

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija D. Nešović

ULOGA INHIBITORA SRC TIROZIN-KINAZE U
PREVAZILAŽENJU UROĐENO REZISTENTNOG I
INVAZIVNOG FENOTIPA GLIOBLASTOMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija D. Nešović

THE ROLE OF SRC TYROSINE KINASE INHIBITORS IN
OVERCOMING THE INTRINSICALLY RESISTANT AND
INVASIVE PHENOTYPE OF GLIOBLASTOMA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI:

1. **dr Nadežda Nedeljković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
2. **dr Jelena Dinić**, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE:

1. **dr Nadežda Nedeljković**, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
2. **dr Jelena Dinić**, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
3. **dr Milica Pešić**, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
4. **dr Aleksandra Divac Rankov**, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
5. **dr Marija Adžić**, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane:



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za molekularnu neuro-onkologiju na Odeljenju za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Identifikacija molekularnih markera za predikciju progresije tumora, odgovora na terapiju i ishoda bolesti“ (III41031, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije).

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Jeleni Dinić koja je kvalitetno osmislila ovu disertaciju i nesebično mi pružila pomoć u njenoj realizaciji, naročito prilikom rešavanja problema i diskutovanja dobijenih rezultata. Veliko hvala na strpljenju, stručnoj i moralnoj podršci i što mi je omogućila da steknem novo naučno iskustvo u Laboratoriji za molekularnu neuro-onkologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

Prof. dr Nadeždi Nedeljković se zahvaljujem na podršci tokom doktorskih studija, kontinuiranom interesovanju za moj naučni rad, pokroviteljskom odnosu i pomoći u oblikovanju disertacije.

Dr Milici Pešić se zahvaljujem na pruženoj prilici za rad u Laboratoriji za molekularnu neuro-onkologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, kao i na stručnoj i moralnoj podršci u mom dosadašnjem radu.

Dr Aleksandri Divac Rankov iz Laboratorije za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu se zahvaljujem na pomoći u uspostavljanju in vivo modela, kao i analizi i diskusiji dobijenih rezultata.

Dr Silvii Schenone sa Univerziteta u Đenovi, kao i dr Mauriziu Botta sa Univerziteta u Sijeni u Italiji se zahvaljujem na dugogodišnjoj saradnji bez koje ne bi bila moguća izrada ove doktorske disertacije.

Svojim koleginicama i kolegi iz laboratorije 25 Ani Podolski-Renić, Mirni Jovanović, Miodragu Dragoju, kao i koleginicama Sonji Stojković Burić i Tijani Stanković se zahvaljujem na nesebičnoj pomoći u eksperimentnom radu, i na izvanrednoj saradnji i druženju u laboratoriji.

Dr Nataši Todorović se zahvaljujem na pruženoj prilici za rad u nauci.

Dr Mariji Adžić se zahvaljujem na savetima i sugestijama za oblikovanje ove disertacije.

Koleginicama i kolegama iz laboratorije 32 i 26 se zahvaljujem na pomoći, saradnji i druženju tokom eksperimentalnog rada koji je deo ove disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na njihovoj podršci i razumevanju tokom proteklog vremena.

ULOGA INHIBITORA SRC TIROZIN-KINAZE U PREVAZILAŽENJU UROĐENO REZISTENTNOG I INVAZIVNOG FENOTIPA GLIOBLASTOMA

Sažetak

Glioblastomi su najagresivniji primarni tumora mozga, koje odlikuje visoka aktivnost Src tirozin-kinaze. Stoga, ovaj enzim, koji reguliše preživljavanje i invazivnost tumorskih ćelija, predstavlja potencijalnu metu za razvoj ciljane terapije. U ovom radu je ispitano dejstvo Src tirozin-kinaznih inhibitora, Si306 i njegovog proleka pro-Si306 na invazivni potencijal humanih ćelijskih linija glioblastoma (U87 i U87-TxR) i tri primarne ćelijske kulture glioblastoma, kao i na višestruku rezistenciju na lekove posredovanu ekspresijom P-glikoproteina u U87-TxR ćelijskoj liniji. P-glikoprotein je ATP vezujući transporter, koji ima protektivnu ulogu u krvno-moždanoj barijeri, dok na membrani tumorskih ćelija sprečava prodiranje brojnih lekova i tako umanjuje njihovu efikasnost.

Značajan efekat Si306 i pro-Si306 na ćelijski rast glioblastoma dobijen je u mikromolarnom opsegu koncentracija 1-20 μ M. Sposobnost ćelija glioblastoma da razgrade vanćelijski matriks je bila značajno smanjena primenom Src tirozin-kinaznih inhibitora. Oba inhibitora su uticala na ekspresiju komponenti Src signalnog puta i pokazala anti-invazivni potencijal *in vitro*. *In vivo*, inhibitori su sprečili invadiranje U87 ćelija u ksenograft modelu embriona zebriće. Pored svoje primarne uloge, Src tirozin-kinazni inhibitori su pokazali sposobnost da umanje aktivnost P-glikoproteina i povećaju efikasnost paklitaksela kod U87-TxR ćelija.

Uzimajući u obzir rezultate ovog rada, Si306 i pro-Si306 predstavljaju kandidate za buduća klinička ispitivanja na glioblastomima kod kojih su terapijske mogućnosti ograničene. Prolek pro-Si306 je pokazao sličnu efikasnost kao i Si306, što ukazuje na opravdanost njegove upotrebe zbog povoljnijih farmakokinetičkih svojstava u odnosu na sam lek.

KLJUČNE REČI: glioblastom, Src tirozin-kinazni inhibitor, invazivnost, fokalna ahezijska kinaza, matriksne metaloproteinaze, višestruka rezistencija na lekove, P-glikoprotein

NAUČNA OBLAST: Molekularna onkologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Kancerogeneza

THE ROLE OF SRC TYROSINE KINASE INHIBITORS IN OVERCOMING THE INTRINSICALLY RESISTANT AND INVASIVE PHENOTYPE OF GLIOBLASTOMA

Abstract

Glioblastoma, as the most aggressive brain tumor, displays high activity of Src tyrosine kinase. Thus, this enzyme that participates in the survival, migration, and invasiveness of tumor cells emerged as a potential target for glioblastoma therapy. The effects of Src inhibitors, Si306 and its prodrug pro-Si306, on invasive potential in human glioblastoma cell lines (U87 and U87-TxR) and three primary glioblastoma cell cultures were investigated in this study. Another phenomenon investigated was multidrug resistance mediated by the overexpression of P-glycoprotein in the resistant glioblastoma cell line U87-TxR. This ATP-binding cassette membrane transporter has a protective role in the blood-brain barrier, while it limits drug delivery through tumor membrane and decreases their efficacy.

