



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE KLINIČKE MEDICINE

**DELOVANJE LEKOVA
REGISTROVANIH ZA NEONKOLOŠKE INDIKACIJE
NA EKSPERIMENTALNI FIBROSARKOM HRČKA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Prof. dr Dušan Lalošević
Prof. dr Jovanka Kolarović

Kandidat:
Dušica Popović

Novi Sad, 2019. godine

Ispitivanja koja su urađena za vreme izrade doktorske disertacije finansirana su iz sredstava dugoročnog projekta od značaja za nauku i tehnološki razvoj AP Vojvodine - naučnog projekta broj 142-451-2413/2018-03 (u toku je treća faza projektnog ciklusa 2016-2019. godine) pod nazivom: „Efikasna, selektivna, netoksična antitumorska terapija nanoinkapsulacijom, ciljanim pogađanjem antikancerskih meta i PET/CT praćenjem bolesnika“, Medicinski fakultet Novi Sad iz Novog Sada (koji je finansirala AP Vojvodina, Pokrajinski sekretarijat za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost).

Zahvalnica

Zahvaljujem se svojim mentorima, prof. dr Dušanu Laloševiću, šefu Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu i prof. dr Jovanki Kolarović, načelnici Odeljenja za hematologiju Službe za dečju hematologiju i onkologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, na nesebičnoj pomoći i požrtvovanom zalaganju koje je bilo presudno za nastanak ove disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Ivanu Čapo, šefu Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na korisnim sugestijama i izdvojenom vremenu tokom izrade doktorata, pomoći, predusretljivosti i razumevanju.

Zahvaljujem se prijateljima i kolegama, asistentima dr Dejanu Miljkoviću i dr Milanu Popoviću sa Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, i dr Kostu Popoviću sa Zavoda za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu na velikom trudu koji su uložili prilikom izrade ove teze.

Takođe se zahvaljujem kolegama dr Pavlu Banoviću sa Pasterovog zavoda, Jovani Drljači, Mileni Vujkov i Dragici Bulajić sa Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu za dragocenu pomoć.

Posebno se zahvaljujem višem naučnom saradniku Sari Savić i naučnom saradniku Marini Žekić sa Naučnog instituta za veterinarstvo u Novom Sadu za pomoć u vezi hematološke i biohemijske analize krvi.

Prof. dr Jasni Mihailović, prof. emeritusu dr Branimiru Guduriću, izuzetnim stručnjacima za onkologiju, kao i doc. dr Božani Nikolić, zahvaljujem na korisnim savetima.

Ogromnu zahvalnost dugujem bratu i roditeljima, Jovanu i Vesni, koji su uvek bili nezamenjiv oslonac i podrška, tokom celog mog života, i posebno tokom izrade ovog rada.

Dušica Popović

Univerzitet u Novom Sadu
Medicinski fakultet
Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Dušica Popović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Dušan Lalošević Prof. dr Jovanka Kolarović
Naslov rada: NR	Delovanje lekova registrovanih za neonkološke indikacije na eksperimentalni fibrosarkom hrčka
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2019.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 8 / stranica 117 / slika 36 / referenci 150 / priloga 1)
Naučna oblast: NO	Medicinske nauke
Naučna disciplina: ND	Histologija i embriologija, Onkologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	eksperimentalni sarkom + terapija lekovima; metformin; mebendazol; itrakonazol; diklofenak; nitroglicerin; deoksiholna kiselina; kofein; eksperiment na životinjama; sirijski zlatni hrčak
UDK	615.2.017:616-006 615.2.017:[612.08:599.323.4 615.277.07
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Mnogi lekovi registrovani za razne druge indikacije mogu da deluju selektivno na tumorske receptore, signalne puteve, metaboličke procese, bioenergetske faktore, enzime, proteine, gene koji regulišu proliferaciju, apoptozu i neoangiogenezu tumora ne pogađajući ove procese kod zdravih ćelija. Uvođenje novih lekova je izrazito dug, složen i skup proces istraživanja. Korišćenjem principa otkrivanja antikancerskog efekta kod već registrovanih lekova za druge indikacije, direktno se utiče na skraćivanje vremena i troškova istraživanja.</p> <p>Eksperimentalno je ispitana efikasnost antitumorskog delovanja mebendazola, metformina, itrakonazola, diklofenaka, nitroglicerina i deoksiholne kiseline na fibrosarkom hrčka izazvan BHK21/C13 tumorskom ćelijskom linijom praćenjem veličine i histologije lečenih tumora.</p> <p>Eksperimentalno je ispitana mogućnost primene deoksiholne kiseline, nitroglicerina, kofeina i itrakonazola kao adjuvansa u kombinaciji sa pojedinim ispitivanim lekovima (metformin, itrakonazol, diklofenak) za lečenje fibrosarkoma hrčka.</p> <p>Kako je ispitivanje vršeno na mladuncima i</p>

	<p>mladim hrčkovima i kako su sarkomi najčešći u dečijem uzrastu, definisanje potencijalne antikancerske uloge ispitivanih lekova se odnosi prvenstveno na njihovu primenu u pedijatriji. Pokazano je da metformin, kombinacije metformina sa kofeinom, metformina sa itrakonazolom i metformina sa nitroglicerinom deluju u pogledu svih ispitivanih parametara tumora antitumorski na fibrosarkom hrčka. Kofein, itrakonazol i nitroglicerin pojačavaju antitumorsko dejstvo metformina na fibrosarkom hrčka.</p> <p>Tokom svih eksperimenata realizovanih u okviru ove disertacije, pokazalo se da nije bilo delotvornog tretmana, koji ne sadrži metformin.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	10.11.2016. godine
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: prof. dr Dušan Lalošević član: prof. dr Jovanka Kolarović član: prof. dr Jasna Mihailović član: doc. dr Božana Nikolić član: prof. emeritus dr Branimir Gudurić

Univesity of Novi Sad
Faculty of Medicine
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Dušica Popović
Mentor: MN	PhD Dušan Lalošević, full professor PhD Jovanka Kolarović, full professor
Title: TI	Effect of repurposing non-cancer drugs on experimental fibrosarcoma in hamsters
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng./ srb.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LG	Vojvodina
Publication year: PY	2019.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Medical Faculty, Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Physical description: PD	(number of chapters 8 / pages 117 / pictures 36 / references 150 / additions 1)
Scientific field: SF	Medical science
Scientific discipline: SD	Histology and embriology, Oncology
Subject, key words: SKW	Sarcoma, Experimental + drug therapy; Metformin; Mebendazole; Itraconazole; Diclofenac; Nitroglycerin; Deoxycholic Acid; Caffeine; Animal Experimentation; Mesocricetus
UC	615.2.017:616-006 615.2.017:[612.08:599.323.4 615.277.07
Holding data: HD	Library of Medical faculty, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>Many drugs registered for various other indications can act selectively to tumor receptors, signaling pathways, metabolic processes, bioenergetic factors, enzymes, proteins, genes that regulate proliferation, apoptosis, and neoangiogenesis of the tumor without affecting these processes in the healthy cells. The introduction of new drugs is a very long, complex and expensive process of research. Using the principle of detecting the anticancer effect in already registered drugs for other indications, directly affects the reduction of time and cost of research.</p> <p>The efficacy of mebendazole, metformin, itraconazole, diclofenac, nitroglycerin and deoxycholic acid antitumor activity on hamster fibrosarcoma induced experimentally by the BHK21/C13 tumor cell line was tested by monitoring the size and histology of the treated tumors.</p> <p>The possibility of using deoxycholic acid, nitroglycerin, caffeine and itraconazole as an adjuvant in combination with investigated drugs (metformin, itraconazole, diclofenac) for the treatment of hamster fibrosarcoma has been experimentally tested.</p>

	<p>As the examination was carried out on young cubs and young hamsters and that sarcomas are the most common in childhood, defining the potential anti-cancer role of the investigated drugs relates primarily to their application in pediatrics.</p> <p>Metformin, combinations of metformin with caffeine, metformin with itraconazole and metformin with nitroglycerin have shown antitumor action on the hamster fibrosarcoma in terms of all tested tumor parameters. Caffeine, itraconazole and nitroglycerin increase the antitumor effect of metformin on the hamster fibrosarcoma. During all the experiments carried out within this dissertation, there has been no effective treatment, which does not contain metformin.</p>
Accepted on Senate on: AS	10 th November 2016
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: PhD Dušan Lalošević, full professor</p> <p>member: PhD Jovanka Kolarović, full professor</p> <p>member: PhD Jasna Mihailović, full professor</p> <p>member: PhD Božana Nikolić, assistant professor</p> <p>member: PhD Branimir Gudurić, professor emeritus</p>

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1 Registrovani lekovi za koje postoje dokazi o antikancerskim svojstvima	3
2.2 Efekat nekih neonkoloških lekova na tumore prema podacima <i>in vitro</i>.....	5
2.2.1. Mebendazol	6
2.2.2. Metformin.....	7
2.2.3. Itrakonazol	7
2.2.4. Diklofenak	7
2.2.5. Nitroglicerina	8
2.3 Mehanizmi delovanja neonkoloških lekova na antitumorske ciljeve	8
2.4 Sarkomi u pedijatriji.....	10
3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	11
3.1 Ciljevi istraživanja	11
3.2 Radne hipoteze	11
3.3 Očekivani rezultati istraživanja.....	11
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	13
4.1 Eksperimentalni model i plan istraživanja.....	15
4.2 Materijal.....	17
4.2.1 Korišćena ćelijska kultura	17
4.2.2 Korišćene hemijske supstance.....	18
4.2.3 Korišćene eksperimentalne životinje.....	19
4.2.4 Supstance korišćene za histološku obradu i imunohistohemijsko bojenje tkiva	19
4.3 Metode.....	20
4.3.1 Programi istraživanja (faze)	20
4.3.2 Histološka obrada i imunohistohemijsko bojenje tkiva	31
4.3.3 Statistička analiza	34
5. REZULTATI.....	35
5.1. Eksperiment I - Delovanje mebendazola na fibrosarkom kod mladih hrčaka ...	35
5.2. Eksperiment II - Delovanje metformina na fibrosarkom kod mladih hrčaka	38
5.3. Eksperiment III - Delovanje kombinacije metformina i kofeina na fibrosarkom kod mladih hrčaka	41

5.4. Eksperiment IV – Delovanje itrakonazola i antikancerska interakcija metformina i itrakonazola na fibrosarkomu mladih hrčaka	45
5.5. Eksperiment V – Delovanje diklofenaka, metformina sa nitroglicerinom (na malim - mladuncima i velikim mladim jedinkama hrčaka) i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom na mladuncima	57
5.6. Eksperiment VI – Delovanje deoksiholne kiseline, nitroglicerina, i kombinacija itrakonazola sa deoksiholnom kiselinom, itrakonazola sa nitroglicerinom, metformina sa deoksiholnom kiselinom, diklofenaka sa deoksiholnom kiselinom i diklofenaka sa nitroglicerinom	61
6. DISKUSIJA	65
6.1. Eksperiment I – Antikancersko delovanje mebendazola.....	65
6.2. Eksperiment II – Antikancersko delovanje metformina	72
6.3. Eksperiment III – Antikancersko delovanje kombinacije metformina i kofeina	77
6.4. Eksperiment IV – Antikancersko delovanje itrakonazola i kombinacije metformina i itrakonazola	81
6.5. Eksperiment V – Antikancersko delovanje kombinacije metformina sa nitroglicerinom i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom	85
6.6. Eksperiment VI – Antikancersko delovanje kombinacija sa deoksiholnom kiselinom	86
7. ZAKLJUČCI	88
8. LITERATURA	91
9. PRILOG.....	106

1. UVOD

Sve je više saznanja da mnogi lekovi registrovani za razne druge indikacije mogu da deluju selektivno na tumorske receptore, signalne puteve, metaboličke procese, bioenergetske faktore, enzime, proteine, gene koji regulišu proliferaciju, apoptozu i neoangiogenezu tumora ne pogađajući ove procese kod zdravih ćelija. Uvođenje novih lekova je izrazito dug, složen i skup proces istraživanja. Korišćenjem principa otkrivanja antikancerskog efekta kod već registrovanih lekova za druge indikacije, direktno se utiče na skraćivanje vremena i troškova istraživanja.

Preklinički laboratorijski eksperimenti i brojne kliničke studije, kao i epidemiološka istraživanja velikih razmera argumentuju perspektivna antitumorska svojstva mnogih postojećih lekova koje milioni ljudi uzimaju sigurno svaki dan za druge indikacije [1-4]. Do sada je identifikovano oko 70 registrovanih lekova za koje postoje dokazi o antikancerskim svojstvima, na primer: antihelmintik mebendazol [5], analgo-antipiretik aspirin [6], antidijabetik metformin [7-9], lekovi za snižavanje holesterola statini [10], antibiotik doksiciklin [11], antacid cimetidin [12], antigljivični lek itrakonazol [13], ACE-inhibitor perindopril [14, 15], vazodilatator nitroglicerina [16], antireumatik diklofenak [17, 18] i dr. Za nabrojane lekove postoje podaci [1-4] da suprimiraju rast kultura malignih ćelija *in vitro* (nisu dovršena ispitivanja na eksperimentalnim životinjama *in vivo*, kao ni klinička ispitivanja) sledećih neoplazmi (Tabela 2.1.): malignog melanoma [18-20], karcinoma pluća [16, 21], adrenokortikalnog [22, 23], kolorektalnog karcinoma [18, 24-26], karcinoma dojke [27], jajnika [28], hepatocelularnog karcinoma [29], fibrosarkoma [18], osteosarkoma [24], sarkoma mekog tkiva [24], akutne mijeloidne leukemije [30, 31], glioblastoma [32], meduloblastoma [33, 34] i dr. Pri tome, ovi lekovi pogađaju neke od sledećih tumorskih meta izazivajući: oštećenje mikrotubula neophodnih za deobu [35-39], stimulaciju p53 proteina čuvara genoma [40], suprimiranje Bcl-2 onkogeni i proteina [40-41], podsticanje Bax gena i proteina stimulatora apoptoze [42-52], inhibiciju AMPK/m-TOR (Mammalian Target of Rapamycin) signalnog puta [7-9, 53-61], antihipoksičke efekte [16, 62, 63], inhibiciju Hedgehog signalnog puta [64, 65], inhibiciju COX-2 (sinteze prostaglandina PGE₂) [17, 18], inhibiciju autofagije [7-9], imunostimulaciju [66-70], antihistaminske efekte [12], antimigratorne efekte [61], čime se postiže suprimiranje proliferacije [4, 36], podsticanje

apoptoze (programirana ćelijska smrt) [40-63], sprečavanje neoangiogeneze [4], ometanje metastaziranja [61] i dr. Treba proširiti shvatanje mogućnosti i značaja primene ovih lekova u onkologiji. Dalji eksperimenti *in vivo* na eksperimentalnim životinjama i kliničke studije neophodni su u cilju potvrđivanja antitumorskih svojstava poznatih lekova koji se standardno primenjuju za druge indikacije, i za koje grupe pacijenata je takva terapija netoksična i efikasnija od uobičajene onkološke terapije. Analiza eksperimentalnih i kliničkih rezultata je ključna za poboljšanje antitumorskog lečenja. Lek protiv raka treba da bude etički odobren i naučno dokazano efikasan. Potrebno je da se pronade najbolji, najsigurniji i što jeftiniji oblik lečenja protiv raka.

Nepovoljna onkoepidemiološka situacija u svetu, posmatrajući trend porasta obolevanja i umiranja od malignih bolesti, utiče na veliku angažovanost farmaceutske industrije u potrazi za lekovima koji bi ispoljavali antitumorski efekat.

U otklanjanju posledica ekološke katastrofe uzrokovane ratom i bombardovanjem osiromašenim uranijumom, od neprocenjivog značaja po zdravlje stanovništva je efikasna i netoksična antitumorska terapija, posebno kod dece, jer su u tom životnom dobu maligniteti u najvećem porastu. Sarkomi, u značajnom procentu smrtonosni maligni tumori, su najčešći u dečijem uzrastu, a mogu se javiti i na samom rođenju (Slika 4.1.). Zbog toga će se antikancerska efikasnost netoksičnih lekova i njihovih kombinacija ispitivati na modelu dečijih kancera, kao što je fibrosarkom mladih hrčkova (slike 4.2, 4.3. i 4.4.).

2. OPŠTI DEO

2.1 Registrovani lekovi za koje postoje dokazi o antikancerskim svojstvima

Pronalasci ciljanog, selektivnog, efikasnog, neškodljivog, brzo primenljivog, finansijski mogućeg lečenja malignih bolesti, ne predstavljaju samo prvorazredni naučni izazov otkrivanja same suštine i mehanizama života i smrti ćelija, nego su pre svega dobrobit za bolesnike, dužinu i kvalitet njihovog života i rada, kao i za ekonomski interes društva. Jedna od mogućnosti u tom pravcu je utvrđivanje antitumorskog dejstva dobro poznatih lekova registrovanih za druge indikacije.

Tabela 2.1. Efekat nekih neonkoloških lekova na tumore prema podacima *in vitro*, u preliminarnim kliničkim i epidemiološkim studijama

Neoplazme	Neonkološki lekovi	Delovanje na antitumorske ciljeve
maligni melanom [5, 12, 18-20]	mebendazol [5], nitroglicerini [16], cimetidin [12], diklofenak [17, 18]	oštećenje mikrotubula [36-39] sprečavanje hipoksije [16, 62, 63] inhibicija autofagije [7-9] inhibicija neoangiogeneze [4] imunomodulacija [66-70]
karcinom pluća [5, 16, 21]	mebendazol [5], metformin [7-9], itakonazol [13], diklofenak [17, 18], nitroglicerini [16]	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija AMPK/mTOR signalnog puta [7-9, 53-61] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18] imunomodulacija [66-70] sprečavanje hipoksije [16, 62, 63]
adrenokortikalni karcinom [5, 22, 23]	mebendazol [5], itakonazol [13], oralni ciklofosfamid	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65]
kolorektalni karcinom [5, 12, 18, 24-26]	mebendazol [5], metformin [7-9], cimetidin [12], diklofenak [17, 18] nitroglicerini [16]	oštećenje mikrotubula [36-39] Inhibicija AMPK/mTOR signalnog puta [7-9, 53-61] imunomodulacija [66-70] inhibicija histamina [12] inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18] sprečavanje hipoksije [16, 62, 63]

Neoplazme	Neonkološki lekovi	Delovanje na antitumorske ciljeve
karcinom dojke [5, 13, 18, 27]	mebendazol [5], metformin [7-9], oralni ciklofosamid, cimetidin [12], nitroglicerin [16]	oštećenje mikrotubula [36-39] Inhibicija AMPK/mTOR signalnog puta [7-9, 53-61] inhibicija neoangiogeneze [4] imunomodulacija [66-70]
karcinom jajnika [5, 13, 18, 28]	mebendazol [5], metformin [7-9], diklofenak [17, 18], itakonazol [13], cimetidin [12]	oštećenje mikrotubula [36-39] Inhibicija AMPK/mTOR signalnog puta [7-9, 53-61] inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija autofagije [7-9]
hepatocelularni karcinom [29]	mebendazol [5], ili albendazol	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65]
karcinom bubrega [12]	cimetidin [12], celekoksib, losartan, itakonazol [13]	inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] imunomodulacija [66-70]
karcinom pankreasa [13, 18]	cimetidin [12], oralni ciklofosamid, diklofenak [17, 18], mebendazol [5], itakonazol [13], PSK (polisaharid K/Krestin)	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija neoangiogeneze [4] imunomodulacija [66-70]
karcinom želuca [12]	cimetidin [12], celekoksib, itakonazol [13]	inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18] inhibicija neoangiogeneze [4] imunomodulacija [66-70]
karcinom prostate [8, 13, 18, 61]	itakonazol [13], statini (fluvastatin), mebendazol [5], metformin [7-9], nitroglicerin [16]	inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija neoangiogeneze [4] oštećenje mikrotubula [36-39]
bazocelularni karcinom [13]	itakonazol [13], celekoksib	inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18]

Neoplazme	Neonkološki lekovi	Delovanje na antitumorske ciljeve
fibrosarkom, osteosarkom i sarkom mekog tkiva [5, 17, 18, 24]	mebendazol [5], itrakonazol [13], metformin [7-9], cimetidin [12], diklofenak [17, 18], oralni ciklofosfamid	oštećenje mikrotubula [36-39] Inhibicija AMPK/mTOR signalnog puta [7-9, 53-61] IGF-I [7-9] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija autofagije [7-9] imunomodulacija [66-70]
akutna mijeloidna leukemija [5, 30, 31]	mebendazol [5], albendazol ili oralni vinorelbin, diklofenak [17, 18]	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18]
glioblastom i meduloblastom [5, 13, 18, 32-34]	mebendazol [5], hidroklorokin, itrakonazol [13], cimetidin [12], diklofenak [17, 18]	oštećenje mikrotubula [36-39] inhibicija autofagije [7-9] inhibicija neoangiogeneze [4] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] imunomodulacija [66-70]
dezmoidalni tumori [18]	diklofenak [17, 18], tamoksifen	inhibicija COX-2 (inhibicija PGE ₂) [17, 18] inhibicija neoangiogeneze [4]

2.2 Efekat nekih neonkoloških lekova na tumore prema podacima *in vitro*

Mnogi lekovi registrovani za razne druge indikacije suprimiraju rast kultura malignih ćelija *in vitro*, ali nisu dovršena ispitivanja na eksperimentalnim životinjama *in vivo*, kao ni klinička ispitivanja. Za pronalazak novog leka potrebno je u proseku 13 godina i oko 1,8 milijardi američkih dolara. Potencijalni novootkriveni antitumorski efekat leka, koji je već registrovan za druge indikacije, ima ogroman značaj imajući u vidu činjenicu da prosečna cena lečenja jednog onkološkog bolesnika danas iznosi više desetina hiljada evra.

Za potrebe ovog istraživanja izabrano je 5 registrovanih lekova za neonkološke indikacije sa antitumorskim svojstvima:

- mebendazol (antihelmintik),
- metformin (antidijabetik),

- itrakonazol (antigljivični lek),
- diklofenak (antireumatik),
- nitroglicerin (vazodilatator).

Ovi lekovi su izabrani iz sledećih razloga:

- od identifikovanih registrovanih lekova za netumorske indikacije sa antikancerskim svojstvima, za navedenih 5 lekova postoje podaci da deluju na ćelijske kulture sarkoma ili mogu aktivirati antitumorske ciljeve koji se koriste kod hemioterapije sarkoma (za razliku od ostalih, koji deluju na ćelije karcinoma i drugih vrsta tumora);
- već dugo se nalaze u širokoj upotrebi u svetu, kao i kod nas;
- nemaju značajnijih neželjenih dejstava, tj. relativno su netoksični;
- lako su dostupni i jeftini.

2.2.1. Mebendazol

Mebendazol, dobro poznat antihelmintik u širokoj kliničkoj upotrebi, je ispoljio antitumorska svojstva u brojnim pretkliničkim studijama na kulturama tumorskih ćelija raznih vrsta [5]. Postoje i prikazi slučajeva o antitumorskim svojstvima na čoveku. S obzirom na oštećenje mikrotubula potrebnih za ćelijske deobe i inhibiciju Hedgehog signalnog puta, pretpostavlja se da mebendazol može delovati sinergistički sa mnogim postojećim hemioterapeuticima, ali su za to potrebna dalja ispitivanja.

Mebendazol je antihelmintik koji se široko primenjuje u terapiji infekcija uzrokovanih parazitskim crvima, posebno u endemskim tropskim oblastima. Iako nema objavljenih rezultata o sprovedenim kliničkim ispitivanjima, postoje brojni dokazi da mebendazol može sprečiti proliferaciju ćelija kancera i pojavu sekundarnih tumora. Mebendazol je pokazao dobru antitumorsku aktivnost protiv različitih tipova kancera: melanoma [19, 20]; karcinoma pluća [21], adrenokortikalnog karcinoma [22, 23], kolorektalnog karcinoma [24-26], karcinoma dojke [27], jajnika [28] i hepatocelularnog karcinoma [29]; osteosarkoma i sarkoma mekog tkiva [24]; akutne mieloidne leukemije [30, 31]; glioblastoma multiforme [32] i meduloblastoma [33, 34].

Međutim, uprkos značajnom antiproliferativnom delovanju na ćelijske kulture *in vitro*, do sada nije istražena, niti u potpunosti objašnjena vrednost mebendazola u

antitumorskoj terapiji. Odnosno, do sada nije *in vivo* na eksperimentalnim životinjama utvrđeno da li mebendazol, i na koji način tačno, inhibira proliferaciju ćelija kancera. Postoji samo nekoliko istraživanja antikancerskog delovanja mebendazola *in vivo* na solidne tumore, uključujući i sarkome, koja su sprovedena na eksperimentalnim životinjama. Zato je cilj ovog istraživanja da odgovori na pitanje da li mebendazol (sam, ili u kombinaciji sa deoksiholnom kiselinom), na bilo koji način sprečava rast solidnih tumora na eksperimentalnom životinjskom modelu, kao što je fibrosarkom kod hrčaka.

2.2.2. Metformin

Za **metformin**, lek prvog izbora u terapiji dijabetes melitusa tipa 2, je u nekoliko kliničkih studija objavljeno da smanjuje rizik od maligniteta kod obolelih od dijabetesa u odnosu na one koji su uzimali ostale antidijabetike [7-9]. *In vitro* studije su ustanovile značajno antiproliferativno i proapoptotičko dejstvo metformina na razne vrste tumorskih ćelija [56]. On stimuliše AMP-aktiviranu protein kinazu (AMPK) ključni regulator energetske homeostaze i inhibira mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) sa posledičnim smanjenjem proliferacije kancerskih ćelija. Ovi novi ohrabrujući eksperimentalni podaci, koji potvrđuju antitumorska svojstva metformina, zahtevaju hitna dalja ispitivanja u cilju njegove što skorije upotrebe u sklopu sinergističke terapije usmerene na AMPK/mTOR antitumorsku metu.

2.2.3. Itrakonazol

Itrakonazol, lek koji se uobičajeno i široko koristi u prevenciji i sistemske terapiji gljivičnih oboljenja, na ćelijskim kulturama pokazuje antikancerska svojstva inhibicijom Hedgehog signalnog puta i inhibicijom autofagije [13]. Kliničke studije su pokazale da su pacijenti sa karcinomima prostate, pluća, jajnika, dojke, pankreasa i bazalnih ćelija (epiderma kože), kao i leukemijom imali koristi od itrakonazola [13]. Zahvaljujući navedenim nalazima, itrakonazol zahteva dalja ispitivanja kao antitumorski lek i ispitivanja mogućnosti njegove kombinacije sa drugim antitumorskim lekovima.

2.2.4. Diklofenak

Diklofenak je dobro poznat i široko korišćen nesteroidni antiinflamatorni lek sa nizom delovanja koja su značajna u onkologiji. Tako, diklofenak, snažni inhibitor COX-2 i

sinteze prostaglandina E₂ ispoljava niz efekata na imunološki sistem, angiogenezu i metabolizam tumora. Pretklinički i početni klinički rezultati na raznim vrstama kancera [18] zahtevaju dalja ispitivanja antitumorskih svojstava diklofenaka, naročito u kombinacijama sa drugim citostaticima.

2.2.5. Nitroglicerín

Nitroglicerín, lek koji se koristi više od 100 godina, ima niz delovanja posebno značajnih za onkologiju [16]. Produkcija azotnog oksida poboljšava srčanu oksigenaciju pomoću više mehanizama: vazodilatacijom, smanjenjem agregacije trombocita, povećanim otpuštanjem kiseonika iz eritrocita, smanjenim iskorišćavanjem kiseonika u mitohondrijama. Njegova vazoaktivna svojstva mogu pojačati propustljivost i zadržavanje antitumorskih lekova u tumorskim tkivima. Nadalje, i sam nitroglicerín ima antiangiogeno, proapoptotičko i stimulišuće dejstvo na antitumorski imunitet. Ove pretkliničke i kliničke podatke o korisnim antitumorskim svojstvima nitroglicerína treba analizirati u daljim studijama, kao i koristi od njegovog sinergističkog dejstva sa drugim antitumorskim lekovima.

2.3 Mehanizmi delovanja neonkoloških lekova na antitumorske ciljeve

Tabela 2.2. Pregled antitumorskih dejstava izabranih registrovanih lekova za netumorske indikacije

	Lek	Vrste tumora za koje je evidentirano antitumorsko dejstvo	Mehanizam antitumorskog dejstva
1	mebendazol [5]	maligni melanom [19-20] karcinom pluća [21] adrenokortikalni karcinom [22, 23] kolorektalni karcinom [24-26] karcinom dojke [27] karcinom jajnika [28] karcinom prostate [8] osteosarkom [24] meduloblastom, glioblastom [32-34]	oštećenje mikrotubula neophodnih za deobu [21, 36-39] stimulacija p53 proteina čuvara genoma [40] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] sprečavanje neoangiogeneze [4]

	Lek	Vrste tumora za koje je evidentirano antitumorsko dejstvo	Mehanizam antitumorskog dejstva
2	metformin [7-9, 56]	kolorektalni karcinom [3] karcinom dojke [3] karcinom jajnika [3] karcinom prostate [61] karcinom pankreasa [3] fibrosarkom, osteosarkom i sarkom mekog tkiva [53-58] mijelom [59] leukemija [60]	inhibicija AMPK/m-TOR (Mammalian Target of Rapamycin) signalnog puta [7-9]
3	itrakonazol [13]	karcinom dojke [13] karcinom prostate [13] karcinom pluća [13] karcinom jajnika [13] karcinom pankreasa [13] bazeocelularni karcinom [13] meduloblastom, glioblastom [13]	inhibicija m-TOR (Mammalian Target of Rapamycin) signalnog puta [7-9] inhibicija Hedgehog signalnog puta [64, 65] inhibicija autofagije [7-9] sprečavanje neoangiogeneze [4]
4	diklofenak [18]	fibrosarkom [17, 18] kolorektalni karcinom [18] karcinom pankreasa [18] karcinom jajnika [18] karcinom dojke [18] karcinom prostate [18] gliom [18] maligni melanom [18] dezmoidalni tumori [18]	inhibicija COX-2 (sinteze prostaglandina PGE ₂) [17, 18] imunostimulacija [66-70] podsticanje apoptoze (programirana ćelijska smrt) [40-63] sprečavanje neoangiogeneze [4]
5	nitroglicerina [16]	maligni melanom [16] karcinom pluća [16] kolorektalni karcinom [16] karcinom dojke [16] karcinom prostate [16]	vazodilatacija [16] antihipoksički efekti [16, 62, 63] imunostimulacija [66-70] podsticanje apoptoze (programirana ćelijska smrt) [40-63]

2.4 Sarkomi u pedijatriji

Istražujemo inovativnu antikancersku terapiju na eksperimentalnom modelu sarkoma *in vivo* (Slika 4.2.), koji su najčešći u dečijem uzrastu [71-74].

Rabdomiosarkom (embrionalni i alveolarni podtip) je najčešći mekotkivni sarkom kod dece i adolescenata (40%). Petogodišnje preživljavanje za decu ispod 15 godina je 67%, a za adolescente od 15 do 19 godina 51% [75-77].

Sinovijalni sarkom kod adolescenata i mladih osoba [76], infantilni fibrosarkom (Slika 4.1.), dermatofibrosarkom protuberans, gigantocelularni fibroblastom [78] hemangiopericitom i maligni rabdoidni tumori kod male dece [75] su najčešći pedijatrijski nerabdomiosarkomi (60% mekotkivnih tumora). Preživljavanje dece kod diseminacije <15 %.

Osteosarkom je najčešći koštani tumor kod dece i adolescenata [75, 79]. Najveća učestanost je u uzrastu od 15 godina [75]. Preživljavanje kod hemoterapije je 50%, a kod isključivo hirurške terapije oko 20%.

Ewing-ov sarkom je drugi po učestanosti od koštanih tumora kod dece i adolescenata [75, 76]. Više od 50% pacijenata su adolescenti. Uz hemoterapiju, hirurgiju i radioterapiju, petgodišnje preživljavanje je veće od 50% [75, 76].

U pedijatriji bi bilo od najvećeg značaja:

1. Povećati efikasnost dosadašnje terapije kancera, a posebno sarkoma u pedijatriji
2. Sprečiti dugoročna toksična dejstva dosadašnjih antikancerskih terapija kod dece (smanjen fertilitet, imunološka kompetentnost, rast i razvoj)
3. Sprečiti kratkoročna neželjena dejstva dosadašnje terapije maligniteta u pedijatriji (muka, povraćanje, dijareja, alopecija)
4. Prevencija relapsa maligniteta kod dece, sprečiti širenje na limfne čvorove i metastaziranje netoksičnim sredstvima
5. Pronaći netoksično preventivno sredstvo za slučajeve povećanog rizika od kancera kod dece.

3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

3.1 Ciljevi istraživanja

1. Eksperimentalno dokazati efikasnost antitumorskog delovanja mebendazola, metformina, itrakonazola, diklofenaka i nitroglicerina na fibrosarkom hrčka izazvan BHK21/C13 tumorskom ćelijskom linijom praćenjem veličine i histologije lečenih tumora
2. Eksperimentalno dokazati mogućnost primene deoksiholne kiseline i nitroglicerina kao adjuvansa u kombinaciji sa pojedinim ispitivanim lekovima (metformin, itrakonazol, diklofenak) za lečenje fibrosarkoma hrčka.

3.2 Radne hipoteze

1. Mebendazol, metformin, itrakonazol, diklofenak i nitroglicerin deluju antitumorski na fibrosarkom hrčka.
2. Deoksiholna kiselina i nitroglicerin pojačavaju antitumorsko delovanje metformina, itrakonazola i diklofenaka na fibrosarkom hrčka.

3.3 Očekivani rezultati istraživanja

Očekuje se da lekovi mebendazol, metformin, itrakonazol, diklofenak i nitroglicerin ispolje antitumorsko delovanje na eksperimentalno izazvanom fibrosarkomu hrčka. Takođe, očekuje se da deoksiholna kiselina i nitroglicerin potenciraju efekat metformina, itrakonazola i diklofenaka na fibrosarkom hrčka.

Očekuje se primena naročito u pedijatriji. Na eksperimentalnim sarkomima mladunaca hrčaka, očekuje se definisanje potencijalne antikancerske uloge netoksičnih lekova u pedijatriji registrovanih za druge indikacije. To će skratiti ispitivanje i cenu antitumorskog leka u pedijatriji.

Rezultati istraživanja treba da doprinesu efikasnoj i kraćoj antitumorskoj terapiji dece, uz smanjenje neželjenih dejstava i cene lečenja.

Utvrđivanje dodatnih antitumorskih efekata dobro poznatih lekova (metformin, itrakonazol, nitroglicerina, kofeina), može naći primenu upravo zbog njihove neškodljivosti, niske cene i dostupnosti.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Univerziteta u Novom Sadu dala je pozitivno mišljenje o etičnosti rada i odobrila sprovođenje oglada na životinjama (broj 01-78/18-5 od 26.04.2016. godine) u svrhe medicinskih istraživanja koja se odnose na zdravstvene poremećaje i bolesti, njihov uzrok, genezu, dijagnostiku, tretman, prevenciju i slično. Kao cilj korišćenja životinja prijavljeno je i odobreno ispitivanje antitumorskih svojstava netoksičnih lekova registrovanih za neonkološke indikacije na eksperimentalnom fibrosarkomu mladih hrčaka, koji je izazvan potkožnom inokulacijom kulture BHK21/C13 tumorskih ćelija i praćenje veličine i histologije lečenih tumora.

Svi postupci manipulacije sa eksperimentalnim životinjama bili su u skladu sa preporukom Helsinške deklaracije. Injekcije su davane što je moguće bezbolnije. Eksperimenti u okviru ovog istraživanja sprovedeni su u skladu sa zakonskim odredbama i smernicama za zaštitu i dobrobit životinja, posebno u skladu sa Direktivom 2010/63/EU od 22. septembra 2010. godine o zaštiti životinja koje se koriste u naučne svrhe i sa „Vodičem za negu i korišćenje laboratorijskih životinja” Ministarstva zdravlja SAD iz 1985. godine (U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institute’s of Health “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. NIH Publication No. 85-23. Revised 1985.) i Osmim izdanjem istog Vodiča iz 2011. godine, kao i sa Zakonom o dobrobiti životinja Republike Srbije („Službeni glasnik Republike Srbije”, br. 41/09. od 10. juna 2009. godine), i Pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Novom Sadu, od 19. maja 2017. godine. Pored toga, eksperimenti na životinjama sprovedeni su u skladu sa dokumentima: Naučne procedure i uputstva za rad sa životinjama (Velika Britanija), smernice ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) britanskog Nacionalnog centra za zamenu, usavršavanje procedura i smanjenje korišćenja životinja u istraživanjima (The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research – NC3R, London, UK), i sa smernicama za eutanaziju AVMA Američkog veterinarskog medicinskog udruženja (American Veterinary Medical Association) iz 2013. godine. Opterećenje tumorom nije prekoračilo preporuke Smernica za zaštitu i korišćenje životinja Univerziteta u Pensilvaniji (University of Pennsylvania Institutional Animal Care and

Use Committee - IACUC guidelines, ~10% telesne mase). Principi zaštite na radu obezbeđeni su u skladu sa obrazloženjem plana i programa ovog istraživanja.

Utvrđeni su sledeći humani kriterijumi za eutanaziju eksperimentalnih životinja: značajan gubitak telesne težine (20%), značajno smanjena aktivnost i/ili brzina reagovanja praćena gubitkom telesne težine, nesposobnost za pravilno držanje tela, uzimanje hrane, mokrenje ili defekaciju. Takođe, prečnik tumora preko 3,5 cm (preko 22,44 cm³) ili ulceracija tumora definisani su kao humani kriterijumi za eutanaziju.

U našem istraživanju, kod eksperimentalnih životinja praćeni su: ponašanje, opšte stanje, telesna težina (merena jednom dnevno), opšti klinički znaci (dijareja, neurološki znaci, poremećaji disanja). Pored toga, praćeno je povećavanje prečnika tumora, anatomska lokacija, učestanost pojave višestrukih tumora i ulceracije tumora.

Prilikom realizacije eksperimentalnog dela disertacije, uz saglasnost, korišćeni su prostor, oprema i potrošni materijal Pasterovog zavoda i Katedre za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu:

- kavezni sistem za individualni smeštaj i negu eksperimentalnih životinja,
- laboratorijska oprema (vaga, laboratorijski sudovi, ...),
- potrošni materijal (bočice lekova, rukavice, špricevi, igle, vata, papirni ubrusi, rastvarači, sredstva za održavanje higijene, milimetarski papir, ...),
- metalne želudačne sonde, specijalno dizajnirane za intragastričnu aplikaciju lekova eksperimentalnim životinjama – hrčkovima,
- hirurška oprema za obdukciju (sto, skalpel, makaze, pincete, ...),
- oprema za histološku obradu i imunohistohemijsko bojenje uzoraka tkiva,
- mikroskop marke Leica DMLB100T (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany),
- kamera marke Leica MC190HD (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany),
- digitalni fotoaparati za pripremu foto-dokumentacije,
- računar sa instaliranim softverima za:
 - brojanje tumorskih ćelija u mitozima i kvantifikovanje ostalih pokazatelja na fotografijama imunohistohemijskih preparata (softver UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00),

- statističku analizu (softver TIBCO Statistica 13.3.1, TIBCO Software, Palo Alto, California, USA, Nov. 2017).

U skladu sa zakonom, Pasterov zavod sprovodi proceduru za odlaganje uginulih životinja ili životinja lišenih života (zaključen je ugovor sa fabrikom „Proteinka” u Somboru). Pored toga, upotrebljene bočice lekova, rukavice, špricevi, igle, vata, odlažu se u Pasterovom zavodu prema odgovarajućim propisima (potpisan je ugovor o odlaganju sa Medical Wast Disposal iz Zrenjanina).

Takođe, za hematološke i biohemijske analize krvi životinja korišćeni su aparati hematološki autoanalizator (Abacus Junior Vet, Diatron MI PLC, Hungary), biohemijski autoanalizator za serum (Rayto, RT-1904C, PR China) i komercijalni testovi (BioSystems S.A. Barcelona, Spain) Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad” u Novom Sadu.

4.1 Eksperimentalni model i plan istraživanja

Jednostavni **eksperimentalni model fibrosarkoma**, izazvanog subkutanom inokulacijom kulture malignih ćelija (BHK21/C13) kod mladih hrčaka, koji je primenjen u ovom ispitivanju, zbog mogućnosti izvođenja u našim uslovima, pogodan je da pruži dodatne podatke o delovanjima na sarkomske tumore i doprinese primeni pomenutih netoksičnih lekova u pedijatriji i onkologiji.

Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka

U ogleadne i kontrolne grupe će se uključiti sirijski zlatni hrčkovi (*Mesocricetus auratus*) starosti do 3 meseca, oba pola, težine do 150 g. Svaka grupa će se sastojati od minimalno šest nasumično odabranih jedinki (vodeći računa o podjednako polnoj zastupljenosti).

Tabela 4.1. Pregled eksperimentalnih i kontrolnih grupa

R. br. grupe	Primenjeni lekovi	Broj životinja	Trajanje eksperimenta
1)	čist rastvarač (kontrolne grupe)	6	1 mesec
2)	deoksiholna kiselina	6	1 mesec
3)	mebendazol	6	1 mesec

R. br. grupe	Primenjeni lekovi	Broj životinja	Trajanje eksperimenta
4)	metformin	6	1 mesec
5)	itakonazol	6	1 mesec
6)	diklofenak	6	1 mesec
7)	nitroglicerini	6	1 mesec
8)	metformin + nitroglicerini	6	1 mesec
9)	itakonazol + nitroglicerini	6	1 mesec
10)	diklofenak + nitroglicerini	6	1 mesec
11)	metformin + deoksiholna kiselina	6	1 mesec
12)	itakonazol + deoksiholna kiselina	6	1 mesec
13)	diklofenak + deoksiholna kiselina	6	1 mesec
Minimalno:		78	13 meseci

U toku rada, na osnovu rezultata dobijenih sa metforminom i analiziranja aktivacije zahvaćenih antikancerskih signalnih puteva, posebno antifolatnog, a sve u skladu sa osnovnim predmetom, ciljevima, zadacima, hipotezama i odobrenjem Etičke komisije, sprovedeno je ispitivanje kombinacijama metformina (antifolat) sa kofeinom (antifolat) i itrakonazolom (antifolat) na istom eksperimentalnom modelu, istom metodologijom.

