.* 2009; 32(Suppl 2): S237-45.
292. Neale G, Lewis B, Weaver V, Panveliwalla D. Serum bile acids in liver disease. *Gut.* 1971; 12: 145-52.
293. Lee J, Hong EM, Kim JH, Kim JH, Jung JH, Park SW, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits epithelial-mesenchymal transition, suppressing invasiveness of bile duct cancer cells: An in vitro study. *Oncol Lett.* 2022; 24(6): 448.
294. Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Effect of silibinin in human colorectal cancer cells: targeting the activation of NF- κ B signaling. *Mol Carcinog.* 2013; 52(3): 195-206.
295. Friedrich M, Reichert K, Woeste A, Polack S, Fischer D, Hoellen F, et al. Effects of Combined Treatment with Vitamin D and COX2 Inhibitors on Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* 2018; 38(2): 1201-7.
296. Cho K, Lee HG, Piao JY, Kim SJ, Na HK, Surh YJ. Protective Effects of Silibinin on Helicobacter pylori-induced Gastritis: NF- κ B and STAT3 as Potential Targets. *J Cancer Prev.* 2021; 26(2): 118-27.
297. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Fahey TJ 3rd. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 2004; 25(3): 419-23.

298. Song S, Guha S, Liu K, Buttar NS, Bresalier RS. COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signalling pathways in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut*. 2007; 56(11): 1512-21.
299. Abdel-Latif MM, Inoue H, Reynolds JV. Opposing effects of bile acids deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on signal transduction pathways in oesophageal cancer cells. *Eur J Cancer Prev*. 2016; 25(5): 368-79.
300. Hashemi-Bajgani SM, Samareh-Fekri M, Paghaleh AJ, Yazdani R, Zarandi MA, Shafahi A. Prevalence of Micro-Aspiration of Bile Acids in Patients with Primary Lung Cancer: A Cross-Sectional Study. *Ethiop J Health Sci*. 2022; 32(4): 715-22.
301. Aldhahrani A, Verdon B, Ward C, Pearson J. Effects of bile acids on human airway epithelial cells: implications for aerodigestive diseases. *ERJ Open Res*. 2017; 3(1): 00107-2016.
302. Esmaily H, Vaziri-Bami A, Miroliaee AE, Baeri M, Abdollahi M. The correlation between NF- κ B inhibition and disease activity by coadministration of silibinin and ursodeoxycholic acid in experimental colitis. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011; 25(6): 723-33.
303. Joo SS, Won TJ, Lee DI. Potential role of ursodeoxycholic acid in suppression of nuclear factor kappa B in microglial cell line (BV-2). *Arch Pharm Res*. 2004; 27(9): 954-60.
304. Wu J, Gong J, Geng J, Song Y. Deoxycholic acid induces the overexpression of intestinal mucin, MUC2, via NF- κ B signaling pathway in human esophageal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 2008; 8: 333.
305. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol*. 2014; 4: 64.
306. Zhang C, Zhou J, Hu J, Lei S, Yuan M, Chen L, et al. Celecoxib attenuates hepatocellular proliferative capacity during hepatocarcinogenesis by modulating a PTEN/NF- κ B/PRL-3 pathway. *RSC Adv*. 2019; 9(36): 20624-32.
307. Chu TH, Chan HH, Kuo HM, Liu LF, Hu TH, Sun CK, et al. Celecoxib suppresses hepatoma stemness and progression by up-regulating PTEN. *Oncotarget*. 2014; 5(6): 1475-90.
308. Jahanafrooz Z, Motameh N, Bakhshandeh B. Comparative Evaluation of Silibinin Effects on Cell Cycling and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 and T47D Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17(5): 2661-5.