Si306 and pro-Si306 have shown significant effects on cell growth of glioblastoma cells applied in concentrations range 1-20 μ M. The ability of glioblastoma cells to degrade the extracellular matrix was considerably compromised after application of Src tyrosine kinase inhibitors. Both compounds affected Src signaling pathway members and showed their anti-invasive potential *in vitro*. In addition, Si306 and pro-Si306 displayed an anti-invasive effect against U87 xenografts in the zebrafish embryo model *in vivo*. Moreover, the tested compounds were found to inhibit the activity of P-glycoprotein, and enhance the efficacy of paclitaxel in P-glycoprotein overexpressing cells.

Considering the results of this study, clinical testing of Si306 and pro-Si306 in glioblastoma with limited treatment options is anticipated in the near future. The prodrug showed similar efficacy to the drug, implying the rationality of its use in clinical settings.

KEY WORDS: glioblastoma, Src tyrosine kinase inhibitor, invasion, focal adhesion kinase, matrix metalloproteinase, multidrug resistance, P-glycoprotein

SCIENTIFIC FIELD: Molecular oncology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Cancerogenesis

Lista skraćenica

- ABC - engl. *ATP-binding cassette* (ATP-vezujući transporteri)
- ABCB1 - engl. *ATP binding cassette subfamily B member 1* (ATP-vezujući transporter B1)
- ABCC1 - engl. *ATP binding cassette subfamily C member 1* (ATP-vezujući transporter C1)
- ABCG2 - engl. *ATP binding cassette subfamily G member 2* (ATP-vezujući transporter G2)
- AKT - familija serin/treonin specifičnih protein kinaza
- ANOVA - engl. *analysis of variance* (analiza varijanse)
- ATCC - engl. *American Type Culture Collection*
- ATP - adenzin trifosfat
- BCRP - engl. *breast cancer resistance protein* (protein rezistencije raka dojke)
- bFGF - engl. *basic fibroblast growth factor* (osnovni faktor rasta fibroblasta)
- BSA - engl. *bovine serum albumin* (albumin govedeg seruma)
- cDNK - komplementarna DNK
- Ct - engl. *threshold cycle* (granični ciklus)
- dATP - dezoksiadenozin-trifosfat
- dCTP - dezoksicitidin-trifosfat
- DEPC - dietil pirokarbonat
- dGTP - dezoksiguanozin-trifosfat
- DMEM - Dulbeko modifikovani minimalni esencijalni medijum
- DMEM/F12 - Dulbeko modifikovani minimalni esencijalni medijum sa Hamovim F-12 medijumom
- DMSO - dimetilsulfoksid
- DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
- dTTP - dezoksitimidin-trifosfat
- EDTA - etilendiamin tetraacetat
- EGF - engl. *epidermal growth factor* (epidermalni faktor rasta)
- EGFR - engl. *epidermal growth factor receptor* (receptor za epidermalni faktor rasta)
- ERK - engl. *extracellular signal-regulated protein kinase* (kinaza regulisana vanćelijskim signalima)
- FAK - engl. *focal adhesion kinase* (fokalna adhezijska kinaza)
- FBS - engl. *fetal bovine serum* (fetalni goveđi serum)
- FDA - engl. *Food and Drug Administration* (Američka uprava za hranu i lekove)
- FITC - fluorescein izotiocijanat
- GFAP - engl. *glial fibrillary acidic protein* (kiseli glijalni fibrilarni protein)
- HRP - engl. *horseradish peroxidase* (peroksidaza rena)
- IC₅₀ - inhibitorna koncentracija (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)
- IDH - engl. *isocitrate dehydrogenase* (izocitratna dehidrogenaza)
- iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina
- KMB - krvno-moždana barijera
- MAPK - engl. *mitogen-activated protein kinase* (mitogenom-aktivirana protein kinaza)
- MEK - engl. *mitogen-activated protein kinase kinase* (kinaza mitogenom-aktivirane protein kinaze)
- MEM - minimalni esencijalni medijum
- MDR - engl. *multidrug resistance* (višestruka rezistencija na lekove)
- MDR1 - engl. *multidrug resistance protein* (protein višestruke rezistencije na lekove 1)
- MMP - engl. *matrix metalloproteinase* (matriksna metaloproteinaza)
- MRP1 - engl. *multidrug resistance-associated protein 1*
- mTOR - engl. *mammalian target of rapamycin* (ciljni molekul rapamicina kod sisara)
- MTT - 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijum bromid
- PAGE - engl. *Polyacrylamide gel electrophoresis* (elektroforeza u poliakrilamidnom gelu)
- PBS – engl. *phosphate-buffered saline* (fosfatni pufer)
- PCR - engl. *polymerase chain reaction* (lančana reakcija polimeraze)
- PFA - paraformaldehid
- P-gp - P-glikoprotein
- PI3K - engl. *phosphoinositide 3-kinase* (fosfatidil inozitol 3-kinaza)

PTEN - engl. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
(homolog fosfataze i tenzina)
PVDF - polivinilidini fluorid
qPCR - engl. *quantitative polymerase chain reaction* (kvantitativna lančana reakcija polimeraze)
RAF - proto-onkogeni serin/treoninska proteinska kinaza
RAS - proteinska familija GTP-aza
RNK - ribonukleinska kiselina
RTK - engl. *receptor tyrosine kinase* (tirozin-kinazni receptor)
SD - standardna devijacija
SDS - natrijum dodecil sulfat
SEM - engl. *standard error of the mean* (standardna greška srednje vrednosti)
SFK - engl. *Src family kinase* (familija Src tirozin-kinaza)
TB - engl. *trypan blue* (tripan plavo)
TBE - Tris boratni EDTA pufer
TBS-T - Tris-boratni pufer sa dodatkom Tween-20 deterdženta
TEMED - tetrametiletilendiamin
TKI - tirozin-kinazni inhibitor
VEGF - engl. *vascular endothelial growth factor* (vaskularni endotelski faktor rasta)
VEGFR - engl. *vascular endothelial growth factor receptor* (receptor vaskularnog endotelskog faktora rasta)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Opšte odlike malignih tumora	1
1.2. Ciljana terapija malignih tumora	4
1.2.1. Tirozin-kinaze kao mete ciljane terapije malignih tumora.....	4
1.2.2. Interakcija tirozin-kinaznih inhibitora sa ABC transporterima.....	6
1.2.3. Potencijal inhibicije Src tirozin-kinaze u terapiji malignih tumora.....	9
1.3. Glioblastomi	10
1.3.1. Invazivnost glioblastoma	12
1.3.2. Rezistencija glioblastoma na terapiju	13
1.4. Terapija glioblastoma	14
1.4.1. Novi terapeutski pristupi u lečenju glioblastoma	15
1.4.2. Src tirozin-kinazni inhibitori u lečenju glioblastoma	16
1.4.2.1. Src tirozin-kinazni inhibitori Si306 i pro-Si306.....	17
2. CILJEVI	20
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Lekovi i farmakološki inhibitori.....	22
3.2. Hemikalije i reagensi	22
3.3. Čelijske linije.....	22
3.4. Određivanje broja ćelija.....	22
3.5. Uzorci tkiva	23
3.6. Uspostavljanje primarnih ćelijskih kultura glioblastoma	23
3.7. Imunocitohemijska analiza primarnih ćelijskih kultura glioblastoma.....	23
3.8. MTT test vijabilnosti ćelija.....	24
3.8.1. Pojedinačni i kombinovani tretmani ćelija.....	24