Naime, rezultati eksperimenata sa metforminom su davali značajan antikancerski efekat samo ako se metformin daje bar 7 dana pre inokulacije tumora. Cilj je bio postizanje antikancerskog efekta terapijom posle inokulacije tumora. Zato je predviđeno da se ispituju, osim kombinacije metformina sa nitroglicerinom (koji ima takođe antifolatna svojstva), i kombinacije metformina sa lekovima za koje su analizom delovanja na antikancerske signalne puteve otkriveni zajednički mehanizmi sa metforminom, a pronađeno je da je to antifolatno dejstvo kofeina i itrakonazola. Cilj je da se pokaže dejstvo metformina u tom pravcu. Očekuje se sinergističko dejstvo metformina sa kofeinom, metformina sa itrakonazolom, kao i metformina sa nitroglicerinom, jer sva četiri leka, prema najnovijim saznanjima imaju antifolatno dejstvo. Ove kombinacije bi mogle biti efikasne i davanjem posle inokulacije tumora. Zajedničko antifolatno dejstvo metformina sa kofeinom, itrakonazolom ili nitroglicerinom bi moglo imati efekte metotreksata (najpoznatiji antifolatni citostatik) bez njegovih neželjenih dejstava. Metotreksat je jedan od najefikasnijih citostatika u lečenju osteosarkoma, mekotkivnih sarkoma i limfosarkoma, posebno kod dece [80-82]. Međutim, ima neželjena dejstva kao i svi citostatici.

4.2 Materijal

4.2.1 Korišćena ćelijska kultura

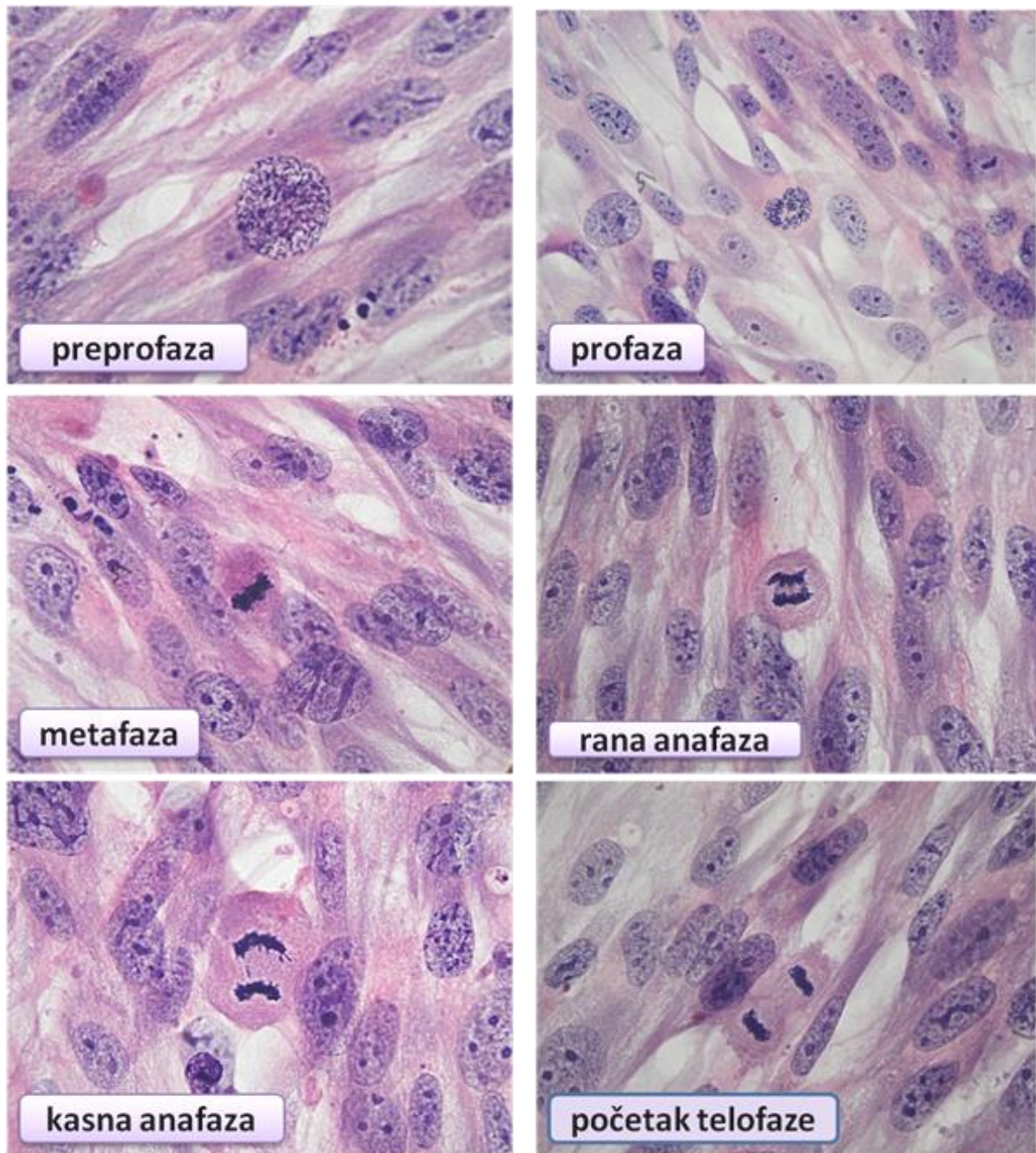
Korišćena je fibroblastna ćelijska linija BHK-21 sirijskog zlatnog hrčka, kultivisana od bubrega životinja starih 1 dan (Baby Hamster Kidney) [83-85], poreklom sa Pasterovog zavoda u Novom Sadu.

Primarne kulture iz kojih je izvedena fibroblastna ćelijska linija BHK-21 sirijskog hrčka kultivisane su u martu 1961. godine od bubrega 5 hrčaka starih 1 dan, iz legla broj 21. Devetnaest dana kasnije, prvo su uočene promene u brzini rasta, 8 klonova se razvilo od svake ćelije u maloj kapi medija mineralnog ulja. Jedan od njih, označen BHK-21/13 (ili C13) detaljno je ispitan i od njega potiče većina BHK ćelija koje se distribuiraju laboratorijama širom sveta. Brz rast i visoka efikasnost kloniranja BHK-21/C13 ćelija, u kombinaciji sa malim brojem hromozoma čini ih izuzetno pogodnim za različite pretkliničke eksperimente [83].

Vakcina protiv besnila proizvedena na BHK-21 ćelijama koristi se na životinjama već dugo vremena. Ova ćelijska linija predstavlja veoma dobar supstrat za uzgoj kultura virusa besnila, što omogućava proizvodnju vakcine bez skupih koncentracionih procedura [84]. BHK-21 linija fibroblasta sirijskog hrčka je u širokoj upotrebi za istraživanja virusa i neoplastičnih transformacija ćelija *in vitro* [85-87]. Nekoliko klonova BHK-21 ćelija (na primer, C-13) izazivaju tumore kod hrčaka [87]. Kao što je već opisano u literaturi [87, 88], BHK ćelije imaju sposobnost reprodukcije u tkivima hrčka, i sposobnost da izazovu pojavu tumora.

Subkutana inokulacija od 10^7 BHK-21/C13 ćelija izaziva pojavu fibrosarkoma koji ne metastazira kod hrčka (za razliku od drugih glodara), ali zbog veličine i lokalne infiltracije (ako se ne odstrani) dovodi do smrti životinje za 40 dana [86-88].

Fibroblastna ćelijska linija BHK-21/C13 je izabrana za ove eksperimente zbog svoje tumorogenosti (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Različiti stadijumi mitoze kod BHK kulture ćelija, H&E, 1000x

4.2.2 Korišćene hemijske supstance

U okviru ovog istraživanja korišćeni su

a) lekovi:

- mebendazol (u supstanci, dobijen od, Galenika a.d. Beograd, Republika Srbija)
- metformin (u supstanci, Galenika a.d. Beograd, Republika Srbija)

- itrakonazol (dobijen iz Kanazol® kapsula, 100 mg, Slavijamed d.o.o. Beograd, Republika Srbija)
- diklofenak (Diklofen®, rastvor za injekcije, ampule, 75 mg / 3 ml, Galenika a.d. Beograd, Republika Srbija)
- nitroglicerina (Nirmin®, koncentrat za rastvor za infuziju, ampula, 5 mg / 1,6 ml, Hemofarm A.D. Vršac, Republika Srbija).

b) fiziološki rastvor - 0,9% NaCl

c) maslinovo ulje

4.2.3 Korišćene eksperimentalne životinje

U izvođenju eksperimenta korišćene su mlade jedinke oba pola sirijskog zlatnog hrčka (*Mesocricetus auratus*), težine oko 100 grama, starosti 2-3 meseca (veliki) ili mladunci oko 40g, starosti oko 1 mesec (mali), poreklom sa Pasterovog zavoda u Novom Sadu.

4.2.4 Supstance korišćene za histološku obradu i imunohistohemijsko bojenje tkiva

Za pripremu i bojenje isečaka tkiva korišćeni su formalin, izopropanol, parafin, hematoksilin i eozin (HE).

U imunohistohemijskom bojenju korišćena su primarna antitela na Ki-67 pAb (kat. br. AB9260; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 1:50), Cytochrom C (Lab Vision – Thermo scientific) u razblaženju 1:100, CD34 (kat. br. EP373Y; Abcam, Cambridge, UK, 1:200), CD68 (Lab Vision – Thermo scientific) u razblaženju 1:40, PCNA, CD31 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), COX4 (kat. br. AB10526; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, 1:1,000), GLUT1 i iNOS (kat. br. PA1-21041 i PA1-21054; LabVision; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA, oba 1:200), koziji serum (kat. br. G6767; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), TBS (kat. br. T6789; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), BSA (kat. br. T6789; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), HRP (kat. br. ab6721; Abcam, Cambridge, UK), hromogen 3,3-diaminobenzidin-tetrahidrochloridom (kat. br. K3468; Liquid DAB + SubstratChromogen System; DakoCytomation).

4.3 Metode

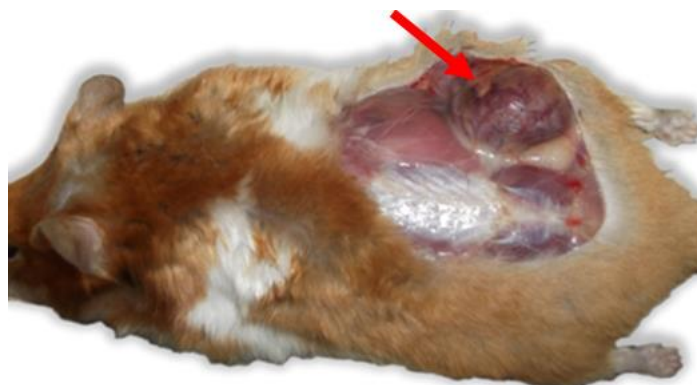
4.3.1 Programi istraživanja (faze)

Antitumorska dejstva lekova registrovanih za druge indikacije su ispitivana na eksperimentalnom fibrosarkomu hrčka.

Faza 1. Izvršena je inokulacija tumora sirijskim zlatnim hrčkovima. U okviru našeg eksperimentalnog istraživanja, 1ml sarkomske ćelijske kulture BHK-21/C13 ($1-2 \times 10^6$ ćelija ml^{-1}), Slika 4.1, subkutano je inokulisano sirijskim zlatnim hrčkovima, u lumbalnom predelu sa desne strane svake životinje (Slika 4.2.a), za produkciju subkutanog tumora (BHK fibrosarkom), Slika 4.2.



Slika 4.2.a Inokulacija sarkomske ćelijske kulture BHK-21/C13 sirijskom zlatnom hrčku



Slika 4.2. Makroskopski uočljiv subkutano lokalizovan tumor izazvan BHK ćelijama

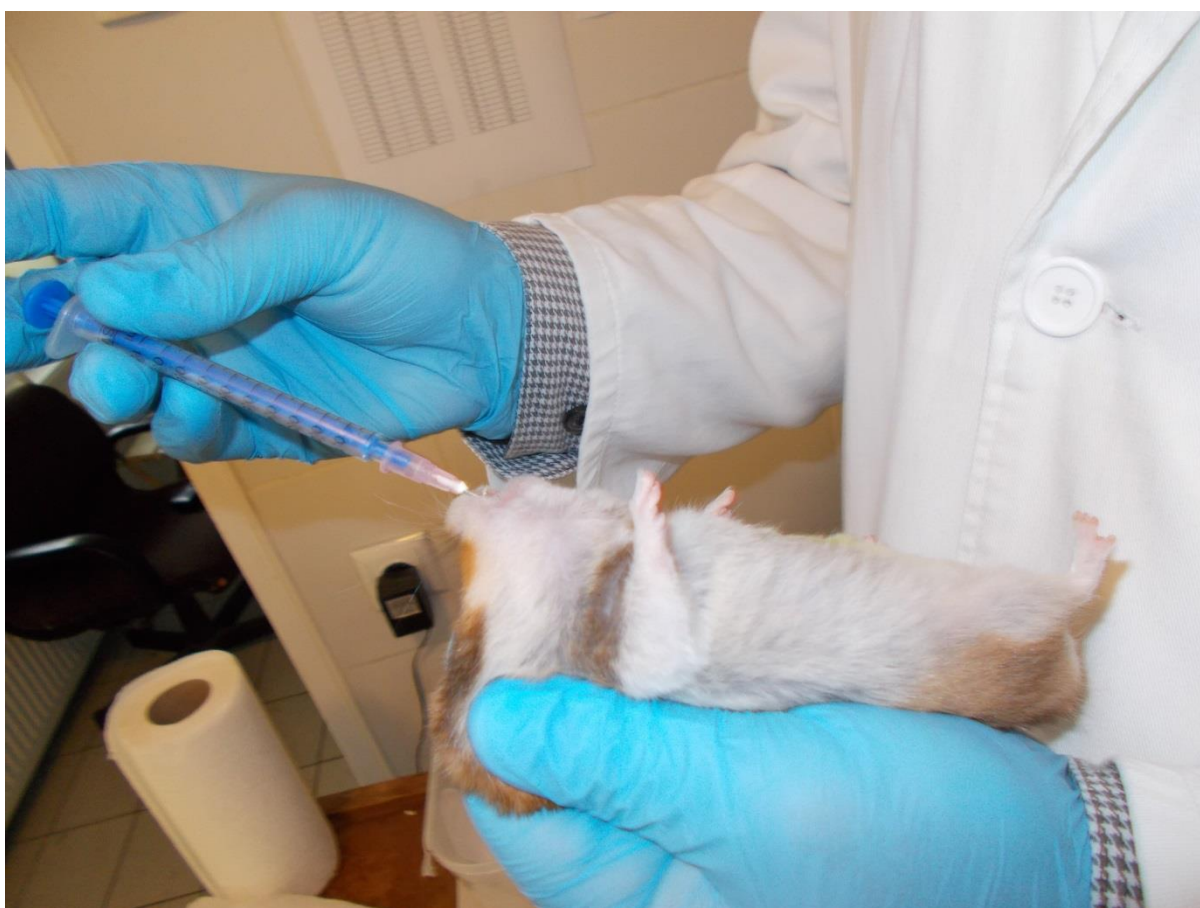
Faza 2. Posle Faze 1, životinje sa eksperimentalnim fibrosarkomom su lečene peroralno. Jedinkama je svakodnevno merena telesna masa neposredno pre aplikacije supstance (Slika 4.3.a).



Slika 4.3.a Hrčkovi sa fibrosarkomom - merenje telesne mase

Svakodnevno je praćeno ponašanje eksperimentalnih životinja, njihovo opšte stanje, eventualno prisustvo opštih kliničkih znakova (dijareja, neurološki znaci, disanje), kao i lokalno (lokalizacija, prećnik tumora, stanje kože).

U odrećenom broju eksperimenata ispitivano je delovanje predtretmana, pa je tretman zapoćeo do 7 dana pre inokulacije. Životinje su lećene peroralno preko metalne želudaćne sonde, specijalno dizajnirane za hrćka, u volumenu 1ml rastvora na jedinku tešku 100 grama (Slika 4.3.b).



Slika 4.3.b Peroralna aplikacija leka hrćku preko želudaćne sonde

Doze ispitivanih lekova antitumorskih svojstava bile su oko 30-50 % LD_{50} u 1 ml tećnosti (maslinovog ulja za mebendazol ili fiziološkog rastvora za ostale), sa ili bez deoksiholne kiseline (2 mg u 1 ml vode), sa ili bez nitroglicerina (25 mg/kg) jednom dnevno (u 10:00 h). Svaka grupa se sastojala od najmanje šest nasumićno odabranih jedinki.

Kombinacija sa deoksiholnom kiselinom (20 mg/kg) bi trebala da omogućiti bolje prodiranje liposolubilnih lekova u tkiva, a sa nitroglicerinom bolju prokrvljenost (vazodilatacija), oksigenaciju i dopremanje leka u tumor. Peroralne doze lekova su: mebendazol, 460 mg/kg, metformin 250-500 mg/kg, itrakonazol 250 mg/kg, diklofenak 62,5 mg/kg, nitroglicerin 25 mg/kg, kofein 100 mg/kg.

Kontrolne grupe sa tumorom su na isti način peroralno (sondom) umesto leka ili adjuvansa (deoksiholna kiselina, nitroglicerin) dobijale istu količinu čistog ekscipiensa (tečnog nosača) - maslinovog ulja (samo u eksperimentu sa mebendazolom) ili fiziološkog rastvora.

Kontrolne grupe bez tumora (sa po 6 nasumično odabranih jedinki uz podjednaku polnu zastupljenost) tokom oglada su podvrgnute peroralnom tretmanu ispitivanim lekovima, jednom dnevno (u 10:00 h, u pojedinačnoj dozi). Primena ispitivanih supstanci izvršena je takođe gastričnom sondom.

Faza 3. Po završetku lečenja, životinje su žrtvovane (i ogleadne i kontrolne grupe). Životinje su uvođene u opštu anesteziju sa 60 mg/kg pentobarbitala intraperitonealno i njihovo stanje je stalno praćeno. Posle 5 minuta, kontrolisan je gubitak svesti kombinovanim metodama, kao što su utvrđivanje gubitka reakcije na palpaciju i štipanje i izostanak vidljivih respiratornih pokreta. Ukoliko gubitak svesti nije pouzdano utvrđen i osiguran, data je dodatna doza 30 mg/kg pentobarbitala do potpune duboke opšte anestezije. Smernice za anesteziju hrčaka Univerziteta u Minesoti (<https://www.researchservices.umn.edu/services-name/research-animal-resources/research-support/guidelines/anesthesia-hamsters>), kao i Smernice za anesteziju i analgeziju u hrčaka sa Univerziteta u Mičigenu (<https://az.research.umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-hamsters>) preporučuju davanje 50-90 mg/kg pentobarbitala za anesteziju hrčaka. Smrt životinja prouzrokovana je intrakardijalnom punkcijom i potpunom srčanom ekssangvinacijom, koja je sprovedena u opštoj anesteziji, odmah posle utvrđivanja gubitka svesti. Zapremina krvi dobijena totalnom kardijalnom ekssangvinacijom bila je 3-5,5 ml, u zavisnosti od težine i pola hrčaka. Prema podacima sa internet prezentacije britanskog Nacionalnog centra za zamenu, usavršavanje procedura i smanjenje korišćenja životinja u istraživanjima (NC3R, <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>), za hrčkove težine

85-150 g, zapremina krvi za koju se očekuje da uzrokuje ekssangvinaciju iznosi 2,9-4,5 ml kod jedinki muškog pola i 3,3-5,2 ml kod jedinki ženskog pola. Samo 2-3 ml od ukupno sakupljene krvi korišćeno je za standardnu laboratorijsku analizu, koja obuhvata određivanje broja ćelijskih elemenata i osnovnih biohemijskih pokazatelja. Odmah posle ekssangvinacije, smrt životinja je verifikovana odstranjivanjem vitalnih organa (srca, pluća, jetre, bubrega, mozga).

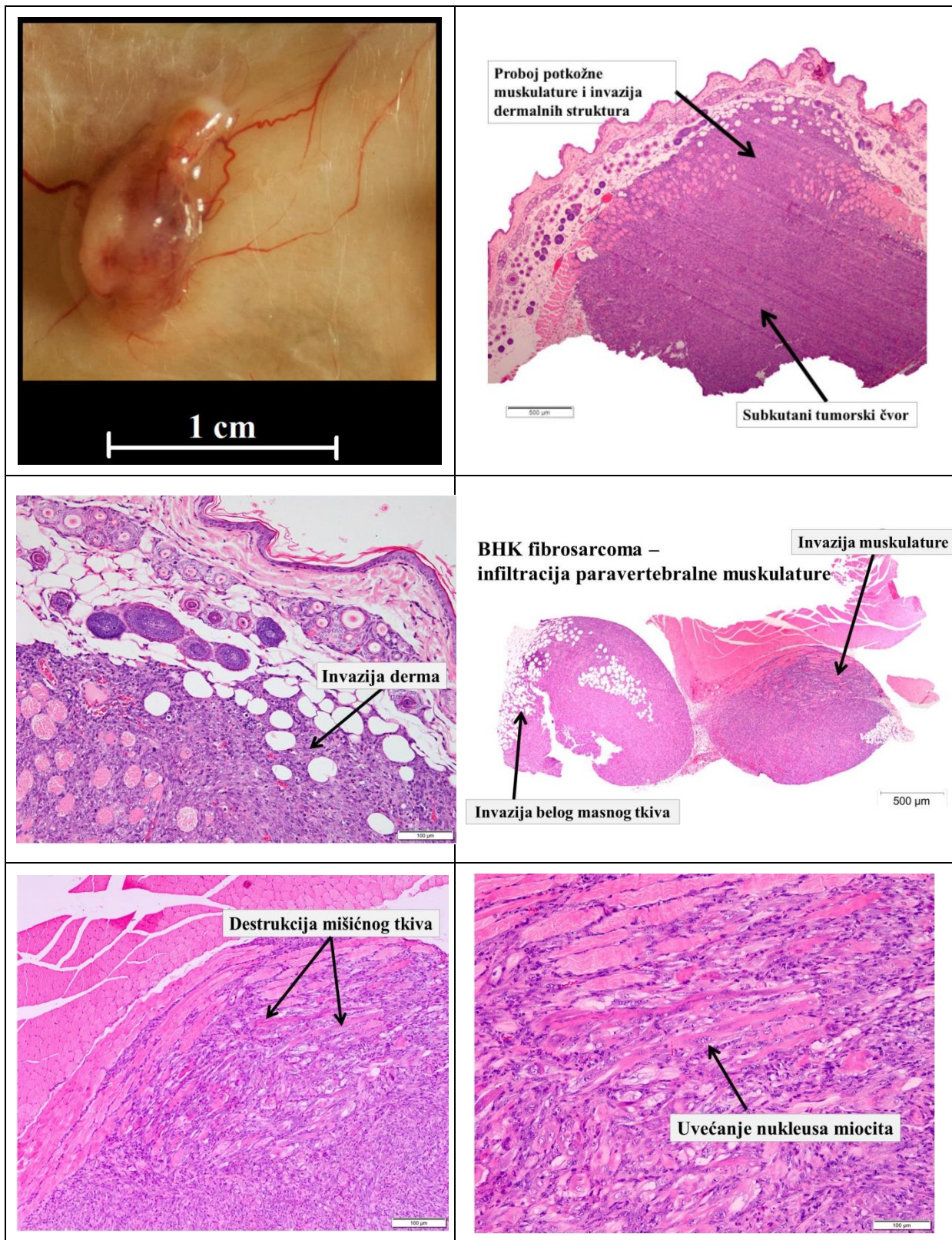
Kod svih jedinki, na mestu inokulacije (u lumbalnom predelu sa desne strane) detektovana je dobro demarkirana solidna supkutano lokalizovana tumorska masa, bez neželjenih dejstava na njihovo opšte zdravlje, ponašanje i aktivnosti, tako da potrebe za eutanazijom, pre žrtvovanja, nije bilo. Nakon uklanjanja krzna sa tog područja izvršena je makroskopska analiza i fotografisanje inokulisanog tumora (Slika 4.3.c), potom pažljiva preparacija tumorskog čvora uz merenje težine, zapremine i njegovih prostornih dimenzija. Zapremina tumora je određivana volumetrijski preciznom menzурom na osnovu razlike nivoa tečnosti pre i posle totalnog potapanja tumora, ili na osnovu formule $L \times S^2 / 2$, gde je L najduži, a S najkraći prečnik. Kod svih jedinki izvršena je kompletna obdukcija sa pregledom organa, a isečci iz jetre i bubrega uzeti su za histološku analizu. Patološke i patohistološke analize, posle obdukcije, pokazale su da nema znakova metastaza ni ascitesa ni kod jedne ispitivane životinje.



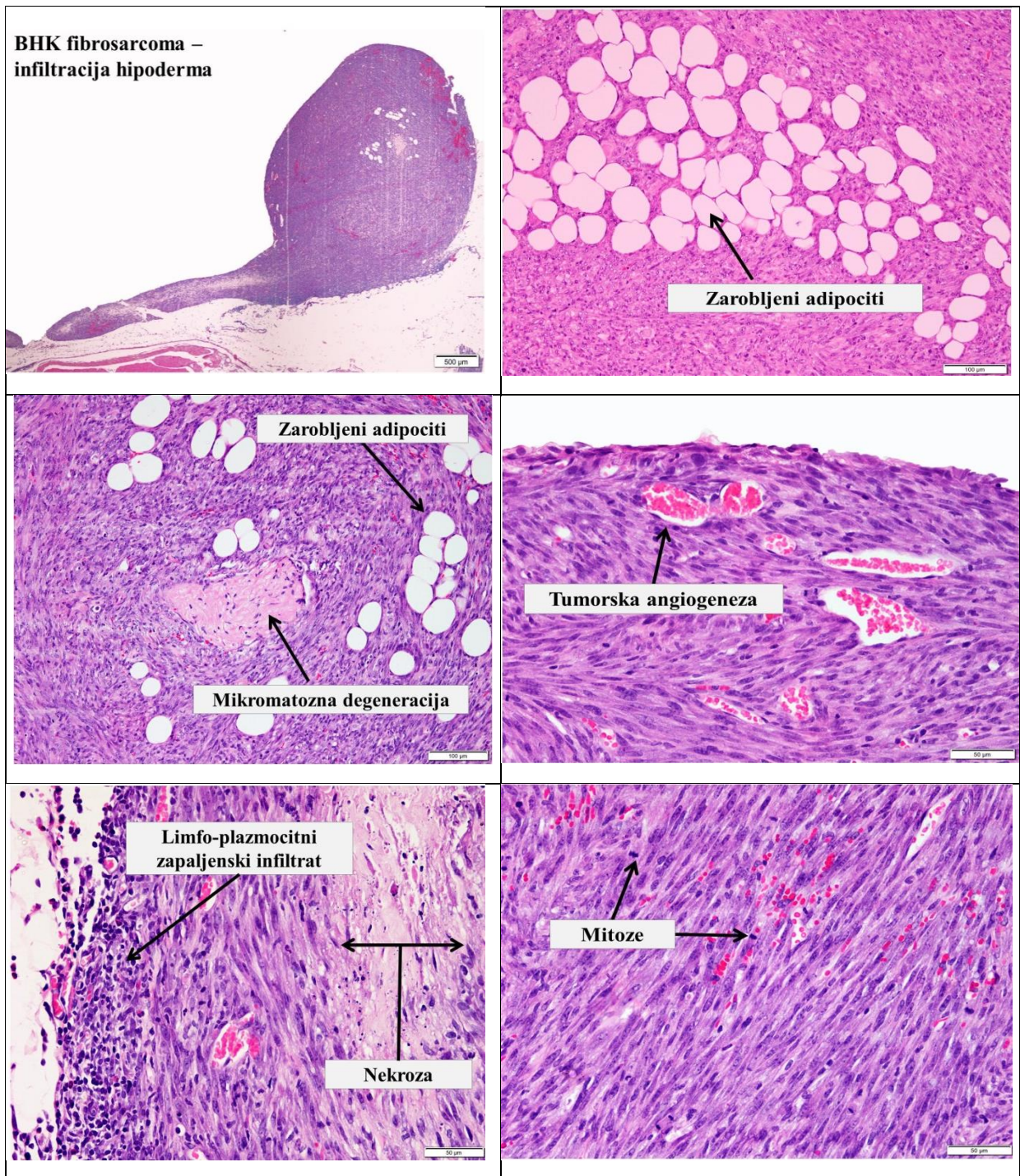
Slika 4.3.c Makroskopska analiza i fotografije inokulisanog tumora

Kompletno tumorsko tkivo, kao i isečci pomenutih parenhimskih organa, fiksirani su u 4 % puferisanom rastvoru formalina (pH 7,4) na 4 °C tokom 24 h.

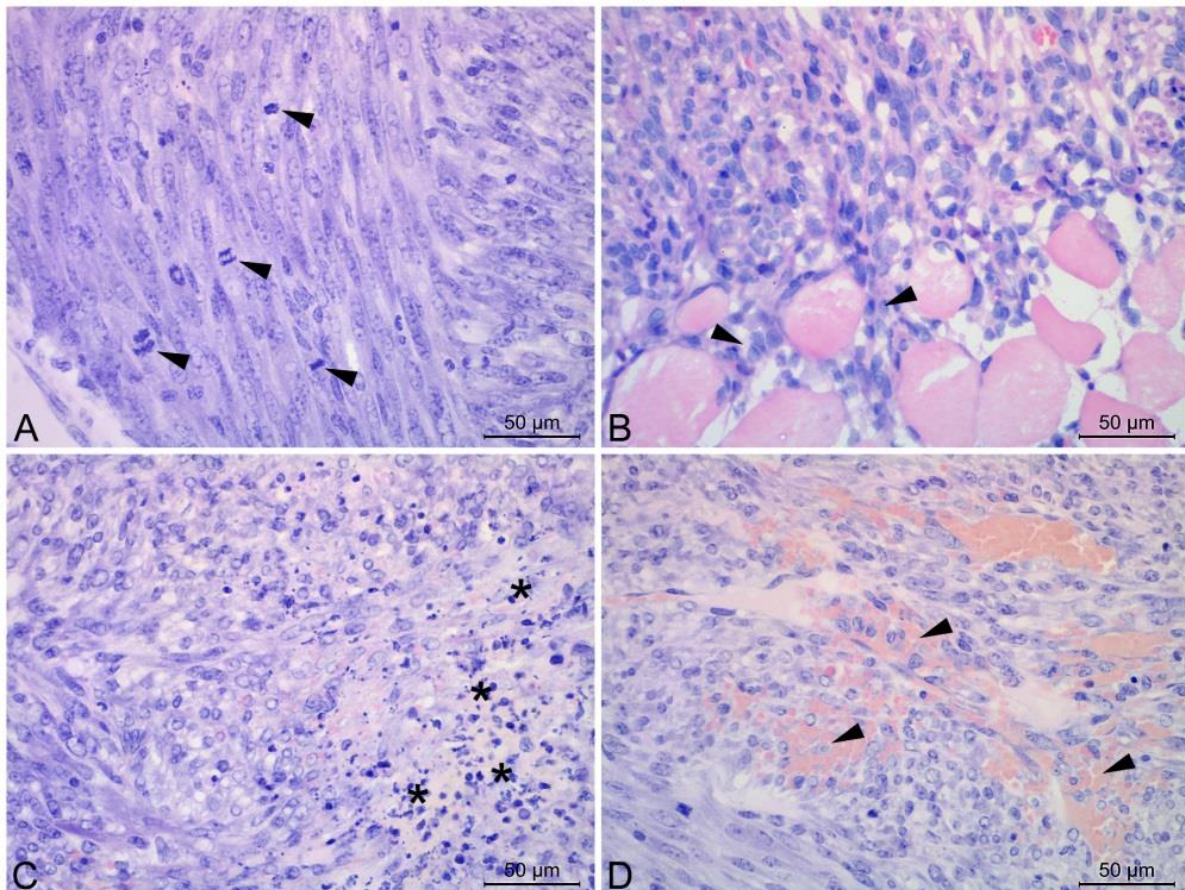
Posle 24h fiksacije u formalinu i merenja dimenzija tumora, uzeti su isečci za toksikološku i histološku analizu, i to po jedan isečak debljine 5 mm iz jetre i bubrega (za toksikološku analizu), dok je isečak tumora debljine do 5 mm (za histološku analizu) uzet iz predela koji predstavlja najširu cirkumferenciju tumorskog čvora. Svaki isečak organa i isečak tumorskog tkiva je bojen metodom hematoksilin i eozin (HE), slike 4.3, 4.4. i 4.5.



Slika 4.3. BHK fibrosarcoma – subkutana lokalizacija



Slika 4.4. BHK fibrosarcoma – infiltracija hipoderma



Slika 4.5.

- A – brojne mitotske figure unutar tkiva eksperimentalnog BHK sarkoma (strelica)
 B – infiltracija poprečnoprugaste muskulature sarkomskim ćelijama (strelica)
 C – multipla područja tumorske nekroze (*)
 D – česta područja svežih krvarenja u tumorskom tkivu (strelica)

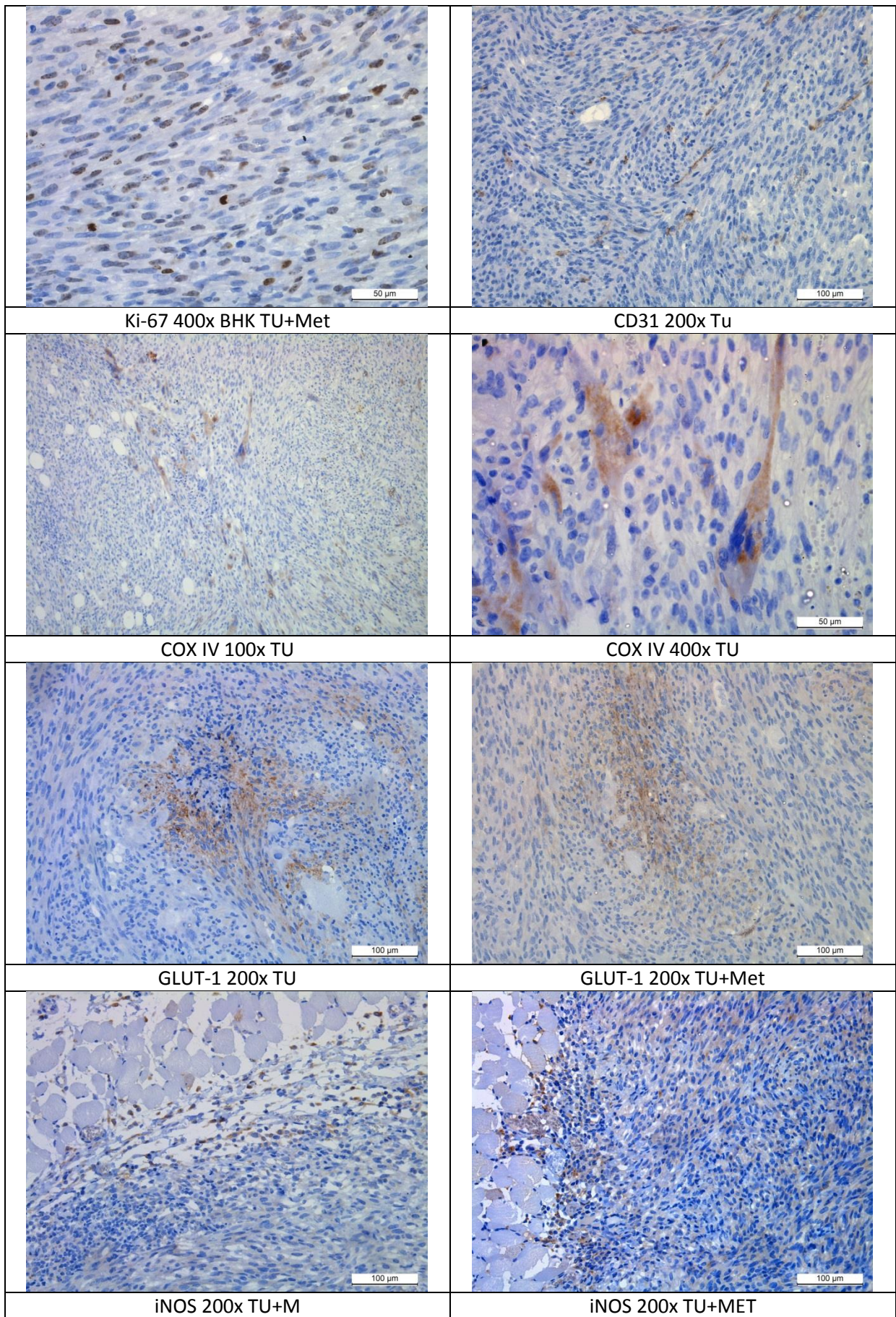
U analizi tumorskog tkiva, pored isečka za HE bojenje, od svake jedinke su uzeti iseći za dodatnu imunohistohemijsku analizu.

U imunohistohemijskom bojenju su korišćena primarna antitela Ki-67, PCNA, CD31, CD34, CD68, COX IV, Cytochrom C, GLUT-1 i iNOS (Slika 4.6.).

Ki-67 - indikator proliferacije tumorskih ćelija; specifični nuklearni protein marker povećan kod ćelija koje proliferišu (u G2, M i drugij polovini S faze). Prognoza tumora je dobra ako je procenat obojenih ćelija manji od 10%.

PCNA - kao i Ki-67 je marker ćelijske proliferacije, (Proliferating Cell Nuclear Antigen), ali manje specifičan od Ki-67. PCNA je protein poznat i pod nazivom ciklin.

- CD31 - indikator angiogeneze; marker endotelne diferencijacije (Cluster of Differentiation). Najosetljiviji i najspecifičniji endotelni marker, osjetljiviji i specifičniji za endotelnu diferencijaciju od CD34. Potvrđuje vaskularnu invaziju i određuje gustinu mikrocirkulacije tumora značajne za prognozu.
- CD34 - endotelni indikator angiogeneze; markira angiogene vaskularne endotelne ćelije tumora.
- CD68 - makrofagni indikator angiogeneze; markira tumorske makrofage koji proizvode važne angiogeneze faktore. Povećanje tumorskih makrofaga korelira sa povećanjem vaskulature tumora.
- COX IV - indikator apoptoze; mitohondrijalni marker koji koristi citohrom oksidazu subjedinicu IV (COX IV). Mitohondrije se selektivno eliminišu iz eukariotskih ćelija posle blokade kaspaza tokom apoptoze.
- Cytochrom C - indikator apoptoze, gde se u ćeliji Cytochrom C naglo oslobađa iz mitohondrija u citoplazmu; aktivira kaspaze koje izdvajaju aminokiselinsku sekvencu (DEVD) ključnu za sprovođenje apoptoze (regulisane proteinima Bcl2 i proapoptotičnim homologom Bax).
- GLUT-1 - indikator metabolizma glikoze; marker glikoznog transportera 1 koji je izražen na membrani i u citoplazmi tumorskih ćelija. Bojenje normalnih ćelija je mnogo manje nego tumorskih, koje imaju jako povećan metabolizam glikoze.
- iNOS - citoplazmatski indikator izraženosti enzima inducibilne NO (azot monoksid) sintetaze koji katalizuje produkciju NO, reaktivnog slobodnog radikala (sa jednim neuparenim elektronom). NO učestvuje u antizapaljenjskim i antitumorskim procesima makrofaga i tumorskih ćelija. Marker izražen kod tumorskog rasta.



Slika 4.6. Imunohistohemijska metodologija (TU - tumor, M - mebendazol, MET – metformin)

Praćeni su zapremina i težina tumora, kao i histološke karakteristike (prodiranje u okolna tkiva, broj mitozu, krvni sudovi tumora, prisustvo i veličina tumorske nekroze i zapaljenskog infiltrata i dr.).

Preparati su analizirani na mikroskopu marke Leica DM LB pri uveličanju objektiva od 10, 20, 40, 63 i 100 puta i okulara od 10 puta, i fotografisani kamerom marke Leica MC190HD.

Za brojanje tumorskih ćelija u mitozu na fotografijama imunohistohemijskih preparata (Ki-67, PCNA) korišćen je softver UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00 [89, 90].

4.3.2 Histološka obrada i imunohistohemijsko bojenje tkiva

Tkivo uzoraka je dehidrirano u rastućim koncentracijama izopropanola, kalupljeno u parafin i sečeno na rotacionom mikrotomu marke Leica pri debljini histoloških rezova od 5µm. Svaki od organa i isečak tumorskog tkiva je kalupljen u zaseban kalup. Po jedan isečak iz tkiva jetre i bubrega kod svih jedinki obojen je metodom hematoksilin i eozin (HE), slike 4.3, 4.4. i 4.5.

U analizi tumorskog tkiva pored isečka za HE bojenje od svake jedinke uzeto je po još 4 isečka za dodatnu imunohistohemijsku analizu (Slika 4.6.).