309. Nguyen TT, Ung TT, Li S, Sah DK, Park SY, Lian S, et al. Lithocholic Acid Induces miR21, Promoting PTEN Inhibition via STAT3 and ERK-1/2 Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(19): 10209.
310. Huang R, Huang Y, Zeng G, Li M, Jin Y. Ursodeoxycholic acid inhibits intimal hyperplasia, vascular smooth muscle cell excessive proliferation, migration via blocking miR-21/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Cell Cycle.* 2020; 19(8): 918-32. Update in: *Cell Cycle.* 2022; 21(8): 881.
311. Jendrossek V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett.* 2013; 332(2): 313-24.
312. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018; 25(1): 104-13.
313. Lin XM, Li S, Zhou C, Li RZ, Wang H, Luo W, et al. Cisplatin induces chemoresistance through the PTGS2-mediated anti-apoptosis in gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 116: 105610.
314. Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends Pharmacol Sci.* 2022; 43(3): 206-20.
315. Ezhilarasan D, Evraerts J, Sid B, Calderon PB, Karthikeyan S, Sokal E, et al. Silibinin induces hepatic stellate cell cycle arrest via enhancing p53/p27 and inhibiting Akt downstream signaling protein expression. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2017; 16(1): 80-7.
316. Pashaei-Asl F, Pashaei-Asl R, Khodadadi K, Akbarzadeh A, Ebrahimie E, Pashaiasl M. Enhancement of anticancer activity by silibinin and paclitaxel combination on the ovarian cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018; 46(7): 1483-7.
317. Barrasa JI, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27(2): 964-77.
318. Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem.* 2014; 289(45): 30880-8.
319. Szczuraszek K, Materna V, Halon A, Mazur G, Wróbel T, Kuliczowski K, et al. Positive correlation between cyclooxygenase-2 and ABC-transporter expression in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncol Rep.* 2009; 22(6): 1315-23.
320. Ma M, Yang X, Zhao L, Wang X, Liu L, Jiao W, et al. Celecoxib enhances sensitivity to chemotherapy drugs of T-cell lymphoma. *Oncol Lett.* 2018; 15(4): 4649-56.

321. van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, van der Bent C, Hoekman K, van der Pluijm G, et al. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF-kappaB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. *Eur J Cancer*. 2007; 43(2): 433-42.
322. Liu B, Yan S, Qu L, Zhu J. Celecoxib enhances anticancer effect of cisplatin and induces anoikis in osteosarcoma via PI3K/Akt pathway. *Cancer Cell Int*. 2017; 17: 1.
323. Kang HK, Lee E, Pyo H, Lim SJ. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4(9): 1358-63.
324. Gradilone A, Pulcinelli FM, Lotti LV, Trifirò E, Martino S, Gandini O, et al. Celecoxib upregulates multidrug resistance proteins in colon cancer: lack of synergy with standard chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008; 8(5): 414-20.
325. Nguyen H, Zhang S, Morris ME. Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells. *J Pharm Sci*. 2003; 92(2): 250-7.
326. Delmas D, Xiao J, Vejux A, Aires V. Silymarin and Cancer: A Dual Strategy in Both in Chemoprevention and Chemosensitivity. *Molecules*. 2020; 25(9): 2009.
327. Chewchuk S, Boorman T, Edwardson D, Parissenti AM. Bile Acids Increase Doxorubicin Sensitivity in ABCC1-expressing Tumour Cells. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 5413.
328. Mrówczyńska L, Bobrowska-Hägerstrand M, Wróbel A, Söderström T, Hägerstrand H. Inhibition of MRP1-mediated efflux in human erythrocytes by mono-anionic bile salts. *Anticancer Res*. 2005; 25(5): 3173-8.
329. Musalam A, Andarawi M, Osman M, Al-Shriam M, Elrefaie A, Mahfouz AA, et al. Alterations of COX-2, HER-2/neu and E-Cadherin protein expression in the prostatic adenocarcinoma: preliminary findings. *Am J Transl Res*. 2019; 11(3): 1653-67.
330. Fujii R, Imanishi Y, Shibata K, Sakai N, Sakamoto K, Shigetomi S, et al. Restoration of E-cadherin expression by selective Cox-2 inhibition and the clinical relevance of the epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014; 33(1): 40.
331. Zhang X, Qu P, Zhao H, Zhao T, Cao N. COX-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and migration in osteosarcoma MG-63 cells via PI3K/AKT/NF-κB signaling. *Mol Med Rep*. 2019; 20(4): 3811-9.