3.9. Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije	25
3.9.1. Izolacija RNK	25
3.9.2. Provera kvaliteta RNK.....	25
3.9.3. Reakcija reverzne transkripcije	26
3.10. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu	26
3.11. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom	27
3.11.1. Akumulacija rodamina 123	27
3.11.2. Analiza ekspresije P-glikoproteina.....	27
3.11.3. Analiza ekspresije Src tirozin-kinaze.....	27
3.12. Izolacija proteina i „Western blot“ analiza.....	28
3.12.1. Izolacija proteina.....	28
3.12.2. Elektroforeza proteina	28
3.12.3. Elektrotransfer proteina	28
3.12.4. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina.....	29
3.12.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova.....	29
3.13. Analiza invazivnog potencijala ćelija.....	30
3.13.1. Metoda degradacije želatina	30
3.13.2. Test invazivnosti ćelija.....	30
3.14. Životinjski model zebrice	31
3.14.1. Uzgajanje i mrešćenje zebrica.....	31
3.14.2. Inokulacija ćelija glioblastoma u embrione zebrica	32
3.15. Statistička obrada rezultata.....	33
4. REZULTATI.....	34
4.1. Karakterizacija primarnih ćelijskih kultura glioblastoma	34
4.2. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na inhibiciju vijabilnosti glioblastoma.....	36

4.2.1. Zavisnost osetljivosti ćelija glioblastoma na Si306 i pro-Si306 od nivoa ekspresije Src tirozin-kinaze	37
4.3. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na invazivni potencijal ćelija glioblastoma <i>in vitro</i>	38
4.3.1. Invazivni potencijal ćelija glioblastoma	38
4.3.2. Si306 i pro-Si306 smanjuju invazivni potencijal U87 i U87-TxR ćelija	40
4.3.2.1. Degradacija želatina	40
4.3.2.2. Invazija kroz membranu	42
4.3.3. Si306 i pro-Si306 smanjuju invazivni potencijal primarnih ćelija glioblastoma u testu degradacije želatina	43
4.4. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na invazivni potencijal ćelija glioblastoma <i>in vivo</i>	46
4.5. Inhibicija komponenti Src tirozin-kinaznog signalnog puta u ćelijama glioblastoma	49
4.5.1. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost Src tirozin-kinaze i ushodnih članova njenog signalnog puta (FAK i EGFR)	49
4.5.2. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost nishodnih članova Src tirozin-kinaznog signalnog puta (AKT i ERK)	50
4.5.3. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost Src u primarnim ćelijama glioblastoma	51
4.6. Interakcija Src tirozin-kinaznih inhibitora sa P-glikoproteinom u rezistentnim ćelijama glioblastoma	52
4.7. Reverzija rezistencije na paklitaksel	55
5. DISKUSIJA	57
5.1. Src tirozin-kinazni inhibitori smanjuju vijabilnost ćelija glioblastoma	58
5.2. Src tirozin-kinazni inhibitori sprečavaju invaziju ćelija glioblastoma	58
5.3. Si306 i pro-Si306 menjaju Src-posredovanu signalizaciju u ćelijama glioblastoma	60
5.4. Src tirozin-kinazni inhibitori modulišu višestruko-rezistentan fenotip ćelija glioblastoma	62
6. ZAKLJUČCI	64
7. LITERATURA	66

1. UVOD

1.1. Opšte odlike malignih tumora

Masa ćelija koju karakteriše nekontrolisana deoba predstavlja neoplazmu, tj. tumor. Tumori se dele na benigne i maligne. Za razliku od benignih tumora koji se ne šire po organizmu, maligne tumore karakteriše agresivnost i migracija u vidu invazije okolnog tkiva i metastaziranja u udaljena tkiva (Motofei, 2018). Maligni tumori se odlikuju pojavom genskih mutacija koje dovode do aktivacije onkogenih ili inhibicije tumor-supresorskih gena. Promene u obe klase ovih gena u humanim i životinjskim ćelijama dovode do nastanka malignih tumora (Kontomanolis i sar., 2020). Razumevanje tumorogeneze nam omogućava napredak u razvoju novih uspešnijih terapeutika.

Napredak u molekularnoj biologiji i razvoj sofisticiranih tehnika za proučavanje mehanizama kancerogeneze doveli su do unapređivanja našeg znanja i evolucije koncepata koji objašnjavaju transformaciju normalnih ćelija u tumorske. Prvo je predloženo da je nastanak malignih tumora povezan sa pojavom šest ćelijskih odlika (Hanahan i Weinberg, 2000):

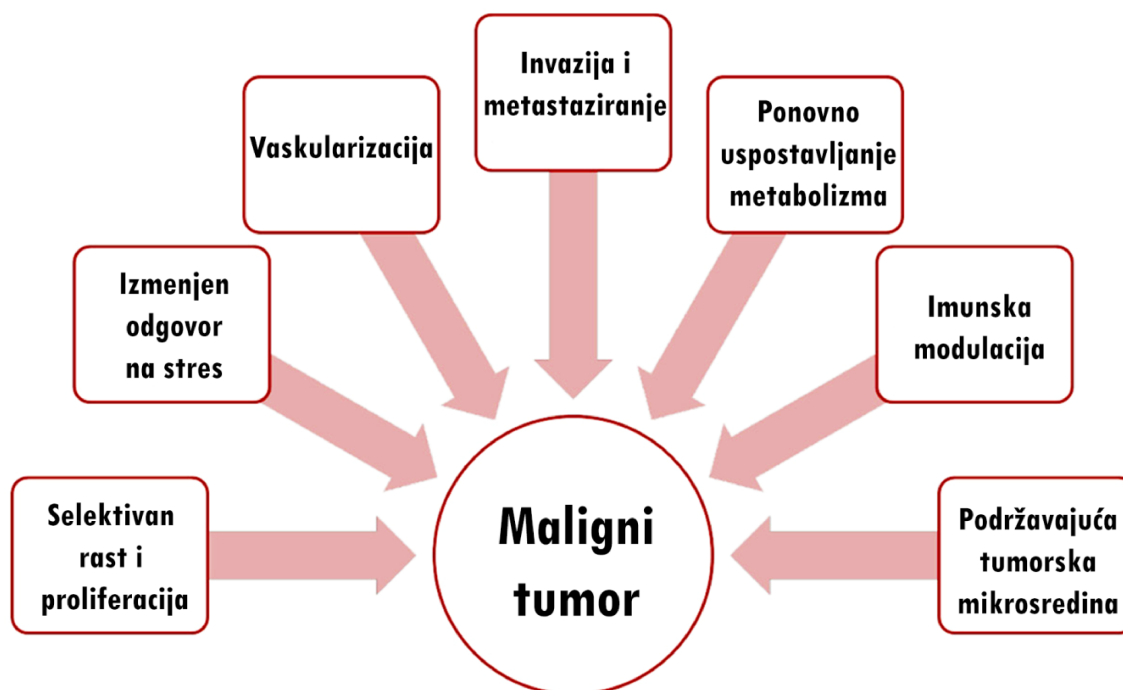
- 1) Samostalna regulacija proliferacije
- 2) Neosetljivost na signale koji inhibiraju proliferaciju
- 3) Izbegavanje programirane ćelijske smrti (apoptoze)
- 4) Neograničen replikativni potencijal
- 5) Tumorska angiogeneza
- 6) Invazija normalnog tkiva i metastaze