Za imunohistohemijska bojenja korišćena su sledeća primarna antitela: Ki-67 pAb (kat. br. AB9260; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 1:50), CD34 (kat. br. EP373Y; Abcam, Cambridge, UK, 1:200), COX4 (kat. br. AB10526; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, 1:1,000), GLUT1 i iNOS (kat. br. PA1-21041 i PA1-21054; LabVision; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA, oba 1:200). Isečki debljine 5 µm su deparafinizovani ksilenom (100%) i rehidratisani potapanjem u opadajuće koncentracije etanola (100%, 2×3 min; 95% 3 min i 70% 3 min). Posle toga isečki su stavljeni u mikrotalasnu pećnicu podešenu na 850 W (oko 98°C) u trajanju od 20 min u puferu Tris-EDTA Buffer (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA rastvor, 0,05% Tween 20, pH 9.0), ispirani 2×5 min sa TBS plus 0,025% Triton X-100 (uz mućkanje) i blokirani potapanjem u 10% kozijeg seruma (kat. br. G6767; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) sa 1% BSA u TBS (kat. br. T6789; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) tokom 2h na sobnoj temperaturi. Primarna antitela rastvorena

u TBS sa 1% BSA (kat. br. T6789; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) inkubirana su na 4°C preko noći (oko 16h). Sledećeg dana iseći su isprani 2 puta po 5 min sa TBS plus 0,025% Triton X-100 (uz mućkanje) i inkubirani u 0,3% H₂O₂ u TBS tokom 15 min. Kozije poliklonalno sekundarno antitelo i zečije IgG konjugovano sa HRP (kat. br. ab6721; Abcam, Cambridge, UK), rastvoreno u TBS sa 1% BSA inkubirano je 2h na sobnoj temperaturi. Posle toga, iseći su ispirani 3 puta po 5 min u TBS. Za vizuelizaciju, na sobnoj temperaturi primenjena je inkubacija 10 min sa hromogen 3,3-diaminobenzidinetetrahidrohloridom (kat. br. K3468; Liquid DAB + SubstratChromogen System; DakoCytomation). Iseći su ispirani u vodi 5 min i obojeni Mayer-ovim hematoksilinom. Obojeni iseći tumora su posmatrani pomoću mikroskopa Leica DMLB100T (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) pri uvećanju ×400. Za fotografisanje korišćena je kamera Leica MC190HD camera (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Fotografije Ki-67 bojenja obrađene su pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows version 3.00. Na svakoj fotografiji izbrojane su Ki-67 pozitivne ćelije. Srednja vrednost broja Ki-67 pozitivnih ćelija (po 20 fotografija isečaka tumora za svaku eksperimentalnu životinju) upoređeno je između grupa. Vaskulatura u uzorcima tumora ocenjena je pomoću CD34, apoptoza pomoću COX4, metabolizam glikoze pomoću GLUT1, i produkcija NO pomoću iNOS. Imunoekspresija ovih citoplazmatskih markera je određena na osnovu merenja dela obojene površine (odnos obojene i ukupne površine) u isećima tumora (srednja vrednost za 10 merenja) korišćenjem UTHSCSA Image Tools for Windows version 3.00.

Kompletna metoda imunohistohemijskog bojenja data je u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Protokol imunohistohemijskog bojenja

korak	1. DAN
1.	Iseći debljine oko 5µm se dovode do vode na sledeći način: a) Xylol: 2x po 3 min; b) Xylol sa 100% etanolom: 3 min; c) 100% etanol: 2x 3 min; d) 95% etanol: 3 min; e) 70% etanol: 3 min; f) ispiranje hladnom vodom i držanje u njoj do sprovođenja retrieval reakcije

2.	Retrival reakcija Potapanje isečaka u rastvor Tris-EDTA Buffer* i stavljanje u mikrotalasnu pećnicu na jačinu od 850W (oko 98 °C) tokom 20min i potom hlađenje na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta.
3.	Ispiranje isečaka 2x po 5 min TBS plus 0,025% Triton X-100 uz mućkanje
4.	Blokada rastvorom 10% normalnog (goat-koziji serum) seruma sa 1% BSA u TBS-u tokom 2h na sobnoj temperaturi
5.	Oceđivanje isečaka nekoliko sekundi (ne ispira se) i sakupljanje tečnosti oko isečaka papirom za tkivo
6.	Aplikovanje primarnog antitela rastvorenog u TBS sa 1% BSA
7.	Inkubiranje tokom čitave noći na 4 °C
korak	2. DAN
1.	Ispiranje isečaka 2x po 5 min u TBS plus 0,025% Triton X-100 uz mućkanje
2.	Inkubiranje isečaka u 0,3% H₂O₂ u TBS-u tokom 15 minuta
3.	Za enzimsku detekciju aplikuje se sekundarno antitelemo (Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG – H&L(HRP)) na isečke rastvoreno u TBS sa 1% BSA i inhibiranje 2h na sobnoj temperaturi
4.	Ispiranje 3x po 5 min u TBS-u
5.	Za vizuelizaciju koristi se hromogen (DAB supstrate kit) tokom 10 min na sobnoj temperaturi
6.	Ispiranje isečaka u vodi tokom 5 min
7.	Kontrastira se u Majer-ovom hematoksilinu
8.	Dehidriranje i čišćenje u ksilolu i montiranje u DPX-u

4.3.3 Statistička analiza

Za statističku analizu korišćene su mere centralne tendencije i varijabilnosti, korelaciona analiza, Studentov t -test i ANOVA praćena Student-Newman-Keuls post hoc testom, sa nivoom značajnosti $p = 0,05$. Posle svakog parametrijskog statističkog testa proverena je njegova validnost i neparametrijskim testom. Za statističku analizu korišćen je softver TIBCO Statistica 13.3.1 (TIBCO Software, Palo Alto, California, USA, Nov. 2017). Prikazane su samo p -vrednosti validiranih parametrijskih rezultata testova. Za validaciju parametrijskog t -testa korišćen je neparametrijski Mann-Whitney U test.

5. REZULTATI

Rezultati su dobijeni u nekoliko vremenski odvojenih eksperimenata, ali svaki sa zasebnom kontrolnom grupom, vodeći računa da svi ispitivani lekovi i njihove kombinacije budu testirani na predviđenom broju eksperimentalnih životinja, a minimalno prema odobrenom planu istrživanja iz prijave teze (Tabela 4.1, poglavlje 4.1).

5.1. Eksperiment I - Delovanje mebendazola na fibrosarkom kod mladih hrčaka

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja mebendazola na *in vivo* model solidnog tumora - fibrosarkoma kod mladih hrčaka.

Dvadeset i četiri sirijska zlatna hrčka, telesne mase od približno 100 g, oba pola, nasumično su raspoređena u 2 eksperimentalne i 2 kontrolne grupe sa po 6 životinja u svakoj grupi, vodeći računa o podjednako polnoj zastupljenosti, kako bi se izbegao uticaj polnih hormona na rezultate eksperimenta. 2×10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml je injektovano subkutano na leđa svake životinje u 3 grupe. Eksperimentalne grupe započele su peroralni tretman sa 460 mg/kg dnevno mebendazola putem gastrične sonde, odmah nakon inokulacije tumora. Jedna eksperimentalna grupa dodatno je primala 20 mg/kg deoksiholne kiseline jednom dnevno. Posle 2 sedmice, kada su tumori porasli do 1-2 cm u kontrolnoj grupi, sve životinje su žrtvovane, krv je prikupljena kardijalnom punkcijom tokom anestezije za laboratorijske analize, tumori ekscidirani, izmerene njihove težine i prečnici, izračunate zapremine, uzorci tumora patohistološki proučeni i glavni organi toksikološki analizirani. Određen je broj Ki-67-pozitivnih ćelija u uzorcima tumora, čije fotografije su obrađene pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za određivanje statističke značajnosti korišćen je parametrijski Studentov *t*-test validiran neparametrijskim (Mann-Whitney U test), kao i ANOVA praćena Student-Newman-Keuls post hoc testom. Prikupljeni podaci su obrađeni i prikazani tabelarno (Tabela 5.1.) i grafički (Prilog, Slike P1-P4.).

Subkutana inokulacija BHK-21/C13 ćelija kod hrčkova izaziva formacije fibrosarkoma na mestu injiciranja, kod svih inokulisanih životinja. Peroralni tretman mebendazolom i

kombinacijom mebendazola i deoksiholne kiseline usporio je rast tumora, što je verifikovano na osnovu redukovane proliferacije ćelija tumora, i prikazano pomoću Ki-67 bojenja isečaka tumora hrčaka (Tabela 5.1. i Prilog, Slika P1.). Treba napomenuti da, u ovom eksperimentalnom modelu, zapremina i težina tumora nisu značajno promenjene u obe tretirane grupe (t -test $p > 0.05$).

Tabela 5.1. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane mebendazolom

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Tumor		
	početak	kraj		Težina mg	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana čistim maslinovim uljem						
1	91	95	F	2060	1,50000	17
2	105	117	F	6880	5,00000	23
3	93	94	F	260	0,18750	14
4	94	110	F	1720	1,00000	20
5	105	101	M	2910	2,11981	18
6	97	95	M	1400	1,25025	19
\bar{X}	97,5	102		2538	1,84293	18,5
\pm SD	6,12	9,51		2297	1,67114	3,02
Kontrolna grupa bez inokulacije tumora, tretirana sa 460 mg/kg mebendazola						
1	90	92	F	0	0	0
2	102	112	M	0	0	0
3	100	110	M	0	0	0
4	88	90	F	0	0	0
5	91	90	M	0	0	0
6	102	105	F	0	0	0
\bar{X}	95,50	99,83				
\pm SD	6,50	10,32				

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Tumor		
	početak	kraj		Težina mg	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20
Grupa tretirana sa 460 mg/kg mebendazola						
1	110	90	M	730	0,448	12
2	116	86	M	980	0,567	13
3	114	92	M	2110	1,608	14
4	105	95	F	2570	1,710	16
5	110	88	F	690	0,395	8
6	102	100	M	3010	2,280	18
\bar{X}	109,5	91,83		1682	1,168	13,5
\pm SD	5,25	5,08		1012	0,8001	3,45
p (t-test)	< 0,01			> 0,05	> 0,05	< 0,05
Grupa tretirana sa 460 mg/kg mebendazola i 20 mg/kg deoksiholne kiseline						
1	103	100	F	1250	0,690	13
2	95	85	M	3120	2,490	18
3	110	98	M	620	0,377	8
4	117	105	F	1320	0,710	13
5	102	90	M	765	0,480	12
6	98	84	F	2415	1,860	15
\bar{X}	104,2	93,7		1582	1,1012	13,17
\pm SD	8,08	8,60		983	0,8645	3,31
p (t-test)	> 0,05			> 0,05	> 0,05	< 0,02

Patohistološka analiza ispitivanih tumora posle tretmana mebendazolom pokazala je redukciju vaskulature, smanjenje prodiranja u tkiva i ekspanziju nekroze.

Tretman mebendazolom značajno je uticao na telesnu težinu životinja u toku trajanja eksperimenta (Tabela 5.1.; Prilog, Slika P2.).

Eksperimentalne i kontrolna grupa su statistički upoređene u odnosu na broj crvenih i belih krvnih zrnaca i trombocita, nivo hemoglobina, hematokrit, nivo proteina u serumu i sedimentaciju, ali nije zapažena značajna razlika između grupa.

Izvršen je pregled glavnih organa i nisu ustanovljene ni patološke, ni toksikološke promene u kontrolnim i eksperimentalnim grupama.

Rezultati: Mebendazol je smanjio broj mitozna tumora, vaskulaturu, prodiranje u okolna tkiva i povećao je nekrozu tumora. Zapremina i težina tumora su neznatno smanjene. Toksičnost nije zapažena.

5.2. Eksperiment II - Delovanje metformina na fibrosarkom kod mladih hrčaka

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja metformina na *in vivo* model solidnog tumora - fibrosarkoma kod mladih hrčaka.

33 sirijska zlatna hrčka oba pola, težine oko 100 g, na slučaj su raspoređena u 3 eksperimentalne i 2 kontrolne grupe približno podjednake polne zastupljenosti. 2×10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml su subkutano ubrizgane u leđa životinja u 4 grupe. Prva eksperimentalna grupa (7 životinja) započela je peroralnu terapiju metforminom 500 mg/kg dnevno preko želudačne sonde 7 dana pre inokulacije tumora, druga (8 životinja) 3 dana pre inokulacije i treća (6 životinja) odmah nakon inokulacije. Posle 2 nedelje, kada su tumori bili oko 2-3 cm u kontrolnoj grupi sa tumorima (6 hrčaka), sve životinje su žrtvovane.

Krv je sakupljena za određivanje glukoze i druge laboratorijske analize kardiopunkcijom tokom anestezije. Tumori su ekscizovani, određena je njihova težina i njihovi prečnici su izmereni. Uzorci tumora su histološki ispitani, a glavni organi toksikološki analizirani, uključujući 6 kontrolnih životinja koje su primile metformin bez inokulacije tumora. Zapremina tumora je određena na osnovu formule $L \times S^2 / 2$, gde je L najduži, a S najkraći prečnik. Ki-67-pozitivne ćelije u uzorcima tumora su kvantifikovane; slike su snimljene i obrađene softverom UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za određivanje statističkog značaja razlika u težini tumora, zapremini, broju Ki-67-pozitivnih

ćelija i drugim parametrima korišćen je neparametrijski validiran Studentov *t*-test, kao i ANOVA praćena Student-Newman-Keuls post hoc testom. Prikupljeni podaci su obrađeni i prikazani tabelarno (Tabela 5.2.) i grafički (Prilog, Slike P5-P8.).

Supkutana inokulacija BHK-21/C13 ćelija hrćcima rezultirala je formiranjem fibrosarkoma na mestu aplikacije kod svih inokuliranih životinja. Peroralni tretman metforminom znaćajno je inhibirao rast tumora. Ovo je verifikovano u grupi koja je 7-dana dobijala predtretman. U toj grupi je ustanovljeno je znatno smanjenje težine i zapremine tumora, a takode i smanjenje proliferacije tumorskih ćelija pokazano Ki-67 bojenjem isećaka tumora (Tabela 5.2.). Treba istaći da je u našem eksperimentalnom modelu samo 7-dnevni predtretman bio povezan sa statistićeki znaćajnim antitumorskim efektima.

Tabela 5.2. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane metforminom

Hrćak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	poćetak	kraj			Težina mg	Zapremina cm ³	$\frac{\text{Ki-67}}{\bar{X}}$ za 20	
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana fizioloćkim rastvorom								
1	106	118	F	0	6870	5,100	23	3,8
2	90	91	F	0	2070	1,400	14	3,5
3	92	95	F	0	250	0,190	17	4,7
4	104	102	M	0	2890	2,120	20	4,2
5	95	109	M	0	1730	1,010	18	5,5
6	94	94	M	0	1420	1,249	19	4,4
\bar{X}	96,8	101			2538	1,845	18,5	4,3
\pm SD	6,59	10,4			2291	1,7123	3,01	0,61
Kontrolna grupa bez inokulacije tumora, tretirana sa 500 mg/kg metformina								
1	88	91	F	0	0	0	0	2,4
2	90	91	F	0	0	0	0	2,9
3	101	110	F	0	0	0	0	3,8
4	99	91	M	0	0	0	0	8,7
5	100	107	M	0	0	0	0	3,9
6	93	92	M	0	0	0	0	4,1
\bar{X}	95,17	97,00						4,3
\pm SD	5,56	8,97						2,25

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred- tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina mg	Zapremina cm ³	$\frac{\text{Ki-67}}{\bar{X}}$ za 20	
Grupe tretirane sa 500 mg/kg metformina								
1	93	103	F	7	500	0,36000	7	3,3
2	96	112	F	7	300	0,21600	11	3,1
3	75	88	F	7	30	0,02250	3	3,5
4	80	80	M	7	1030	0,75000	9	3,9
5	81	73	M	7	140	0,12500	12	3,7
6	136	121	M	7	15	0,00892	8	4,1
7	98	105	F	7	170	0,10035	9	3,4
\bar{X}	94,14	97,43			312	0,22611	8,43	3,57
\pm SD	20,46	17,54			358	0,26049	2,94	0,35
p (t-test)					< 0,02	< 0,02	< 0,01	< 0,05
1	91	89	F	3	10	0,0240	6	6,9
2	90	93	M	3	450	0,01250	14	3,9
3	107	120	F	3	1880	0,7955	16	2,9
4	87	92	M	3	1950	1,680	25	3,7
5	65	72	F	3	1390	0,870	16	4,1
6	88	95	M	3	1410	0,690	15	3,3
7	77	79	F	3	1500	0,710	16	4,6
8	72	75	F	3	190	0,042	7	3,4
\bar{X}	84,63	89,37			1097,5	0,6171	14,38	4,1
\pm SD	13,04	15,15			766,23	0,5561	5,93	1,24
p (t-test)					> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
1	90	105	M	0	2900	2,10109	17	3,2
2	92	110	F	0	1400	1,02050	13	3,5
3	78	90	M	0	1200	0,87055	7	3,7
4	86	81	M	0	2900	2,11060	21	3,1
5	82	75	F	0	410	0,29889	10	5,2
6	126	122	M	0	1700	1,22066	18	10,8
\bar{X}	92,33	97,17			1752	1,27038	14,33	4,9
\pm SD	17,27	18,15			987	0,71619	5,28	2,98
p (t-test)					> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Patološka evaluacija otkrila je sličnu razmeru nekrotičnih područja u tumorima sa ili bez predtretmana i tretmana metforminom, iako su tumori u slučaju predtretmana i tretmana bili manji.

Predtreatment i tretman metforminom nije imao značajnog uticaja na telesnu težinu životinja u toku studije (Tabela 5.2.).

Metformin je uzrokovao blagi pad nivoa glikoze u krvi hrčaka našte, kao što je prikazano u Tabeli 5.2. Eksperimentalne i kontrolne grupe su takođe statistički upoređene u pogledu crvenih i belih krvnih zrnaca, broja trombocita, nivoa hemoglobina, hematokrita, serumskih proteina i sedimentacije, ali nije zabeležena značajna razlika između grupa.

Ispitivanjem glavnih organa nisu otkrivene nikakve patološke ni toksikološke promene u kontrolnim i eksperimentalnim grupama.

REZULTATI: Metformin je inhibirao rast fibrosarkoma kod hrčaka bez toksičnosti. Sedmodnevni pretrtman bio je važan za statistički značajan efekat.

5.3. Eksperiment III - Delovanje kombinacije metformina i kofeina na fibrosarkom kod mladih hrčaka

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja kombinacije metformina i kofeina na *in vivo* model solidnog tumora - fibrosarkoma kod mladih hrčaka.

32 sirijska zlatna hrčka oba pola, težine oko 100 g, na slučaj su raspoređena u 3 eksperimentalne i 2 kontrolne grupe, sa najmanje 6 životinja u grupi, vodeći računa o uporedivoj polnoj zastupljenosti. 2×10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml su subkutano ubrizgane u leđa životinja u 4 grupe. Prva eksperimentalna grupa započela je peroralan tretman sa 500 mg/kg metformina dnevno, druga sa 100 mg/kg kofeina dnevno, a treća sa kombinacijom 500 mg/kg metformina i 100 mg/kg kofeina dnevno, putem gastrične sonde 3 dana pre inokulacije tumora. Dve nedelje kasnije, kada su prečnici tumora u kontrolnoj grupi bili oko 2 cm, sve životinje su žrtvovane. Krv je sakupljena kardiopunkcijom tokom anestezije za glikozu i druge analize. Tumori su ekscizovani, a njihova težina i prečnici izmereni. Uzorci tumora bili su analizirani patohistološki (HE) i imunohistohemijski (Ki-67, CD 31, COXS IV,

GLUT-1, iNOS). Glavni organi su toksikološki analizirani, uključujući životinje iz kontrolne grupe koje su primale metformin i kofein. Zapremina tumora je određena koristeći formulu $LxS^2/2$, gde je L najduži, a S najkraći prečnik. Ki-67-pozitivne ćelije u uzorcima tumora su kvantifikovane. Slike su snimljene i obrađene pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za određivanje statističkog značaja korišćen je validiran Studentov *t*-test i ANOVA praćena Student-Newman-Keuls post hoc testom. Najvažniji podaci su obrađeni i prikazani tabelarno (Tabela 5.3.) i grafički (Prilog, Slike P9-P12.).

Subkutana inokulacija BHK-21/C13 ćelija hrčkovima rezultirala je formiranjem fibrosarkoma na mestu injekcije kod svih inokuliranih životinja. Peroralni tretman kombinacijom metformina i kofeina značajno je inhibirao rast tumora. Ovo je potvrđeno značajnim smanjenjem težine i zapremine tumora i smanjenjem proliferacije tumorskih ćelija, koja je pokazana Ki-67 bojenjem isečaka tumora hrčaka (Tabela 5.3.). Treba napomenuti da je u ovom istraživanju samo kombinacija metformina i kofeina bila povezana sa statistički značajnim antitumorskim efektom.

Tabela 5.3. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane metforminom i kofeinom

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj		Težina mg	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana fiziološkim rastvorom, predtretman 3 dana							
1	100	106	F	2070	1,700	18	4,9
2	97	115	M	1690	1,500	21	3,4
3	107	119	F	6890	5,200	24	3,8
4	101	97	M	2920	2,300	17	4,4
5	99	100	M	1410	1,150	20	4,3
6	80	85	F	270	0,195	12	5,0
\bar{X}	97,3	104		2542	2,0075	18,66	4,3
\pm SD	9,14	12,4		2300	1,7112	4,08	0,62

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj		Težina mg	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Kontrolna grupa bez inokulacije tumora, tretirana sa 500 mg/kg metformina i 100 mg/kg kofeina							
1	103	110	M	0	0	0	2,2
2	92	98	M	0	0	0	2,7
3	108	110	F	0	0	0	4,0
4	80	91	M	0	0	0	4,0
5	89	98	F	0	0	0	7,2
6	101	105	F	0	0	0	3,8
\bar{X}	95,5	102					4,0
\pm SD	10,37	7,62					1,74
Grupa tretirana sa 500 mg/kg metformina, predtretman 3 dana							
1	108	119	F	1930	0,8800	18	3,1
2	88	92	M	11	0,0250	7	6,8
3	95	100	M	400	0,0130	13	4,0
4	85	90	M	2000	1,7900	24	3,8
5	79	83	F	1400	0,9200	15	4,2
6	86	88	F	180	0,0900	8	3,7
7	90	94	M	1420	0,8820	17	3,0
8	80	87	F	1530	0,9010	14	4,5
\bar{X}	88,62	94,12		1108,9	0,6876	14,50	4,1
\pm SD	8,72	11,26		792,63	0,6142	5,48	1,19
p (t-test)				> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Grupa tretirana sa 100 mg/kg kofeina, predtretman 3 dana							
1	88	100	F	1500	1,2091	18	10,2
2	76	89	F	1300	1,2567	12	3,0
3	90	105	M	3000	2,2180	15	3,4
4	92	90	F	820	0,6981	10	2,9
5	115	120	M	3100	2,8790	20	6,2
6	78	85	M	4200	3,5221	22	3,9
\bar{X}	89,83	98,17		2320	1,9638	16,17	4,9
\pm SD	13,95	13,04		1309	1,0956	4,67	2,85
p (t-test)				> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj		Težina mg	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Grupa tretirana sa 500 mg/kg metformina i 100 mg/kg kofeina, predtretman 3 dana							
1	94	74	M	350	0,180	16	3,5
2	67	76	M	340	0,216	13	3,3
3	77	78	F	300	0,245	12	3,2
4	105	92	F	1050	0,648	18	3,8
5	91	90	M	160	0,080	8	3,8
6	110	118	F	310	0,198	13	4,0
\bar{X}	90,67	88		418	0,261	13,33	3,60
\pm SD	11,31	16,49		317	0,198	3,44	0,32
p (t-test)				< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Patohistološka i imunohistohemijska evaluacija pokazale su smanjenje penetracije tkiva, ekspanziju nekroze i hemoragičnih oblasti i smanjenje vaskulature u svim analiziranim isečcima tumora tretiranih kombinacijom metformina i kofeina, u poređenju sa kontrolama.

Tretmani nisu imali značajnog uticaja na telesnu težinu životinja u toku studije (Tabela 5.3.).

Metformin je uzrokovao blagi pad nivoa glikoze u krvi hrčkova našte, kao što je prikazano u Tabeli 5.3. Takođe, eksperimentalne i kontrolne grupe su statistički upoređene u pogledu broja crvenih i belih krvnih zrnaca, broja trombocita, nivoa hemoglobina, hematokrita, serumskih proteina i sedimentacije, ali nije primećena značajna razlika između grupa.

Ispitivanjem glavnih organa nisu otkrivene ni patološke, ni toksikološke promene u eksperimentalnim i kontrolnim grupama.

REZULTATI: Kombinacija metformina i kofeina značajno je inhibirala rast fibrosarkoma kod hrčaka bez toksičnosti.

5.4. Eksperiment IV – Delovanje itrakonazola i antikancerska interakcija metformina i itrakonazola na fibrosarkomu mladih hrčaka

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja kombinacije metformina i itrakonazola na fibrosarkom kod mladih hrčkova.

U okviru eksperimenta analizirani su težina, prečnici, zapremina, gustina, površina, odnos površine prema zapremini i imunohistohemija eksperimentalnih fibrosarkoma kod hrčaka tretiranih metforminom i itrakonazolom. 48 sirijskih zlatnih hrčaka oba pola, telesne mase oko 100 g, na slučaj su raspoređeni u 8 grupa iste veličine. 2×10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml su subkutano ubrizgane u u leđa eksperimentalnih životinja. Sproveli smo dva seta eksperimenata. Prvi set eksperimenata obuhvatao je četiri grupe životinja. Prva grupa je započela peroralni tretman sa fiziološkim rastvorom, druga sa 500 mg/kg metformina dnevno, treća sa 250 mg/kg itrakonazola dnevno, a četvrta sa kombinacijom 500 mg/kg metformina i 250 mg/kg itrakonazola dnevno, putem gastrične sonde 3 dana pre inokulacije tumora. Posle 2 nedelje, sve životinje su žrtvovane. Drugi set eksperimenata je sproveden na isti način kao i prvi, izuzev što je tretman trajao 3 nedelje i dnevna doza metformina bila je 250 mg/kg. Posle žrtvovanja životinja, krv je sakupljena za određivanje glikoze i druge laboratorijske analize. Tumori su ekscizovani, a njihova težina, prečnici i zapremina izmereni. Uzorci tumora su analizirani patohistološki i imunohistohemijski (Ki-67, CD 34, COX IV, GLUT-1, iNOS). Glavni organi su toksikološki analizirani. Zapremina tumora određivana je volumetrijski preciznom menzурom, na osnovu razlike nivoa tečnosti pre i posle totalnog potapanja tumora. Ki-67-pozitivne ćelije u uzorcima tumora su kvantifikovane. Slike su snimljene i obrađene pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za statističku analizu korišćen je Studentov *t*-test sa neparametrijskom validacijom (Mann-Whitney), kao i ANOVA sa Student-Newman-Keuls post hoc testom. Kombinacija metformina i itrakonazola značajno je promenila fizičko-hemijske i patohistološke karakteristike eksperimentalnih fibrosarkoma – težinu, relativnu težinu (odnos težine tumora i težine eksperimentalne životinje), zapreminu, gustinu, dužinu, površinu, odnos površine prema zapremini i broj mitozu kod hrčaka, bez toksičnosti. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je kombinacija metformina i itrakonazola značajno inhibirala

rast tumora kod hrčaka i da može biti efikasan i siguran pristup netoksičnom antikancerskom adjuvantnom tretmanu i prevenciji relapsa.

Najvažniji rezultati prikazani su tabelarno (tabele 5.4.-5.6.), na slikama 5.1. i 5.2. i grafički (Prilog, Slike P13-P18.)

Treba posebno istaći da je u ovom istraživanju, sa trodnevnim predtretmanom, samo kombinacija metformina i itrakonazola bila povezana sa statistički značajnim antitumorskim delovanjem.

Tabela 5.4. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane metforminom, itrakonazolom i njihovom kombinacijom

Hrčak br.	Tretman u trajanju 2 nedelje			Tretman u trajanju 3 nedelje		
	Težina životinje (g)		Pol	Težina životinje (g)		Pol
	početak	kraj		početak	kraj	
Kontrolna grupa						
1	104	160	F	91	102	F
2	141	158	F	87	98	F
3	112	123	F	82	93	M
4	115	118	M	94	99	M
5	134	141	M	80	91	M
6	105	112	M	84	92	M
\bar{X}	118.5	135.3		96.3	95.8	
\pm SD	15.4	20.7		5.4	4.4	
Grupa tretirana sa 500 mg/kg metformina						
1	124	138	F	79	91	F
2	146	155	F	78	84	F
3	118	133	F	75	87	F
4	87	112	M	112	108	M
5	78	101	M	84	86	M
6	91	73	M	87	92	M
\bar{X}	107.3	118.7		85.8	91.3	
\pm SD	26.2	29.5		13.5	8.7	
Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola						
1	92	107	F	89	98	F
2	132	121	F	99	102	F
3	112	110	F	140	107	F
4	149	129	F	112	100	F
5	125	98	M	95	110	M
6	51	71	M	82	85	M
\bar{X}	110.2	106.0		102.8	100.3	
\pm SD	34.7	20.3		20.8	8.7	
Grupa tretirana kombinacijom metformina (500 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)						
1	93	93	F	94	112	F
2	101	104	F	98	99	F
3	109	113	F	96	94	F
4	84	85	F	105	98	M
5	118	117	M	89	104	M
6	106	114	M	88	90	M
\bar{X}	101.8	104.3		95.0	99.5	
\pm SD	12.1	12.9		6.3	7.7	
Grupa tretirana sa 250 mg/kg metformina						
1	124	138	F	79	91	F
2	146	155	F	78	84	F
3	118	133	F	75	87	F
4	87	112	M	112	108	M
5	78	101	M	84	86	M
6	91	73	M	87	92	M
\bar{X}	107.3	118.7		85.8	91.3	
\pm SD	26.2	29.5		13.5	8.7	
Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola						
1	92	107	F	89	98	F
2	132	121	F	99	102	F
3	112	110	F	140	107	F
4	149	129	F	112	100	F
5	125	98	M	95	110	M
6	51	71	M	82	85	M
\bar{X}	110.2	106.0		102.8	100.3	
\pm SD	34.7	20.3		20.8	8.7	
Grupa tretirana kombinacijom metformina (250 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)						
1	93	93	F	94	112	F
2	101	104	F	98	99	F
3	109	113	F	96	94	F
4	84	85	F	105	98	M
5	118	117	M	89	104	M
6	106	114	M	88	90	M
\bar{X}	101.8	104.3		95.0	99.5	
\pm SD	12.1	12.9		6.3	7.7	

Tabela 5.5. Karakteristike ekscizovanih tumora u grupama eksperimentalnih životinja koje su tretirane dve nedelje i statistička analiza

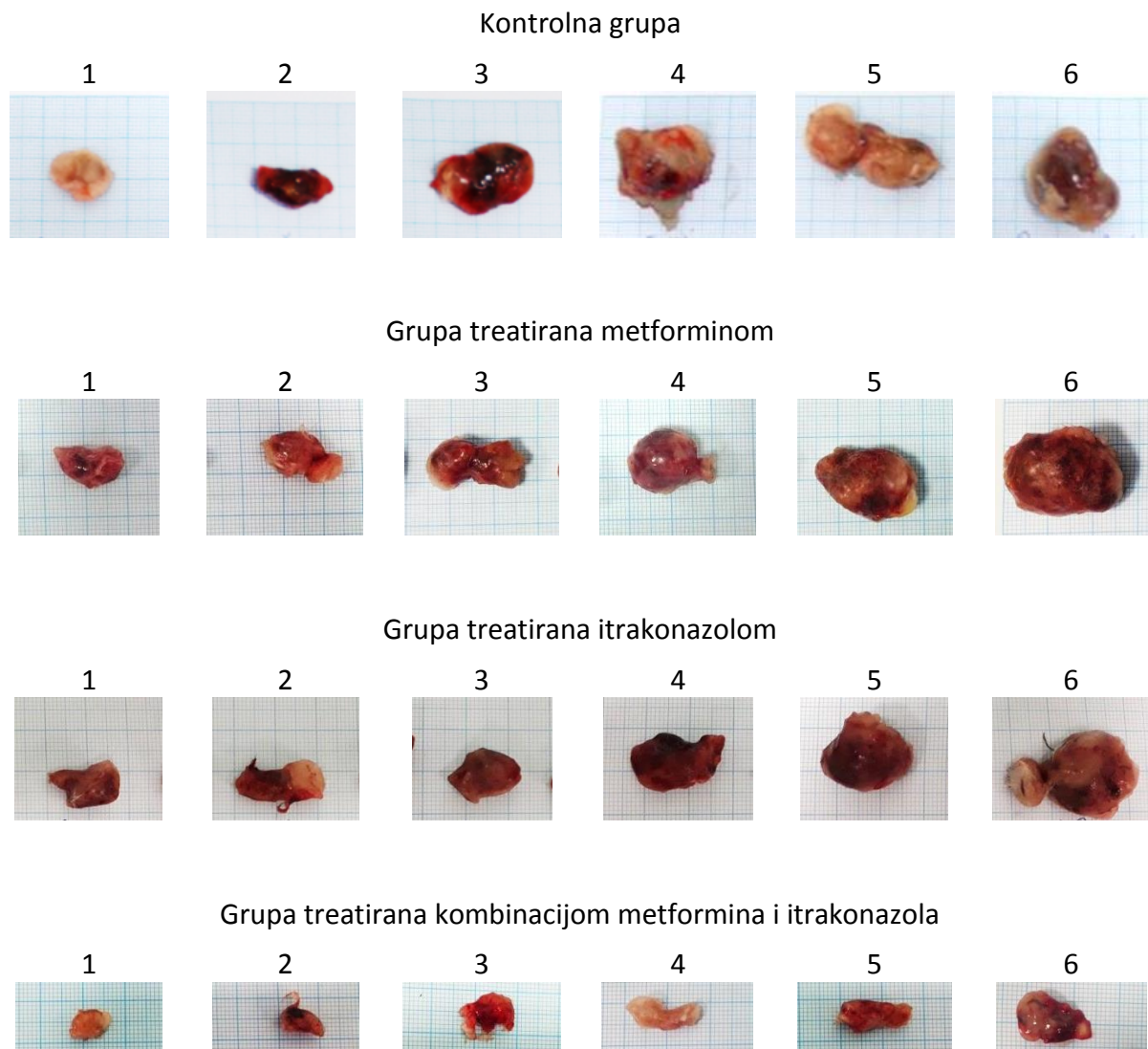
Hrčak br.	Tumor							
	Težina mg	Relativna težina mg/g	Zapremina cm ³	Gustina mg/mm ³	Dužina cm	Površina cm ²	Površina / Zapremina cm ⁻¹	Ki-67 \bar{X} za 20
1. Kontrolna grupa								
1	2370	14,81	2,20	1,077	2,4	18,20	8,27	19
2	2580	16,33	2,24	1,075	3,4	16,10	7,19	20
3	550	4,47	0,35	1,100	1,8	3,28	9,37	14
4	3040	25,76	2,80	1,086	2,4	18,10	6,46	23
5	1600	11,35	1,50	1,067	2,3	10,50	7,00	18
6	670	5,98	0,60	1,117	2,1	5,60	9,33	17
\bar{X}	1802	13,12	1,67	1,087	2,4	11,96	7,94	18,5
\pm SD	1034	7,77	0,96	0,018	0,54	6,51	1,24	3,02
2. Grupa tretirana sa 500 mg/kg metformina								
1	2470	15,93	2,40	1,029	2,5	12,90	5,38	16
2	1270	9,92	1,20	1,058	2,2	7,18	5,98	16
3	3960	29,77	3,80	1,042	2,6	18,08	4,76	25
4	1640	14,64	1,50	1,093	2,0	9,41	6,27	14
5	800	7,92	0,75	1,067	1,6	5,56	7,41	15
6	710	9,73	0,70	1,014	1,8	5,49	7,84	7
\bar{X}	1808,3	14,65	1,56	1,051	2,12	9,77	6,27	15,5
\pm SD	1233,6	8,03	1,15	0,028	0,39	4,93	1,176	5,75
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/2	0,999	0,85	0,900	0,025*	0,3	0,592	0,0499*	0,250
3. Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola								
1	3100	8,18	3,00	1,033	2,0	12,57	4,19	21
2	1160	9,59	1,10	1,055	2,1	6,91	6,28	13
3	800	7,48	0,75	1,067	1,9	6,69	9,56	7
4	630	4,88	0,60	1,050	1,2	3,13	5,22	10
5	780	7,96	0,70	1,114	1,9	3,99	5,70	17
6	2260	1,83	2,00	1,113	2,4	14,27	7,13	18
\bar{X}	1455,0	14,99	1,36	1,072	1,92	7,93	6,34	14,33
\pm SD	1000,6	11,79	0,95	0,034	0,397	4,54	1,859	5,28
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/3	0,610	0,86	0,600	0,450	0,17	0,25	0,11	0,170
Grupe 2/3	0,615	0,95	0,800	0,410	0,47	0,59	0,999	0,850
4. Grupa tretirana kombinacijom metformina (500 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)								
1	350	3,76	0,34	1,029	1,2	1,57	4,62	9
2	120	1,15	0,12	1,000	0,9	1,09	9,08	3
3	400	3,54	0,40	1,000	1,6	1,83	4,57	7
4	170	2,00	0,16	1,062	1,1	1,14	7,12	9
5	460	3,93	0,45	1,022	1,4	1,82	4,04	12
6	250	2,19	0,24	1,042	1,0	1,19	4,96	10
\bar{X}	292	2,78	0,28	1,026	1,20	1,44	5,73	8,33
\pm SD	134	1,15	0,13	0,024	0,26	0,34	1,96	3,08
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/4	0,009*	0,09*	0,0095*	0,009*	0,006*	0,0085*	0,049*	0,0065*
Grupe 2/4	0,019*	0,0088*	0,021*	0,15	0,005*	0,0078*	0,6	0,03*
Grupe 3/4	0,029*	0,037*	0,0205*	0,022*	0,0085*	0,0095*	0,65	0,04*

* - značajna razlika

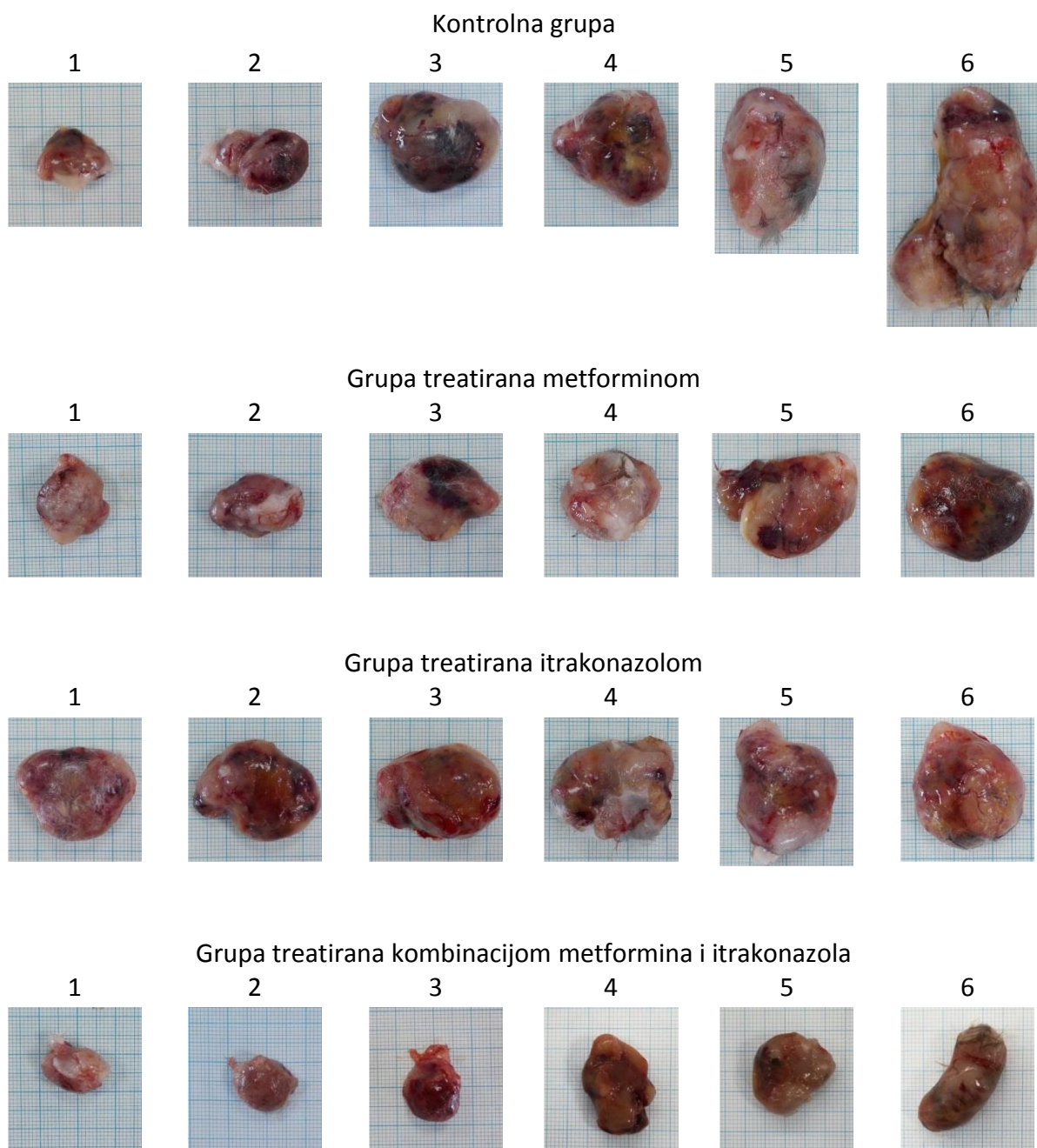
Tabela 5.6. Karakteristike ekscizovanih tumora u grupama eksperimentalnih životinja koje su tretirane tri nedelje i statistička analiza