332. Yang HL, Thiyagarajan V, Shen PC, Mathew DC, Lin KY, Liao JW, et al. Anti-EMT properties of CoQ0 attributed to PI3K/AKT/NFKB/MMP-9 signaling pathway through ROS-mediated apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019; 38(1): 186.
333. Deng QF, Fang QY, Ji XX, Zhou SW. Cyclooxygenase-2 mediates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer through the EGFR/PI3K/AKT axis. *J Cancer.* 2020; 11(12): 3667-74.
334. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells.* 2021; 10(7): 1587.
335. Gungor H, Ilhan N, Eroksuz H. The effectiveness of cyclooxygenase-2 inhibitors and evaluation of angiogenesis in the model of experimental colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018; 102: 221-9.
336. Sales KJ, Maudsley S, Jabbour HN. Elevated prostaglandin EP2 receptor in endometrial adenocarcinoma cells promotes vascular endothelial growth factor expression via cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 2004; 18(6): 1533-45.
337. Li F, Sun Y, Jia J, Yang C, Tang X, Jin B, et al. Silibinin attenuates TGF- β 1-induced migration and invasion via EMT suppression and is associated with COX-2 downregulation in bladder transitional cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2018; 40(6): 3543-50.
338. Si L, Fu J, Liu W, Hayashi T, Nie Y, Mizuno K, et al. Silibinin inhibits migration and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells through induction of mitochondrial fusion. *Mol Cell Biochem.* 2020; 463(1-2): 189-201.
339. Byun HJ, Darvin P, Kang DY, Sp N, Joung YH, Park JH, et al. Silibinin downregulates MMP2 expression via Jak2/STAT3 pathway and inhibits the migration and invasive potential in MDA-MB-231 cells. *Oncol Rep.* 2017; 37(6): 3270-8.
340. Sameri S, Saidijam M, Bahreini F, Najafi R. Cancer Chemopreventive Activities of Silibinin on Colorectal Cancer through Regulation of E-Cadherin/ β -Catenin Pathway. *Nutr Cancer.* 2021; 73(8): 1389-99.
341. Verdura S, Cuyàs E, Ruiz-Torres V, Micol V, Joven J, Bosch-Barrera J, et al. Lung Cancer Management with Silibinin: A Historical and Translational Perspective. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(6): 559.

342. Kainuma M, Takada I, Makishima M, Sano K. Farnesoid X Receptor Activation Enhances Transforming Growth Factor β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(7): 1898.
343. Chen B, You WJ, Liu XQ, Xue S, Qin H, Jiang HD. Chronic microaspiration of bile acids induces lung fibrosis through multiple mechanisms in rats. *Clin Sci (Lond).* 2017; 131(10): 951-63.
344. Miao J, Xiao Z, Kanamaluru D, Min G, Yau PM, Veenstra TD, et al. Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation. *Genes Dev.* 2009; 23(8): 986-96.
345. Rodriguez FJ, Lewis-Tuffin LJ, Anastasiadis PZ. E-cadherin's dark side: possible role in tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1826(1): 23-31.
346. Na HK, Park JM, Lee HG, Lee HN, Myung SJ, Surh YJ. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82(10): 1352-60.
347. Wong KK, Lawrie CH, Green TM. Oncogenic Roles and Inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in Acute Myeloid Leukaemia. *Biomark Insights.* 2019; 14: 1177271919846454.
348. Zhang Y, Xu L, Li A, Han X. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomed Pharmacother.* 2019; 110: 400-8.
349. Sanaei M, Kavooosi F. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on Estrogen Receptor Alpha/Beta and DNA Methyltransferase 1 Genes Expression, Apoptosis Induction, and Cell Growth Prevention of the Colon Cancer HT 29 Cell Line. *Int J Prev Med.* 2020; 11: 147.
350. Gordon K, Clouaire T, Bao XX, Kemp SE, Xenophontos M, de Las Heras JI, et al. Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(6): 3529-41.
351. Fairweather DS, Fox M, Margison GP. The in vitro lifespan of MRC-5 cells is shortened by 5-azacytidine-induced demethylation. *Exp Cell Res.* 1987; 168(1): 153-9.
352. Yu J, Qin B, Moyer AM, Nowsheen S, Liu T, Qin S, et al. DNA methyltransferase expression in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to decitabine. *J Clin Invest.* 2018; 128(6): 2376-88.