Ove odlike potpomažu mehanizme samoodrživosti tumorskih ćelija. Prethodno naveden koncept je proširen sa još 4 dodatne osobine koje su neophodne za transformaciju ćelija (Hanahan i Weinberg, 2011):

- 7) Genomska nestabilnost i mutacije
- 8) Reprogramiranje energetskeg metabolizma ćelije
- 9) Izbegavanje imunskog odgovora
- 10) Tumor-promovišući inflamatorni odgovor

Uzimajući u obzir tumorsku mikrosredinu i njen uticaj na dalji razvoj malignih tumora, najnoviji koncept je proširen na procese koji pored toga što dovode do transformacije fenotipski normalnih ćelija u maligne, utiču i na širenje malignih ćelija na račun normalnog tkiva (Fouad i Aanei, 2017) (Slika 1):

- 1) selektivan rast i proliferacija
- 2) izmenjen odgovor na stres
- 3) vaskularizacija
- 4) invazija i metastaziranje
- 5) ponovno uspostavljanje metabolizma
- 6) podržavajuća tumorska mikrosredina
- 7) imunska modulacija



Slika 1. Mehanizmi transformacije normalnih u maligne ćelije. Preuzeto i izmenjeno prema (Fouad i Aanei, 2017).

Kod malignih tumora narušena je regulacija proliferacije ćelija, koja je pod kontrolom signalnih molekula, faktora rasta i odgovarajućih receptora, kao i citosolnih molekula, koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa. Do progresije malignih tumora dolazi usled prekomerne produkcije faktora rasta, koji ostvaruju autokrino ili parakrino dejstvo, kao i usled smanjenje produkcije faktora koji inhibiraju rast (Thandapani, 2019). Receptori faktora rasta takođe mogu biti povišeno eksprimirani ili konstitutivno aktivni (Rutkowska i sar., 2019). Tokom maligne transformacije, ćelije prolaze kroz različite tipove stresa kao što su nekontrolisana signalizacija, oštećenje DNK, hipoksija ili nedostatak nutrijenata. Da bi odgovorile na ove izazove, ćelije mogu inicirati različite procese, a nepovratno oštećena ćelija može ući u proces ćelijske smrti. U malignim ćelijama ovi regulatorni mehanizmi su utišani, što dovodi do preživljavanja i umnožavanja oštećenih ćelija (Fouad i Aanei, 2017).

Ćelije malignih tumora uspostavljaju višestruke mehanizme popravke kao odgovor na DNK oštećenja. Kod tumora dolazi i do kompenzatornih mehanizama, u slučaju nedostataka osnovnih puteva za popravku DNK (Baretti i Le, 2018). Kada maligna transformacija dovede do ćelijskog stresa koji uključuje DNK oštećenja koja nije moguće popraviti, nekontrolisanu proliferaciju, ali i odvajanje od vanćelijskog matriksa, trebalo bi da dođe do programirane ćelijske smrti, tj. apoptoze (Lopez i Tait, 2015). Ipak, u malignim ćelijama je narušena ravnoteža između ćelijske proliferacije i ćelijske smrti. Apoptoza može biti pokrenuta na dva načina. Spoljašnji put aktivacije apoptoze uključuje interakciju između receptora na površini ćelije sa njihovim ligandima, dok unutrašnji put uključuje prepoznavanje i razlikovanje nivoa stresa u ćeliji koji su dovoljni da dovedu do ovog tipa ćelijske smrti. Oba načina regulacije apoptoze uključuju enzime kaspaze, koji mogu dovesti do ćelijske smrti za nekoliko minuta (Koff i sar., 2015; Lopez i Tait, 2015).

Autofagija predstavlja proces recikliranja unutarćelijskih komponenata. Fiziološki smisao autofagije je provera kvaliteta ćelijskih komponenti i uklanjanje pogrešno upakovanih proteina i

oštećenih organela (Galluzzi i sar., 2015). U procesu suzbijanja tumorogeneze, autofagija učestvuje u eliminaciji oštećenih mitohondrija, degradaciji prekomerno eksprimiranih proteina, imunskom nadzoru ćelija i odbrani protiv potencijalnih kancerogenih bakterija i virusa. Takođe, neki podaci ukazuju da autofagija učestvuje i u ćelijskom preživljavanju i progresiji tumora. Ona tada omogućava tumorima preživljavanje jakog metaboličkog stresa i hipoksije, izbegavanje imunskog nadzora i doprinosi invazivnim i metastatskim osobinama tumora (Mowers i sar., 2017).

Senescencija ili ireverzibilno ćelijsko mirovanje predstavlja još jedan mehanizam odbrane ćelije od unutrašnjih stresora i karakteriše se nepovratnim izlaskom iz ćelijskog ciklusa (Calcinotto i sar., 2019). Senescencija se javlja usled skraćivanja telomera nakon iscrpljivanja replikativnog potencijala ćelije. Skraćivanje telomera predstavlja univerzalnu osobinu prelaska benignih u pre-maligne lezije. Da bi se ćelijski ciklus nastavio potrebno je prevazići problem skraćivanja telomera, što se dešava u potpuno transformisanim malignim ćelijama koje na taj način izbegavaju proces senescencije (Shay, 2016).

Jedna od osnovnih osobina malignih tumora je njihova sposobnost da invadiraju u okolno normalno tkivo i da migriraju do udaljenih mesta, gde formiraju sekundarne tumore – metastaze (Suhail i sar., 2019). Da bi ćelije malignih tumora dospele do udaljenih mesta, one najpre invadiraju kroz vanćelijski matriks (uključujući bazalnu membranu i stromalne ćelije), intravadiraju u krvne sudove tumorskog tkiva, transportuju se cirkulacijom, ekstravadiraju u parenhim udaljenih organa i “nastanjuju se” u stranoj mikrosredini, stvarajući mikrometastaze. Mikrometastaze mogu kasnije prerasti u klinički relevantne makrometastaze koje kolonizuju tkivo drugog organa (Massague i Obenauf, 2016). Paralelno sa invazijom okolnog tkiva dešava se razlaganje vanćelijskog matriksa, u kome ključnu ulogu imaju metaloproteinaze matriksa (MMP). Ovi endopeptidi pored toga što su važni u procesu invazije malignih ćelija, doprinose i ćelijskoj proliferaciji, preživljavanju, imunskom odgovoru, kao i angiogenezi (Shuman Moss i sar., 2012). MMP su pozitivno regulisane u skoro svim tipovima malignih tumora (Winer i sar., 2018), a ekspresija MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 i MMP-12 je povezana sa lošijom kliničkom slikom pacijenata (Hadler-Olsen i sar., 2013).