Hrčak br.	Tumor							
	Težina mg	Relativna težina mg/g	Zapremina cm ³	Gustina mg/mm ³	Dužina cm	Površina cm ²	Površina / Zapremina cm ⁻¹	Ki-67 \bar{X} za 20
1. Kontrolna grupa								
1	7700	75,49	7,00	1,100	3,5	34,20	4,89	18
2	17050	157,87	16,00	1,066	5,3	75,37	4,71	32
3	11380	122,37	10,50	1,084	4,0	46,95	4,47	24
4	2580	26,06	2,30	1,122	2,5	12,03	5,23	18
5	1270	13,96	1,20	1,058	2,0	6,64	5,53	12
6	7930	86,20	7,20	1,101	3,4	34,20	4,75	17
\bar{X}	7985	80,32	7,37	1,089	3,45	34,90	4,93	20,17
\pm SD	5798	55,11	5,44	0,024	1,16	24,92	0,39	6,94
2. Grupa tretirana sa 250 mg/kg metformina								
1	7690	84,50	7,00	1,099	2,8	24,63	3,52	23
2	6690	79,64	6,00	1,115	3,0	25,21	4,20	17
3	4110	47,24	3,80	1,082	2,2	15,21	4,00	18
4	2660	24,63	2,50	1,064	2,2	11,72	4,69	15
5	3860	44,88	3,70	1,043	2,8	17,02	4,60	13
6	2510	27,28	2,40	1,046	1,9	10,56	4,40	19
\bar{X}	4587	51,36	4,23	1,075	2,48	17,39	4,24	17,5
\pm SD	2137	25,50	1,88	0,029	0,44	6,28	0,432	3,45
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/2	0,2	0,2	0,12	0,48	0,095	0,12	0,018*	0,48
3. Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola								
1	7230	73,78	7,00	1,033	3,0	23,44	3,35	19
2	7900	77,45	7,50	1,053	3,2	28,56	3,81	22
3	6700	62,62	6,50	1,117	3,2	25,78	3,97	18
4	5970	59,70	5,50	1,085	3,2	24,57	4,47	16
5	5090	46,27	4,80	1,060	3,0	21,73	4,53	20
6	6530	76,82	6,00	1,088	3,2	28,24	4,71	15
\bar{X}	6570	66,11	6,22	1,073	3,13	25,39	4,14	18,33
\pm SD	977	12,24	0,99	0,030	0,10	2,69	0,519	2,58
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/3	0,6	0,55	0,55	0,4	0,55	0,47	0,015*	0,54
Grupe 2/3	0,051	0,2	0,049*	0,9	0,0095*	0,019*	0,7	0,8
4. Grupa tretirana kombinacijom metformina (250 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)								
1	2970	26,52	2,80	1,061	1,8	9,44	3,37	13
2	2090	21,11	2,00	1,045	1,9	7,013	3,51	18
3	1440	15,32	1,40	1,029	1,7	5,82	4,16	5
4	2450	25,00	2,35	1,043	2,7	7,39	3,14	15
5	1920	18,46	1,85	1,038	2,2	6,519	3,52	14
6	1040	11,55	1,00	1,040	1,4	5,58	5,58	6
\bar{X}	1973	19,66	1,90	1,043	1,95	6,96	3,88	11,83
\pm SD	690	5,72	0,65	0,011	0,45	1,39	0,899	5,19
<i>p</i> (t-test)								
Grupe 1/4	0,035*	0,025*	0,036*	0,005*	0,015*	0,021*	0,03*	0,045*
Grupe 2/4	0,018*	0,015*	0,015*	0,035*	0,06	0,008*	0,45	0,053
Grupe 3/4	0,002*	0,002*	0,003*	0,045*	0,007*	0,0001*	0,55	0,021*

* - značajna razlika

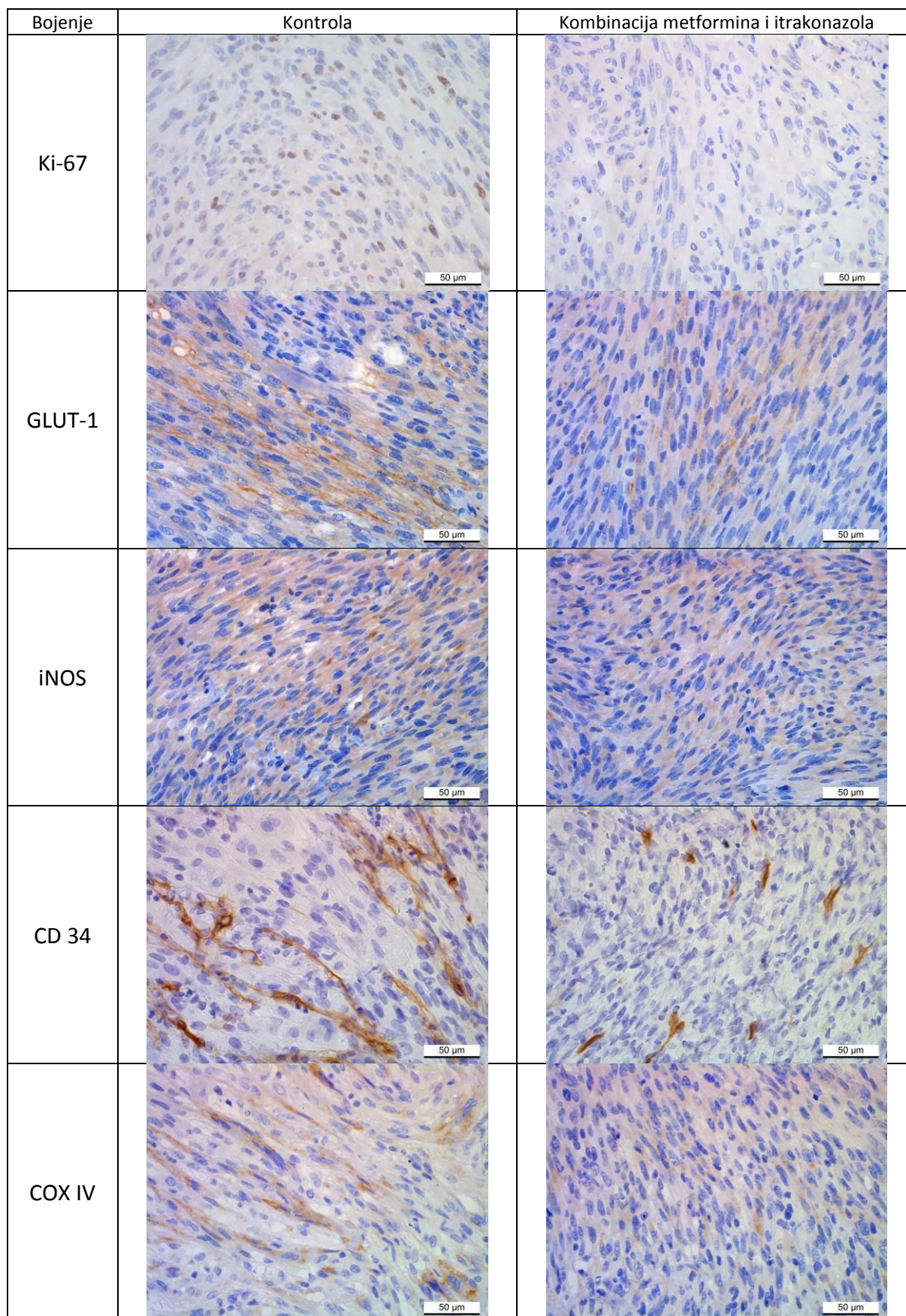


Slika 5.1. Tumori ekscizovani posle dvonedeljnog tretmana, postavljani na milimetarski papir radi vizuelnog poređenja dimenzija

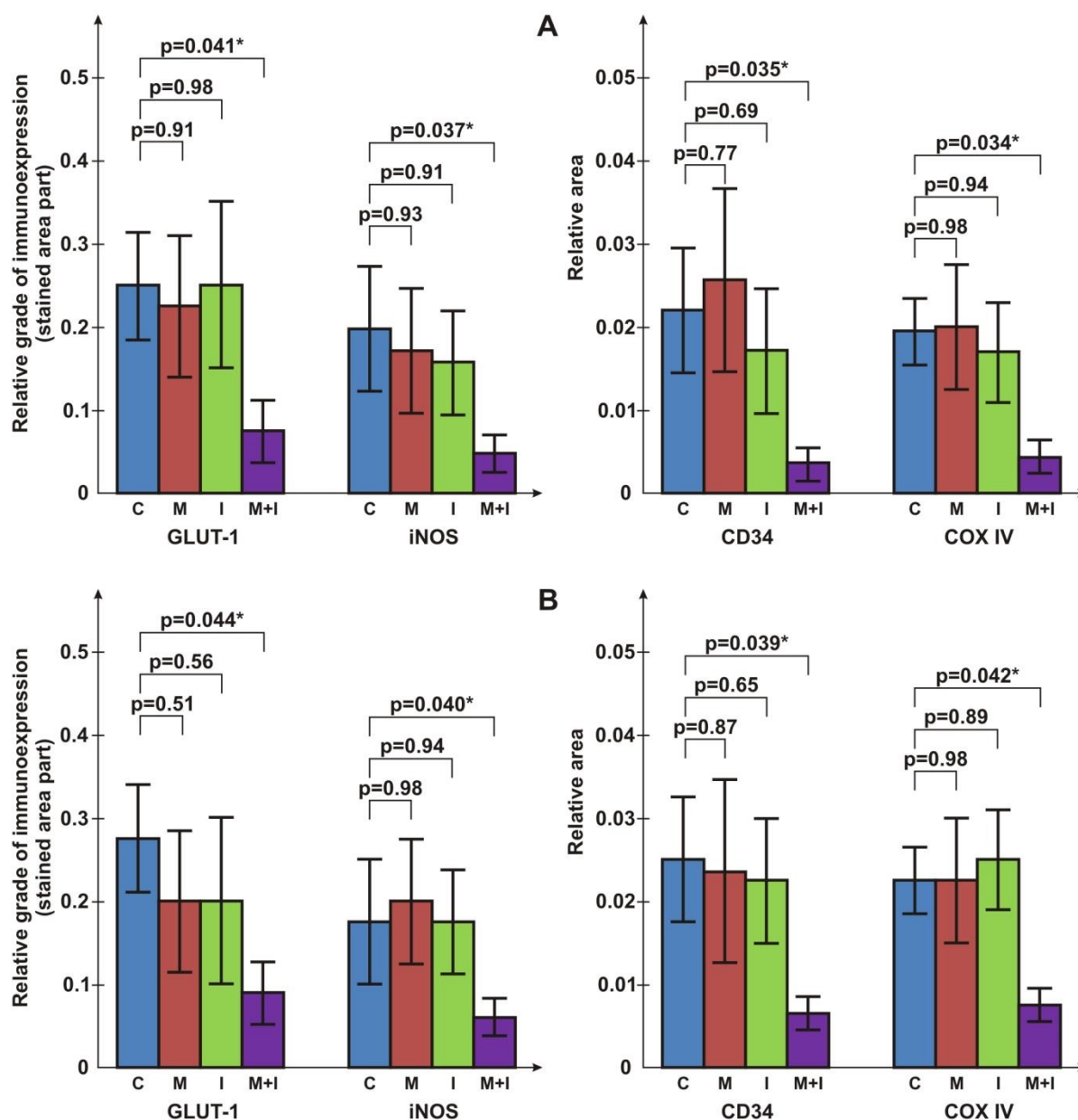


Slika 5.2. Tumori ekscizovani posle tronedelnog tretmana, postavljeni na milimetarski papir radi vizuelnog poređenja dimenzija

U poređenju sa kontrolama, patohistološka i imunohistokemijska evaluacija pokazala je smanjenje penetracije tkiva, ekspanziju nekroze i hemoragične oblasti i smanjenje vaskulature u svim analiziranim isečcima tumora tretiranih kombinacijom metformina i itrakonazola (Slika 5.3.).



Slika 5.3. Imunohistokemijska evaluacija isečaka tumora tretiranih kombinacijom metformina i itrakonazola u poređenju sa kontrolama



Slika 5.4. Relativan stepen imunoekspresije (deo obojene oblasti, srednja vrednost \pm SD za $n = 10$) i statistička analiza ($*p < 0.05$) za: A – grupe tretirane dve nedelje, B - grupe tretirane tri nedelje (C - kontrolna grupa, M - grupa treatirana metforminom, I - grupa treatirana itrakonazolom, M+I - grupa treatirana kombinacijom metformina i itrakonazola)

Tretmani nisu imali značajnog uticaja na telesnu težinu životinja u toku eksperimenta (tabele 5.4.-5.6.).

Metformin nije uzrokovao pad nivoa glikoze u krvi hrčkova našte. Pored toga, eksperimentalne i kontrolne grupe su statistički upoređene u pogledu broja crvenih i belih krvnih zrnaca, broja trombocita, nivoa hemoglobina, hematokrita, proteina u serumu i sedimentacije, ali nije primećena značajna razlika između grupa (tabele 5.7.-5.8.).

Ispitivanjem glavnih organa nisu otkrivene nikakve patološke ni toksikološke promene u eksperimentalnim i kontrolnim grupama.

REZULTATI: Kombinacija metformina i itrakonazola značajno je inhibirala rast fibrosarkoma kod hrčaka bez toksičnosti.

Tabela 5.7. Laboratorijske analize krvi životanja u grupama koje su tretirane dve nedelje

Hrčak br.	Leukociti 3-16·10 ⁹ g/l	Limfociti 50-81 %	Monociti 0-3 %	Granulociti 17-30 %	Eritrociti 4-7·10 ⁶ g/l	Hemoglobin 100-180 g/l	Hematokrit 35-50 %	MCY 67-77	MCH 23-27	MCHC 200-360 g/l	Trombociti 200-500 ·10 ⁹ g/l	Sedimen- tacija	Glikoza mmol/l	Proteini u serumu 45-75 g/l	Albumini 23-43 g/l
Kontrolna grupa															
1	9,60	86,1	1,8	12,0	4,68	112	34,63	74	23,9	323	512	1/2	5,1	57,79	27,49
2	27,41	44,0	0,8	55,2	5,29	136	35,36	67	25,8	386	201	1/2	4,2	52,80	43,00
3	18,14	53,6	8,0	45,6	6,14	134	37,01	60	21,6	361	265	1/2	4,8	54,72	33,84
4	13,38	82,3	4,4	13,3	5,47	114	34,74	64	20,9	329	413	1/2	4,5	50,68	29,32
5	18,69	73,6	6,3	20,1	4,30	92	27,66	64	21,4	332	564	1/2	3,3	89,80	41,70
6	29,14	78,5	7,2	14,3	4,98	114	32,08	64	23,0	356	484	1/2	3,9	53,10	45,30
Srednja vrednost	19,39	69,68	4,75	26,75	5,14	117,00	33,58	65,50	22,77	347,83	406,50		4,30	59,82	36,78
±SD	7,66	16,97	2,95	18,77	0,64	16,24	3,31	4,72	1,86	24,16	144,39		0,65	14,88	7,56
Grupa tretirana sa 500 mg/kg metformina															
1	11,49	43,8	3,6	52,6	5,52	124	36,82	67	22,4	336	538	1/2	3,7	58,94	32,62
2	16,06	73,4	13,7	12,7	6,20	126	38,38	62	20,4	329	228	1/2	4,1	52,60	41,40
3	31,09	41,7	5,1	53,1	6,37	145	37,76	59	22,5	379	330	1/2	4,6	52,41	44,10
4	16,34	90,0	0,7	9,3	7,49	151	43,72	58	20,2	346	146	1/2	3,9	43,50	21,90
5	6,75	81,2	0,8	17,9	4,81	113	34,34	71	23,5	329	312	1/2	3,3	58,56	33,35
6	17,29	77,8	3,3	19,0	6,27	130	40,24	64	20,7	322	544	1/2	4,1	58,94	36,77
Srednja vrednost	16,50	67,98	4,53	27,43	6,11	131,50	38,54	63,50	21,62	340,17	349,67		3,95	54,16	35,02
±SD	8,17	20,30	4,80	20,00	0,90	14,10	3,19	4,93	1,36	20,68	162,06		0,44	6,07	7,83
Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola															
1	15,94	77,5	0,8	21,7	4,87	117	32,64	67	23,9	357	679	1/2	3,5	55,48	29,93
2	15,23	78,5	0,7	20,8	5,69	126	36,74	65	22,2	343	295	1/2	3,7	57,34	25,12
3	5,96	84,7	5,2	10,1	5,09	114	34,01	67	22,5	336	434	1/2	3,2	43,10	20,10
4	36,38	35,0	11,7	53,3	4,83	123	34,79	72	25,5	354	265	1/2	5,2	57,21	36,04
5	12,10	84,1	5,8	10,2	5,68	124	37,40	66	21,9	332	464	1/2	3,1	61,63	40,70
6	17,32	78,7	5,2	16,1	4,45	101	29,82	67	22,7	340	479	1/2	9,9	53,56	42,27
Srednja vrednost	17,16	73,08	4,90	22,03	5,10	117,50	34,23	67,33	23,12	343,67	436,00		4,77	54,72	32,36
±SD	10,25	18,91	4,04	16,11	0,50	9,27	2,78	2,42	1,35	9,93	148,87		2,63	6,29	8,83
Grupa tretirana kombinacijom metformina (500 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)															
1	14,16	58,8	0,7	40,5	3,39	85	24,51	72	25,0	345	406	1/2	3,5	59,90	26,60
2	29,18	86,8	3,8	9,4	5,48	118	38,21	70	21,5	308	542	1/2	3,3	61,63	40,70
3	20,66	34,5	13,9	51,6	6,13	129	35,94	59	21,1	360	421	1/2	3,9	58,10	43,20
4	10,82	88,6	1,7	9,7	5,99	141	39,17	65	23,6	361	416	1/2	4,1	48,80	24,20
5	16,49	65,7	8,0	26,3	5,95	132	38,44	65	22,2	344	475	1/2	3,1	57,98	40,19
6	9,82	73,5	6,5	21,0	4,78	109	32,96	69	23,9	332	551	1/2	3,2	58,97	37,99
Srednja vrednost	16,86	67,98	5,77	26,42	5,29	119,00	34,87	66,67	22,88	341,67	468,50		3,52	57,56	35,48
±SD	7,21	20,10	4,85	16,92	1,05	20,05	5,56	4,68	1,52	19,77	65,07		0,40	4,50	8,02

Tabela 5.8. Laboratorijske analize krvi životanja u grupama koje su tretirane tri nedelje

Hrčak br.	Leucociti 3-16·10 ⁹ g/l	Limfociti 50-81 %	Monociti 0-3 %	Granulociti 17-30 %	Eritrociti 4-7·10 ⁶ g/l	Hemoglobin 100-180 g/l	Hematokrit 35-50 %	MCY 67-77	MCH 23-27	MCHC 200-360 g/l	Trombociti 200-500 ·10 ⁹ g/l	Sedimen- tacija	Glikoza mmol/l	Proteini u serumu 45-75 g/l	Albumini 23-43 g/l
Kontrolna grupa															
1	23,25	62,2	12,5	25,3	4,03	111	28,41	64	24,1	375	519	1/2	2,9	52,03	35,18
2	16,65	63,4	13,1	23,5	4,86	114	33,95	70	23,3	334	581	1/2	5,0	50,10	44,00
3	16,61	81,7	1,8	16,5	3,47	90	23,46	68	25,8	383	192	1/2	2,6	50,60	34,40
4	11,77	80,2	3,6	16,2	5,71	12,6	36,79	64	22,1	343	428	1/2	2,5	57,20	37,00
5	10,44	78,6	4,6	16,8	6,95	149	44,06	63	21,5	339	448	1/2	7,9	61,24	35,55
6	13,78	66,6	4,0	29,4	5,67	129	37,98	67	22,8	340	445	1/2	6,7	55,68	29,56
Srednja vrednost	15,42	72,12	6,60	21,28	5,12	100,93	34,11	66,00	23,27	352,33	435,50		4,60	54,48	35,95
±SD	4,58	8,99	4,90	5,58	1,26	47,52	7,31	2,76	1,54	21,01	132,47		2,31	4,35	4,69
Grupa tretirana sa 250 mg/kg metformina															
1	14,89	76,5	6,2	15,9	5,80	136	35,67	61	23,4	381	484	1/2	4,5	59,50	44,00
2	25,13	71,31	6,9	21,9	3,94	95	27,21	69	24,1	349	445	1/2	4,5	48,30	31,40
3	18,33	54,5	0,2	15,3	6,73	145	42,81	64	21,5	339	400	1/2	5,1	53,95	29,93
4	9,93	62,3	7,1	30,6	7,22	145	45,13	63	20,0	320	544	1/2	6,7	41,60	31,78
5	10,19	83,1	0,3	16,7	7,00	152	48,83	63	21,7	347	418	1/2	3,4	42,40	25,30
6	14,30	80,4	2,7	16,9	6,72	146	43,09	64	21,9	339	357	1/2	3,1	44,90	23,40
Srednja vrednost	15,46	71,35	3,90	19,55	6,24	136,50	40,46	64,00	22,10	345,83	441,33		4,55	48,44	30,97
±SD	5,69	11,07	3,24	5,90	1,22	20,96	7,78	2,68	1,46	20,04	65,94		1,29	7,05	7,23
Grupa tretirana sa 250 mg/kg itrakonazola															
1	10,24	85,8	2,0	12,2	6,65	148	44,04	66	22,3	336	365	1/2	3,7	46,70	22,90
2	29,03	72,4	3,7	21,9	4,63	105	38,33	65	22,7	346	417	1/2	3,2	49,30	37,20
3	18,87	81,2	4,6	14,1	6,29	134	39,98	64	21,3	335	220	1/2	5,6	40,00	20,00
4	16,27	83,9	1,3	14,9	6,74	143	42,73	63	21,4	336	347	1/2	7,3	45,60	22,60
5	15,77	82,6	2,0	16,4	6,75	141	40,55	61	20,9	348	436	1/2	5,1	57,40	27,00
6	7,64	84,2	0,8	15,0	6,89	143	41,44	60,	20,7	344	332	1/2	6,1	49,90	24,80
Srednja vrednost	16,30	81,68	2,40	15,75	6,33	135,67	41,18	63,17	21,55	340,83	352,83		5,17	48,15	25,75
±SD	7,49	4,81	1,46	3,31	0,85	15,69	2,03	2,32	0,79	5,81	76,54		1,53	5,74	6,08
Grupa tretirana kombinacijom metformina (250 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)															
1	6,78	86,1	5,4	8,5	5,91	132	37,69	64	22,4	351	37,7	1/2	4,1	52,39	22,79
2	5,83	84,4	0,8	14,8	7,56	150	43,01	57	19,9	349	266	1/2	5,4	51,68	25,15
3	27,97	78,6	2,1	19,3	5,17	119	34,78	67	23,0	341	189	1/2	7,2	44,70	19,20
4	18,50	65,6	5,7	28,7	6,19	135	38,43	62	21,9	352	557	1/2	3,4	45,70	27,10
5	18,97	77,0	4,1	18,9	6,11	129	38,92	63	20,9	332	485	1/2	4,6	45,60	23,60
6	32,62	81,8	2,5	15,7	5,70	126	36,46	64	22,1	345	271	1/2	6,0	43,00	35,80
Srednja vrednost	18,45	78,92	3,43	17,65	6,11	131,83	38,22	62,83	21,70	345,00	300,95		5,12	47,18	25,61
±SD	10,84	7,36	1,95	6,66	0,80	10,46	2,78	3,31	1,12	7,56	191,51		1,37	3,89	5,65

5.5. Eksperiment V – Delovanje diklofenaka, metformina sa nitroglicerinom (na malim - mladuncima i velikim mladim jedinkama hrčaka) i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom na mladuncima

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja diklofenaka, kombinacije metformina sa nitroglicerinom na malim (mladunci) i većim (oko 100 g) mladim jedinkama, kao i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom kod mladunaca na eksperimentalni fibrosarkom hrčkova.

36 sirijskih zlatnih hrčaka oba pola, težine oko 40 g (mladunci) ili oko 100 g, raspoređeni su u 6 grupa jednake veličine (posebno manje, a posebno veće jedinke slučajnim izborom, vodeći računa o podjednako polnoj zastupljenosti). 10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml su subkutano ubrizgane u leđa životinja. Prva i druga grupa (veliki i mali) započele su peroralni tretman sa fiziološkim rastvorom, treća sa 62,5 mg/kg diklofenaka dnevno, četvrta i peta sa 500 mg/kg metformina i 25 mg/kg nitroglicerina dnevno, a šesta sa kombinacijom 500 mg/kg metformina i 100 mg/kg kofeina dnevno, putem gastrične sonde 3 dana pre, ili odmah posle inokulacije tumora. Posle 17 dana, kada su prečnici tumora bili približno 2 cm u kontrolnim grupama, sve životinje su žrtvovane. Krv je sakupljena za glikozu i druge analize. Tumori su ekscizovani, a njihova težina, zapremina i prečnici izmereni. Uzorci tumora su analizirani patohistološki (HE) i imunohistohemijski (Ki-67 i dr.). Glavni organi su toksikološki analizirani. Zapremina tumora je određena kao razlika nivoa (zapremine) tečnosti u menzuri posle i pre potapanja tumora, kao i formulom $L \times S^2 / 2$, gde je L najduži, a S najkraći prečnik. Ki-67-pozitivne ćelije u uzorcima tumora su kvantifikovane. Slike su snimljene i obrađene pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za statističku analizu korišćen je validirani (Mann-Whitney) Studentov *t*-test, kao i ANOVA sa Student-Newman-Keuls post hoc testom. Najvažniji rezultati su prikazani tabelarno (Tabela 5.9.).

Subkutana inokulacija BHK-21/C13 ćelija hrčkovima rezultirala je formiranjem fibrosarkoma na mestu injekcije kod svih inokuliranih životinja. Peroralni tretmani kombinacijom metformina i nitroglicerina, kao i metformina i kofeina značajno su inhibirali rast tumora. Ovo je potvrđeno značajnim smanjenjem težine i zapremine tumora i

smanjenjem proliferacije tumorskih ćelija, što je pokazano Ki-67 bojenjem isečaka tumora hrčkova (Tabela 5.9.).

U ovom eksperimentu (Tabela 5.9.) delotvorni su bili samo tretman kombinacijom metformina sa nitroglicerinom (Prilog, Slike P19-P22.) i tretman kombinacijom metformina i kofeina (valorizacija Eksperimenta III na malim polno nezrelim jedinkama). Može se zapaziti da svi lekovi u efikasnim tretmanima (metformin, nitroglicerin, kofein) imaju zajednički mehanizam, a to je antifolatno delovanje.

Tabela 5.9. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane diklofenakom, metforminom sa nitroglicerinom i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina g	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana fiziološkim rastvorom - mali								
1	42	56	F	0	1,32	1,30	16	4,71
2	42	61	F	0	3,89	3,80	23	4,92
3	41	66	F	0	2,70	2,60	18	7,59
4	40	68	M	0	1,66	1,60	17	6,57
5	46	65	M	0	1,71	1,70	18	4,17
6	37	60	M	0	5,10	4,80	25	3,28
\bar{X}	41,33	62,67			2,73	2,63	19,50	5,21
\pm SD	21,94	4,46			1,49	1,39	3,62	1,59
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana fiziološkim rastvorom - veliki								
1	124	138	F	0	1,27	1,20	15	4,71
2	146	155	F	0	2,47	2,50	19	4,92
3	118	133	F	0	3,96	3,50	22	7,59
4	87	112	M	0	1,64	1,50	16	6,57
5	78	101	M	0	5,00	4,50	24	4,17
6	109	116	M	0	1,57	1,50	16	3,28
\bar{X}	110,3	125,8			2,65	2,45	18,67	5,21
\pm SD	24,9	19,8			1,51	1,32	3,67	1,59

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina g	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Grupa tretirana diklofenakom (62,5 mg/kg) - veliki								
1	77	102	F	0	2,34	2,00	17	9,26
2	105	92	M	0	2,64	2,50	19	8,02
3	52	65	M	0	2,51	2,50	22	7,34
4	112	87	M	0	0,77	0,48	10	3,20
5	56	59	F	0	2,90	2,45	16	3,50
6	90	97	M	0	3,80	3,50	18	3,72
\bar{X}	82	83,7			2,49	2,24	17,0	5,84
\pm SD	24,9	17,6			0,99	0,99	4,0	2,67
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg) i nitroglicerinom (25 mg/kg) - mali								
1	41	65	F	3	1,07	0,95	13	6,04
2	43	67	M	3	0,90	0,68	15	3,50
3	43	74	F	3	0,63	0,50	10	6,04
4	38	67	F	3	0,22	0,20	10	5,46
5	47	64	M	3	1,28	1,00	7	7,20
6	41	68	F	3	1,32	1,20	11	8,14
\bar{X}	42,2	67,5			0,90	0,76	11,00	6,06
\pm SD	2,3	3,5			0,42	0,37	2,76	1,58
p (t-test)					<0,05*	<0,05*	<0,05*	NS
Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg) i nitroglicerinom (25 mg/kg) - veliki								
1	99	103	F	3	0,95	0,9	14	2,19
2	96,4	92	M	3	0,95	0,9	12	3,28
3	101	107	M	3	0,99	0,95	15	2,59
4	113	116	M	3	0,43	0,40	10	5,23
5	103	122	M	3	0,29	0,25	8	3,28
6	109	118	F	3	2,30	2,00	21	5,10
\bar{X}	103,6	109,7			0,985	0,90	13,33	3,61
\pm SD	6,29	11,18			0,71	0,61	4,55	1,27
p (t-test)					0,05 ⁺	0,05 ⁺	0,05 ⁺	0,09

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina g	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg) i kofeinom (100 mg/kg) - mali								
1	47	61	M	3	0,350	0,32	9	13,87
2	42	66	M	3	0,920	0,90	15	11,08
3	41	70	M	3	0,460	0,45	11	7,45
4	39	58	F	3	0,350	0,33	8	4,07
5	38	63	F	3	0,670	0,65	10	6,55
6	43	62	F	3	0,700	0,68	12	8,94
\bar{X}	110,3	113,8			0,575	0,555	10,83	8,66
\pm SD	3,4	7,0			0,227	0,228	2,48	3,47
p (t-test)					<0,01*	<0,01*	<0,01*	

+ - na granici značajnosti

* - značajna razlika

Patohistološka i imunohistohemijska evaluacija pokazale su smanjenje penetracije tkiva, ekspanziju nekroze i hemoragičnih oblasti i smanjenje vaskulature u svim analiziranim isečcima tumora tretiranih kombinacijom metformina i nitroglicerina, kao i metformina i kofeina, u poređenju sa kontrolnim grupama.

Tretmani nisu imali značajnog uticaja na telesnu težinu životinja u toku studije.

Metformin nije uzrokovao pad nivoa glikoze u krvi ispitivanih hrčkova, kao što je prikazano u Tabeli 5.7. Takođe, eksperimentalne i kontrolne grupe su statistički upoređene u pogledu broja crvenih i belih krvnih zrnaca, broja trombocita, nivoa hemoglobina, hematokrita, serumskih proteina i sedimentacije, ali nije primećena značajna razlika između grupa.

Ispitivanjem glavnih organa nisu otkrivene ni patološke, ni toksikološke promene u eksperimentalnim i kontrolnoj grupi.

REZULTATI: Kombinacije metformina sa nitroglicerinom, kako kod polno nezrelih, tako i kod zrelih jedinki, i metformina sa kofeinom, kod polno nezrelih mladunaca, značajno su inhibirale rast fibrosarkoma kod hrčaka bez toksičnosti.

5.6. Eksperiment VI – Delovanje deoksiholne kiseline, nitroglicerina, i kombinacija itrakonazola sa deoksiholnom kiselinom, itrakonazola sa nitroglicerinom, metformina sa deoksiholnom kiselinom, diklofenaka sa deoksiholnom kiselinom i diklofenaka sa nitroglicerinom

Cilj eksperimenta bio je ispitivanje delovanja deoksiholne kiseline, nitroglicerina, i kombinacija itrakonazola sa deoksiholnom kiselinom, itrakonazola sa nitroglicerinom, metformina sa deoksiholnom kiselinom, diklofenaka sa deoksiholnom kiselinom i diklofenaka sa nitroglicerinom na fibrosarkom kod mladih hrčkova.

48 sirijskih zlatnih hrčaka oba pola, težine oko 100 g, na slučaj su raspoređena u 8 grupa jednake veličine. 10^6 BHK-21/C13 ćelija u 1 ml subkutano su ubrizgane u leđa životinja. Prva grupa je započela peroralni tretman sa fiziološkim rastvorom, druga sa 250 mg/kg itrakonazola i 20 mg/kg deoksiholne kiseline, treća sa 20 mg/kg deoksiholne kiseline, četvrta sa 500 mg/kg metformina i 20 mg/kg deoksiholne kiseline, peta sa 25 mg/kg nitroglicerina, šesta sa 250 mg/kg itrakonazola i 25 mg/kg nitroglicerina, sedma sa 62,5 mg/kg diklofenaka i 20 mg/kg deoksiholne kiseline i osma sa 62,5 mg/kg diklofenaka i 25 mg/kg nitroglicerina dnevno, putem gastrične sonde odmah posle inokulacije tumora. Posle 3 nedelje, kada su prečnici tumora bili približno 2 cm u prvoj grupi, sve životinje su žrtvovane. Krv je sakupljena za glikozu i druge analize. Tumori su ekscizovani, a njihova težina, zapremina i prečnici izmereni. Uzorci tumora su analizirani patohistološki (HE) i imunohistohemijski (Ki-67 i ostale). Glavni organi su toksikološki analizirani. Zapremina tumora je određena menzurom na osnovu zapremine tumorom istisnute tečnosti i pomoću formule $L \times S^2 / 2$, gde je L najduži, a S najkraći prečnik. Ki-67-pozitivne ćelije u uzorcima tumora su kvantifikovane. Slike su snimljene i obrađene pomoću softvera UTHSCSA Image Tools for Windows Version 3.00. Za statističku analizu korišćen je parametrijski Studentov *t*-test, koji je potom neparametrijski validiran (Mann-Whitney), kao i ANOVA sa Student-Newman-Keuls post hoc testom. Najvažniji rezultati su prikazani tabelarno (Tabela 5.10.).

Subkutana inokulacija BHK-21/C13 ćelija hrčkovima rezultirala je formiranjem fibrosarkoma na mestu injekcije kod svih inokuliranih životinja. Peroralni tretmani nisu značajno inhibirali rast tumora u ovom eksperimentu.

U prethodnim eksperimentima (I-V) svi delotvorni tretmani su sadržali metformin.

Tabela 5.10. Karakteristike eksperimentalnih životinja i tumora u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane deoksiholnom kiselinom, nitroglicerinom, i kombinacijama itrakonazola sa deoksiholnom kiselinom, itrakonazola sa nitroglicerinom, metformina sa deoksiholnom kiselinom, diklofenaka sa deoksiholnom kiselinom i diklofenaka sa nitroglicerinom

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina g	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Kontrolna grupa sa inokuliranim tumorom, tretirana fiziološkim rastvorom								
1	131	161	M	0	10,40	10	21	2,32
2	100	119	M	0	2,09	2	13	3,04
3	117	145	M	0	18,28	15	27	3,06
4	104	129	F	0	1,97	2	15	3,14
5	107	140	F	0	16,00	15	25	3,87
6	106	127	F	0	3,28	3	19	3,19
\bar{X}	110,8	136,8			8,67	7,83	20	3,10
\pm SD	11,4	15,1			7,30	6,31	5,48	0,49
Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg) i deoksiholnom kiselinom (20 mg/kg)								
1	113,6	113	F	0	3,67	3,5	19	2,33
2	101,2	102	M	0	0,46	0,25	7	2,98
3	89,2	99	F	0	0,79	0,5	11	3,20
4	92	112	F	0	3,43	3,5	16	3,45
5	96	108	F	0	3,97	3,5	20	3,10
6	82	101	F	0	2,88	2,5	15	2,95
\bar{X}	95,7	105,8			2,53	2,29	14,57	3,00
\pm SD	10,9	5,98			1,52	1,54	4,93	0,38
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05	
Grupa tretirana deoksiholnom kiselinom (20 mg/kg)								
1	124	135	M	0	9,72	10,5	19	2,03
2	101	127	M	0	12,87	12,0	23	2,69
3	112	109	M	0	7,58	7,0	14	4,04
4	196	122	F	0	5,12	5,0	15	3,22
5	77	85	F	0	2,70	2,5	9	3,58
6	98	129	F	0	3,89	3,5	11	3,24
\bar{X}	118,0	117,8			6,98	6,75	15,17	3,13
\pm SD	41,3	18,3			3,84	3,83	5,21	0,70
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05	
Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg) i deoksiholnom kiselinom (20 mg/kg)								
1	121	53	M	0	0,15	0,059	8	2,38
2	108	109	M	0	4,30	4,0	15	3,25
3	82	86	M	0	9,09	8,0	22	2,97
4	96	108	F	0	4,05	3,5	12	3,27
5	96	106	F	0	3,51	3,0	11	3,57
6	99	123	F	0	6,46	5,5	15	3,20
\bar{X}	100,3	97,5			5,48	4,80	13,83	3,10
\pm SD	13,13	24,8			2,31	2,02	4,79	0,40
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05	

Hrčak br.	Težina životinje (g)		Pol	Pred-tretman (dani)	Tumor			Serumska glikoza mmol/l
	početak	kraj			Težina g	Zapremina cm ³	Ki-67 \bar{X} za 20	
Grupa tretirana nitroglicerinom (25 mg/kg)								
1	92	101	M	0	2,60	1,6	8	6,01
2	88	103	F	0	3,22	3	15	2,51
3	103	130	F	0	5,34	5	17	2,95
4	106	131	F	0	7,58	5,5	19	3,11
5	88	105	F	0	6,80	6	15	3,51
6	88	121	F	0	6,48	6,5	14	3,63
\bar{X}	94,2	115,2			5,33	4,60	14,67	3,62
\pm SD	8,2	13,8			2,02	1,90	3,72	1,24
p (t-test)					0,3	0,3	>0,05	
Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg) i nitroglicerinom (25 mg/kg)								
1	119	136	M	0	10,35	9,0	23	3,11
2	106	111	M	0	7,29	7,0	17	2,47
3	101	109	M	0	3,85	3,0	12	3,52
4	96	94	F	0	2,39	1,94	9	4,03
5	115	116	F	0	4,82	4,5	15	2,65
6	98	58	F	0	2,97	2,0	8	4,20
\bar{X}	105,8	104,0			5,28	4,57	14,00	3,33
\pm SD	9,37	26,3			3,02	2,88	5,59	0,71
p (t-test)					>0,05 \cong 0,3	>0,05 0,3	>0,05	
Grupa tretirana diklofenakom (62,5 mg/kg) i deoksiholnom kiselinom (20 mg/kg)								
1	97	101	M	0	12,81	12,5	20	3,25
2	95	96	M	0	2,84	3,0	11	2,34
3	101	52	M	0	0,40	0,20	6	4,10
4	90	107	F	0	13,00	12,5	24	4,54
5	90	100	F	0	2,54	2,5	16	2,14
6	111	127	F	0	5,00	4,5	15	3,68
\bar{X}	97,33	97,17			6,10	5,87	15,33	3,34
\pm SD	7,92	24,70			5,47	5,32	6,38	0,96
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05	
Grupa tretirana diklofenakom (62,5 mg/kg) i nitroglicerinom (25 mg/kg)								
1	111	103	M	0	9,46	9,0	20	2,28
2	112	116	M	0	12,47	13,0	22	3,73
3	98	102	M	0	6,85	6,5	18	2,84
4	81	98	F	0	5,65	5,5	19	3,54
5	108	110	F	0	3,74	4,0	15	2,33
6	97	113	F	0	5,25	5,0	17	2,56
\bar{X}	101,2	107,0			7,24	7,17	18,5	2,89
\pm SD	11,8	7,0			3,20	3,33	2,43	0,61
p (t-test)					>0,05	>0,05	>0,05 \cong 0,6	

Patohistološka i imunohistohemijska evaluacija nisu pokazale smanjenje penetracije tkiva, ekspanziju nekroze i hemoragičnih oblasti i smanjenje vaskulature u svim analiziranim isečcima tretiranih tumora, u poređenju sa kontrolom.

Tretmani nisu imali značajnog uticaja na telesnu težinu životinja u toku studije (Tabela 5.10.).

Metformin nije uzrokovao promene nivoa glikoze u krvi ispitivanih hrčkova, kao što je prikazano u Tabeli 5.10. Takođe, eksperimentalne i kontrolne grupe su statistički upoređene u pogledu broja crvenih i belih krvnih zrnaca, broja trombocita, nivoa hemoglobina, hematokrita, serumskih proteina i sedimentacije, ali nije primećena značajna razlika između grupa.

Ispitivanjem glavnih organa nisu otkrivene ni patološke, ni toksikološke promene u eksperimentalnim i kontrolnoj grupi.

REZULTATI: Tretmani primenjeni u ovom eksperimentu (VI) nisu inhibirali rast fibrosarkoma kod hrčaka.

6. DISKUSIJA

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita antikancersko delovanje određenih netoksičnih lekova registrovanih za neonkološke indikacije na tumore eksperimentalnih životinja. Pretkliničke i malobrojne kliničke studije ukazale su na moguću upotrebu izabranih lekova kao netoksičnih antikancerskih sredstava. Prema dostupnim podacima, do naših ispitivanja nisu objavljeni rezultati drugih istraživanja antitumorskog delovanja kombinacije ovde korišćenih lekova in vivo. Mogućnosti sinergističkih antikancerskih interakcija i sigurne multitargetske terapije, zasnovane na prethodno sprovedenim zasebnim pretkliničkim studijama, glavni su razlozi za testiranje kombinacija izabranih lekova na eksperimentalnom modelu fibrosarkoma kod hrčaka.

6.1. Eksperiment I – Antikancersko delovanje mebendazola

Iako klinička ispitivanja nisu završena, već je potvrđeno da mebendazol, poznati antiparazitski lek koji se široko koristi u tropskim oblastima, inhibira rast ćelija kancera. Pretkliničke studije pokazuju da mebendazol značajno otežava rast malignih i metastatskih tumora, kao što su osteosarkom i sarkom mekog tkiva, melanom, karcinom (pluća, kolorektalni, dojki, jajnika, hepatocelularni i adrenokortikalni), akutna mieloidna leukemija, multiformni glioblastom i meduloblastom. Mebendazol može indukovati depolimerizaciju mikrotubula neoplazme i novoformirane vaskulature, zaustavljanje rasta tumora i neoangiogenezu, zajedno sa drugim predloženim mehanizmima delovanja [74].