353. Zhang N, Liu Y, Wang Y, Zhao M, Tu L, Luo F. Decitabine reverses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer by regulating miR-200/ZEB axis. *Drug Des Devel Ther.* 2017; 11: 969-83.
354. Thiel A, Ganesan A, Mrena J, Junnila S, Nykänen A, Hemmes A, et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(14): 4572-80.
355. Liu YY, Han JY, Lin SC, Liu ZY, Jiang WT. Effect of CDH1 gene methylation on transforming growth factor (TGF- β)-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cell line A549. *Genet Mol Res.* 2014; 13(4): 8568-76.
356. Cathcart MC, Gray SG, Baird AM, Boyle E, Gately K, Kay E, et al. Prostacyclin synthase expression and epigenetic regulation in nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2011; 117(22): 5121-32.
357. Tuli HS, Mittal S, Aggarwal D, Parashar G, Parashar NC, Upadhyay SK, et al. Path of Silibinin from diet to medicine: A dietary polyphenolic flavonoid having potential anti-cancer therapeutic significance. *Semin Cancer Biol.* 2021; 73: 196-218.
358. Mateen S, Raina K, Agarwal C, Chan D, Agarwal R. Silibinin synergizes with histone deacetylase and DNA methyltransferase inhibitors in upregulating E-cadherin expression together with inhibition of migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 345(2): 206-14.
359. Kusaczuk M. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells.* 2019; 8(12): 1471.
360. Zhang Q, Agoston AT, Pham TH, Zhang W, Zhang X, Huo X, et al. Acidic Bile Salts Induce Epithelial to Mesenchymal Transition via VEGF Signaling in Non-Neoplastic Barrett's Cells. *Gastroenterology.* 2019; 156(1): 130-44.e10.
361. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(9-10): 1865-79.
362. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021; 17(1): 22-8.
363. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 44(2): 532-53.
364. Chatterjee A, Gupta S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 2018; 433: 33-42.

365. Peddireddy V, Siva Prasad B, Gundimeda SD, Penagaluru PR, Mundluru HP. Assessment of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer. *Biomarkers*. 2012; 17(3): 261-8.
366. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, et al. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol*. 2001; 431(1): 91-102.
367. Ahmed S, Gul S, Gul H, Zia-Ul-Haq M, Ercisli S. Cyclooxygenase-2 inhibition improves antioxidative defense during experimental hypercholesterolemia. *Bosn J Basic Med Sci*. 2014; 14(2): 63-9.
368. Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer*. 2022; 22(5): 280-97.

PRILOG - Lista skraćenica

15-PGDH – 15-hidroksiprostaglandin dehidrogenaza
8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
A – apsorbanca
A549 – humana ćelijska linija adenokarcinoma pluća
ABC transporteri – *adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters*
ABCC1 – gen koji kodira sintezu ABCC1 (MRP1) transportera
AC – adenilat ciklaza
ACTB – gen koji kodira sintezu β -aktina
ADAM – *A disintegrin and metalloproteinases*
Apaf-1 – *Apoptotic protease activating factor 1*
APC – *adenomatous polyposis coli*
ATP – adenzin trifosfat
BAX – *BCL2 associated X apoptosis regulator*
BCL2 – *BCL2 apoptosis regulator*
BCRP/ABCG2 – *breast cancer resistance protein*
BRAF – *V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
BSEP/ABCB11 – eksportna pumpa za žučne soli
CA – holna kiselina
cAMP – ciklični adenzin monofosfat
CAT – katalaza (gen *CAT*)
CDCA – henodeoksiholna kiselina
CDH1 – gen koji kodira sintezu E-kadherina
cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
COX-1 – ciklooksigenaza-1 (prostaglandin endoperoksid sintaza 1, gen *PTGS1*)
COX-2 – ciklooksigenaza-2 (prostaglandin endoperoksid sintaza 2, gen *PTGS2*)
cPGES – citosolna prostaglandin E2 sintaza
CREB – ciklični adenzin monofosfat vezujući elemenat
Ct – prag ciklusa (*cycle threshold*)
CtBP – C-terminalni vezujući protein
DAMP – *danger-associated molecular patterns*
DCA – deoksiholna kiselina
DISC – signalni kompleks koji indukuje ćelijsku smrt (*death-inducing signaling complex*)
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA – deoksiribonukleinska kiselina
DNaza – deoksiribonukleaza
DNMT – DNA metiltransferaza
DNMT1 – *DNA methyltransferase 1*
DNMT3A – *DNA methyltransferase 3 alpha*
DNMT3B – *DNA methyltransferase 3 beta*
dNTP – deoksiribonukleotid-trifosfat
ECM – ekstracelularni matriks
EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*
EGF – epidermalni faktor rasta
EGFR (ERBB1) – receptor za epidermalni faktor rasta (*epidermal growth factor receptor*)