Intravazacija, do koje dolazi nakon prolaska ćelija kroz vanćelijski matriks, predstavlja prolazak invazivnih ćelija u lumen krvnih sudova (Zavyalova i sar., 2019). Kada se jednom nađu u cirkulaciji, tumorske ćelije moraju proći kroz različite procese prilagođavanja, kako bi opstale u krvnom sudu (Alix-Panabieres i Pantel, 2016). Kada tumorske ćelije dospeju u cirkulaciju, one postaju zarobljene u malim krvnim sudovima gde nastavljaju da rastu što vodi pucanju krvnog suda, ili iniciranju ekstravazacije (Massague i Obenauf, 2016). Pojedini organi, kao što su jetra i kostna srž, imaju visoko propustljive sinusoidne krvne sudove, pa su samim tim pogodniji za metastaziranje od drugih organa (Lorusso i Rüegg, 2012). S obzirom na to da je mesto ekstravazacije udaljeno od primarnog tumora i mikrotumorske sredine koja omogućava lakši prolazak kroz krvni sud, ekstravazacija je zahtevniji proces od intravazacije (X. Cheng i Cheng, 2021). Različiti sistemski signali doprinose pripremanju sekundarnog mesta za tumorske ćelije. Ovaj proces se može javiti i dosta ranije pre diseminacije tumorskih ćelija stvarajući, tzv. pre-metastatsku nišu (Zeeshan i Mutahir, 2017). Nastajanje ove nove sredine stimulišu faktori koje stvara i sekretuje sam tumor, kao i ćelije nastale u kostnoj srži. U slučaju da se odloži priprema nove tumorske niše dolazi do prelaska tumorskih ćelija u dormantno stanje (stanje mirovanja). Dormantne ćelije se mogu naći posle dugog vremena u kostnoj srži mnogih pacijenata kod kojih je došlo do odstranjivanja primarnih tumora. Ove ćelije mogu biti odgovorne za javljanje recidiva (Y. Liu i Cao, 2016). Dormantne ćelije koje su sposobne da se dalje izmene i metastaziraju, tj. kolonizuju novo tkivo poseduju osobine matičnih ćelija koje omogućavaju dalji rast i preživljavanje malignih tumora (Celia-Terrassa i Kang, 2016).

1.2. Ciljana terapija malignih tumora

Tradicionalni pristup u terapiji tumora je baziran na radioterapiji koja cilja sve ćelije koje se nalaze u tumoru i njegovom okruženju, ili hemioterapiji koja cilja sve ćelije u procesu rasta i deobe. Oba pristupa dovode i do smrti normalnih ćelija (Baudino, 2015). Ovim pristupima se često ne uklanjaju u potpunosti sve tumorske ćelije, što dovodi do rezistencije na terapiju i stvaranja još agresivnijih oblika malignih tumora (Y. T. Lee i sar., 2018). Pored toga, pacijenti nakon terapije imaju brojna neželjena dejstva koje utiču na njihov kvalitet života. Ova dva tipa lečenja malignih tumora se mogu koristiti u različitim kombinacijama. Neoadjuvantna terapija predstavlja prvo primenu hemioterapije, pa zračenja pre hirurškog odstranjivanja tumora. Ovaj tretman dovodi do smanjivanja tumora radi lakšeg hirurškog odstranjivanja i većeg procenta preživljavanja pacijenata nakon terapije (Wang i Mao, 2020). Pored toga, postoji adjuvantna terapija koja se primenjuje nakon hirurškog odstranjivanja tumora da bi se odstranile potencijalne zaostale tumorske ćelije u normalnom tkivu (Rebuzzi i sar., 2020). Na kraju, istovremena terapija predstavlja primenu radioterapije i hemioterapije zajedno bez hirurške intervencije (Le Rhun i sar., 2019).

Zbog nespecifičnosti standardnih terapija, javila se potreba za razvijanjem lekova koji poseduju selektivnost ka tumorskim ćelijama, bez pojave neželjenih dejstava. Tako je došlo do razvoja ciljane terapije malignih tumora.

Molekularna ciljana terapija predstavlja upotrebu lekova ili drugih supstanci koji ciljaju specifične molekule radi suzbijanja rasta i širenja ćelija malignih tumora (Y. T. Lee i sar., 2018). Identifikacija potencijalnih meta ključna je za razvoj ciljane terapije. Osnovu stvaranja malignih tumora predstavljaju promene u ekspresionim profilima enzima i receptora koji učestvuju u preživljavanju i proliferaciji tumorskih ćelija, stoga ove specifične izmene predstavljaju dobre ciljeve za razvoj ovog tipa terapije (Røsland i Engelsen, 2015). Ciljni molekuli se mogu odrediti sekvenciranjem genoma koje omogućava otkrivanje promena u genskoj ekspresiji malignih u odnosu na normalne ćelije (E. Y. Zhao i sar., 2019).

Ciljana terapija malignih tumora zasniva se na primeni specifičnih agenasa ili na genskoj terapiji. Agensi koji se koriste u ciljanoj terapiji malignih tumora klasifikuju se na male molekule, monoklonska antitela i imunoterapijske vakcine (Y. T. Lee i sar., 2018). Ovi agensi mogu da blokiraju signale koji dovode do ćelijskog rasta, utiču na regulaciju ćelijskog ciklusa i/ili dovode do ćelijske smrti malignih ćelija (Padma, 2015). Zbog svoje specifične aktivnosti, agensi mogu da spreče progresiju tumora i invazivnost, ali i rezistenciju, kada se koriste u kombinaciji sa klasičnim hemioterapeuticima (Gotwals i sar., 2017).

1.2.1. Tirozin-kinaze kao mete ciljane terapije malignih tumora

Najzastupljenije kandidate za ciljanu terapiju malignih tumora u kliničkim studijama čine mali molekuli (Y. T. Lee i sar., 2018). To su organska jedinjenja male molekulske mase, usled čega imaju poboljšanu sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu i interakciju sa metama unutar ćelije (Roskoski, 2019).