Brojni laboratorijski eksperimenti u ranoj fazi, kliničke studije i epidemiološka istraživanja su dokumentovali obećavajuća antikancerska svojstva mnogih postojećih lekova koje milioni ljudi bezbedno uzimaju svaki dan za druge indikacije [1-3]. Projekat primene u onkologiji lekova registrovanih za druge namene (Repurposing Drugs in Oncology - ReDO) [91], koji koordinira Fond za borbu protiv kancera (Anticancer Fond), identifikovao je 70 lekova za koje postoje dokazi antikancerskih svojstava. Oni uključuju antiparazitski lek mebendazol [4], analgetik aspirin [6], lek za dijabetes metformin [7-9], statine koji snižavaju holesterol [10], antibiotik doksiciklin [11], antacid cimetidin [12], anti-gljivični lek itrakonazol

[13], ACE inhibitor perindopril [14, 15], vazodilatator nitroglicerina [16] i imunoterapijski lek levamizol [92, 93]. Ovi lekovi treba da budu testirani i primenjeni u onkologiji.

Klinička ispitivanja su od suštinskog značaja za određivanje da li su u onkologiji lekovi registrovani za druge namene primenljivi i bolji od redovne terapije i za koje grupe pacijenata. Cilj je pronalaženje najboljih, najsigurnijih i najjeftinijih oblika antikancerske terapije [1-3], [91].

Mebendazol je benzimidazolski antihelmintik sa hemijskom formulom $C_{16}H_{13}N_3O_3$, molekularnom masom 295,293 g/mol i sistematizovanim nazivom u IUPAC nomenklaturi metil (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) karbamat. Uveden je 1970-ih kao ekvivalent ranije registrovanom tiabendazolu, ali sa značajno smanjenom toksičnošću. Svetska zdravstvena organizacija navodi mebendazol kao osnovni lek protiv različitih vrsta parazitskih crva. Mebendazol se primenjuje oralno i paralizuje parazite u alimentarnom kanalu.

Niska toksičnost mebendazola pripisuje se maloj količini apsorbovanog leka (5 - 10% kod svih vrsta, 17 - 22% kod ljudi) [94].

Masna hrana poboljšava apsorpciju mebendazola [94]. First-pass metabolizam skoro celokupnog apsorbovanog mebendazola javlja se u crevima i jetri [94]. Eliminise se preko urina i žuči, uglavnom u obliku metabolita. Velika količina se eliminise nepromenjena preko fecesa, bez apsorpcije. U ljudskom krvotoku 95% mebendazola je vezano za proteine [94]. Zbog lipofilnosti, mebendazol prolazi kroz krvno-moždanu barijeru [94]. Bezbednost mebendazola nije u potpunosti istražena u trudnoći (C kategorija) i dojenju. Gastrointestinalni bol, dijareja i viši nivoi enzima jetre česti su neželjeni efekti terapije mebendazolom. U retkim slučajevima mogu se pojaviti leukopenija, agranulocitoza i trombocitopenija.

Kombinacija mebendazola sa metronidazolom može retko izazvati Stevens-Johnson-ov sindrom. Antiepileptici fenitoin i karbamazepin snižavaju koncentracije mebendazola u plazmi [95]. Interakcije sa cimetidinom podižu koncentracije mebendazola [95].

Rezultati brojnih istraživanja pokazuju da mebendazol, koji se široko koristi za lečenje oboljenja izazvanih parazitskim crvima, naročito u endemskim tropskim predelima, može sprečiti proliferaciju ćelija kancera i pojavu sekundarnih tumora, iako nisu dovršena klinička

ispitivanja. U laboratorijskim uslovima, mebendazol je pokazao dobru antitumorsku aktivnost protiv različitih vrsta kancera: melanom [19, 20], karcinom pluća [21], adrenokortikalni karcinom [22, 23], kolorektalni karcinom [24-26], karcinom dojke [27], jajnika [28] i hepatocelularni karcinom [29]; osteosarkom i sarkom mekog tkiva [24]; akutna mieloidna leukemija [30, 31]; multiformni glioblastom [32] i meduloblastom [33, 34].

Mebendazol selektivno inhibira sintezu mikrotubula u intestinalnim ćelijama parazitskih crva, što blokira njihovo uzimanje šećera i drugih hranljivih materija, stvarajući paralizu i eliminaciju helminta iz ljudskog tela [94]. Pokazano je da mebendazol indukuje depolimerizaciju tubulina u različitim modelima karcinoma [19-34].

Mikrotubuli su široko prihvaćene antikancerske mete, zbog njihove vitalne uloge u ćelijskom životnom ciklusu. Lekovi koji ciljano deluju na mikrotubule, kao što su vinka alkaloidi i taksani, inhibiraju deobu ćelija, podstičući apoptozu. Mikrotubuli u kulturi ćelija kancera pluća bili su efektivne mete za antikancersku terapiju mebendazolom. Ova terapija blokirala je mitozu, indukovala je apoptozu ćelija kancera pluća, aktivirala kaspazu i oslobodila citohrom c [21].

Modulacija proteina Bcl-2, Bax i p53

Bcl-2 i srodni proteini, kodirani onkogenom Bcl-2, suzbijaju ili promovišu apoptozu [40]. Konačni apoptotski efekat zavisi od količine pro- i anti-apoptotskih Bcl-2 proteina [40]. Oštećenje Bcl-2 gena izaziva kancer i otpornost na onkološku terapiju [41].

Kao i drugi Bcl-2 proteini, Bax protein, kodiran Bax onkogenom, suzbija ili promoviše apoptozu [40]. Bax protein formira Bax-Bax homodimer koji deluje kao induktor apoptoze, dok heterodimer sa Bcl-2 (Bcl-2-Bax) funkcioniše kao antiapoptotski regulator [40].

Bax otvara anjonski kanal mitohondrije i oslobađa citohrom c smanjujući potencijal membrane [43]. Uticaj Bax gena na apoptozu zavisi od supresora tumora p53 [40]. Protein p53 i srodni geni štite višćelijske organizme od pojave kancera. Ovaj supresor kancera naziva se „genomski čuvar” jer sprečava mutacije. Bax se može aktivirati pod uticajem Bcl-2, kao i p53 [40] ili Bif-1 proteina [44]. Nasuprot tome, Bax se može inaktivirati interakcijom sa

VDAC2 proteinom spoljašnje membrane mitohondrija (naponski zavisni anjonski kanali) [45], enzimom Pin1 i IBRDC2 (IBR-tip E3 ubikvitin ligazom) [47, 74].

Publikacije o efektu mebendazola na ćelije melanoma (putem inaktivacije Bcl-2 plus drugi mehanizmi) i na melanocyte daju bolji uvid u antikancerski mehanizam delovanja mebendazola [19, 20]. Ove studije su pokazale da antikancerski efekat mebendazola na hemorezistentne ćelije melanoma uključuje mikrotubularno oštećenje pod uticajem Bcl-2. Bcl-2 protein, koji je najčešće izražen u humanom melanomu, omogućava proliferaciju mutiranih ćelija. Povezan je sa hemorezistencijom melanoma, kroz svoju antiapoptotičku ulogu [19, 20].

U mnogim slučajevima, melanom sa metastazama je otporan na standardnu hemoterapiju vinblastinom i paklitakselom usmerenu na oštećenje mikrotubula [19]. Mebendazol deluje preko mesta vezivanja kolhicina, koje se razlikuje od mesta vezivanja vinblastina ili paklitaksela [19, 52]. Dalje, mebendazol ima nukleotidnu strukturu [19], koja dozvoljava interakcije sa širokim spektrom biomolekula. Shodno tome, mebendazolove antikancerogene aktivnosti obuhvataju i druge efekte, različite od oštećenja mikrotubula, kao što su smanjenje fumarata i smanjenje iskorišćenja glukoze [19].

Oblimersen, Bcl-2 antisense (antikodirajući – vezivanjem za DNK kod) oligodeoksinukleotid, selektivno cilja Bcl-2 mRNK, smanjujući proizvodnju Bcl-2 proteina, koji omogućava proliferaciju ćelija kancera i razvoj karcinoma [96]. Ispitana je upotreba oblimersena kao ciljane anti-Bcl-2 terapije protiv malignog melanoma [97].

Kombinacija oblimersena i dakarbazina daje znatno bolje kliničke rezultate u lečenju naprednog melanoma nego sam dakarbarzin [97]. Važno je napomenuti da mebendazol, kao i oblimersen, takođe uzrokuje apoptozu ćelija melanoma preko Bcl-2 [19]. Oblimersen se primenjuje samo intravenskom infuzijom. Nasuprot tome, mebendazol je lako dozirati, jer se može dati oralno.

Preparati Bcl-2 siRNA (small interfering RNA - mala interferirajuća RNK) pokazuju umeren efekat na mitoze ćelija kultura melanocita i linija melanoma [98].

Prethodne studije ukazuju na post-translatorno fosforilisani protein Bcl-2 kao regulator reakcije ćelije na mebendazol u ćelijama melanoma i melanocitima [19]. Samo u

ćelijama melanoma mebendazol je prouzrokovao brzu fosforilaciju Bcl-2 proteina [19]. Bcl-2 fosforilacija blokira njegovu interakciju sa mediatorom apoptoze Bax (sprečavanje formiranja antiapoptotičkog heterodimera Bcl-2-Bax), čime se podstiče selektivna apoptoza u ćelijama melanoma [19]. Takođe postoje dokazi da tretman melanocita rezistentnih na mebendazol sa siRNA Bcl-2 smanjuje nivoe Bcl-2 i povećava osetljivost ćelija na antiproliferativne efekte mebendazola [19].

Drugi rad na ksenograftima melanoma [20] potvrdio je da mebendazol inhibira rast melanoma fosforilacijom Bcl-2 i dokumentovao da mebendazol smanjuje koncentracije X-inhibitora apoptoze.

U ćelijama ne-mikrocelularnog karcinoma ćelija pluća, Bcl-2 fosforilacija nije bio neophodan događaj za apoptozu indukovanu mebendazolom. To je zasnovano na zapažanju da se Bcl-2 fosforilacija javljala u proapoptotičkom odgovoru na tretman mebendazolom u ćelijama H460, ali ne i u ćelijama A549 [21]. U dve ispitivane ćelijske linije ne-mikrocelularnog karcinoma ćelija pluća, A549 i H460, fosforilacija Bcl-2 proteina uzrokovana mebendazolom podržava apoptozu samo u kulturi H460 [21].

Inhibicija Hedgehog signalnog puta

Hedgehog (Hh) signalni put se intenzivno aktivira u tumoru mozga, meduloblastomu i nekim drugim agresivnim kancerima kod ljudi. Hh signalni blokator vismodegib pokazao je ohrabrujuće antikancerske efekte. Zbog toga je Hh signalni put postao novi perspektivan cilj u istraživanjima potencijalno onkoloških lekova. Mebendazol je snažno potisnuo Hh signalizaciju i smanjio proliferaciju Hh kontrolisanih humanih ćelijskih linija meduloblastoma u koncentracijama koje se mogu postići u kliničkim uslovima [65].

Mutacijski status Hh signalnih gena u tumoru nakon progresije bolesti, kao što je mutirani serpentinski receptor Smoothened, izazivao je rezistenciju na antikancersku terapiju vismodegibom. Protein Smoothened, receptor povezan sa G proteinom, deo je Hedgehog signalnog puta, koji je evoluciono konzerviran od muva do kičmenjaka i ljudi. Smoothened se enkodira SMO genom i formira serpentinski protein koji je uključen u Hh signalni put. Mebendazol u humanim ćelijskim linijama inhibira genu primarnog cilijuma, mikrotubularne organele ćelije koja ima ulogu koordinatora za stimulaciju Hh signalnog puta

[65]. Mebendazol efikasno inhibira Hh signalizaciju, čak i kod ćelijskih klonova rezistentnih na vismodegib zbog mutiranog gena koji enkodira Smoothened protein [65]. Kombinacija mebendazola i vismodegiba ima dodatni inhibitorski efekat na Hh signalizaciju [65].

Inhibicija neoangiogeneze i imunomodulacije

Neki antimikotubularni lekovi, kao što je mebendazol, mogu izazvati depolimerizaciju ćelijskih mikrotubula u krvnim sudovima tumora i kao takvi ciljaju vaskulaturu da bi smanjili neoangiogenezu i snabdevanje neoplazmi hranljivim materijama [33]. Bai et al. [33] u prekliničkoj studiji nedavno su pokazali da mebendazol suzbija različite oblike meduloblastoma. Mebendazol tu inhibira vaskularni endotelni faktor rasta receptor 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 - VEGFR2), glavni receptor koji kontroliše delovanje VEGF [33]. U prekliničkom eksperimentu na miševima sa meduloblastom, pokazano je da mebendazol blokira neoangiogenezu, koja je neophodna za rast tumora [33]. Mikrovaskularna gustina značajno je smanjena u lečenim tumorima kod miševa, u poređenju sa nelečenim tumorima. Imunohistohemija tumora tretiranih mebendazolom ukazuje na inhibiciju VEGFR2 kinaze. Zbog toga je mebendazol antiangiogeno sredstvo koje smanjuje razvoj tumorske neovaskulature blokiranjem aktivnosti VEGFR2 [33].

Delovanje mebendazola na imunološki sistem organizama sa kancerom još uvek nije poznato. Ipak, pokazano je da mebendazol može stimulisati ćelijski imunitet kod miševa sa ehinokokozom [4]. Postoje dokazi da poboljšani imunološki mehanizmi mogu biti povezani sa dinamikom mikrotubula i da to može takođe doprineti antitumorskom delovanju lekova koji oštećuju mikrotubule [4].

VERIFIKACIJA ANTIKANCERSKOG DELOVANJA MEBENDAZOLA U KLINIČKIM STUDIJAMA

Istraživanja antikancerogenog delovanja mebendazola u kliničkim uslovima još nisu završena [91]. Do sada su objavljena samo dva rada (studije slučaja) sa završenim rezultatima istraživanja: lečenje pacijenta sa metastatskim adrenokortikalnim karcinomom [23] i lečenje pacijenta sa metastatskim karcinomom debelog creva [26].

Idealni lekovi za kancer su „ciljani” lekovi, čije delovanje je usmereno isključivo na ciljeve koji su specifični samo za ćelije kancera. Međutim, veliki broj raspoloživih antikancerskih lekova, poznatih kao „prljavi”, ima za cilj nekoliko meta, delujući na više

proteina ili signalnih puteva, i u ćelijama kancera i u normalnim ćelijama istovremeno. Upotreba netoksičnih lekova registrovanih za druge namene u kombinaciji sa drugim lekovima trebalo bi da bude efikasna protiv kancera, uz smanjenu toksičnost. Dobar pravac istraživanja bio bi eksperimentisanje sa kombinacijama niskotoksičnih terapija protiv kancera (Tabela 2.1.) [4, 6-16, 19-34]. Tretman mebendazolom može imati sledeće prednosti: oralno doziranje (nema potrebe za infuzijom), niža toksičnost (nema potrebe za posebnom opremom koja se koristi u slučajevima toksičnosti), manja učestanost vizita, potencijalno manji broj testova krvi i niske cene - manji troškovi za pacijenta i bolji odgovor na terapiju.

Dakle, do sada, ustanovljeno je da mebendazol izaziva depolimerizaciju tubulina u različitim modelima kancera [19-34]. Mikrotubule su opšteprihvaćene kao efektivni ciljevi antikancerske terapije. Na primer, tretman ćelijske linije kancera pluća mebendazolom izazvao je zaustavljanje mitotske aktivnosti, koje je sledila apoptotska ćelijska smrt uz pojavu aktivacije kaspase i otpuštanje citohroma c [21]. Mebendazol je izazvao dozno i vremenski zavisani apoptotski odgovor u ćelijskim linijama kancera pluća kod ljudi [21]. Publikacije o efektu mebendazola na ćelije melanoma (pomoću Bcl-2 inaktivacije i drugih mogućih mehanizama) i melanocite objašnjavaju antikancerski mehanizam delovanja mebendazola [19, 20].

Mebendazol je snažno inhibirao Hedgehog (Hh) signalizaciju i usporio rast Hh-upravljanih ćelija meduloblastoma ljudi u klinički osvarivim koncentracijama [65].

Neki antimikrotubularni lekovi, kao što je mebendazol, mogu izazvati depolimerizaciju mikrotubula u novoformiranoj vaskulaturi i kao takvi, deluju ciljano na vaskularne organe da bi se prekinula neoangiogeneza i snabdevanje neoplazmi krvlju [39], što je u skladu sa našim patohistološkim nalazima na ispitivanoj tumorskoj vaskulaturi.

U našim eksperimentima primećeno je patohistološko poboljšanje ispitivanih tumora, ali pretpostavljamo da kratko trajanje tretmana mebendazolom predstavlja glavni razlog zbog kojeg su zapremina i težina tumora ostali neznatno promenjeni u obe tretirane grupe. Kombinacija mebendazola sa deoksiholnom kiselinom pokazala je malu prednost u odnosu na patohistološka svojstva, verovatno zbog boljeg prodiranja mebendazola u tkiva. U cilju verifikacije ovih preliminarnih rezultata, potrebna su dalja pretklinička ispitivanja.

Klinička ispitivanja mebendazola kao tretmana protiv kancera nisu završena i objavljena do danas [91]. Postoje samo dve dobro dokumentovane studije slučaja: slučaj dugotrajne kontrole tumora kod metastatskog adrenokortikalnog karcinoma [23] i slučaj metastatskog karcinoma debelog creva [26].

Buduće kliničke studije će pokazati da li mebendazol ima potencijal da postane adjuvans u aktuelnim antitumorskim, naročito antisarkomskim, terapijama.

6.2. Eksperiment II – Antikancersko delovanje metformina

Kandidat za antikancersko sredstvo metformin aktivira kinazu jetre LKB1-upravljanom AMPK (5'-AMP-aktivirana protein kinaza), koja smanjuje signalizaciju mTOR kompleksa 1 i fosforilaciju S6K1 uključene u sintezu proteina i proliferaciju ćelija karcinoma [9, 99]. LKB1 je glavna ushodna kinaza AMPK. AMPK takođe direktno inhibira raptor (regulatory associated protein - regulatorno povezani protein) mTOR [99]. Na MG-63 ćelijama osteosarkoma *in vitro* metformin je pojačao fosforilaciju AMPK α na mestu Tyr172 i smanjio fosforilaciju mTOR-a i njegovih nishodnih efektor ribozomnih proteinskih S6 kinaza [54]. Takođe je inhibirao proliferaciju, metastaze i stvaranje sfernih formacija sličnih kao kod kancerskih stem-ćelija [54].

Metformin ne mora da deluje obavezno preko AMPK kada indukuje inhibiciju rasta i apoptozu ćelijske linije osteosarkoma MG-63 [54]. Pored toga, metformin direktno inhibira mTOR C1 signalni put, povećava REDD1, negativni regulator mTOR-a, u zavisnosti od p53 i inhibira ekspresiju ciklina D1 i proteina retinoblastoma (ključni regulatori ćelijskog ciklusa) u različitim ćelijskim linijama nezavisno od AMPK [100].

Učešće mTOR-a u genezi sarkoma povezano je sa primordijalnom ulogom IGF (Insulin-like Growth Factor) sistema u ovim tumorima. Insulin/IGF-1 je uključen ne samo u regulaciju uzimanja glikoze, već i u karcinogenezu putem pojačavanja signalnog puta insulin/IGF-1 receptora [101]. Pored toga, inhibicija signalnih puteva mTOR i mTOR C1 dovodi do direktnog antiangiogenog efekta [55]. Zato su mTOR inhibitori dobar izbor za *in vivo* i kliničko testiranje u lečenju sarkoma [55].

Metformin takođe inhibira aktivnost matične metaloproteinaze-9 (MMP-9) *in vitro* u ćelijama humanog fibrosarkoma HT-1080 nezavisno od AMPK [102]. On izaziva inhibiciju sinteze proteina, mRNA i transkripcijsku aktivnost MMP-9 gena zahvaljujući Ca-zavisnoj supresiji forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) fosforilacije ekstracelularnog proteina 1, aktivatora kinaze. MMP-9 je visoko izražen u humanom sarkomu i ćelijama drugih kancera. Metformin je inhibirao PMA-indukovanu invaziju i migraciju ćelija humanih fibrosarcoma *in vitro* putem Ca-zavisnih signalnih puteva i stoga ima potencijal da postane antisarkomski lek [102].

Metformin utiče na glikolitički kapacitet i smanjuje mitohondrijalno disanje, snižavajući energetske efikasnost u ćelijama limfocitne leukemije *in vitro* [103]. Inhibicija mitohondrijskog respiratornog kompleksa I dovodi do smanjenja ATP, akumulacije AMP i fosforilacije AMPK u ćelijama limfocitne leukemije *in vitro* [103]. AMPK je negativni regulator Warburg-ovog efekta [103]. Aktivacija AMPK i smanjenje metabolizma glikoze (inhibicija oksidativne fosforilacije) suprotstavlja se progresiji tumora. Pokazano je da neunošenje glikoze (izgladnjivanje) ili inhibicija glikolize povećavaju citotoksičnost metformina u ćelijama limfocitne leukemije *in vitro* [103].

Kombinacija metformina i 2-deoksiglikoze, kompetitivnog inhibitora glikolize (koja se široko koristi za PET/CT skeniranje), efikasna je protiv širokog spektra pretkliničkih modela humanih karcinoma (želuca, jednjaka, dojke) *in vitro* i *in vivo* [104]. Kao objašnjenje, predložena je dualna inhibicija energetske snabdevanja tumora [104]. Kombinacija metformina i 2-deoksiglikoze bila je efikasnija od bilo kojeg od tih jedinjenja posebno u osam ćelijskih linija sarkoma [53]. Ćelije sarkoma u kulturama bile su 2-5 puta osetljivije na kombinaciju, nego normalne ćelije [53]. Kombinacija metformina i 2-deoksiglikoze blokirala je *in vitro* ćelijski ciklus karcinoma prostate u G₂-M fazi i indukovala apoptozu zavisnu od p53 [105].

Poremećaj jednokarbonskog pula (rezervoara ugljenika koji ima kapacitet da primi ili oslobodi ugljenik) antifolatnom aktivnošću metformina na ćelijama karcinoma dojke *in vitro* je novi prepoznat mehanizam indukcije AMPK [106, 107]. Metformin *in vitro* na ćelijama karcinoma dojke može delovati na sličan način kao antifoladni hemoterapeutski agens koji inhibira replikaciju DNK i proliferaciju ćelija [106]. Koncept da metformin deluje kao otrov

mitohondrijalnog kompleksa I, koji dovodi do neravnoteže AMP/ATP [53, 103-105] značajno je dopunjen nakon nalaza da može delovati kao antifolat koji indukuje ataksija teleangiektazija mutiranu (ATM) kinazu i sekundarno nishodno indukuje AMPK, nakon promene u ciklusu ugljenika, preko folatno regulisanih jednokarbonskih puteva [106]. Iako metformin uzrokuje promenu protoka ugljenika putem folat-zavisnog jednokarbonskog metabolizama *in vitro*, to ne podrazumeva direktnu inhibiciju enzima ciklusa folne kiseline na koje ciljano deluje metotreksat i na taj način izaziva znatno manji broj neželjenih efekata [106].

Tretman metforminom pokazuje efekat sličan deficitu vitamina B₁₂ u ćelijama karcinoma dojke [106] koji verovatno uzrokuje defekt u de novo biosintezi purin / pirimidin, akumulaciju homocisteina i blokadu biosinteze glutationa. Pored toga, nekoliko novih studija ukazalo je na poremećaj metabolizma vitamina B₁₂ kao osnovu antifolne antikancerske aktivnosti metformina [106, 108].

Indukcija smrti ćelija limfocitne leukemije metforminom *in vitro* [103] takođe je povezana sa inhibicijom Mcl-1, jednog od Bcl-2 familije proteina koji omogućava preživljavanje [103]. Ćelije limfocitne leukemije *in vitro* više zavise od zaštitne aktivnosti antiapoptotskih proteina Bcl-2 nego normalne ćelije. Metformin je u ćelijama limfocitne leukemije *in vitro* inhibirao transkripcione faktore koji su u osnovi puteva bitnih za preživljavanje i aktivaciju ćelija leukemije, naročito PI3/AKT i NF-κB/STAT3 [103].

Metformin je izazvao sledeće promene proteina povezanih sa apoptozom i ćelijskim ciklusu ćelijama mieloma *in vitro* [59]: aktivirao je kaspazu-3, kaspazu-9, PARP-1, Bak i p21, inaktivirao Mcl-1, Ki-67, HIAP-1, ciklin D1, CDK4 i CDK6 i inhibirao receptor za insulinski faktor rasta 1 (IGF-IR), fosfatidil inozitol 3-kinazu (PI3K), protein kinazu B (PKB/AKT) i mTOR.

Nekoliko nezavisnih puteva RAS (kancer pankreasa), AKT (ćelije kancera dojke) i HIF-1α (model dijabetesa pacova) mogu doprineti antikancerskom dejstvu metformina *in vitro* [109]. Istaknuti su određeni geni (CDKN1A, ESR1, MAKS, MIC, PPARGC1A, SP1, STK11, CHOP, CAV-1, HO-1, SGK-1, Par-4), preko kojih metformin može izazvati svoj antikancerski efekat *in vitro* [109, 110]. Neki *in vitro* nalazi u ćelijama karcinoma dojke ukazuju na to da primarni efekat metformina predstavlja inhibicija mRNK [110]. Metformin *in vitro* izaziva transkripcionu regulaciju efekta na neuvijenih proteina ćelija karcinoma dojke [110].

Pored toga, metformin aktivira metaboličke puteve PERK-ATF4 u ćelijama karcinoma dojke, što rezultira signalima stresa endoplazmatskog retikuluma i povećava nivo CHOP mRNA transkripcionog faktora [110]. Metformin inhibira ekspresiju PLC ϵ gena i signalne puteve Notch1/Hes i androgenog receptora u ćelijama karcinoma prostate [111]. Štaviše, metformin pokazuje uticaj na autofagiju, migraciju ćelija (metastaziranje), senescenciju (ćelijsko starenje), matične ćelije kancera i imunitet ćelija u različitim ćelijskim linijama kancera, što se objašnjava različitim mehanizmima [56, 61].

Međutim, uprkos značajnom antiproliferativnom efektu metformina na ćelijske kulture *in vitro*, on još uvek nije dovoljno ispitan *in vivo*, pa nije u potpunosti objašnjeno da li i kako metformin inhibira proliferaciju ćelija kancera kod eksperimentalnih životinja i kolika je njegova terapijska antitumorska vrednost. Postoji samo nekoliko kontradiktornih studija o antikancerskom efektu metformina *in vivo* na solidnim tumorima, uključujući sarkome, kod eksperimentalnih životinja [58, 59, 104, 112, 113]. Metformin može indirektno antikancerski pripremiti metabolizam domaćina smanjenjem glikoneogeneze i cirkulišućeg insulina [99]. Metformin takođe poboljšava metabolizam glikoze i lipida smanjenjem koncentracije ukupnih žučnih kiselina u serumu [114]. Stoga je i cilj našeg istraživanja bio da odgovori na pitanje da li metformin na bilo koji način može inhibirati rast solidnog tumora na eksperimentalnom životinjskom modelu, kao što je fibrosarkom kod hrčka.

Efekti tretmana metforminom različitih tipova kultura malignih ćelija definisani su različitim direktnim molekularnim, energetskim i genetskim mehanizmima uticaja na rast, proliferaciju, migraciju, starenje, autofagiju i apoptozu ćelija. Uprkos značajnim antikancerskim i hemiosenzibilizirajućim efektima *in vitro*, mehanizmi delovanja metformina na rast solidnih tumora *in vivo*, kao što su sarkomi, još uvek nisu u potpunosti ispitani. Konkretno, njegova efikasnost nije dovoljno istražena i potvrđena.

Kombinacija 250 mg/kg/d metformina i 500 mg/kg/d 2-deoksiglikoze primenjenih intraperitonealno značajno inhibira rast subkutanih tumora na modelima ksenografta kod miševa nakon inokulacije karcinoma (dojke, ezofagogastričnog), što nije slučaj sa bilo kojom komponentom datom posebno [104].

Na modelu ksenografta humanog mijeloma kod miša, kao u našem radu, životinje koje su primile intraperitonealni tretman od 200 mg/kg/d metformina imale su manje

tumore nego u kontrolnoj grupi [59]. Pored toga, terapija metforminom značajno je produžila preživljavanje miševa sa tumorima [59]. Imunohistohemijski, metformin je aktivirao kaspazu-3, kaspazu-9, p21 i inhibirao Mcl-1, Ki-67, ciklin D1, AKT, mTOR i 4E-BP1 u ovom modelu ksenografta [59].

U skladu sa našim rezultatima, intraperitonealni tretman sa 2-4 mg/kg/d metformina značajno je inhibirao rast limfoma B- i T-ćelija koji su subkutano inokulirani miševima [112]. U ovim modelima ksenografta glodara, kod životinja lečenih metforminom fosforilacija AMPK je značajno povećana, uz smanjenje mTOR.

Efikasnost 200-500 mg/kg/d metformina datog p.o. ili intraperitonealno nije potvrđena na ksenograftu Ewing-ovog sarkoma kod atimičnih miševa [113]. Pretpostavlja se da je hipoksija, koja se često javlja kod solidnih tumora, promenila aktivaciju AMPK i inhibiciju mTOR signalizacije.

Metformin primenjen p.o. intragastrično u dozi od 250 mg/kg/d inhibirao je rast tumora na ksenograft modelu karcinoma ezofagealnih skvamoznih ćelija [58]. AMPK, p53, p21^{cip1}, p27^{kip1} i ciklin D1 su uključeni u inhibiciju rasta tumora u ovoj *in vivo* studiji. Kada je tretman metforminom započet 7 dana pre implantacije i nastavljen do kraja studije, veličina tumora u toku eksperimenta bila je značajno manja u odnosu na grupu koja je lečena metforminom isključivo nakon implantacije (bez predtretmana) [58]. Kada je metformin dat posle implantacije, nije primećena značajna razlika u veličini tumora u lečenoj grupi miševa u poređenju sa kontrolnom (do 42 dana) [58]. Upotreba metformina pre implantacije u ovom modelu [58] značajno je odložila razvoj tumora. Brza ćelijska proliferacija i relativno slaba angiogeneza u ovim tumorima uzrokovali su hipoksiju i ishemiju, što je dovelo do nekroze. Metformin može inhibirati tumorsku angiogenezu u navedenom modelu [58]. Inhibicija procesa angiogeneze u ovom modelu može biti preko AMPK zavisnih i AMPK nezavisnih signalnih puteva.

U našem eksperimentalnom modelu sarkoma na hrčkovima, 7-dnevni predtretman metforminom pre inokulacije ćelija BHK-21/C13 takođe je važan za statistički značajan efekat leka na težinu tumora, zapreminu i broj obojenih ćelija metodom Ki-67 u histološkim preparatima. Na osnovu prethodno objavljenih rezultata (terapija ksenograftova Ewing-ovog sarkoma sa 200-500 mg/kg/d metformina [113] i ezofagealnog skvamoznog karcinoma sa

250 mg/kg/d metformina [58]), možemo pretpostaviti da je dovoljno dug period predtretmana metforminom u našem modelu sarkoma minimizirao uticaj hipoksije koja štiti tumor i pojačao sistemske efekte metformina na domaćina (smanjenje glikoneogeneze i cirkulišućeg insulina). Pretpostavljamo da je u našem eksperimentalnom modelu potreban period lečenja duži od 14 dana i/ili veći broj životinja da bi se postigli statistički značajni antitumorski efekti metformina u drugim eksperimentalnim grupama.

Različiti nivoi metformina koji su pronađeni u tumorima (ćelije kolorektalnog karcinoma) kod miševa sa ksenograftom (9-56 μM) tretiranih peroralno (5 mg/ml u vodi za piće, u toku 16 dana) odgovaraju onima u plazmi. To pokazuje konzistentnu isporuku leka tumorskom tkivu dovoljnu za direktno antitumorsko delovanje [115]. 15-dnevni tretman sa 125 mg/kg/d i.p. metformina, 30 min nakon poslednje injekcije, proizveo je koncentraciju u plazmi miševa od 66-215 μM i koncentraciju u tumorskom ksenograftu od 42-100 μM [115]. Koristili smo isti red veličine oralnih doza kod hrčaka. Treba pomenuti da u istraživanjima molekularnih mehanizama delovanja metformina većina *in vitro* tretmana koristi mnogo veće koncentracije (1000 \times), između 1 i 50 mM [115]. Tako visoke koncentracije se ne mogu bezbedno postići kod ljudi. Maksimalna doza metformina kod pacijenata sa dijabetesom, do 3g/d, ekvivalentna je našim dozama od 500 mg/kg/d koje su date hrčkovima, normalizovano na površinu tela [73]. Antikancersko delovanje naših doza datih hrčkovima i mogućnost postizanja uporedivo visokih netoksičnih nivoa metformina kod ljudi, putem povećanja doze, ukazuju na mogućnost ostvarivanja efikasne netoksične antitumorske terapije metforminom kod ljudi. Dalje kliničke studije će razjasniti da li metformin može da bude uključen kao adjuvantni lek u aktuelne antitumorske, a posebno antisarkomske, terapije.

6.3. Eksperiment III – Antikancersko delovanje kombinacije metformina i kofeina

Metformin smanjuje glikolitički kapacitet, mitohondrijalno disanje i energetska efikasnost u ćelijama limfocitne leukemije *in vitro* [103]. Takođe uzrokuje smanjenje adenozin trifosfata (ATP), akumulaciju adenozin monofosfata (AMP) i fosforilaciju adenozin monofosfatom aktivirane protein kinaze (AMPK) [103]. AMPK je negativni regulator

Warburg efekta. Aktivacija AMPK i smanjenje metabolizma glikoze (inhibicija oksidativne fosforilacije) metforminom (mitohondrijalni otrov) sprečava progresiju tumora. Smanjen unos glikoze (izgladnjivanje) ili inhibicija glikolize pojačava antikancersko delovanje [103].

AMPK smanjuje aktivnost signalnog puta mTOR (mammalian target of rapamycin - rapamicinske mete kod sisara) kompleksa 1 (mTOR C1) i fosforilaciju S6K1 (ribozomalni protein S6 kinaza) koji su važni za sintezu proteina i proliferaciju ćelija karcinoma [55]. mTOR utiče na genezu sarkoma aktiviranjem signalnog puta insulin/IGF-1 receptora (IGF - Insulin-like Growth Factor - insulinu sličan faktor rasta) [55]. Inhibicija signalnih puteva na koje utiču mTOR i mTOR C1 dovodi do direktnog antiangiogenog efekta [55]. Zato su mTOR inhibitori interesantni za testiranje kod sarkoma [55].

Metformin inhibira aktivnost matriksne metaloproteinaze-9 (MMP-9) (nezavisno od AMPK), kao i *in vitro* invaziju i migraciju ćelija humanog fibrosarkoma putem Ca-zavisnih signalnih puteva. Prema tome, metformin ima potencijal da bude antisarkomski lek [102].

Kao antifolat, metformin može da izazove promenu protoka ugljenika putem folatnih monokarbonskih metaboličkih puteva, što sekundarno indukuje ATM (ataksija teleangiektazija mutiranu) kinazu i nishodno indukuje AMPK u ćelijama karcinoma dojke *in vitro* [106]. Metformin deluje na način slično antifolatnom hemoterapijskom agensu, inhibirajući replikaciju DNK i proliferaciju ćelija [106]. Ova aktivnost ne izaziva direktnu inhibiciju enzima ciklusa folne kiseline, na koje ciljano deluje metotreksat, i zato uzrokuje značajno manje neželjenih efekata [106]. Nekoliko studija bavilo se promenama metabolizma vitamina B12 u proučavanju antikancerskog delovanja metformina [106], [108].

Metformin *in vitro* je prouzrokovao transkripcionu regulaciju odgovora neuvijenih proteina u ćelijama karcinoma dojke [110]. Metformin može inhibirati ekspresiju PLC ϵ gena, Notch1/Hes i androgen receptor signalne puteve, kao i proliferaciju, invaziju i apoptozu u ćelijskoj kulturi kancera prostate koja je otporna na kastraciju [111]. Štaviše, dokazano je da metformin utiče na autofagiju, migraciju ćelija (metastatsko stanje), starenje, matične ćelije kancera i ćelijski imunitet u različitim ćelijskim linijama kancera [56, 61].

Odgovarajuća kombinacija može poboljšati efikasnost metformina. Kombinacija sa 2-deoksiglikozom, konkurentskim inhibitorom glikolize (široko korišćena u PET/CT skeniranju), bila je efikasnija *in vitro* od bilo kojeg jedinjenja samostalno datog protiv humanog karcinoma (želuca, jednjaka, dojke, prostate) [104, 105] i kod osam ćelijskih linija sarkoma [53]. Sarkomske ćelije u kulturama bile su 2 do 5 puta osetljivije na kombinaciju nego normalne ćelije. Sinergističko antikancersko delovanje metformina i prirodne antioksidantne kofeinske kiseline pokazalo se kroz regulaciju mitohondrijalnog metabolizma u ćelijama cervikalnog karcinoma [116].

Kao i metformin, kofein može izazvati apoptozu u različitim ćelijskim linijama karcinoma čoveka, kao što su neuroblastom [117], adenokarcinomi pluća [118] i pankreasa [119], ćelije leukemije [120] i mikrocelularni karcinom pluća [121]. Pored toga, kofein povećava toksičnost zračenja i osetljivost ćelija kancera na hemoterapiju [122].

Prisustvo kofeina pojačava delovanje cisplatina na ćelije karcinoma pluća *in vitro* aktivacijom ATM i promenom aktivnosti ATR, dve važne proteinske kinaze uključene u procese zaustavljanja ćelijskog ciklusa i apoptoze izazvane oštećenjem DNK [123].

Na motivaciju za naše istraživanje značajno je uticao nalaz da je kofein povećao antifolatnu aktivnost pemetrekseda u četiri ispitivane ćelijske linije mezotelioma [71, 124]. Povećanje fosforilacije ATM izazvano pemetreksedom i odlaganje progresije ćelijskog ciklusa pomoću kofeina [124] su u skladu sa ranijim izveštajem o superaktivaciji ATM/ATR u ćelijama izloženim kofeinu [125].

Na osnovu napred pomenutih nezavisno dobijenih dokaza *in vitro* o antifolatnoj aktivnosti metformina [106] i kofeina [124] putem indukcije ATM, zaključili smo da je moguće sinergističko antikancersko delovanje ovih lekova. Nema objavljenih podataka o ispitivanjima *in vitro* ili *in vivo* antikancerskog delovanja kombinacije ova dva leka. Pored toga, metabolizam domaćina može biti indirektno antikancerski pripremljen metforminom putem smanjenja glikoneogeneze [104], cirkulišućeg insulina [104] i ukupnih žučnih kiselina u serumu [114]. Pored toga, kofein pomaže antitumorski imuni odgovor stimulacijom adenozin A receptora [126]. Postoji nekoliko kontradiktornih *in vivo* studija o antikancerskom efektu metformina na solidne tumore, uključujući sarkome, kod miševa [58, 59, 104, 112, 113]. S druge strane, kofein može inhibirati UVB-indukovani rak kože kod

miševa [127]. Kofein je takođe smanjio brzinu razvoja 3-metilholantrenom intramuskularno indukovanih fibrosarkoma i inhibirao rast tumora nakon inokulacije ćelija fibrosarkoma miševima [126]. Pored toga, antisarkomski efekat ova dva leka do sada nije istražen kod hrčaka. Zbog toga je cilj našeg istraživanja da odgovori na pitanje da li metformin, kofein i njihova kombinacija mogu suprimirati rast solidnog tumora na eksperimentalnom životinjskom modelu, kao što je fibrosarkom kod hrčka.

Kombinacija 250 mg/kg/d metformina i 500 mg/kg/d 2-deoksiglukoze primenjena intraperitonealno značajno je inhibirala rast subkutanog tumora na modelima ksenografta miševa nakon inokulacije karcinoma (dojke, ezofagogastričnog). Ovo, međutim, nije bio slučaj ni sa jednom komponentom navedene kombinacije kada je data zasebno [104].

Na modelu ksenografta humanog mieloma kod miša, životinje koje su primile intraperitonealni tretman u dozi od 200 mg/kg/d metformina imale su manje tumore i produženo preživljavanje u poređenju sa kontrolnom grupom [59].

Intraperitonealni tretman sa 2-4 mg/kg/d metformina značajno je inhibirao rast limfoma B- i T-ćelija nakon subkutane inokulacije miševima [112].

Metformin primenjen p.o. intragastrično u dozi od 250 mg/kg/d inhibirao je rast tumora i angiogenezu karcinoma ezofagealnih skvamoznih ćelija na ksenograft modelu miša samo kada je terapija počela 7 dana pre implantacije [58]. Brza ćelijska proliferacija i relativno slaba angiogeneza u ovim tumorima uzrokovali su hipoksiju i ishemiju, što je dovelo do nekroze.

Efikasnost 200-500 mg/kg/d metformina datog p.o. ili intraperitonealno nije potvrđena na ksenograftu Ewing-ovog sarkoma kod atimičnih miševa [113]. To je objašnjeno je hipoksijom, čestom pojavom kod solidnih tumora.

Prethodne studije su pokazale da kofein inhibira karcinogenezu na modelima miša [126-128]. Od naročitog značaja za naše istraživanje je nalaz da tretman kofeinom smanjuje rast fibrosarkoma na modelu miša [126]. Ovo je u skladu sa našim rezultatima tretmana fibrosarkoma na hrčkovima kombinacijom kofeina i metformina.

Kofein indukuje apoptozu kulture endotelijalnih ćelija humane umbilikalne vene i sprečava nastanak novih krvnih sudova kod embrionske horioalantinske membrane kokošijeg jajeta *in vivo* [128].

Aktivacija ATM sa ispoljavanjem antifolatne aktivnosti na ćelijskim kulturama i inhibicija angiogeneze zapažene su zasebno u ranijim studijama delovanja metformina [106, 113] i kofeina [124, 128]. Uticaj na ove ciljeve može biti odgovoran za sinergističko antikancersko delovanje navedene kombinacije lekova koje je utvrđeno u našem istraživanju.