EGFR-TKI – EGFR-tirozin kinaza inhibitor
EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija
EP1, EP2, EP3 i EP4 – receptori za PGE2
ERK – ekstracelularnim signalima-regulisana kinaza
FAP – porodična adenomatozna polipoza (*familial adenomatous polyposis*)
FBS – fetalni goveđi serum
FDA – Agencija za hranu i lekove
FGF – fibroblastni faktor rasta
FXR – farnezoid X receptor (gen *FXR*)
GERB – gastroezofagusna refluksna bolest
GPx – glutation peroksidaza
GR – glutation reduktaza
GSH/G-S-S-G – redukovani glutation/oksidovani glutation
GSK-3 β – kinaza glikogen sintaze-3 β
GST – glutation-S-transferaza (gen *GST*)
HDAC – histon deacetilaza
HER2 (ERBB2) – *human epidermal growth factor receptor 2*
HIF – hipoksija-inducibilni faktor
HNE – 4-hidroksi-2-nonenal
HNPCC – *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* (Linčov sindrom)
HOBP – hronična opstruktivna bolest pluća
HPGD – gen koji kodira sintezu 15-PGDH
HT-29 – humana ćelijska linija adenokarcinoma kolona
IAP proteini – *inhibitors of apoptosis proteins*
IBD – inflamatorna bolest creva
IC₅₀ – koncentracija supstance koja dovodi do 50% inhibicije ćelijskog rasta (*half maximal inhibitory concentration*)
IFN- γ – interferon- γ
IL – interleukin
iNOS – inducibilna azot oksid sintaza
IP – prostaciklinski receptor
JAK/STAT – Janus kinaza/signalni prenosilac i aktivator transkripcije
JNK – *c-Jun N-terminal kinase*
KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LCA – litoholna kiselina
LDL – lipoprotein niske gustine
LPS – lipopolisaharid
MAPK – mitogen-aktivisana protein kinaza
MDA – malondialdehid
MDR – *multidrug resistance*
MDR1/P-gp1/ABCB1 – *multidrug resistance 1/P-glycoprotein 1*
MDSC – supresorske ćelije mijeloidnog porekla (*myeloid-derived suppressor cells*)
miRNA – mikroRNA
MMP – matriksna metaloproteinaza
MMP2 i MMP9 – geni koji kodiraju sintezu MMP-2 i MMP-9
MOMP – propustljivost spoljašnje mitohondrijalne membrane (*mitochondrial outer membrane permeabilization*)
mPGES-1 i mPGES-2 – mikrozomalna prostaglandin E2 sintaza-1 i 2
MRC-5 – humana ćelijska linija fetalnih plućnih fibroblasta

mRNA – informaciona ribonukleinska kiselina
MRP1/ABCC1 – *multidrug resistance protein 1*
MRP4/ABCC4 – *multidrug resistance protein 4*
MSI – mikrosatelitna nestabilnost (*microsatellite instability*)
mTOR – *mechanistic target of rapamycin kinase*
NAD/NADH – nikotinamid adenin dinukleotid
NADP/NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBD – nukleotid-vezujući domen transportera
NER – *nucleotide excision repair*
NF κ B – gen koji kodira sintezu NF- κ B
NF- κ B – *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*
NIK – NF- κ B inducibilna kinaza
NK – ćelije prirodne „ubice” (*natural killers*)
NOS – azot oksid sintaza
NOX – NADPH oksidaza
NRF2 – *nuclear factor E2-related factor*
NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lekovi
NSCLC – nesitnoćelijski karcinom pluća (*non-small-cell lung cancer*)
NTC – negativna kontrola (*non-template control*)
NTCP/SLC10A1 – natrijum-zavisni transporter za žučne soli
p53 – tumor protein 53 (gen *TP53*)
PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*
PBS – *phosphate buffered saline*
PCNA – proliferišući ćelijski nuklearni antigen
PD-1 – *programmed death-1 receptor*
PDGF – trombocitni faktor rasta
PDK-1 – 3-fosfoinozimid-zavisna kinaza-1
PD-L1 – *programmed death-ligand 1*
PGD2 – prostaglandin D2
PGE2 – prostaglandin E2
PGF2 α – prostaglandin F2 α
PGG2 – prostaglandin endoperoksid G2
PGH2 – prostaglandin endoperoksid H2
PGI2 – prostaglandin I2 (prostaciklin)
PGIS – prostaciklin sintaza
PGT/SLCO2A1 – prostaglandin transporter
PI3K/AKT – fosfatidilinozitol 3-kinaza/protein kinaza B-AKT
PIP₂ – fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PIP₃ – fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat
PKA – protein kinaza A
PKC – protein kinaza C
PLA2 – fosfolipaza A2
PLC – fosfolipaza C
POX – peroksidaza
PPAR – receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma
pRb – protein retinoblastom
PTEN – *phosphate and tensin homolog deleted from chromosome ten (gen PTEN)*
PTGES – gen koji kodira sintezu mPGES-1