Protein kinaze (PK) predstavljaju jednu od najvećih familija proteina koja obuhvata 518 članova. Ova familija proteina reguliše brojne ćelijske i biološke procese kao što su proliferacija, preživljavanje, ćelijski ciklus, diferencijacija, migracija, međućelijska komunikacija, morfogeneza i metabolizam (Beretta i sar., 2017). PK katalizuju prenos γ -fosfatne grupe sa ATP na hidroksilnu grupu serina, treonina ili tirozina njihovih proteinskih supstrata. Ovakve post-translacione

modifikacije menjaju enzimsku aktivnost supstrata u odgovoru na spoljašnje i unutrašnje signale. U zavisnosti na kojoj aminokiselini fosforilišu hidroksilnu grupu, PK se dele na tirozin-kinaze, tirozin-kinazama slične enzime i serin/treonin kinaze (Jha i sar., 2020). Takođe, familija PK obuhvata i enzime poput MEK1/2 koji katalizuju fosforilaciju i tirozinskih i treoninskih ostataka supstrata. Zbog toga se MEK1/2 i njima slični enzimi klasifikuju kao dvojno specifične PK (Roskoski, 2021).

Zbog svoje uloge u kancerogenezi, tirozin-kinaze predstavljaju najčešće mete ciljane terapije. Ova podfamilija enzima učestvuje u regulaciji osnovnih ćelijskih funkcija, kao što su diferencijacija, odgovor na stres, apoptoza, preživljavanje i proliferacija, ekspresija gena i imunski odgovor (Du i Lovly, 2018). Mnogi mali molekuli imaju sposobnost da inhibiraju tirozin-kinaze i na taj način dovode do blokade signalnih puteva koji nisu pravilno regulisani tokom kancerogeneze. Tirozin-kinaze mogu biti receptorske i ne-receptorske. Receptori spregnuti sa aktivnošću tirozin-kinaze ili tirozin-kinazni receptori (engl. *receptor tyrosine kinase*- RTK) čine grupu membranskih receptora za faktore rasta, citokine i hormone, čiji unutarćelijski domen poseduje intrinzičnu aktivnost tirozin-kinaze, koja se aktivira nakon vezivanja liganda. Konstitutivna aktivnost ovih receptora, najčešće usled genskih mutacija, dovodi do maligne transformacije i proliferacije tumora. (Trenker i Jura, 2020). Ne-receptorske tirozin-kinaze su solubilni enzimi ili enzimi vezani za unutrašnju stranu ćelijske membrane, koji se aktiviraju nakon vezivanja liganda za receptor, i iniciraju unutarćelijske signalne kaskade. Povećana aktivnost ne-receptorskih tirozin-kinaza uzrokovana genskim mutacijama može biti odgovorna za rast i progresiju tumora, pojavu rezistencije na lekove, stvaranje metastaza i neovaskularizaciju tumora (Cirotti i sar., 2020).

Tirozin-kinazni inhibitori (TKI) su mali molekuli koji se kompetitivno vezuju za ATP-vezujuće mesto na tirozin-kinazi i na taj način direktno inhibiraju njenu enzimsku aktivnost (Y. T. Lee i sar., 2018). Nakon vezivanja za svoju metu, TKI inaktiviraju specifičnu tirozin-kinazu i sprečavaju nishodnu signalizaciju (Baudino, 2015). Na ovaj način ciljana terapija tirozin-kinaznim inhibitorima utiče na same maligne ćelije, inhibirajući njihovu proliferaciju i promovišući apoptozu, ali može ciljati i tumorsko mikrokruženje posredno utičući na angiogenezu i invaziju tumorskih ćelija i stvaranje metastaza (Krchniakova i sar., 2020).

Najčešće mete ciljane terapije malignih tumora uključuju sledeće tirozin-kinaze:

Receptor epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor receptor* - EGFR) i **humanog epidermalnog faktora rasta – 2** (engl. *human epidermal growth factor receptor 2* - HER2). EGFR je transmembranski tirozin-kinazni receptor uključen u širok spektar procesa u ćeliji, uključujući ćelijski rast, proliferaciju, preživljavanje, migraciju i invaziju (Rutkowska i sar., 2019). Ekspresija i aktivacija EGFR su nepravilno regulisane u najvećem broju epitelijalnih tumora zbog čega je EGFR dobra meta za ciljanu terapiju (Sigismund i sar., 2018). HER2 je prekomerno ekspimiran u karcinomima dojke i povezan je sa agresivnijim formama maligniteta, tako što pozitivno utiče na proliferaciju, angiogenezu i invazivnost malignih ćelija, što čini HER2 idealnom metom za ciljanu terapiju (Loibl i Gianni, 2017). **Iresa** (gefitinib, AstraZeneca) je mali molekul koji specifično cilja ATP-vezujuće mesto na EGFR proteinu. Na taj način gefitinib efikasno sprečava aktivaciju ove tirozin-kinaze i posledično ćelijski rast (Ma i sar., 2015). Ovaj inhibitor je odobren za tretman metastatskog nesitnoćelijskog karcinoma pluća (Baudino, 2015). **Tikerb** (lapatinib, GlaxoSmithKline) je mali molekul i inhibitor EGFR i HER2 proteina. Lapatinib inhibira vezivanje ATP-a za ATP-vezujuće mesto na HER2 i tako sprečava posledičnu kaskadu fosforilacije (Voigtlaender i sar., 2018), blokirajući na taj način signalne puteve PI3K i RAS/MAPK (Xuhong i sar., 2019).

Receptor vaskularnog endotelskog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor receptor* - VEGFR). VEGF je jedan od najviše proučavanih faktora angiogeneze (Ferrara i Adamis, 2016). Receptori VEGF su receptorske tirozin-kinaze, koje se aktiviraju unakrsnom fosforilacijom nakon vezivanja liganda (Ferrara i Adamis, 2016). Aktivacija VEGFR-2 receptora dovodi do povećanja vaskularne permeabilnosti, kao i migracije i proliferacije ćelija (Peach i sar., 2018) što čini ovu tirozin-kinazu dobrom metom za terapiju malignih tumora. Nekoliko malih molekula koji ciljaju VEGFR prošlo je kroz različite faze prekliničkih i kliničkih ispitivanja (Aprile i sar., 2015). **Neksavar** (sorafenib, Bayer HealthCare) je mali molekul koji cilja i VEGFR-2 i VEGFR-3, ali i c-Kit i PDGFR- β (Escudier i sar., 2019). Neksavar je odobren od strane Američke uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug administration* – FDA) za tretman hepatocelularnog inoperabilnog karcinoma (D. W. Kim i sar., 2017), kao i uznapređovalog karcinoma bubrežnih ćelija (Escudier i sar., 2019). Ovaj mali molekul inhibira RAF/MEK/ERK signalni put kroz interakciju sa kinaznim domenom VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit i PDGFR- β (Escudier i sar., 2019).