Nivoi metformina u ćelijama kolorektalnog karcinoma na ksenograftu miševa (9-215 μM) tretiranih peroralno i intraperitonealno odgovaraju koncentracijama u plazmi [115]. To ukazuje na konzistentnu isporuku leka tumorskom tkivu. Koristili smo isti red veličine doza oralno datih hrčkovima. Maksimalna doza metformina kod pacijenata sa dijabetesom, do 3g/d, ekvivalentna je našoj dozi od 500 mg/kg/d datoj hrčkovima, koja je normalizovana na površinu tela. Antikancerske aktivnosti naših doza metformina i kofeina tokom istovremene aplikacije hrčkovima i mogućnost postizanja uporedivo visokih netoksičnih nivoa metformina kod ljudi, u kombinaciji sa netoksičnim dozama kofeina, ukazuju da je moguće realizovati efikasnu netoksičnu onkološku terapiju sa ovom kombinacijom lekova. Neophodna klinička ispitivanja će pokazati da li kombinacija metformina i kofeina ima potencijal da postane adjuvantni tretman u aktuelnim antikancerskim i posebno antisarkomskim terapijama.

6.4. Eksperiment IV – Antikancersko delovanje itrakonazola i kombinacije metformina i itrakonazola

U našem prethodnom eksperimentu, našli smo antikancerske efekte metformina na fibrosarkom BHK-21/C13 kod mladih hrčaka. Metformin može ispoljiti antikancersko delovanje *in vitro* na osnovu sledećih glavnih antitumorskih mehanizama [73]: inhibicija AMPK/mTOR signalizacije, antiangiogeneza, inhibicija folata i autofagije. Metformin takođe može pokazati antikancerski efekat kroz pripremu domaćina [114], smanjivanje glukoneogeneze i uticaj na cirkulišući insulin, metabolizam lipida i žučne kiseline u serumu.

Pored toga, prepoznati su i drugi mogući mehanizmi delovanja metformina, kao što su transkripciona regulacija određenih gena [110], deficijencija kobalamina [108], inhibicija signalnih puteva Notch1/Hes i androgenih receptora [111] i regulacija tesnih ćelijskih veza preko MLCK-MLC signalnog puta [129].

Kod pacijenata sa dijabetesom, metformin se obično kombinuje sa najčešćim i najsigurnijim antimikotičnim lekom itrakonazolom, pošto su gljivične infekcije česte kod dijabetesa. Ova kombinacija je netoksična kod ljudi. Itrakonazol, kao metformin, poseduje antikancerske osobine.

Antikancerska dejstva itrakonazola *in vitro* na ćelijskim kulturama kancera uključuju sledeće: inhibiciju AMPK/mTOR signalizacije [130], antiangiogenezu [130], antilimfangiogenezu [130], inhibiciju autofagije [130] i folata [131], inhibiciju Hedgehog signalizacije [132, 133], inhibiciju P-glikoproteina (P-gp) koja pokazuje hemosenzitizaciju (obrnuti MDR – Multi Drug Resistance, naročito na citotoksične antitumorne lekove) [130], [134] inhibiciju transportera i pumpe holesterola [130] i inhibiciju Wnt/ β -katenin signalizacije [130]. Treba posebno istaći da je identifikovan sinergizam između antifolata i itrakonazola koji uzrokuje inhibiciju biosinteze ergosterola [131].

Među antikancerskim metama na koje deluju metformin i itrakonazol, mogu se uočiti sledeće zajedničke mete: inhibicija AMPK/mTOR, antiangiogeneza, inhibicija autofagije i folata. Hemosenzitivirajuća svojstva itrakonazola takođe su važna, jer mogu povećati terapijsku efikasnost anticancerskih lekova putem inhibicije P-gp.

Mogućnosti sinergističkih anticancerskih interakcija metformina i itrakonazola i bezbedne multitargeting terapije, što se bazira na prethodnim odvojenim pretkliničkim istraživanjima, predstavljaju glavne razloge za antitumorsko testiranje kombinacije ovih lekova na našem eksperimentalnom modelu fibrosarkoma kod hrčaka.

Naš cilj bio je da pronađemo efikasan antikancerski tretman kombinovanjem netoksičnih lekova koji su već registrovani za druge indikacije. Objavljeni pretklinički i ograničeni klinički podaci upućivali su na upotrebu metformina [73] ili itrakonazola [130] kao perspektivnih potencijalnih netoksičnih antikancerskih sredstava. Nema objavljenih rezultata u vezi antikancerskog delovanja kombinacije ovih lekova. Identifikovani su

višestruki zajednički ili različiti mehanizmi antikancerskog delovanja metformina [73] i itrakonazola [130].

Pored toga, farmakokinetička interakcija između metformina i itrakonazola, zasnovana na kompetitivnoj inhibiciji metabolizma koju jedan drugom izazivaju preko hepatičnog i intestinalnog CYP3A1/2, značajno povećava AUC posle oralne ili i.v. administracije kod pacova, čime se pojačava delovanje oba leka [135]. Takođe, metformin i itrakonazol jedan drugom značajno inhibiraju metabolizam preko CYP3A4 u humanim mikrozomima [135]. Oba leka se metabolišu putem subfamilije CYP3A kod pacova i ljudi [135, 136]. Metformin se kod ljudi uglavnom izlučuje nepromenjen u urinu, sa manje od 20% i.v. doze koja se metaboliše [135]. Nasuprot tome, itrakonazol se eliminiše isključivo putem hepatičkog metabolizma, gde je CYP3A4 uključen kod ljudi, a CYP3A1/2 kod pacova, kako bi se formiralo nekoliko metabolita, uključujući 7-hidroksi-itraconazol, glavni metabolit kod obe vrste [135].

Itrakonazol može inhibirati P-gp [130], smanjujući eliminaciju i povećavajući apsorpciju organskih katjonskih lekova. Metformin postoji kao katjon pri fiziološkom pH [137]. Organski katjonski transporter (OCT1 i OCT3) su aktivni transporter metformina [138]. Stoga, kao moćni inhibitor P-gp i CYP3A4, itrakonazol može povećati koncentracije u plazmi i pojačati efekte P-gp i CYP3A4 supstrata, kao što je metformin.

Kombinacija metformina i itrakonazola u Eksperimentu IV smanjila je težinu, relativnu težinu (odnos težine tumora i težine eksperimentalne životinje), zapreminu, gustinu, dužinu, površinu, odnos površine prema zapremini, broj mitozna, vaskulaturu i prodiranje fibrosarkoma u tkiva. Svi navedeni efekti, kao i povećana nekroza tumora i hemoragija opažena u toku imunohistohemijske i histološke analize može biti uzrokovana citotoksičnošću primenjenog tretmana, koji verovatno utiče na ekspresiju tumorskih ćelija, rast vaskulature i proteine koji regulišu apoptozu [139]. Radiološki (4D CT) određena gustina u ćelijama karcinoma pluća [140] varirala je od 0,236 do 1,010 g/cm³. Tumori veće gustine češće imaju loš ishod i imaju slabije preživljavanje bez bolesti [140]. Prosečne normalne vrednosti gustine tkiva u rasponu od 1,027-1,054 g/cm³ (krv – 1,0428, kosti – 1,7500, masti - 0,9094, mišići – 1,0599) [141] uporedive su sa gustinama tumora u Eksperimentu IV.

Odnos površine prema zapremini za elipsoidne objekte predstavlja funkciju dužine poluosa [142]. Objekti sa tankim šiljkovima imaju veoma veliku površinu u odnosu na datu zapreminu. Što su tela više zaobljena, imaju sve manju površinu. Lopta je telo sa najmanjom površinom (i zato sa najmanjim odnosom površine prema zapremini) za zadatu zapreminu. Za sferu jedinične zapremine, odnos površine prema zapremini je 4,83515. Odnos površine prema zapremini takođe se smanjuje sa povećanjem zapremine, pa zato, za dati oblik, odnos površine prema zapremini inverzno je proporcionalan veličini objekta. Pravilnost površine tumora bila je prediktor preživljavanja kod pacijenata sa malignitetom kojima je izvršena kompletna resekcija [143]. Pacijenti sa glioblastomom nepravilne površine nisu imali veće koristi od totalne u odnosu na korist od delimične resekcije, ali kod pacijenata sa tumorima pravilnog oblika, totalna resekcija se pokazala kao uspešnija [143].

Nivo metformina u ćelijama kolorektalnog karcinoma na ksenograftu kod miševa (9-215 μM), koji je uspešno tretiran peroralno i intraperitonealno, odgovarao je koncentracijama u plazmi [115]. To ukazuje na konzistentnu isporuku leka tumorskom tkivu. U našem eksperimentu korišćen je isti red veličine doza, koje su oralno administrirane hrčkovima. Maksimalna doza metformina kod pacijenata sa dijabetesom, do 3g/d, ekvivalentna je dozi od 500 mg/kg/d koja je u našem eksperimentu data hrčkovima, normalizovano na površinu tela.

Terapija itrakonazolom inhibirala je rast meduloblastoma i karcinoma bazalnih ćelija na modelu alografta miša pri koncentracijama u serumu koje su uporedive sa koncentracijama kod pacijenata na antifungalnoj terapiji [144]. Nivoi itrakonazola koji su postignuti u ovim tumorima bili su slični nivoima leka u serumu, što ukazuje da itrakonazol dobro prodire u tumorska tkiva [144].

Antiangiogeneza izazvana itrakonazolom može se sinergistički primeniti u kombinaciji sa efektima klasičnih toksičnih hemoterapijskih lekova, kao što je paklitaksel, kod epitelijalnih karcinoma jajnika [145] i kod karcinoma pluća.

Antikancersko delovanje doza metformina i itrakonazola u toku simultane aplikacije hrčkovima u našem eksperimentu, i mogućnost postizanja uporedivo visokih netoksičnih nivoa metformina kod ljudi u kombinaciji sa netoksičnim dozama itrakonazola, sugerišu mogućnost ostvarivanja efikasne onkološke terapije i prevencije relapsa kancera ovom

kombinacijom lekova. Neophodna klinička ispitivanja će razjasniti da li kombinacija metformina i itrakonazola ima potencijal da postane adjuvantni tretman ili tretman za prevenciju relapsa u okviru aktuelnih antikancerskih, i posebno antisarkomskih terapija.

6.5. Eksperiment V – Antikancersko delovanje kombinacije metformina sa nitroglicerinom i valorizacija delovanja kombinacije metformina sa kofeinom

Često je antitumorska terapija neefikasna zbog hipoksije tumora, odnosno manjka kiseonika u tumorskom tkivu [16]. „Gušenje” tumora ga čini teško dostupnim za citostatike koji u uslovima hipoksije slabo prodiru u tumor. Svaka intervencija koja poboljšava oksigenaciju tumora može popraviti rezultate radijacione i hemoterapije. Nitroglicerina može biti sredstvo za takve intervencije.

Pored toga što popravlja hipoksiju tumora, nitroglicerina može poboljšati dostavu hemoterapeutika u tumor [16].

Na osnovu prethodno prikazanih uspešnih tretmana vidi se da su svi oni imali lekove sa antifolatnim dejstvom. I u valorizaciji kombinacije metformina i kofeina, koja se i u ovom eksperimentu potvrdila kao efikasna, i metformin i kofein imaju izvesno antifolatno dejstvo. Međutim, i nitroglicerina prema najnovijim podacima [146] deluje antifolatno. Naime, primena nitroglicerina *in vivo* kod miševa sa implantiranim karcinomom pluća, u kombinaciji sa antifolatnim citostatikom pemetreksedom, pokazala je značajnu redukciju tumorskog rasta u odnosu na netretiranu kontrolu (20%, 15-og dana, $p < 0,05$), dok to sa pojedinim komponentama nije bio slučaj. Ista situacija je ranije primećena u nezavisnom radu, gde su kombinovani pemetreksed i kofein [124] kod humanog mezotelioma. Dakle, oba leka (kofein, nitroglicerina) sa antifolatnim svojstvima uz antifolat pemetreksed daju značajan sinergizam.

Pemetreksed je novi antifolat. Nitroglicerina pojačava antikancersko dejstvo pemetrekseda povećavajući ekspresiju redukovano folatnog nosača (carrier) 1 (RFC1) i folilpoliglutamata sintetaze (FPGS), kao i stimulišući signalne puteve cikličnog gvanozin monofosfata (cGMP) u kancerskim ćelijama [146].

6.6. Eksperiment VI – Antikancersko delovanje kombinacija sa deoksiholnom kiselinom

Deoksiholna kiselina se intenzivno ispituje kao površinski aktivna supstanca – surfaktant, pojačivač apsorpcije, nosač pri raspodeli lekova u organizmu i antitumorski agens [147]. Naročito se koristi kao farmaceutski ekscipiens za poboljšanje rastvorljivosti u vodi liposolubilnih lekova, kako bi se poboljšala njihova biološka iskoristljivost i prodiranje u tkiva (permeabilitet) [147]. Iako je sugerisano da može povećati rizik od karcinoma debelog creva, intenzivno se ispituje kao antitumorski lek, pošto je ustanovljeno njeno inhibitorno delovanje na više ćelijskih linija karcinoma [147]. U ovde sprovedenim eksperimentima, ni deoksiholna kiselina, ni njene kombinacije, nisu bile delotvorne.

Značaj eksperimentalnog modela

Eksperimenti na modelima sarkoma su od fundamentalnog značaja u istraživanjima terapije kancera zbog višestrukih patoloških i kliničkih ispoljavanja ovih maligniteta, otpornosti na aktuelne terapije i visoke smrtnosti [148]. Sarkomi su velika grupa raznorodnih mezenhimskih malignih tumora nastalih iz vezivnog i mekog tkiva, kao što su kosti, mišići, hrskavica, masno tkivo, vaskularno tkivo, koža ili hematopoetska tkiva. Sarkomi svake godine pogađaju oko 200.000 ljudi širom sveta i predstavljaju veći procenat ukupnog kancerskog morbiditeta i mortaliteta kod dece i adolescenata, nego kod odraslih [149, 150]. Sarkomi čine više od 20% svih pedijatrijskih solidnih malignih tumora. Osteosarkom je najčešći primarni tumor kostiju i uglavnom pogađa adolescente i mlade odrasle osobe. Rabdomiosarkom je najčešći sarkom mekog tkiva u dečijem uzrastu. Postoji preko 100 različitih histoloških podtipova sarkoma mekog tkiva, koji se mogu razviti na različitim lokacijama [150]. Fibrosarkom, jedan od čestih sarkoma mekog tkiva, čini oko 10% svih vrsta sarkoma, može se javiti u svakom uzrastu, ali kod dece većina tumora se dijagnostikuje u prvoj godini i ima tendenciju da se javi u donjim ekstremitetima, dok lezije glave i vrata čine do 20% slučajeva. Uprkos protokolima lečenja koji kombinuju hemoterapiju, uključujući metotreksat, cisplatin, doksorubicin i ifosfamid, hirurgiju i radioterapiju, petogodišnja stopa

preživljavanja kod pacijenata sa dijagnozom sarkoma ili fibrosarkoma je oko 60%, a kod pacijenata sa metastazama samo oko 30%. Postojeća terapija sarkoma, uključujući fibrosarkome, povezana je sa značajnim neželjenim delovanjima i nije bilo značajnih poboljšanja u prognozi u poslednjoj deceniji [150]. Povećavanje doza hemoterapijskih lekova nije poboljšalo ishod [149, 150]. Zato postoji značajna potreba za poboljšanim netoksičnim terapijama sarkoma i fibrosarkoma [148-150]. Glavni razlog za upotrebu metformina i njegovih kombinacija za antisarkomsku terapiju u našem eksperimentalnom modelu fibrosarkoma na hrčkovima je antifolatni antikancerski efekat, koji je već ustanovljen na malignim ćelijama in vitro za svaki od korišćenih netoksičnih lekova posebno. Pretpostavili smo da veza između ciklusa folne kiseline i lekova korišćenih u ovom istraživanju može izazvati sinergističko antikancersko delovanje slično kao antifolatni citostatik metotreksat, ali bez toksičnosti.

7. ZAKLJUČCI

Eksperiment I

Pokazalo se da netoksične p.o. doze mebendazola, date posle inokulacije BHK21/C13 ćelija kod mladih hrčaka, iako ne smanjuju težinu i zapreminu tumora, inhibiraju proliferaciju ćelija sarkoma bez promene laboratorijskih nalaza krvi hrčaka, pa bi mebendazol mogao biti kandidat za dalja istraživanja novih netoksičnih antiproliferativnih terapija kod dece i odraslih.

Eksperiment II

Budući da netoksične p.o. doze metformina, koje su date dovoljno dug period pre i posle inokulacije BHK21/C13, značajno inhibiraju rast sarkoma kod mladih hrčkova bez promene laboratorijskih nalaza krvi hrčaka, metformin može biti bezbedan novi kandidat za adjuvantnu terapiju sarkoma i prevenciju relapsa kod dece i odraslih. Primena metformina kao leka protiv tumora može postati efikasan i siguran terapijski pristup u novim netoksičnim terapijama sarkoma kod dece i odraslih.

Eksperiment III

Pošto netoksične p.o. doze metformina sa netoksičnim dozama kofeina značajno inhibiraju rast sarkoma kod mladih hrčkova bez promene laboratorijskih nalaza krvi hrčaka, ova sinergistička antikancerska kombinacija može postati sigurna nova adjuvantna terapija i terapija prevencije relapsa humanog sarkoma. Davanje metformina sa kofeinom može postati efikasan i bezbedan pristup novom netoksičnom adjuvantnom tretmanu protiv raka kod dece i odraslih.

Eksperiment IV

Kako netoksične p.o. doze metformina sa netoksičnim dozama itrakonazola značajno inhibiraju rast sarkoma kod mladih hrčkova bez promene laboratorijskih nalaza krvi hrčaka, sinergistička antitumorska kombinacija ovih lekova može biti kandidat za novu efikasnu, sigurnu i netoksičnu antikancersku adjuvantnu terapiju ili terapiju prevencije relapsa maligniteta kod dece i odraslih.

Eksperiment V

Kod malih – polno nezrelih (40 g) i većih jedinki hrčaka (telesne mase oko 100 g) pokazalo se da statistički značajno antikancersko dejstvo ima tretman kombinacijom netoksičnih doza metformina sa nitroglicerinom bez promene laboratorijskih nalaza krvi hrčaka, pa i ova kombinacija može biti kandidat za dalja klinička ispitivanja lečenja malignih tumora.

Kod polno nezrelih, kao i kod polno zrelih jedinki u Eksperimentu III, kombinacija metformina sa kofeinom ima značajno antitumorsko dejstvo bez promene laboratorijskih nalaza i toksičnosti.

Eksperiment VI

Tokom svih eksperimenata realizovanih u okviru ove disertacije, pokazalo se da nije bilo delotvornog tretmana, koji ne sadrži metformin.

Opšti zaključci na osnovu svih realizovanih eksperimenata

Delotvorni tretmani, po svim ispitivanim parametrima tumora, bili su metforminom (uz 7 dana predtretman) i kombinacijama metformina sa kofeinom (i kod polno nezrelih i kod većih zrelih jedinki), metformina sa itrakonazolom i metformina sa nitroglicerinom (kako kod polno nezrelih, malih oko 40 g, tako i kod većih životinja od oko 100 g).

U odnosu na sve ispitivane parametre tumora, nisu bili efikasni tretmani: mebendazolom (izuzev histološkog poboljšanja), metforminom bez predtretmana, kofeinom, itrakonazolom, diklofenakom, deoksiholnom kiselinom, metforminom sa deoksiholnom kiselinom, itrakonazolom sa deoksiholnom kiselinom, nitroglicerinom, itrakonazolom sa nitroglicerinom, diklofenakom sa deoksiholnom kiselinom i diklofenakom sa nitroglicerinom.

Kod ispitivanih eksperimentalnih životinja nisu ustanovljene promene laboratorijskih vrednosti krvi, niti su ustanovljene toksikološke, patoanatomske i patohistološke promene, što govori o netoksičnosti i bezbednosti svih tretmana.

Svi efikasni tretmani sadrže jedan ili dva leka koji imaju antifolatno dejstvo slično metotreksatu (metformin, kofein, itrakonazol, nitroglicerin).

Jedino je kao monoterapija tretman metforminom, ako se daje sa predtretmanom 7 dana, bio efikasan, po svim ispitivanim parametrima tumora.

Rezultati ovog rada treba da doprinesu efikasnoj i kraćoj antitumorskoj terapiji, uz smanjenje neželjenih dejstava i cene lečenja, naročito sarkoma, najčešćih kod dece, i to posebno adjuvantnoj (uz hirušku i radioterapiju), kao i za prevenciju relapsa bolesti i metastaza.

ZAHVALNICA

Izrada ove disertacije finansirana je u okviru projekta Pokrajinskog sekretarijata za visoko obrazovanje i naučnoistraživačku delatnost, broj 142-451-2413/2018.

Hvala Katedri i Zavodu za histologiju i embriologiju, kao i farmaciju Medicinskog fakulteta, Pasterovom zavodu i Naučnom institutu za veterinarstvo u Novom Sadu, čiji su prostori, oprema, analize i pomoć korišćeni.

8. LITERATURA

- [1] Bertolini F, Sukhatme VP, Bouche G. Drug repurposing in oncology- patient and health systems opportunities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(12):732-42.
- [2] Strittmater SM. Overcoming drug development bottlenecks with repurposing: old drugs learn new tricks. *Nat Med*. 2014;20(6):590-1.
- [3] Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ, Aggarwal BB. Cancer drug discovery by repurposing teaching new tricks old dogs. *Trends Pharmacol Sci*. 2013;34:508-17.
- [4] Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP. The repurposing drugs in oncology (ReDO) project. *Eancermedalscience*. 2014;8:443. [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4096024/>
- [5] Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP: Repurposing drugs in oncology (ReDO) – mebendazole as an anti cancer agent. *Eancermedalscience*. 2014;8:443.
- [6] Langley RE. Clinical evidence for the use of aspirin in the treatment of cancer. *Eancermedalscience*. 2013;7:297. [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622409/>
- [7] Morales DR, Morris AD. Metformin in Cancer Treatment and Prevention. *Annu Rev Med*. 2015;66:17-29.
- [8] Azvolinsky A. Repurposing to Fight Cancer: The Metformin–Prostate Cancer Connection. *JNCI (J Natl Cancer Inst)*. 2014;106(2):dju030.
- [9] Dowling RJO, Goodwin PJ, Stambolic V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. *BMC Medicine*. 2011;9:33-9.
- [10] Osmak M. Statins and cancer: Current and future prospects. *Cancer Lett*. 2012;324(1):1–12.
- [11] Peiris-Pagès M, Sotgia F, Lisanti MP. Doxycycline and therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer cells: old drug, new purpose. *Oncoscience*. 2015;2(8):696–9.

- [12] Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – cimetidine as an anti cancer agent. *Ecancermedalscience*. 2014;8:485. [cited 2017 May 17]. Available from: <http://ecancer.org/journal/8/pdf/485-repurposing-drugs-in-oncology-redo-cimetidine-as-an-anti-cancer-agent.php>
- [13] Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – itraconazole as an anti cancer agent. *Ecancermedalscience*. 2015;9:521. [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC25932045/>
- [14] Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Perindopril: possible use in cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs*. 2002;13(3):221-8.
- [15] Yasumatsu R, Nakashima T, Masuda M, Ito A, Kuratomi Y, Nakagawa T, et al. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(10):567-73.
- [16] Sukhatme V, Bouche G, Meheus L, Sukhatme VP, Pantziarka P. Repurposing drugs in oncology (ReDO) – nitroglycerin as an anti cancer agent. *Ecancermedalscience*. 2015;9:568. [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26435741/>
- [17] Hofer M, Hoferová Z, Fedoročko P, Macková NO. Hematopoiesis-stimulating and anti-tumor effects of repeated administration of diclofenac in mice with transplanted fibrosarcoma cells. *Physiol Res*. 2002;51:629-32.
- [18] Pantziarka P, Sukhatme V, Bouche G, Melhuis L, Sukhatme VP. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancer*. 2016;10:610. / DOI: 10.3332/ecancer.2016.610
- [19] Doudican N, Rodriguez A, Osman I, Orlow SJ. Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res*. 2008;6(8):1308-15.
- [20] Doudican NA, Byron SA, Pollock PM, Orlow SJ. XIAP downregulation accompanies mebendazole growth inhibition in melanoma xenografts. *Anticancer Drugs*. 2013;24(2):181-8.

- [21] Sasaki J, Ramesh R, Chada S, Gomyo Y, Roth JA, Mukhopadhyay T. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(13):1201–9.
- [22] Martarelli D, Pompei P, Baldi C, Mazzoni G. Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61(5):809-17.
- [23] Dobrosotskaya IY, Hammer GD, Schteingart DE, Maturen KE, Worden FP. Mebendazole monotherapy and long-term disease control in metastatic adrenocortical carcinoma. *Endocr Pract.* 2011;17(3):e59-62.
- [24] Mukhopadhyay T, Sasaki J, Ramesh R, Roth JA. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res.* 2002;8(9):2963–9.
- [25] Nygren P, Fryknäs M, Agerup B, Larsson R. Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(12):2133-40.
- [26] Nygren P, Larsson R. Drug repositioning from bench to bedside: tumour remission by the antihelmintic drug mebendazole in refractory metastatic colon cancer. *Acta Oncol.* 2014;53(3):427-8.
- [27] Coyne CP, Jones T, Bear R. Gemcitabine-(C4-amide)-[anti-HER2/neu] Anti-Neoplastic Cytotoxicity in Dual Combination with Mebendazole against Chemotherapeutic-Resistant Mammary Adenocarcinoma. *J Clin Exp Oncol.* 2013;2(2):pii:1000109.
- [28] Steg AD, Katre AA, Bevis KS, Ziebarth A, Dobbin ZC, Shah MM, et al. Smoothened antagonists reverse taxane resistance in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(7):1587-97.
- [29] Pourgholami MH, Woon L, Almajd R, Akhter J, Bowery P, Morris DL. *In vitro* and *in vivo* suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Lett.* 2001;165(1):43–9.
- [30] Spagnuolo PA, Hu J, Hurren R, Wang X, Gronda M, Sukhai MA, et al. The anthelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood.* 2010;115(23):4824-33.

- [31] Shukla N, Kobos R, Renaud T, Steinherz LJ, Steinherz PG. Phase II trial of clofarabine with topotecan, vinorelbine, and thiotepa in pediatric patients with relapsed or refractory acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(3):431-5.
- [32] Bai RY, Staedtke V, Aprhys CM, Gallia GL, Riggins GJ. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol*. 2011;13(9):974-82.
- [33] Bai RY, Staedtke V, Rudin CM, Bunz F, Riggins GJ. Effective treatment of diverse medulloblastoma models with mebendazole and its impact on tumor angiogenesis. *Neuro Oncol*. 2015;17(4):545-54.
- [34] Bai RY, Staedtke V, Wanjiku T, Rudek MA, Joshi A, Gallia GL, et al. Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polymorphs in a Mouse Brain Tumor Model. *Clin Cancer Res*. 2015;21(15):3462-70.
- [35] Gull K, Dawson PJ, Davis C, Byard EH. Microtubules as target organelles for benzimidazole anthelmintic chemotherapy. *Biochem Soc Trans*. 1987;15(1):59-60.
- [36] Sorger PK, Dobles M, Tournebise R, Hyman AA. Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(6):807-14.
- [37] Lacey E, Watson TR. Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, *in vitro*. *Biochem Pharmacol*. 1985;34(7):1073-7.
- [38] Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(1):123-30.
- [39] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(4):253-65.
- [40] Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(12):1099-109.
- [41] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
- [42] Pawlowski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS*. 2000;97(2):529-31.

- [43] Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J Biol Chem.* 1999;274(4):2225-33.
- [44] Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, et al. Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20559-65.
- [45] Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis. *Science.* 2003;301(5632):513-7.
- [46] Rippmann JF, Hobbie S, Daiber C, Guilliard B, Bauer M, Birk J, et al. Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth Differ.* 2000;11(7):409-16.
- [47] Benard G, Neutzner A, Peng G, Wang C, Livak F, Youle RJ, et al. IBRDC2, an IBR-type E3 ubiquitin ligase, is a regulatory factor for Bax and apoptosis activation. *EMBO J.* 2010;29(8):1458-71.
- [48] Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol.* 1999;17(3):1061-70.
- [49] Hari M, Loganzo F, Annable T, Tan X, Musto S, Morilla DB, et al. Paclitaxel-resistant cells have a mutation in the paclitaxel-binding region of beta-tubulin (Asp26Glu) and less stable microtubules. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(2):270-8.
- [50] Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(3):194-204.
- [51] Li Y, McClay EF. Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol.* 2002;29(5):413-26.
- [52] Lu Y, Chen J, Xiao M, Li W, Miller DD. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm Res.* 2012;29(11):2943-71.
- [53] Issaq SH, Teicher BA, Monks A. Bioenergetic properties of human sarcoma cells help define sensitivity to metabolic inhibitors. *Cell Cycle.* 2014;13(7):1152-61. doi: 10.4161/cc.28010.

- [54] Chen X, Hu C, Zhang W, Shen Y, Wang J, Hu F, et al. Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells *in vitro*. *Tumour Biol.* 2015;36(12):9873-83. doi: 10.1007/s13277-015-3751-1.
- [55] Quesada J, Amato R. The Molecular Biology of Soft-Tissue Sarcomas and Current Trends in Therapy. *Sarcoma.* 2012; Article ID 849456. doi:10.1155/2012/849456
- [56] Sui X, Xu Y, Wang X, Han W, Pan H, Xiao M. Metformin: A Novel but Controversial Drug in Cancer Prevention and Treatment. *Mol Pharm.* 2015;12(11):3783-91. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00577.
- [57] Duo J, Ma Y, Wang G, Han X, Zhang C. Metformin synergistically enhances antitumor activity of histone deacetylase inhibitor trichostatin a against osteosarcoma cell line. *DNA Cell Biol.* 2013;32(4):156-64. doi: 10.1089/dna.2012.1926.
- [58] Cai X, Hu X, Tan X, Cheng W, Wang Q, Chen X, et al. Metformin Induced AMPK Activation, G0/G1 Phase Cell Cycle Arrest and the Inhibition of Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinomas *In vitro* and *In vivo*. *PLOS One.* 2015;10:e0133349. DOI: 10.1371/journal.pone.0133349
- [59] Zi FM, He JS, Li Y, Wu C, Yang L, Yang Y, et al. Metformin displays anti-myeloma activity and synergistic effect with dexamethasone in *in vitro* and *in vivo* xenograft models. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt B):443-53. doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.050.
- [60] Rosilio C, Ben-Sahra I, Bost F, Peyron JF. Metformin: a metabolic disruptor and anti-diabetic drug to target human leukemia. *Cancer Lett.* 2014;346(2):188-96. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.006.
- [61] Dirat B, Ader I, Golzio M, Massa F, Mettouchi A, Laurent K, et al. Inhibition of the GTPase Rac1 mediates the antimigratory effects of metformin in prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(2):586-96. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0102.
- [62] Hendifar AE, Van Tine B, Chawla N, Yafee P, Chawla SP. A novel approach to soft tissue sarcoma therapy: targeting tumor hypoxia. *Annals of Cancer Research.* 2015;2:5. Available at: <http://www.vipoa.org/cancer/2/5>.
- [63] Knowles HJ, Schaefer KL, Dirksen U, Athanasou NA. Hypoxia and hypoglycaemia in Ewing's sarcoma and osteosarcoma: regulation and phenotypic effects of Hypoxia-Inducible Factor. *BMC Cancer.* 2010;10:372. doi: 10.1186/1471-2407-10-372.

- [64] Yauch RL, Dijkgraaf GJP, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, et al. Smoothened Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor in Medulloblastoma. *Science*. 2009;326(5952):572-4.
- [65] Larsen AR, Bai RY, Chung JH, Borodovsky A, Rudin CM, Riggins GJ, et al. Repurposing the antihelminthic mebendazole as a hedgehog inhibitor. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(1):3-13.
- [66] Dvorožnáková E, Porubcová J, Snábel V, Fedorocko P. Immunomodulative effect of liposomized muramyltripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE) on mice with alveolar echinococcosis and treated with albendazole. *Parasitol Res*. 2008;103(4):919-29.
- [67] Roselli M, Cereda V, di Bari MG, Formica V, Spila A, Jochems C, et al. Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells. *Oncoimmunology*. 2013;2(10):e27025-1-12.
- [68] Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med*. 2009;7:58.
- [69] Sevko A, Michels T, Vrohling M, Umansky L, Beckhove P, Kato M, et al. Anti-tumor Effect of Paclitaxel is Mediated by Inhibition of MDSCs and Chronic Inflammation in the Spontaneous Melanoma Model *J Immunol*. 2013;190(5):2464–71.
- [70] Sevko A, Kremer V, Falk CS, Umansky L, Shurin MR, Shurin G. Application of paclitaxel in low non-cytotoxic doses supports vaccination with melanoma antigens in normal mice. *Journal of Immunotoxicology*. 2012;9(3):275-81.
- [71] Popović DJ, Lalošević D, Miljković D, Popović KJ, Čapo I, Popović JK. Caffeine induces metformin anticancer effect on fibrosarcoma in hamsters. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:2461-7.
- [72] Popović DJ, Lalošević D, Popović KJ, Čapo I, Popović JK, Miljković D. Effect of mebendazole on fibrosarcoma in hamsters. *Trop J Pharm Res*. 2017;16(10):2445-51.
- [73] Popović DJ, Lalošević D, Miljković D, Popović KJ, Čapo I, Popović JK. Effect of metformin on fibrosarcoma in hamsters. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(23):5499-505.

- [74] Popović DJ, Poša M, Popović KJ, Kolarović J, Popović JK, Banović PZ: Application of a widely-used tropical anti-worm agent mebendazole in modern oncology, *Trop J Pharm Res.* 2017;16(10):2555-62.
- [75] Williams RF, Fernandez-Pineda I, Gosain A. Pediatric Sarcomas. *Surgical Clinics of North America* 2016;96(5):1107-25.
- [76] Anderson JL, Denny CT, Tap WD, Federman N. Pediatric sarcomas: translating molecular pathogenesis of disease to novel therapeutic possibilities. *Pediatr Res.* 2012;72(2):112-21.
- [77] Burningham Z, Hashibe M, Spector L, Schiffman JD. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res.* 2012;2(1):14. doi: 10.1186/2045-3329-2-14.
- [78] Shmookler BM, Enzinger FM, Weiss SW. Giant cell fibroblastoma. A juvenile form of dermatofibrosarcoma protuberans. *Cancer.* 1989;64(10):2154-61.
- [79] Calvert GT, Randall RL, Jones KB, Cannon-Albright L, Lessnick S, Schiffman JD. At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond. *Sarcoma.* 2012;2012:152382. 9 pages, doi: 10.1155/2012/152382.
- [80] University College, London. Will Glucarpidase After Methotrexate Treatment for Bone Sarcoma Lead to Fewer Side Effects and Reduce Chemotherapy Delays? *ClinicalTrials.gov.* 2015; *ClinicalTrials.gov Identifier:* NCT02022358. [cited 2018 May 18]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02022358>.
- [81] Saeter G, Alvegård TA, Elomaa I, Wiebe T, Björk O, Strander H, et al. Chemotherapy for osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1997;273:120-5.
- [82] Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije (ALIMS). Sažetak karakteristika leka Methotrexate Pfizer, 50 mg/2 mL, rastvor za injekciju, Methotrexate Pfizer, 500 mg/20 mL, rastvor za injekciju. ALIMS. 2017; [cited 2018 May 20]. Available from: <https://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-00815-16-001.pdf>
- [83] Stoker M, Macpherson I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. *Nature.* 1964;203:1355-7.
- [84] Lalosević D, Stankov S, Lazarević-Ivanc L, Lalosević V, Knezević I. Immunogenicity of BHK-rabies vaccine in human volunteers. *Med Pregl.* 1998;51(1):17-9.

- [85] Shipman C, Vander Weide GC, Ma BI. Prevalence of type R virus-like particles in clones of BHK-21 cells. *Virology*. 1969;38:707-10.
- [86] Walker TA, Wilson BA, Lewis AM, Cook JL. E1A oncogene induction of cytolytic susceptibility eliminates sarcoma cell tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(15):6491-5.
- [87] Mayo J, Lombardo J.L, Klein-Szanto AJP, Conti C J, Moreira JL. An Oncogenic Virus Carried by Hamster Kidney Cells. *Cancer Res*. 1973;33:2273-7.
- [88] Johnson TS, Scholfield CI, Parry J, Griffin M. Induction of tissue transglutaminase by dexamethasone: its correlation to receptor number and transglutaminase-mediated cell death in a series of malignant hamster fibrosarcomas. *Biochem J*. 1998;331(Pt 1):105-12.
- [89] Sousa ATO de, Vasconcelos JMB, Soares MJGO. Software Image Tool 3.0 as an Instrument for Measuring Wounds. *English/Portuguese J Nurs UFPE on line*, 2012;6(10):2569-73.
- [90] Karaman M, Firinci F, Kiray M, Tuncel T, Bagriyanik A, Yilmaz O, et al. Beneficial effects of erythropoietin on airway histology in a murine model of chronic asthma. *Allergol Immunopathol*. 2012;40(02):75-80. doi: 10.1016/j.aller.2011.02.010
- [91] Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP. The repurposing drugs in oncology (ReDO) project. *Ecancermedicalscience*. 2014;8:442 [cited 2017 May 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4096030/>
- [92] Amery K. Levamisole as an immunotherapeutic agent in the treatment of cancer. *World J Surg*. 1977;1:597-602. doi:10.1007/BF01556185.
- [93] Janik J, Kopp WC, Smith JW 2nd, Longo DL, Alvord WG, Sharfman WH, et al. Dose-related immunologic effects of levamisole in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 1993;11(1):125-35.
- [94] Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop*. 2003;86(2-3):141-59.
- [95] Pawluk SA, Roels CA, Wilby KJ, Ensom MH. A review of pharmacokinetic drug-drug interactions with the anthelmintic medications albendazole and mebendazole. *Clin Pharmacokinet*. 2015;54(4):371-83.

- [96] Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2002;12(3):193-213.
- [97] Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4738-45.
- [98] Bogusławska J, Małecki M. siRNA preparations in gene therapy of melanoma. *Med Wieku Rozwoj.* 2013;17(3):196-201.
- [99] Meng S. The anticancer effect of metformin, the most commonly used anti-diabetes drug. *J Endocrinol Diabetes Obes.* 2014;2:1030-5.
- [100] Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* 2011;71:4366-72.
- [101] Kasznicki J, Sliwinska A, Drzewoski J. Metformin in cancer prevention therapy. *Ann Transl Med.* 2014;2:57-67.
- [102] Hwang YP, Jeong HG. Metformin blocks migration and invasion of tumour cells by inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation through a calcium and protein kinase $\text{C}\alpha$ -dependent pathway: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced/extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1. *Br J Pharmacol.* 2010;160:1195–211.
- [103] Bruno S, Ledda B, Tenca C, Ravera S, Orengo AM, Mazzarello AN, et al. Metformin inhibits cell cycle progression of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget.* 2015;6:22624–40.
- [104] Cheong JH, Park ES, Liang J, Dennison JB, Tsavachidou D, Nguyen-Charles C, et al. Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther.* 2011;10:2350-62.
- [105] Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, et al. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010;70:2465-75.

- [106] Corominas-Faja B, Quirantes-Piné R, Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Martin-Castillo B, et al. Metabolomic fingerprint reveals that metformin impairs one-carbon metabolism in a manner similar to the antifolate class of chemotherapy drugs. *Aging*. 2012;4:480–98.
- [107] Hatoum D, McGowan EM. Recent advances in the use of metformin: can treating diabetes prevent breast cancer? *Biomed Res Int*. 2015;2015:548436.
- [108] Purchiaroni F, Galli G, Annibale B. Metformin plus proton pump inhibitors therapy: the cobalamin deficiency challenge. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:2501-2.
- [109] Hart T, Dider S, Han W, Xu H, Zhao Z, Xie L. Toward repurposing metformin as a precision anti-cancer therapy using structural systems pharmacology. *Sci Rep*. 2016;6:20441.
- [110] Salis O, Bedir A, Ozdemir T, Okuyucu A, Alacam H. The relationship between anticancer effect of metformin and the transcriptional regulation of certain genes (CHOP, CAV-1, HO-1, SGK-1 and Par-4) on MCF-7 cell line. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18:1602-9.
- [111] Yang Y, Wu XH. Study on the influence of metformin on castration-resistant prostate cancer PC-3 cell line biological behavior by its inhibition on PLC ϵ gene-mediated Notch1/Hes and androgen receptor signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:1918-23.
- [112] Shi WY, Xiao D, Wang L, Dong LH, Yan ZX, Shen ZX, et al. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2012;3:e275.
- [113] Garofalo C, Capristo M, Manara MC, Mancarella C, Landuzzi L, Belfiore A, et al. Metformin as an adjuvant drug against pediatric sarcomas: hypoxia limits therapeutic effects of the drug. *PLoS ONE*. 2013;8:e83832.
- [114] Meng XM, Ma XX, Tian YL, Jiang Q, Wang LL, Shi R, et al. Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:2232-7.

- [115] Dowling RJO, Lam S, Bassi C, Mouaaz S, Aman A, Kiyota T, et al. Metformin pharmacokinetics in mouse tumors: implications for human therapy. *Cell Metab.* 2016;23:567–8.
- [116] Tyszka-Czochara M, Bukowska-Strakova K, Majka M. Metformin and caffeic acid regulate metabolic reprogramming in human cervical carcinoma SiHa/HTB-35 cells and augment anticancer activity of Cisplatin via cell cycle regulation. *Food Chem Toxicol.* 2017;106:260-72.
- [117] Jang MH, Shin MC, Kang IS, Baik HH, Cho YH, Chu JP, et al. Caffeine induces apoptosis in human neuroblastoma cell line SK-N-MC. *J Korean Med Sci.* 2002;17:674-8.
- [118] Qi W, Qiao D, Martinez JD. Caffeine induces TP53-independent G(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner. *Radiat Res.* 2002;157:166-74.
- [119] Gururajanna B, Al-Katib AA, Li YW, Aranha O, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular effects of taxol and caffeine on pancreatic cancer cells. *Int J Mol Med.* 1999;4:501-7.
- [120] Dai Y, Yu C, Singh V, Tang L, Wang Z, McInistry R, et al. Pharmacological inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase/MAPK cascade interact synergistically with UCN-01 to induce mitochondrial dysfunction and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res.* 2001;61:5106-15.
- [121] Hałas M, Izdebska M, Klimaszewska-Wiśniewska A, Gagat M, Radciniewska D, Glińska A, et al. Caffeine induces cytoskeletal changes and cell death in H1299 cells. *Cent Eur J Biol.* 2014;9:727–38.
- [122] Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, et al. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy.* 2011;7:176-87.
- [123] Wang G, Bhoopalan V, Wang D, Wang L, Xu X. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. *Exp Hematol Oncol.* 2015;4:5.
- [124] Min SH, Goldman ID, Zhao R. Caffeine markedly sensitizes human mesothelioma cell lines to pemetrexed. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;61:819-27.