qRT-PCR – kvantitativna lančana reakcije polimeraze u stvarnom vremenu, uz reverznu transkriptazu (*quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, qRT-PCR)

RIN – *RNA integrity number*

RNaza – ribonukleaza

RNS – reaktivne azotne vrste (*reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivne kiseonične vrste (*reactive oxygen species*)

rRNA – ribozomalna ribonukleinska kiselina

RXR – retinoidni X receptor

SBP – supstrat-vezujući protein transportera

SCLC – sitnoćelijski karcinom pluća (*small-cell lung cancer*)

SD – standardna devijacija

SERCA – kalcijum-zavisna ATP-aza sarko/endoplazmatskog retikuluma

SHP – *small heterodimer partner* (gen *SHP*)

SOD – superoksid dismutaza (gen *SOD*)

TBXAS1 – tromboksan sintaza

TGF- β – transformišući faktor rasta- β

TGR5 – Takeda receptor povezan sa G-proteinom

TIMP – endogeni tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

TLR – *Toll-like receptor*

TMD – transmembranski domen transportera

TNFR – receptor TNF- α

TNF- α – faktor tumorske nekroze- α

TP/TBXA2R – tromboksan A2 receptor

TRAF6 – TNF receptor-asocirani faktor 6

TxA2 – tromboksan A2

UDCA – ursodeoksiholna kiselina

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta

VEGFR – receptor za vaskularni endotelni faktor rasta

ZEB1 – *zinc finger E-box binding homeobox 1*

α 7-nAChR – α 7-nikotinski acetilholinski receptor

γ -GCS – γ -glutamil-cistein sintaza

План третмана података

| Назив пројекта/истраживања |
|--|
| <i>In vitro</i> испитивање улоге ензима циклооксигеназе-2 у етиопатогенези и терапији аденокарцинома плућа и аденокарцинома колона |
| Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање |
| а) Лабораторија за експерименталну онкологију Института за онкологију Војводине у Сремској Каменици б) Служба за патолошко-анатомску и молекуларну дијагностику Института за плућне болести Војводине у Сремској Каменици в) Департман за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду г) Центар за судску медицину, токсикологију и молекуларну генетику Клиничког центра Војводине у Новом Саду г) Завод за фармакологију, токсикологију и клиничку фармакологију Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду |
| Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање |
| Докторске академске студије – Молекулска медицина, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду |
| 1. Опис података |
| <p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Експериментални рад на хуманим ћелијским линијама аденокарцинома плућа, аденокарцинома колона и феталних плућних фибробласта, у смислу третмана ћелија селективним инхибитором ензима циклооксигеназе-2 (целекоксибом), односно деметилационим агенсом (децитабином), као и њиховим комбинацијама са силибинином и жучним киселинама. Изведено је испитивање експресије одабраних гена који су значајни за процес канцерогенезе, односно одређивана је количина мРНК циљаних гена, а урађено је и испитивање биохемијских показатеља оксидативног стреса.</p> <p>Крајњи циљ истраживања ове докторске дисертације јесте да се, на основу добијених резултата, изнесу закључци о улози ензима циклооксигеназе-2 и епигенетских догађаја у патогенези карцинома плућа и колона. Такође, важан циљ овог истраживања јесу закључци о могућој примени селективног инхибитора циклооксигеназе-2 (целекоксиба), односно деметилационог агенса (децитабина), као и њихових комбинација са силибинином и жучним киселинама, у хемопревенцији и терапији малигнух болести плућа и колона.</p> |
| <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни</p> <p>б) квалитативни</p> |

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) **узорци ткива:**

хумана ћелијска линија аденокарцинома плућа (*A549*), хумана ћелијска линија аденокарцинома колона (*HT-29*), хумана ћелијска линија феталних плућних фибробласта (*MRC-5*).