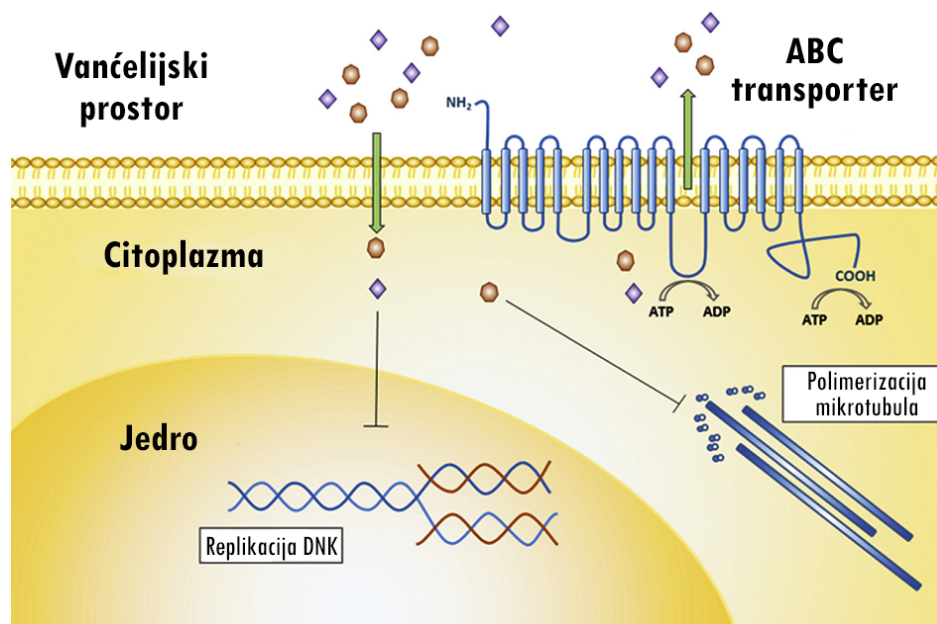
Ciljni molekul rapamicina kod sisara (engl. *mammalian target of rapamycin* - mTOR). mTOR je tirozin-kinaza uključena u regulaciju citoskeleta, ćelijskog rasta i proliferacije i kataboličkih procesa (Hua i sar., 2019). Pored toga, mTOR predstavlja tačku ukrštanja nekoliko signalnih puteva, uključujući i put homologa fosfataze i tenzina (engl. *phosphatase and tensin homolog* - PTEN) (Sun, 2021). Gubitak funkcije PTEN dovodi do aktivacije signalnog puta PI3K/AKT/mTOR, što stimulira ćelijsku deobu. Signalni put PI3K/AKT/mTOR je prekomerno aktivan u različitim malignim tumorima, uključujući tumore mozga, bešike, dojke, pluća, prostate, štitaste žlezde i bubrega (Hua i sar., 2019), zbog čega se pojavila potreba za ciljanjem mTOR tirozin-kinaze u terapiji malignih tumora. Analog rapamicina **Torisel** (temsirolimus, Wyeth Research) je mali molekul i inhibitor mTOR koji se koristi u terapiji karcinoma bubrežnih ćelija (Hua i sar., 2019). Rezultati faze III kliničkih ispitivanja ukazali su da terapija toriselom povećava preživljavanje pacijenata u odnosu na one koji su primali interferon alfa-2a (Roferon-A, Roche) (Baudino, 2015). **Certikan** (everolimus, Novartis), lek sličan toriselu koji cilja mTOR, pokazao se kao još jedan uspešan inhibitor progresije karcinoma bubrežnih ćelija, ali i u terapiji neuroendokrino tumora pankreasa i uznapređovalog raka dojke (Hua i sar., 2019).

BCR-ABL1 je proteinska himera uslovljena fuzijom genskom sekvencom *BCR-ABL1*, koja se nalazi na abnormalnom hromozomu 22 kod gotovo svih pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. Ova genska translokacija uslovljava konstitutivnu aktivaciju ABL1 tirozin kinaze, što uslovljava nekontrolisanu proliferaciju mijeloidnih ćelija. Lekovi koji ciljaju ovaj kompleks predstavljaju jedan od najvećih uspeha ciljne terapije (Braun i sar., 2020). **Glivek** (imatinib mesilat, Novartis) je mali molekul koji se vezuje za tirozin-kinazni domen BCR-ABL1 i narušava tirozin-kinaznu aktivnost ovog proteinskog kompleksa (Flynn i Gerriets, 2021), a slabo interaguje sa drugim tirozin-kinazama. Budući da je BCR-ABL1 translokacija prisutna kod većine pacijenata sa hroničnom mijeloidnom leukemijom, tretman glivekom dovodi do pozitivnog odgovora kod 98% pacijenata (Baudino, 2015). Tirozin-kinazni inhibitor **Spricel** (dasatinib, Bristol-Myers Squibb) je mali molekul koji svoju funkciju inhibitora postiže na sličan način kao glivek, tako što kompetira za ATP-vezujuće mesto tirozin-kinaznog domena BCR-ABL1 kompleksa. Dasatinib je preporučan pacijentima koji su razvili rezistenciju na glivek. Takođe, za razliku od gliveka, dasatinib ima širi spektar meta i inhibira tirozin-kinaze iz Src familije, c-Kit, PDGFR- β i EphA2 (Rossari i sar., 2018).

1.2.2. Interakcija tirozin-kinaznih inhibitora sa ABC transporterima

ATP-vezujući transporteri (engl. *ATP-binding cassette* – ABC) su membranski glikoproteini koji koristeći energiju hidrolize ATP-a, izbacuju strane supstance i ksenobiotike iz ćelija (Slika 2).

ABC transporteri imaju fiziološku ulogu u transportu mnogih tipova molekula, uključujući aminokiseline, holesterol, hidrofobne lekove i antibiotike (X. Liu i sar., 2019). Takođe, imaju bitnu ulogu u održavanju tkivnih barijera, kao što je krvno-moždana barijera (KMB) (Liebner i sar., 2018), ali se mogu naći i u endotelskim ćelijama posteljice, gastrointestinalnog trakta, bubrega i jetre (Chatuphonprasert i sar., 2018; Jetter i Kullak-Ublick, 2020; Shekhawat i Pokharkar, 2017; X. Yang i Han, 2019). Istaknuta grupa humanih ABC transportera koja se najčešće dovodi u vezu sa rezistencijom na lekove kod malignih tumora uključuje P-glikoprotein (P-gp) (engl. *multidrug resistance protein 1* - MDR1, ABCB1), MRP1 (engl. *multidrug resistance associated protein 1*, ABCC1) i BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*, ABCG2). Ovi transporteri su odgovorni za izbacivanje brojnih supstanci iz tumorskih ćelija (X. Liu i sar., 2019) i njihova povišena ekspresija dovodi do rezistencije na različite lekove (Amawi i sar., 2019). P-gp transporter, koji je kodiran *MDR1* genom, je lociran na ćelijskoj membrani rezistentnih tumorskih ćelija, gde izbacuje anti-tumorske lekove na ATP-zavisan način (Da Ros i sar., 2018), a pored toga se nalazi i u krvnim sudovima koji snabdevaju humane glioblastome i metastatske tumore mozga (Da Ros i sar., 2018).