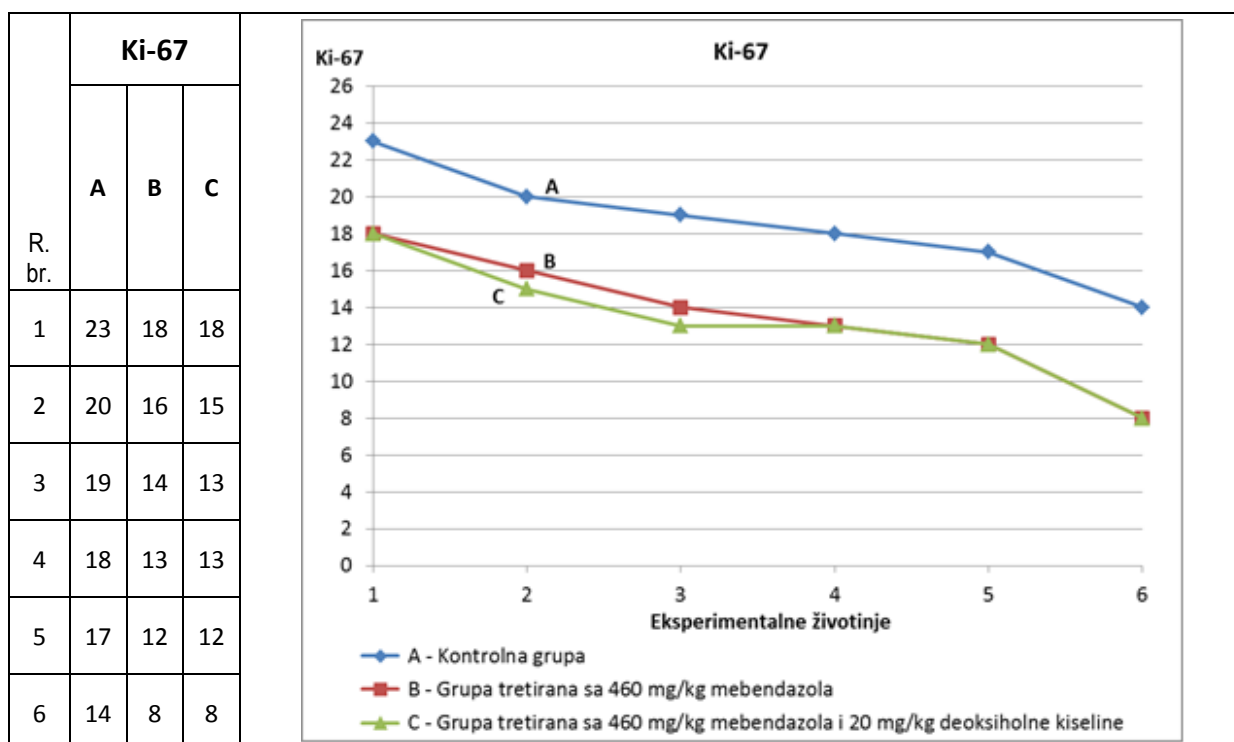
- [125] Cortez D. Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:37139-45.
- [126] Eini H, Frishman V, Yulzari R, Kachko L, Lewis EC, Chaimovitz C, et al. Caffeine promotes anti-tumor immune response during tumor initiation: Involvement of the adenosine A2A receptor. *Biochem Pharmacol.* 2015;98:110-8.
- [127] Lou YR, Lu YP, Xie JG, Huang MT, Conney AH. Effects of oral administration of tea, decaffeinated tea, and caffeine on the formation and growth of tumors in high-risk SKH-1 mice previously treated with ultraviolet B light. *Nutr Cancer.* 1999;33:146-53.
- [128] Li H, Jin SY, Son HJ, Seo JH, Jeong GB. Caffeine-induced endothelial cell death and the inhibition of angiogenesis. *Anat Cell Biol.* 2013;46:57-67.
- [129] Zhou HY, Zhu H, Yao XM, Qian JP, Yang J, Pan XD, et al. Metformin regulates tight junction of intestinal epithelial cells via MLCK-MLC signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(22):5239-46.
- [130] Tsubamoto H, Ueda T, Inoue K, Sakata K, Shibahara H, Sonoda T. Repurposing itraconazole as an anticancer agent. *Oncol Lett.* 2017;14(2):1240–6.
- [131] Navarro-Martínez MD, Cabezas-Herrera J, Rodríguez-López JN. Antifolates as antimycotics? Connection between the folic acid cycle and the ergosterol biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28(6):560-7.
- [132] Pace JR, DeBerardinis AM, Sail V, Tacheva-Grigorova SK, Chan KA, Tran R, et al. Repurposing the Clinically Efficacious Anti-Fungal Agent Itraconazole as an Anti-Cancer Chemotherapeutic. *J Med Chem.* 2016;59(8):3635–49.
- [133] Hu Q, Hou YC, Huang J, Fang JY, Xiong H. Itraconazole induces apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting Hedgehog signaling in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:50.
- [134] Campbell BC, Chan KL, Kim JH. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. *Front Microbiol.* 2012;3:79.
- [135] Choi YH, Lee U, Lee BK, Lee MG. Pharmacokinetic interaction between itraconazole and metformin in rats: competitive inhibition of metabolism of each drug by each other via hepatic and intestinal CYP3A1/2. *Br J Pharmacol.* 2010;161(4):815-29.

- [136] Bondarenko LB, Shayakhmetova GM, Voronina AK, Kovalenko VM. Effects of Metformin on Cytochromes CYP3A, CYP2C and CYP2E1 Functioning at Metabolic Syndrome in Rats of Different Age. *Curr Res Diabetes Obes J.* 2017;4(4):555645. doi: 10.19080/CRDOJ.2017.04.555645.
- [137] Horn JR, Hansten PD. Metformin and Organic Cation Transporter Interactions. *Pharmacy Times.* 2017;4:29. Available at: <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2017/april2017/metformin-and-organic-cation-transporter-interactions>
- [138] Wagner DJ, Hu T, Wang J. Polyspecific organic cation transporters and their impact on drug intracellular levels and pharmacodynamics. *Pharmacol Res.* 2016;111:237-46. DOI:10.1016/j.phrs.2016.06.002.
- [139] Singh V, Singh SM: Effect of high cell density on the growth properties of tumor cells: a role in tumor cytotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Anticancer Drugs* 2007; 18:1123-32.
- [140] Jason CY, Jenghwa C, ZhiQiu L, Wernicke AG, Dattatreyyudu N, Bhupesh: Tumor Density, Size, and Histology in the Outcome of Stereotactic Body Radiation Therapy for Early-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer: A Single-Institution Experience. *Proceedings of the 97th Annual Meeting of the American Radium Society 2015. Oncology.* 2015;29:P097.
- [141] Barber TW, Brockway JA, Higgins LS: The density of tissues in and about the head. *Acta Neurol Scand.* 1970;46:85-92.
- [142] Rivin I. Surface area and other measures of ellipsoids. *Adv Appl Math.* 2007;39(4):409-27.
- [143] Pérez-Beteta J, Molina-García D, Ortiz-Alhambra JA, Fernández-Romero A, Luque B, Arregui E, et al. Tumor Surface Regularity at MR Imaging Predicts Survival and Response to Surgery in Patients with Glioblastoma. *Radiology.* 2018;3:171051. doi: 10.1148/radiol.201171051. [Epub ahead of print]
- [144] Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell.* 2010;17(4):388-99.
- [145] Choi CH, Ryu JY, Cho YJ, Jeon HK, Choi JJ, Ylaya K, et al. The anti-cancer effects of itraconazole in epithelial ovarian cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):6552.

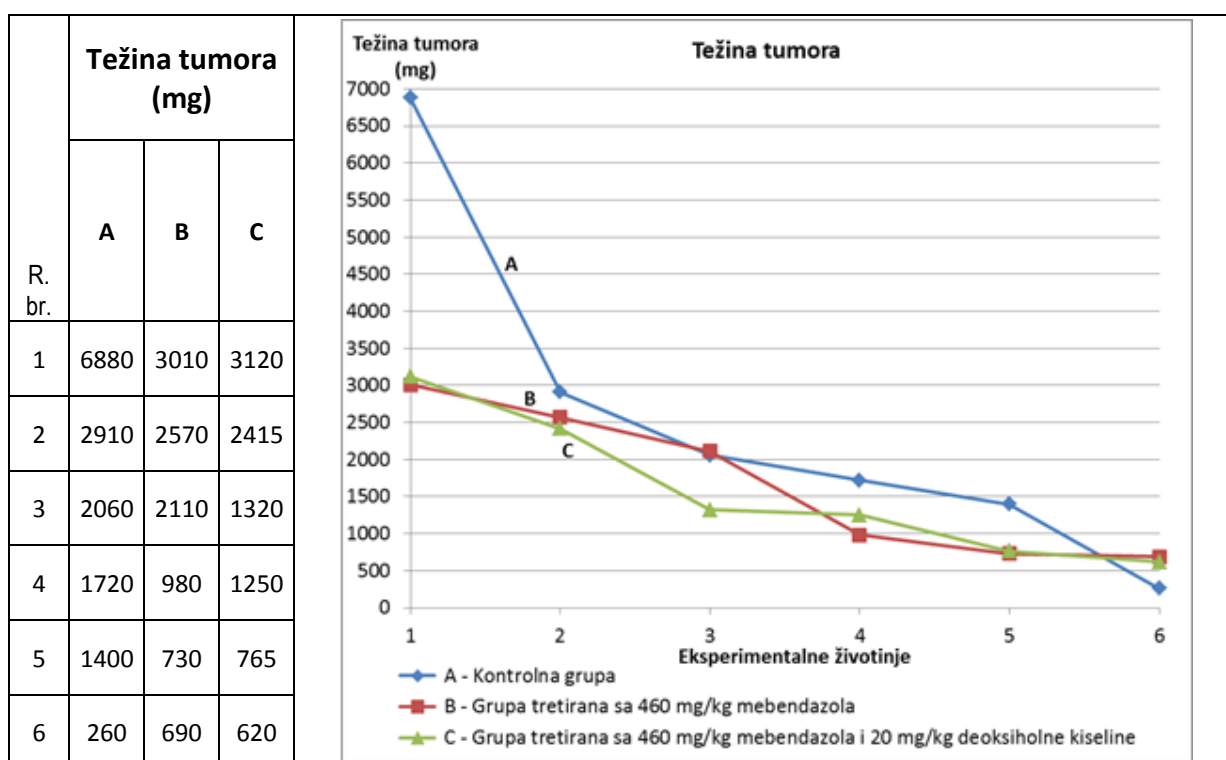
- [146] Nagai H, Yasuda H, Hatachi Y, Xue D, Sasaki T, Yamaya M, et al. Nitric oxide (NO) enhances pemetrexed cytotoxicity via NO-cGMP signaling in lung adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol*. 2012;41(1):24-30. doi: 10.3892/ijo.2012.1461.
- [147] Hwang SR, Kim IJ, Park JW. Formulations of deoxycholic for therapy: a patent review (2011 - 2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015;25(12):1423-40.
- [148] Quesada J, Amato R. The Molecular Biology of Soft-Tissue Sarcomas and Current Trends in Therapy. 2012;2012:849456. doi: 10.1155/2012/849456.
- [149] Issaq SH, Teicher BA, Monks A. Bioenergetic properties of human sarcoma cells help define sensitivity to metabolic inhibitors. *Cell Cycle*. 2014;13: 1152-61. doi:10.4161/cc.28010.
- [150] Hoang NT, Acevedo LA, Mann MJ, Tolani B. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag Res*. 2018;10:1089-114. doi: 10.2147/CMAR.S159641. eCollection 2018.

9. PRILOG

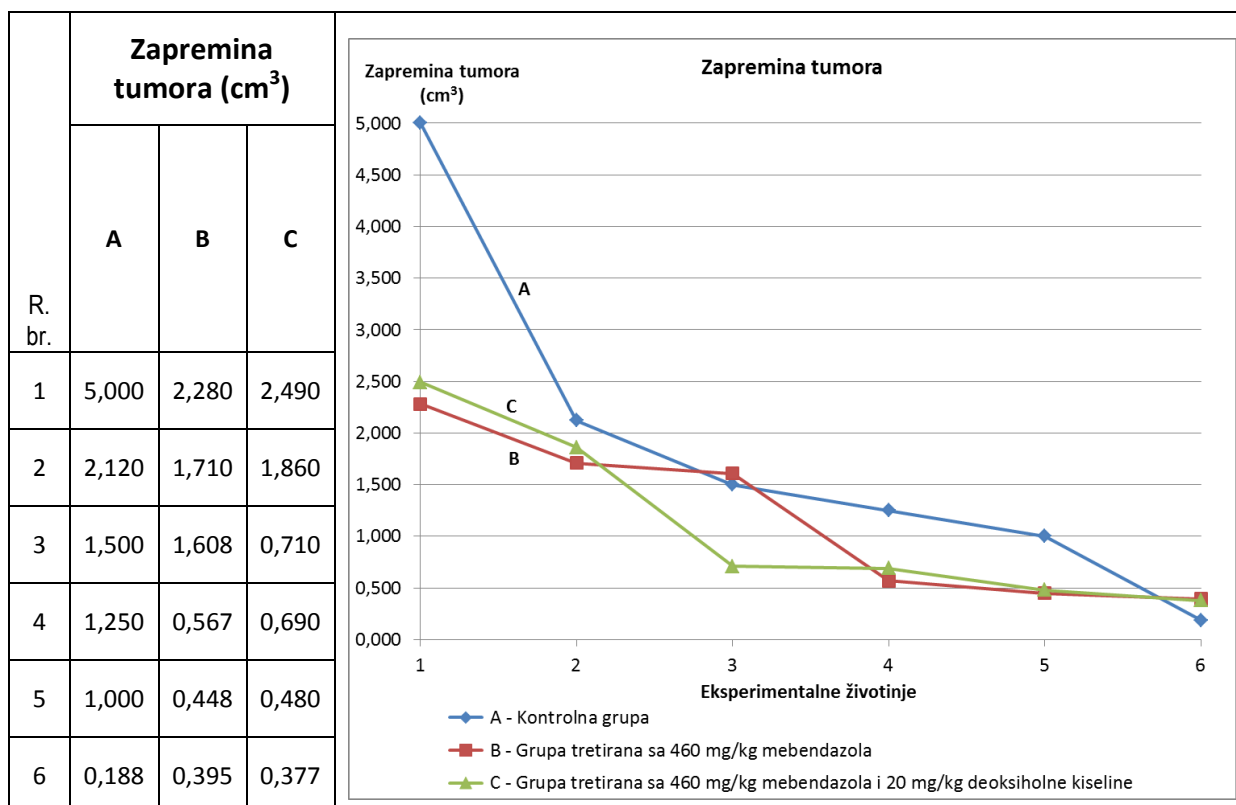
Antikancersko delovanje mebendazola



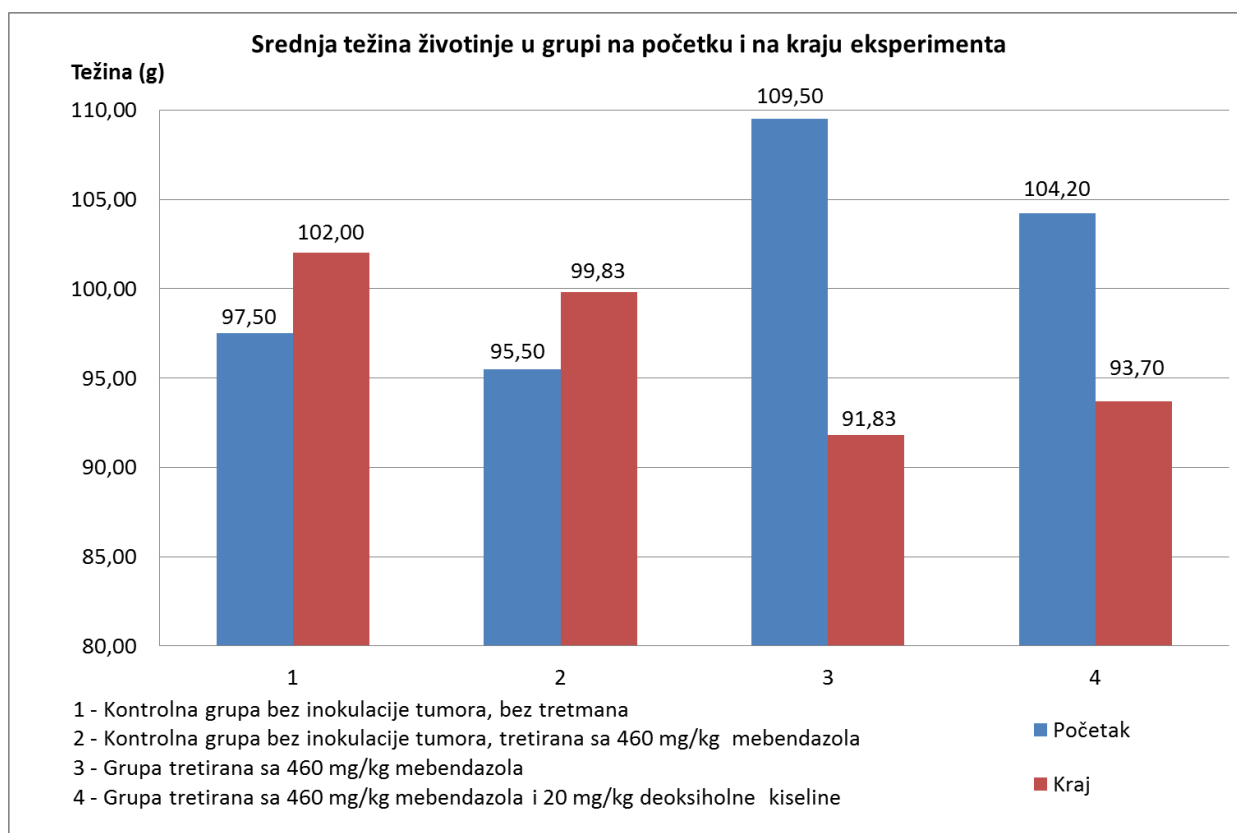
Slika P1. Vrednosti Ki-67 za tumore eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane mebendazolom



Slika P2. Težine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane mebendazolom

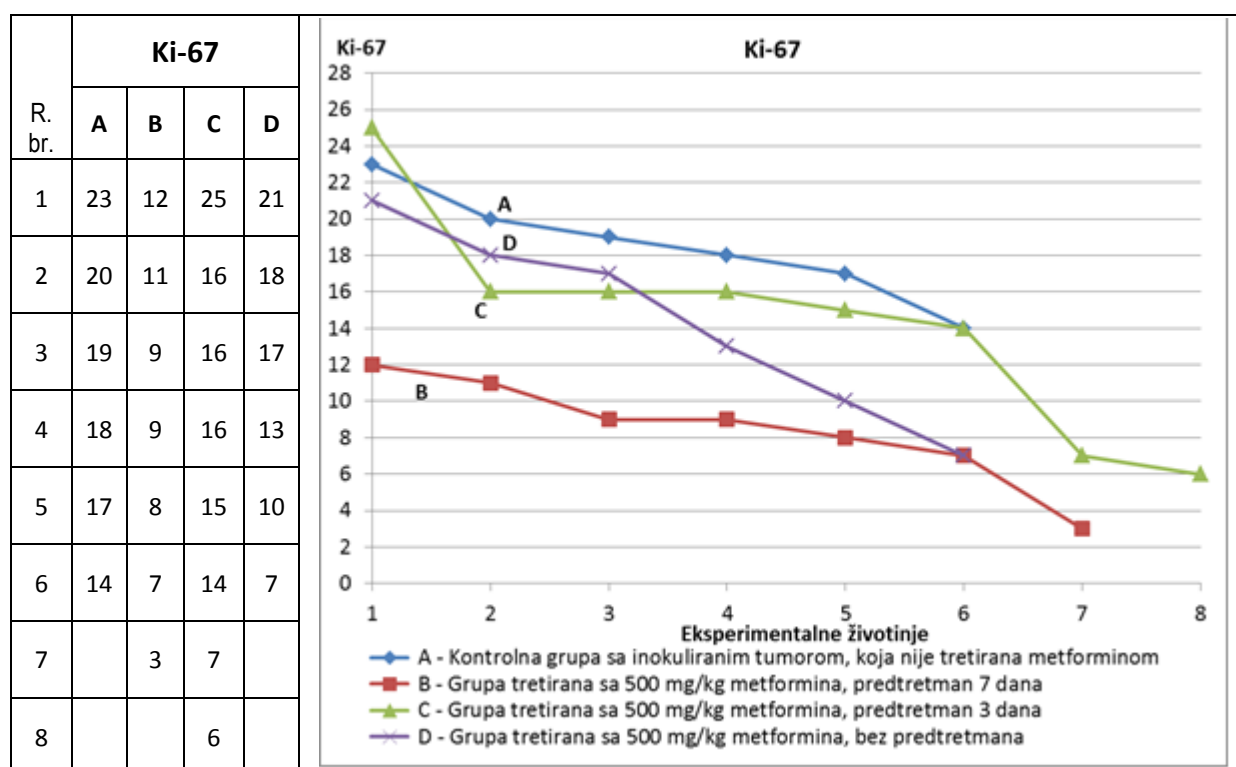


Slika P3. Zapremine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane mebendazolom

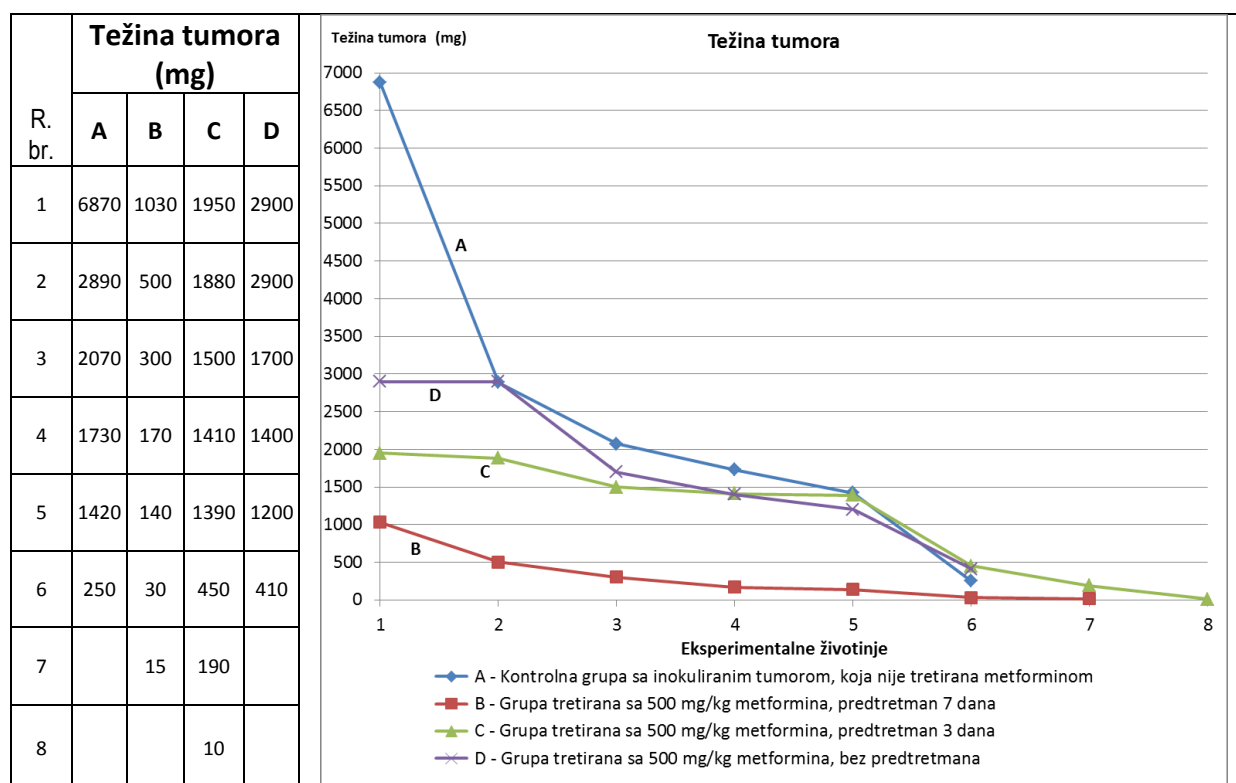


Slika P4. Srednje težine životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane mebendazolom, na početku i na kraju eksperimenta

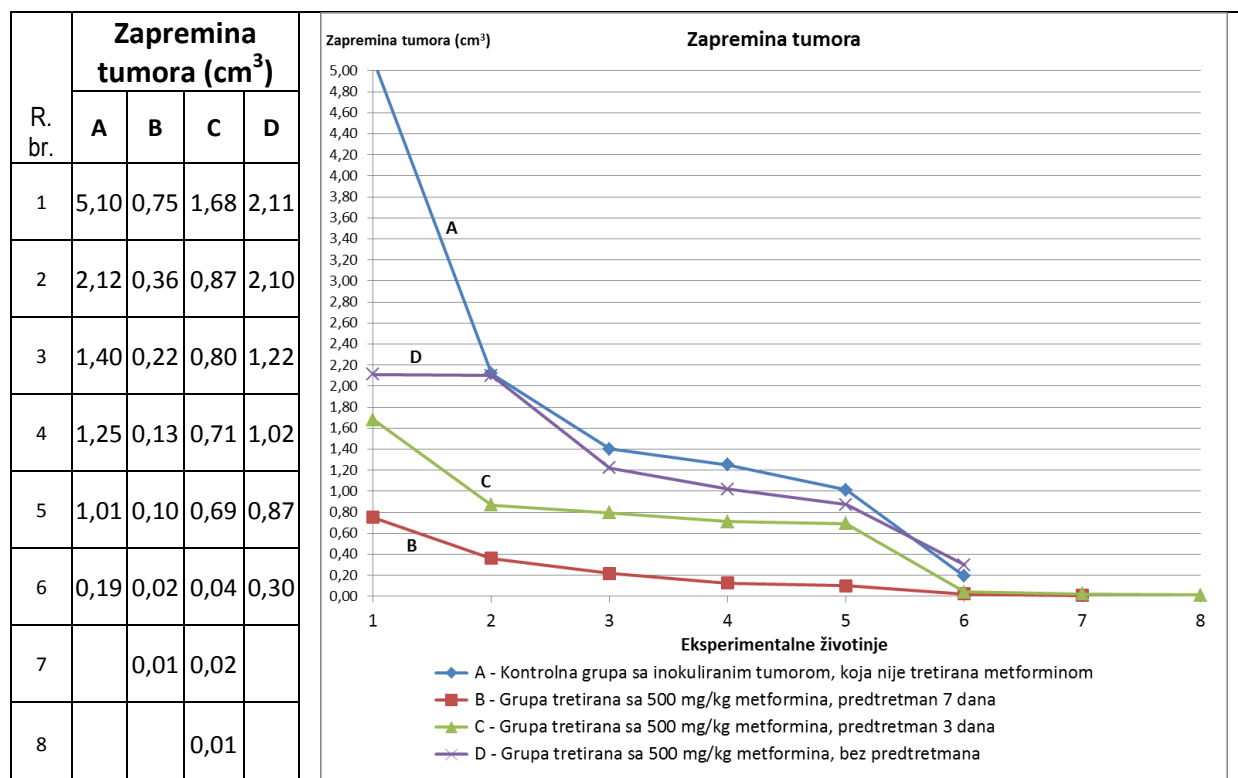
Antikancersko delovanje metformina



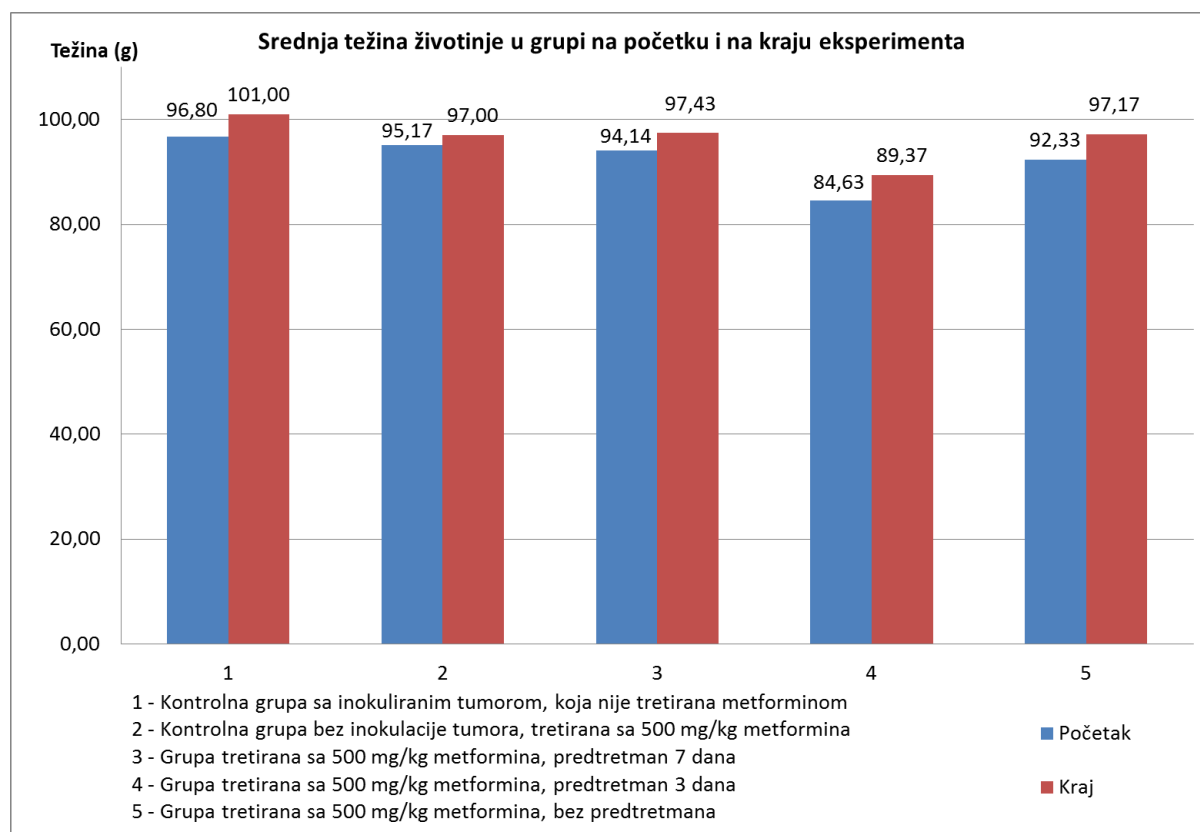
Slika P5. Vrednosti Ki-67 za tumore eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom



Slika P6. Težine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom

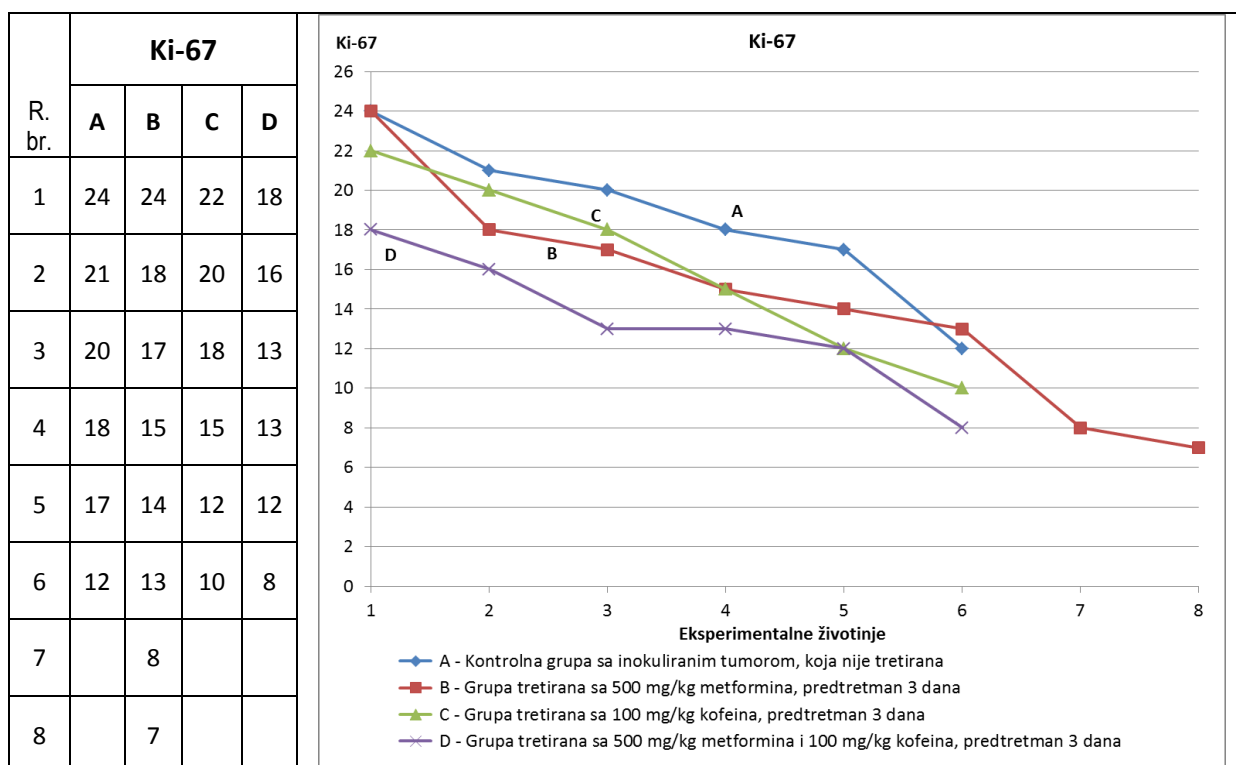


Slika P7. Zapremine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom

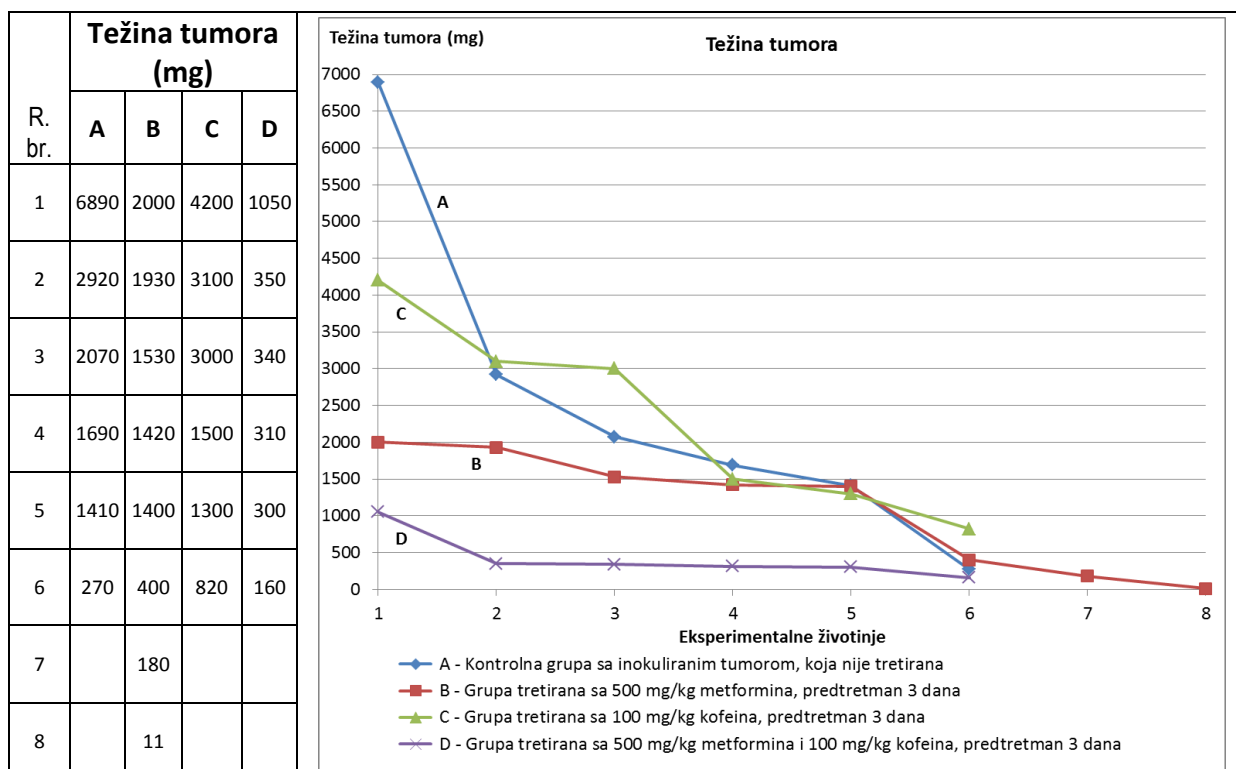


Slika P8. Srednje težine životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, na početku i na kraju eksperimenta

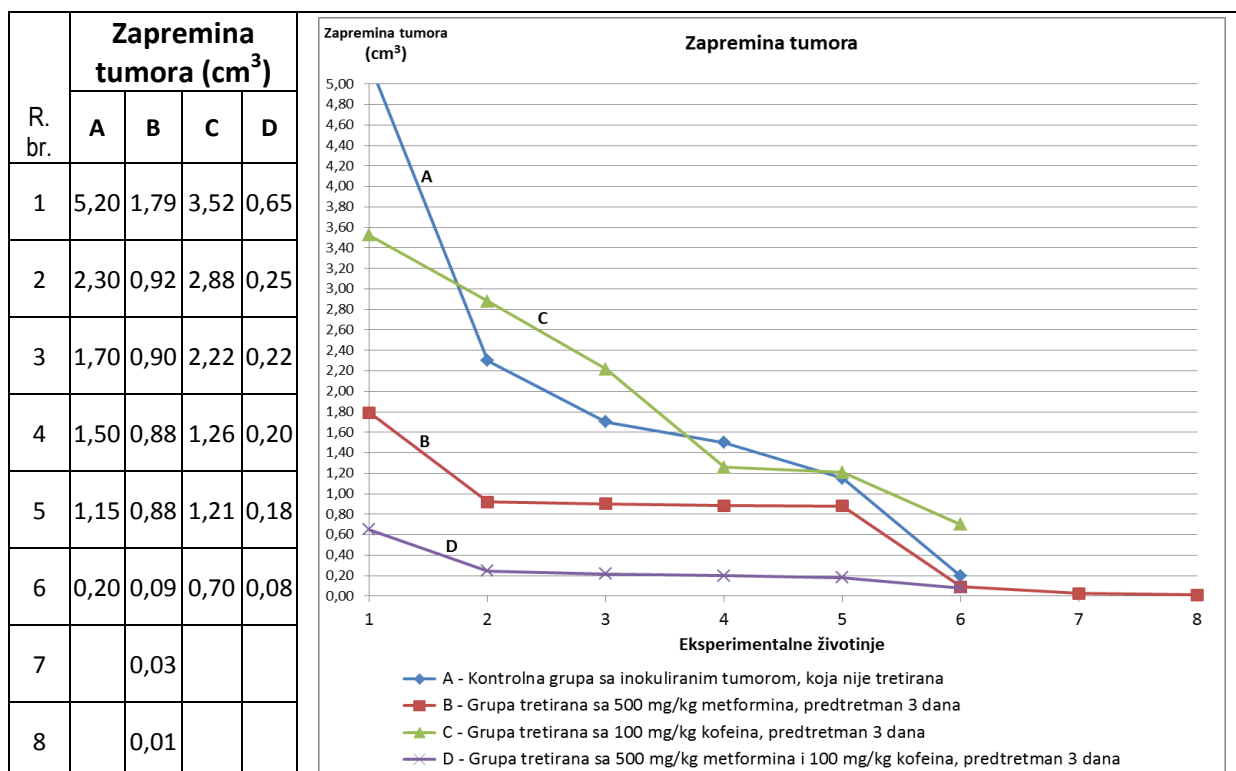
Antikancersko delovanje kombinacije metformina i kofeina