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) **текст:** литература наведена у раду

ж) мапа, навести врсту _____

з) **остало:**

Експериментални рад на ћелијским линијама коришћењем метода молекуларне биологије и стандардних биохемијских метода.

1.3. Формат података, употребљене скале, количина података

Слике JPG (15), Табеле (139) и Графикони (138). Подаци су приказани као релативни компаративни односи генске експресије, нивоа ћелијског присуства метаболита и специфичне активности ензима између контролних (нетретираних) и третираних експерименталних група.

1.3.1. Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека: .xlsx

б) SPSS фајл, датотека: .sav

в) PDF фајл, датотека: .pdf

г) Текст фајл, датотека: .docx

д) JPG фајл, датотека: .jpg

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: Велики број варијабли

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): Сви експерименти су изведени у трипликату, а за статистичку обраду узете су средње вредности резултата анализа у трипликату.

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је: највише 7 дана.
- б) варијабле које се више пута мере односе се на: реплике експеримената.
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као PDF и Excel фајлови.

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: одређивање цитотоксичне активности испитиваних супстанци применом теста одбацивања боје (*DET*) и *MTT* теста на ћелијским линијама. Припрема ћелијских култура за генетска и биохемијска испитивања. Изолација РНК и синтеза цДНК употребом комерцијалних сетова реагенса. Извођење квантитативне ланчане реакције полимеразе у стварном времену, уз реверзну транскриптазу (*quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR*) у циљу испитивања генске експресије. Такође, изведени су биохемијски тестови испитивања оксидативног стреса у ћелијским линијама.

б) корелационо истраживање, навести тип: подаци добијени анализом генске експресије и сви показатељи оксидативног стреса анализирани су корелацијом између података добијених за контролни узорак (нетретиране ћелије) и ћелије третиране само основном супстанцом (целекоксибом, односно децитабином).

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Multiscan MCC340 (Thermo-Scientific); BioSpec-Nano (Shimadzu Corporation); Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies); Real-time PCR SaCycler-96 (Sacace Biotechnologies); Agilent 8453 UV/VIS Spectrophotometer (Agilent Technologies)

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Све контроле квалитета података урађене су од стране аутора дисертације.

Контрола квалитета при извођењу тестова цитотоксичности на ћелијским линијама:

- вијабилност засејаних ћелија била је већа од 90%, одређена *DET* тестом
- употребљене су ћелије у експоненцијалној фази раста, у броју ћелија који је обезбеђивао такав раст ћелија током трајања експеримента (5×10^3 ћелија/отвору)
- коефицијент варијације у контролним и експерименталним групама био је нижи од 15%, а углавном се кретао испод 10%
- апсорбанца контроле (нетретиране ћелије у медијуму) била је најмање три пута већа од средње вредности апсорбанце слепе пробе (само медијум).

Испитиван је степен чистоће и интегритет изоловане РНК. У циљу елиминисања варијабилности у квалитету и иницијалној концентрацији РНК, као и у ефикасности синтезе цДНК, ниво експресије циљаног, испитиваног гена је нормализован у односу на ниво референтног гена (*ACTB*), који има улогу ендogene контроле. У *qRT-PCR* реакцијама су постављане и негативне контроле, односно контроле без матрице цДНК, а које су значајне у детекцији евентуално присутне контаминације и појаве димера прајмера. Приликом биохемијских испитивања коришћене су слепе пробе. Сви експерименти су изведени три пута, односно у трипликату, а уз примену статистичких тестова урађена је коначна контрола квалитета података.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Подаци су преузимани директно и искључиво са експерименталних инструмената на којима су вршене анализе. Све податке је преузимао и обрађивао аутор дисертације.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса: <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- a) **Да**
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) **Не**

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничен временски период

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? **Да** **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? **Да** **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да **Не**

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање:

28. 07. 2015. Етички одбор Института за плућне болести Војводине, Сремска Каменица

Број сагласности 54-VI/24

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ванеса Секеруш, vanesa.sekerus@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ванеса Секеруш, vanesa.sekerus@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ванеса Секеруш, vanesa.sekerus@mf.uns.ac.rs