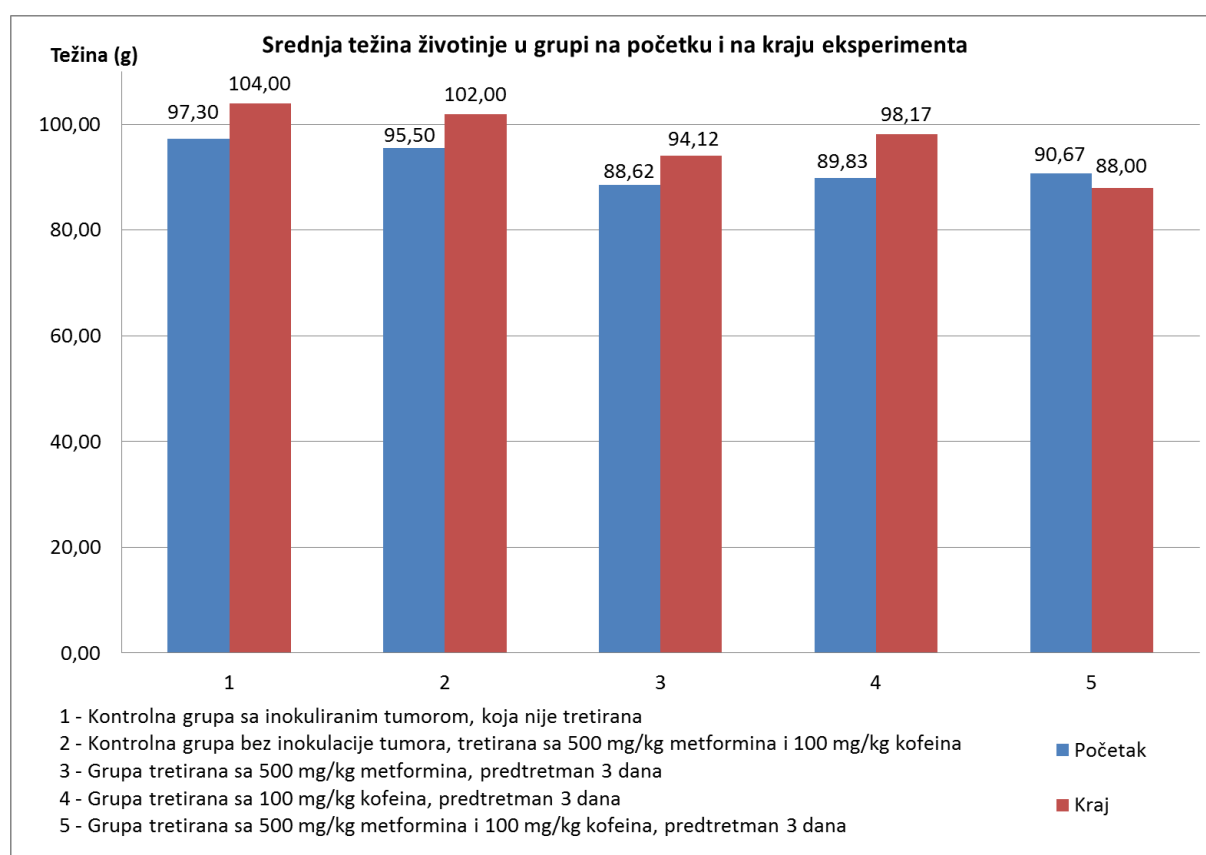
Slika P9. Vrednosti Ki-67 za tumore eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, kofeinom i njihovom kombinacijom



Slika P10. Težine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, kofeinom i njihovom kombinacijom

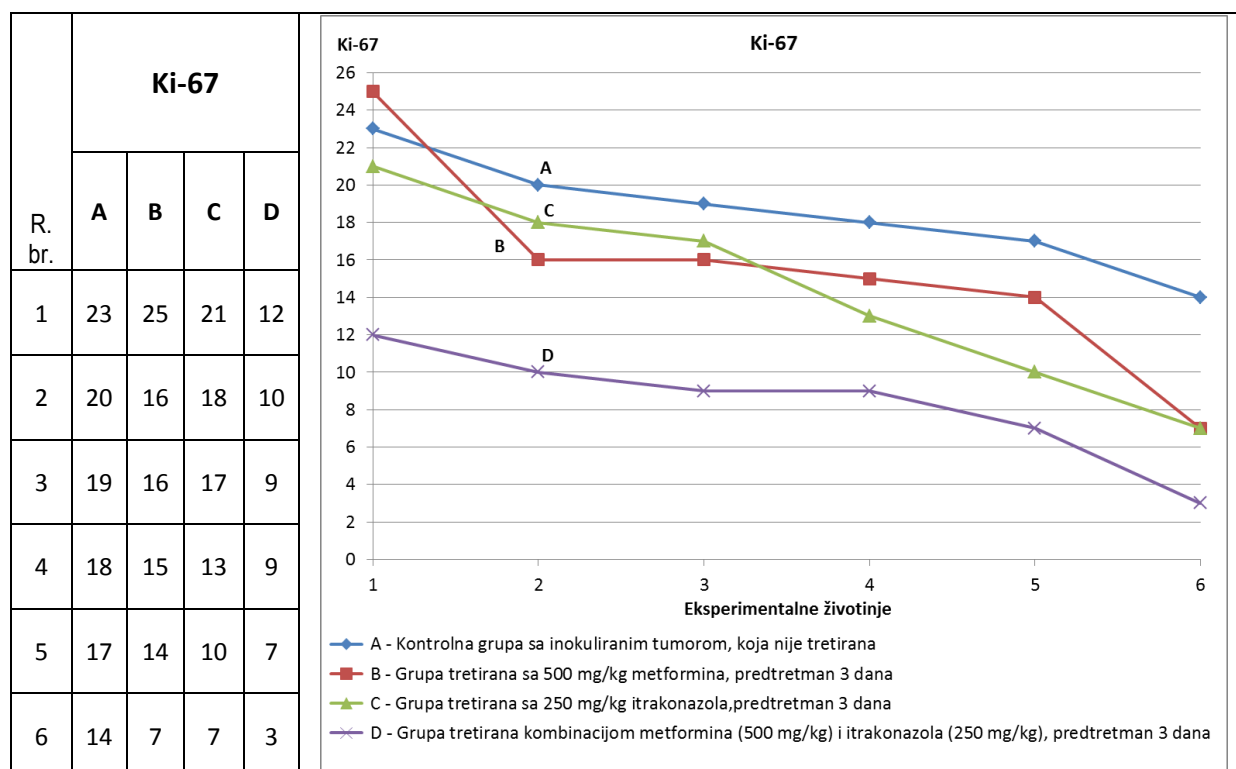


Slika P11. Zapremine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, kofeinom i njihovom kombinacijom

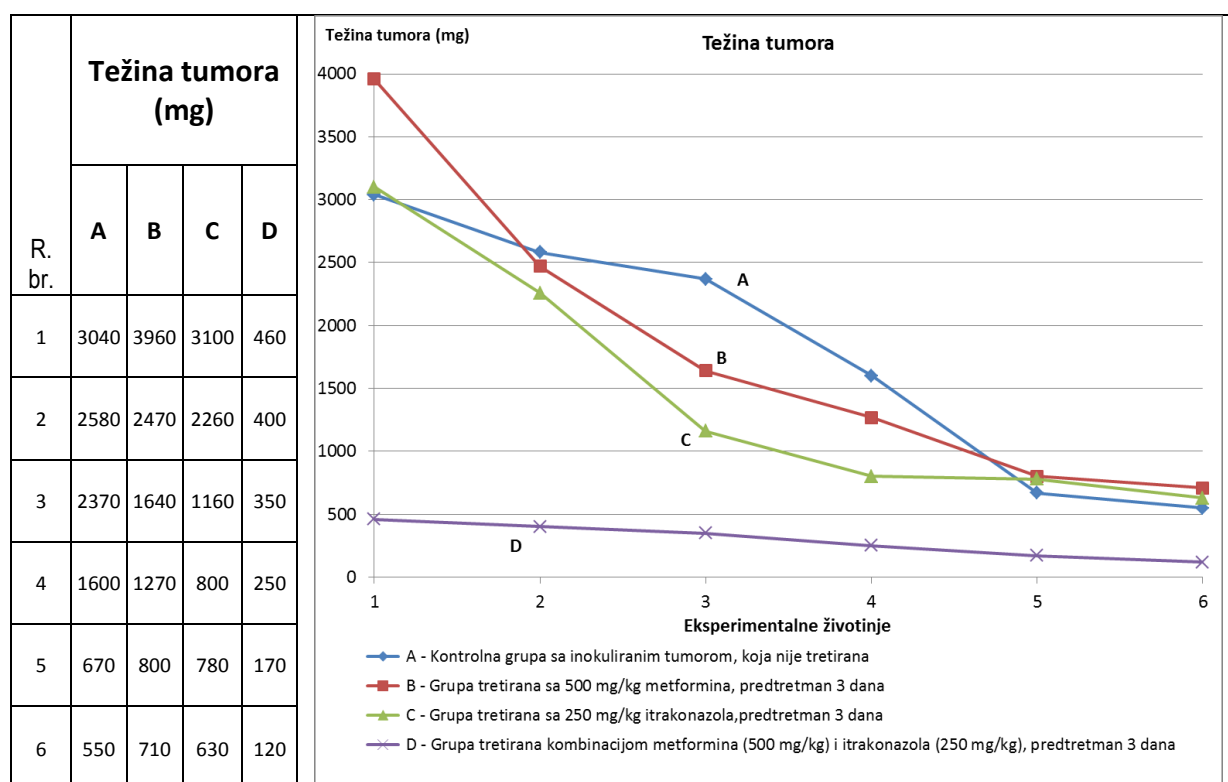


Slika P12. Srednje težine životinja na početku i na kraju eksperimenta, u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, kofeinom i njihovom kombinacijom

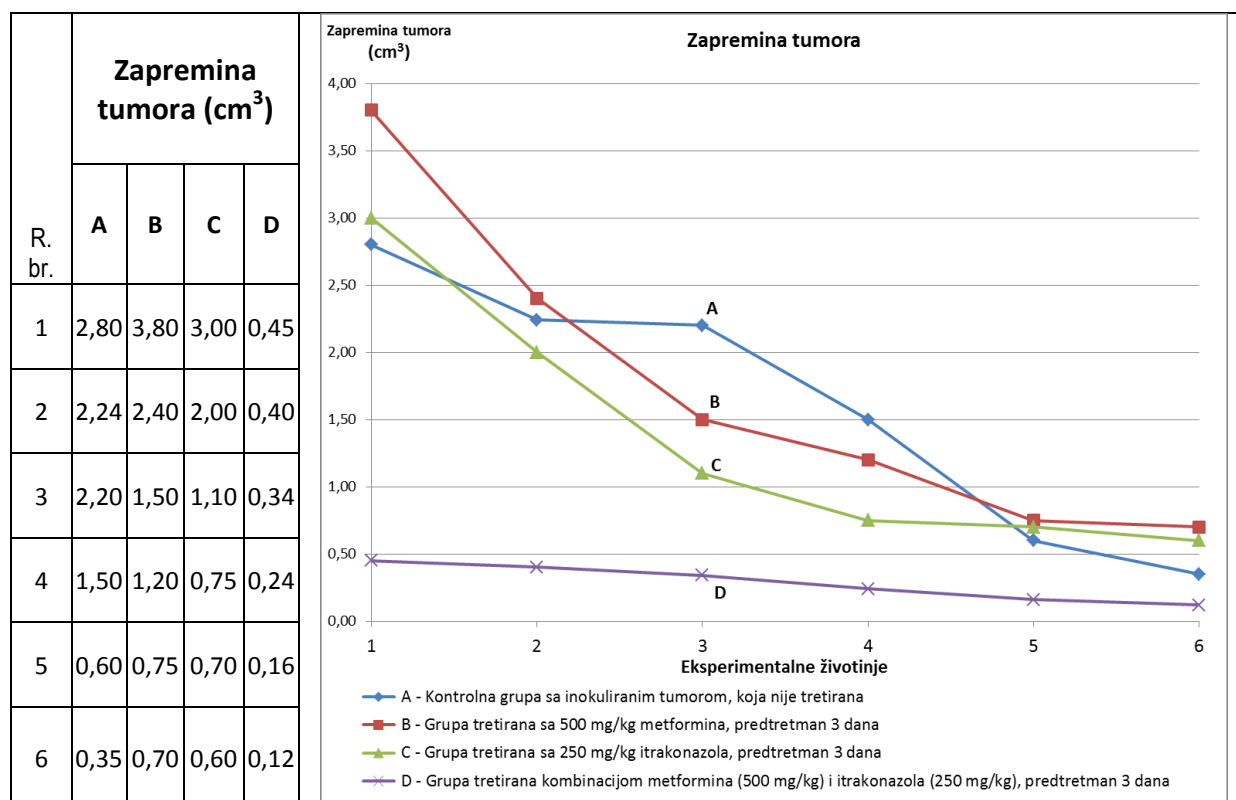
Antikancersko delovanje kombinacije metformina i itrakonazola za dvonedeljni tretman



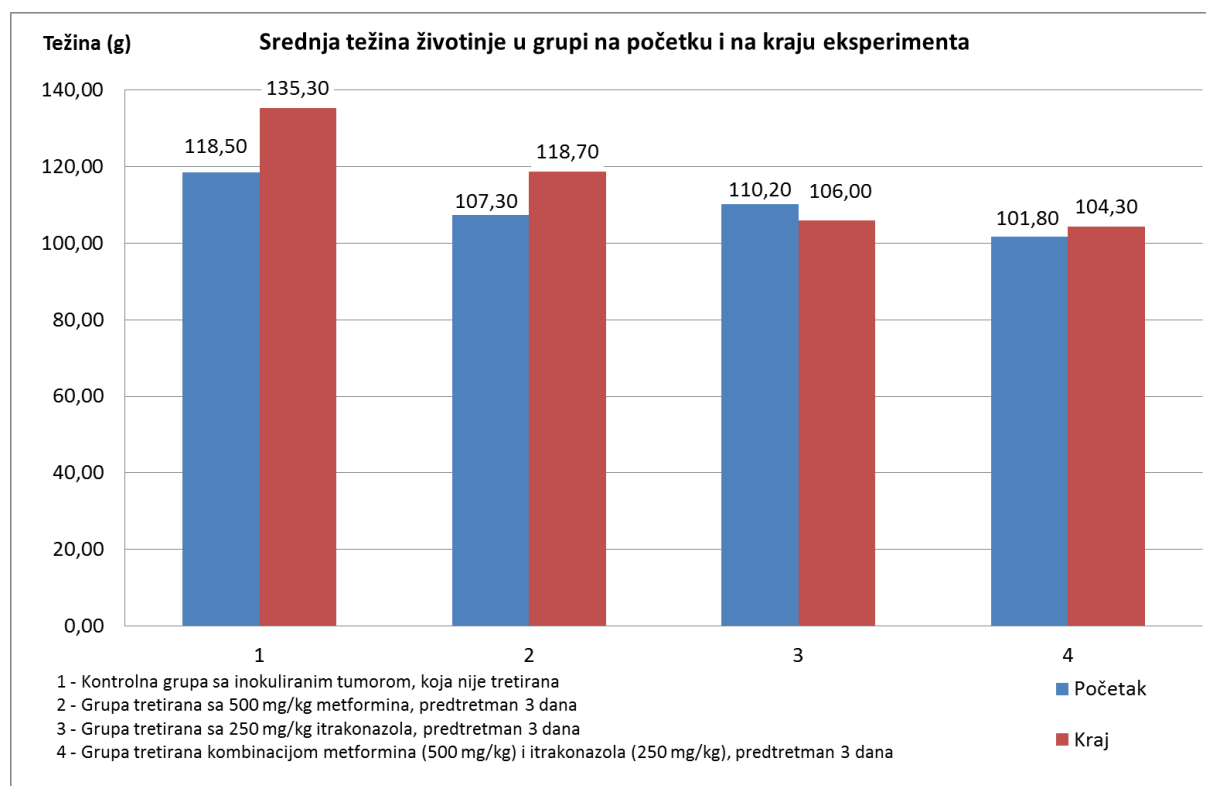
Slika P13. Vrednosti Ki-67 za tumore eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, itrakonazolom i njihovom kombinacijom tokom dve nedelje



Slika P14. Težine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, itrakonazolom i njihovom kombinacijom tokom dve nedelje



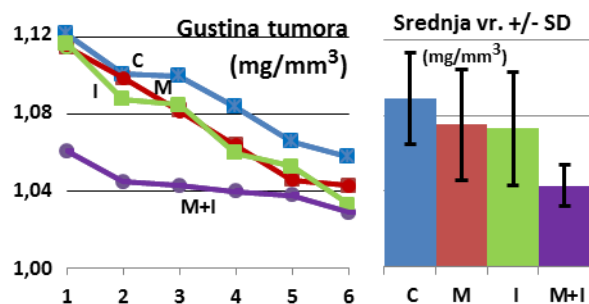
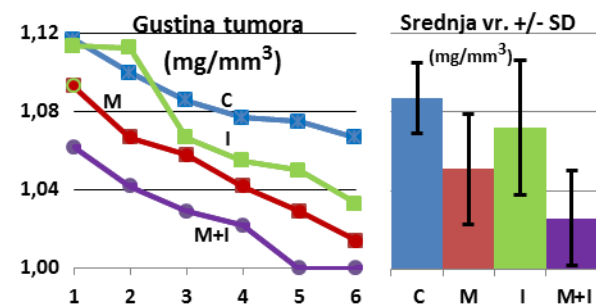
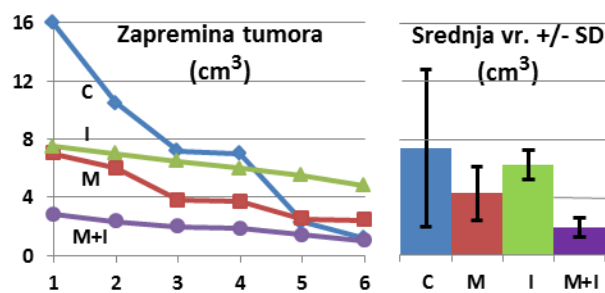
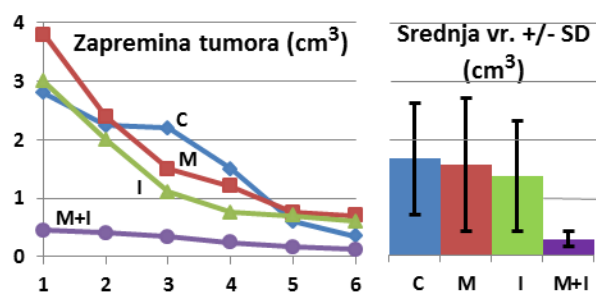
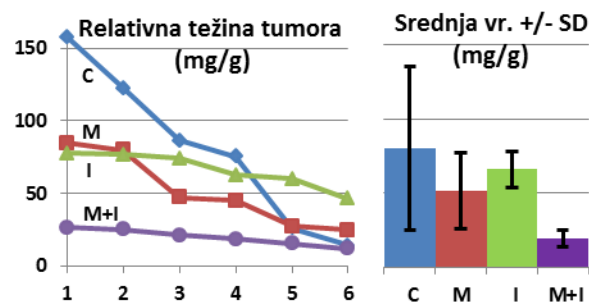
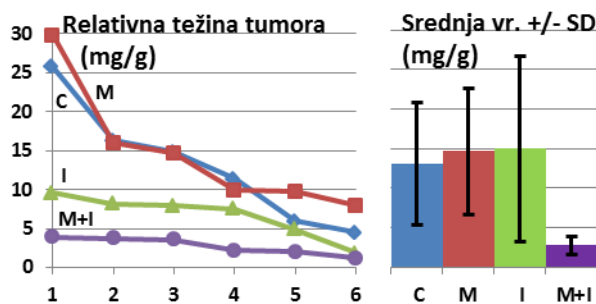
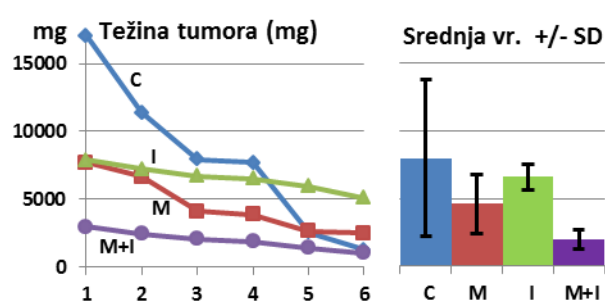
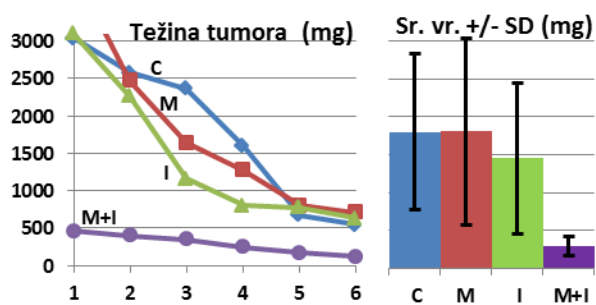
Slika P15. Zapremine tumora eksperimentalnih životinja u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, itrakonazolom i njihovom kombinacijom tokom dve nedelje



Slika P16. Srednje težine životinja na početku i na kraju eksperimenta, u kontrolnoj grupi i grupama koje su tretirane metforminom, itrakonazolom i njihovom kombinacijom tokom dve nedelje

Posle dvonedelnog tretmana

Posle tronedelnog tretmana



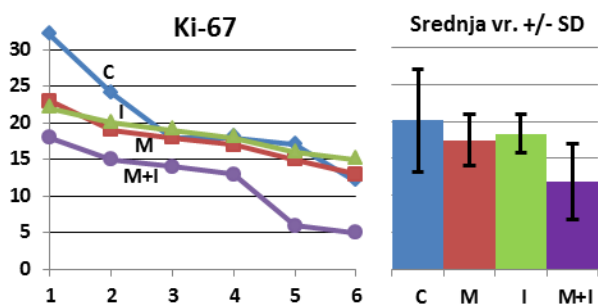
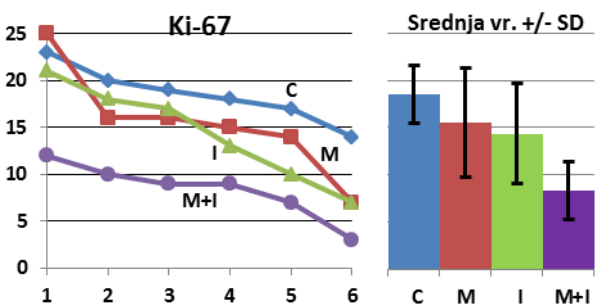
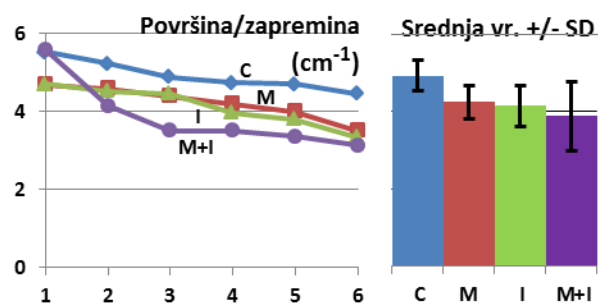
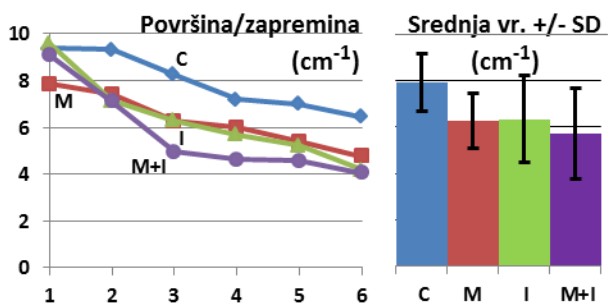
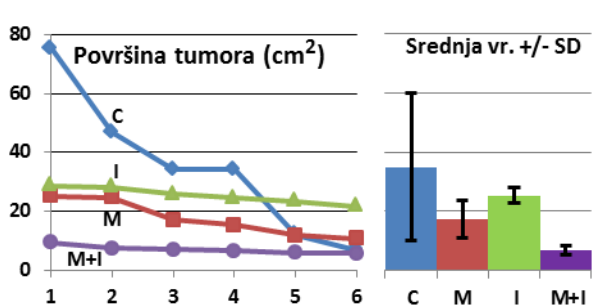
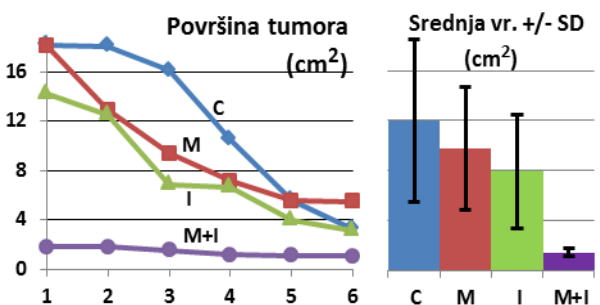
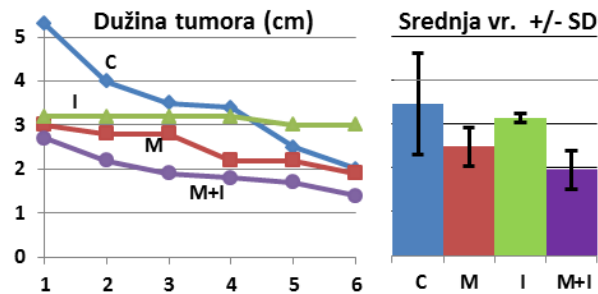
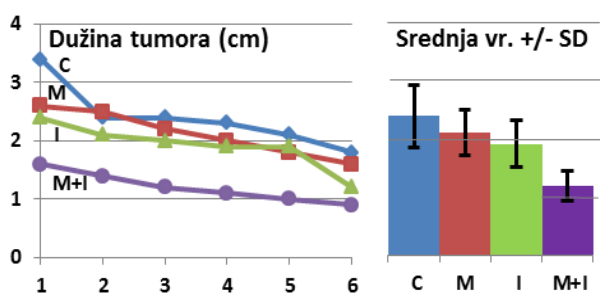
■ C - Kontrolna grupa
■ M - Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg)
■ I - Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg)
■ M+I - Grupa tretirana kombinacijom metformina (500 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)

■ C - Kontrolna grupa
■ M - Grupa tretirana metforminom (250 mg/kg)
■ I - Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg)
■ M+I - Grupa tretirana kombinacijom metformina (250 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)

Slika P17. Karakteristike ekscizovanih tumora u grupama eksperimentalnih životinja koje su tretirane dve nedelje

Posle dvonedeljnog tretmana

Posle tronedeljnog tretmana

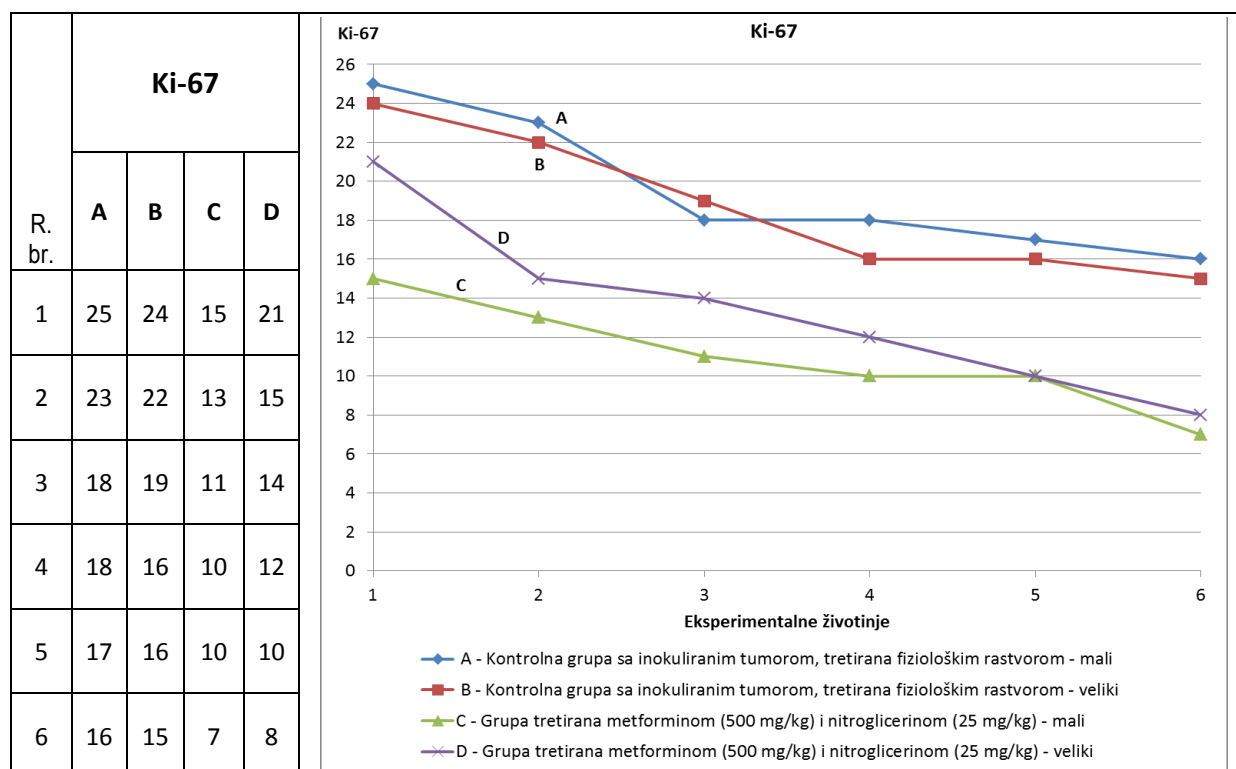


■ C - Kontrolna grupa
■ M - Grupa tretirana metforminom (500 mg/kg)
■ I - Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg)
■ M+I - Grupa tretirana kombinacijom metformina (500 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)

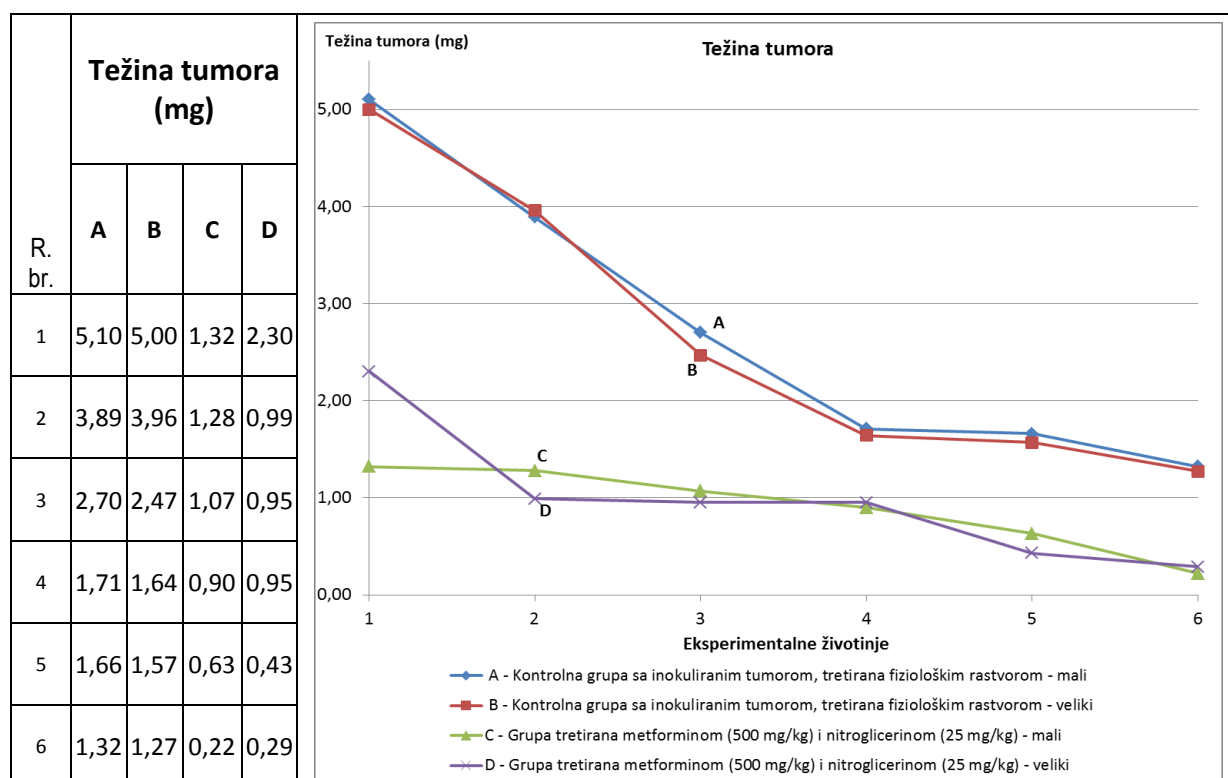
■ C - Kontrolna grupa
■ M - Grupa tretirana metforminom (250 mg/kg)
■ I - Grupa tretirana itrakonazolom (250 mg/kg)
■ M+I - Grupa tretirana kombinacijom metformina (250 mg/kg) i itrakonazola (250 mg/kg)

Slika P18. Karakteristike ekscizovanih tumora u grupama eksperimentalnih životinja koje su tretirane tri nedelje

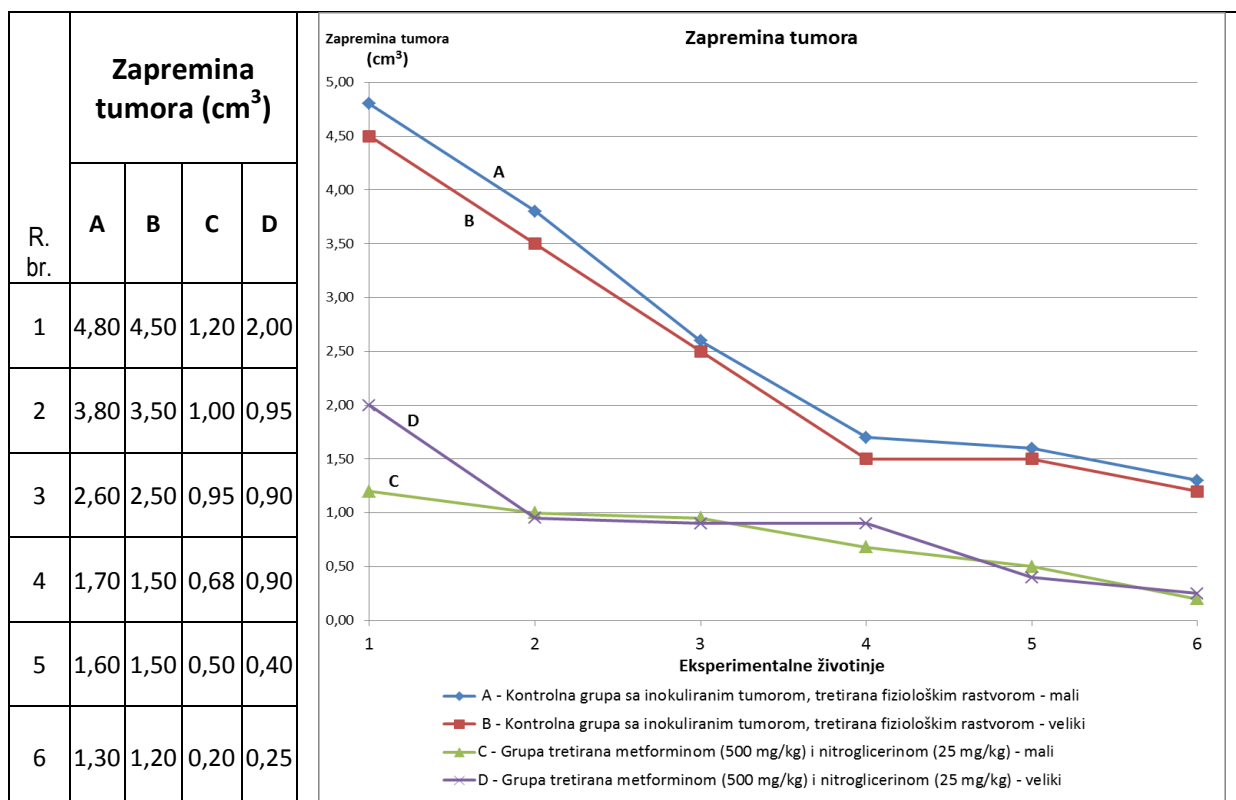
Antikancersko delovanje kombinacije metformina i nitroglicerina na malim (mladunci oko 40g) i većim mladim jedinkama (oko 100 g)



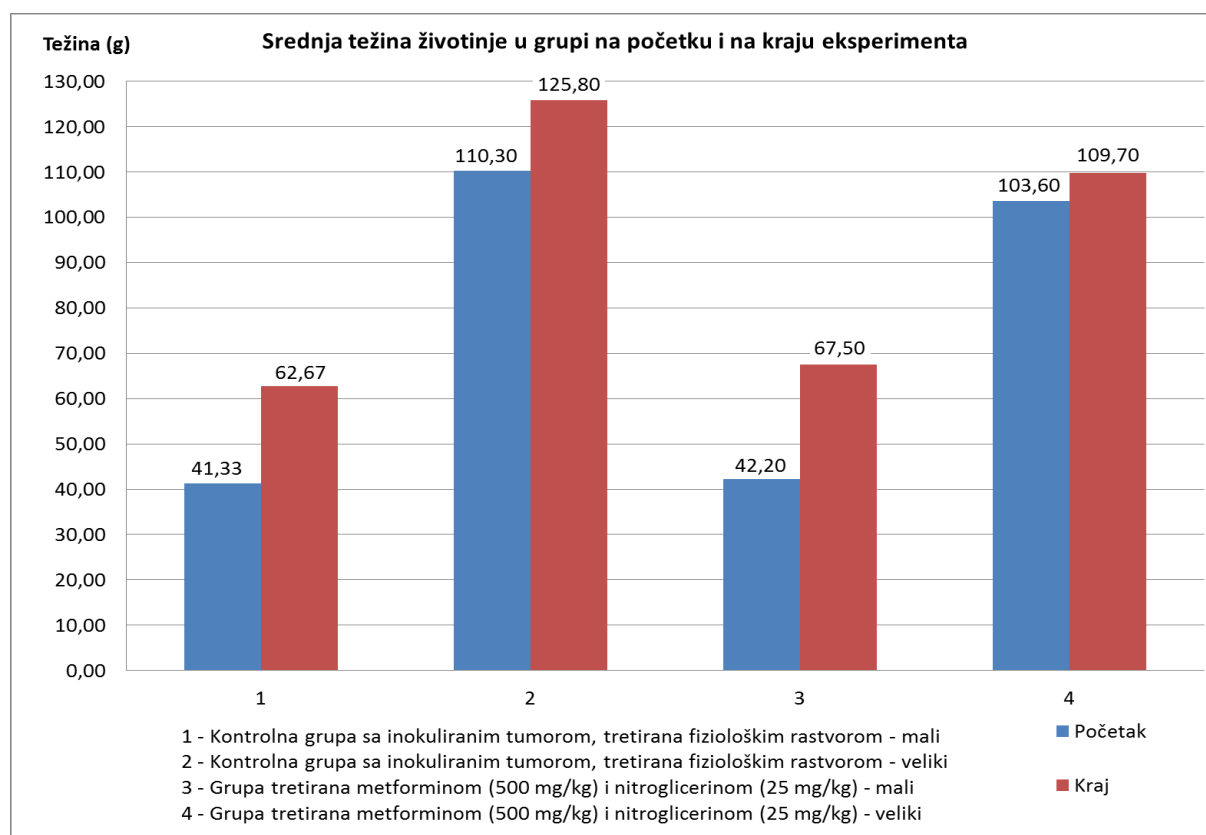
Slika P19. Vrednosti Ki-67 za tumore manjih (~40 g) i većih (~100 g) eksperimentalnih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane kombinacijom metformina i nitroglicerina



Slika P20. Težine tumora manjih (~40 g) i većih (~100 g) eksperimentalnih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane kombinacijom metformina i nitroglicerina



Slika P21. Zapremine tumora manjih (~40 g) i većih (~100 g) eksperimentalnih životinja u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane kombinacijom metformina i nitroglicerina



Slika P22. Srednje težine životinja na početku i na kraju eksperimenta, u kontrolnim grupama i grupama koje su tretirane kombinacijom metformina i nitroglicerina

Biografija Dušica Popović

Dušica Popović je rođena 28. avgusta 1987. godine u Novom Sadu. Završila je osnovnu školu „Đura Daničić“ u Novom Sadu kao nosilac Vukove diplome 2002. godine. Iste godine se upisala na prirodno-matematički smer u Gimnaziju „Jovan Jovanović Zmaj“ u Novom Sadu. Po završetku gimnazije, koju je završila sa odličnim uspehom, 2006. godine upisala se na Medicinski fakultet u Novom Sadu, gde je u toku studija dva puta nagrađena za ostvaren prosek ocena preko 9,50.

Položila je sve ispite predviđene Planom i programom integrisanih studija medicine u Novom Sadu sa prosekom 9,40. Diplomirala je 22.06.2012. g. na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu sa ocenom deset. Medicinski fakultet završila je za 5 godina i 9 meseci (od 01.10.2006. do 22.06.2012. godine). Autor je diplomskog rada: „Kardioembolizacija kao uzrok nastanka ishemijskog moždanog udara“, pod mentorstvom prof. dr Mirjane Jovičević.

Upisala je doktorske studije kliničke medicine na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu 24.10.2012. godine.

Položila je stručni ispit za doktora medicine u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije u Beogradu 29.10.2013. godine.

Od 16.12.2014. godine je na volonterskoj specijalizaciji iz pedijatrije na Institutu za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine.

Posle završene obuke stekla je Potvrdu o obučenosti o dobrobiti eksperimentalnih životinja za poslove koji pripadaju kategoriji V 24.04.2015. godine, broj 01-90/9-32, Univerzitet u Novom Sadu, Etička komisija za zaštitu dobrobiti oglednih životinja.

Izabrana je u zvanje istraživač – pripravnik 2016. godine na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu.

Prihvaćena joj je tema doktorske disertacije pod naslovom „Delovanje lekova registrovanih za neonkološke indikacije na eksperimentalni fibrosarkom hrčka“ 2016. godine na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu, pod mentorstvom prof. dr Dušana Laloševića, redovnog profesora, uža naučna oblast histologija i embriologija, i prof. dr Jovanke Kolarović, vanrednog profesora, uža naučna oblast pedijatrija – hematologija sa onkologijom (Odluka Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, broj 05-14/15-2016/2/20-4.7 od 23.11.2016. godine).

Autor je 8 radova objavljenih u međunarodnim časopisima kategorije M23.

Vlada engleskim i nemačkim jezikom i veštinama rada na računaru, kao što su obrada tekstova, statistička i grafička obrada numeričkih podataka, korišćenje baza podataka, prezentacije i komunikacije. Poznaje rad u elektronskom zdravstvenom kartonu.

Dobila je diplomu za učešće na hercegrovskom Memorijalnom plivačkom maratonu „Mario-Dido Marić“ na relaciji Njivice – Herceg Novi 28.07.2007. godine. Na Medicinijadi održanoj 2013. godine osvojila je bronzanu medalju i treće mesto u šahu.