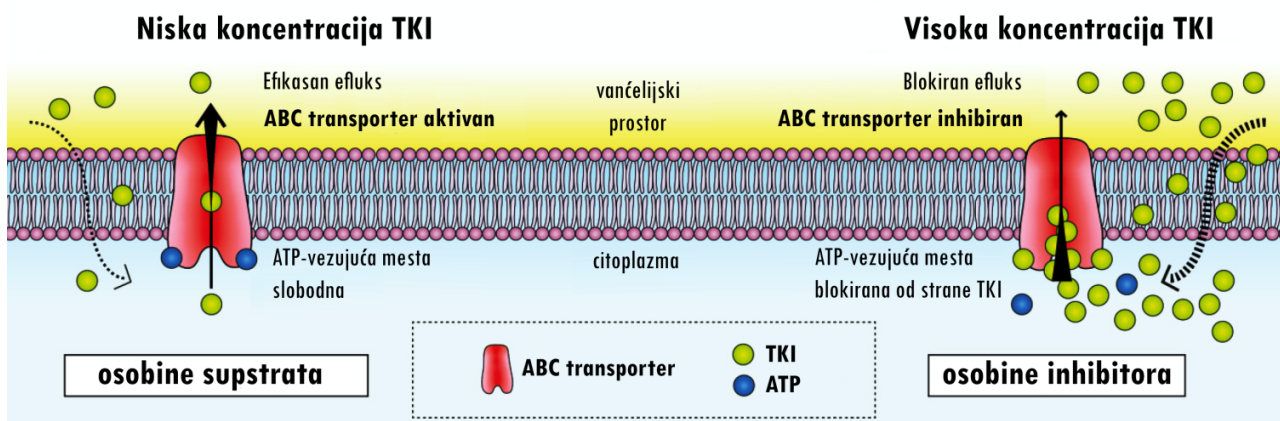
Slika 2. Višestruka rezistencija na lekove posredovana ATP-vezujućim (ABC) transporterima. ABC transporteri predstavljaju ATP-zavisne pumpe koje izbacuju različite hemioterapeutike (simboli narandžaste i ljubičaste boje) u vanćelijski prostor i onemogućavaju im da ispolje svoju funkciju što smanjuje efikasnost terapije. ABC transporteri su povišeno ekspimirani ćelijama malignih tumora i na ovaj način dovode do višestruke rezistencije na lekove. Preuzeto i izmenjeno prema (Uribe i sar., 2017).

Primena tirozin-kinaznih inhibitora u terapiji malignih tumora može dovesti do višestruke rezistencije na lekove (engl. *multidrug resistance* - MDR) (Beretta i sar., 2017). MDR se definiše kao rezistencija ćelija malignih tumora na više od jednog hemioterapeutika koji su strukturno različiti i imaju različite mehanizame delovanja. Višestruka rezistencija ćelija tumora na lekove može biti urođena ili stečena. Urođena rezistencija se javlja usled genskih promena koje dovode do nastanka malignih tumora i prisutna je pre primene anti-tumorske terapije, dok se stečena rezistencija razvija tokom terapije (Kartal-Yandim i sar., 2016).

Pošto ABC transporteri imaju sposobnost da prepoznaju i transportuju različite molekule kroz biološke membrane, prekomerna ekspresija ovih transportera može da utiče na farmakokinetiku TKI, uključujući njihovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam, izlučivanje ili toksičnost (S. Wu i Fu, 2018). Naime, neki TKI predstavljaju supstrate ABC transportera (Eadie i sar., 2018; W. Li i sar., 2018; H. Zhao i sar., 2018), što dovodi do njihovog izbacivanja iz ćelije i uzrokuje smanjenu terapijsku efikasnost i/ili rezistenciju koja nastaje tokom njihove primene (Krchniakova i sar., 2020). Na primer, ABCA3 transporter štiti matične ćelije leukemije od dejstva dasatiniba, imatiniba i nilotiniba koji ciljaju BCR-ABL kinazu. Dejstvo ovih inhibitora dovodi do dozno-zavisnog povećanja ekspresije *ABCA3*, što pomaže njihovom izbacivanju iz ćelija. Ipak, kombinacija ovih TKI sa COX2 inhibitorom indometakinom, smanjuje ekspresiju *ABCA3* i dovodi do anti-tumorskog efekta (Hupfeld i sar., 2013). Gefitinib takođe indirektno povećava ekspresiju *ABCG2* (Beretta i sar., 2017). Ciljanje EGFR tirozin-kinaze gefitinibom dovodi do translokacije EGFR u jedro ćelije, gde utiče na promotor *ABCG2* gena povećavajući njegovu ekspresiju (Krchniakova i sar., 2020).

Pored toga što mogu biti supstrati za ABC transportere, TKI mogu biti i njihovi inhibitori (Krchniakova i sar., 2020). Slično njihovoj interakciji sa tirozin-kinazama, TKI mogu da blokiraju ATP-vezujuće mesto na transporteru, sprečavajući njegovu fosforilaciju i inhibirajući izbacivanje supstrata (Mi i sar., 2010; G. N. Zhang i sar., 2017; H. Zhang i sar., 2014). TKI obično direktno inhibiraju ABC transportere, bez uticaja na njihovu ekspresiju i lokalizaciju (Krchniakova i sar., 2020; H. Zhang i sar., 2014). Takođe, TKI mogu biti supstrati ili inhibitori ABC transportera i u zavisnosti od koncentracije u kojoj se primenjuju i njihovog afiniteta za specifičan ABC transporter (Slika 3). U niskim koncentracijama, TKI najčešće predstavljaju supstrate ABC transportera, dok u višim, ali farmakološki značajnim koncentracijama mogu imati sposobnost inhibicije ovih transportera (Krchniakova i sar., 2020).

Kada TKI inhibiraju ABC transportere, njihovi supstrati se više ne izbacuju iz ćelije i samim tim raste koncentracija supstrata u ćelijama sa MDR fenotipom (Krchniakova i sar., 2020). *In vitro* studije su pokazale da mnogi TKI povećavaju unutarćelijsku akumulaciju supstrata ABC transportera rodamina 123 ili doksorubicina u rezistentnim ćelijama (Shukla i sar., 2009; Tiwari i sar., 2013). TKI koji ujedno inhibiraju i ABC transportere mogu prevazići višestruku rezistenciju na lekove i učiniti tumorske ćelije ponovo osetljivim na delovanje standardnih hemioterapeutika, kao i drugih TKI. Tako na primer, kombinovani tretman dasatinibom, supstratom P-gp transportera, i nilotinibom, P-gp inhibitorom, ima sinergističko dejstvo u rezistentnim ćelijama leukemije (Hiwase i sar., 2010). Takođe, *in vivo* studije u mišjem modelu su pokazale da kombinacija TKI sa tradicionalnim hemioterapeuticima efikasnije sprečava rast ksenografta tumorskih ćelija nego pojedinačni tretmani (Kathawala i sar., 2014; Minocha i sar., 2012; X. Q. Zhao i sar., 2012). Pored toga, erlotinib, inhibitor P-gp i ABCG2 transportera, povećava propustljivost pazopaniba kroz krvno-moždanu barijeru (Minocha i sar., 2012).

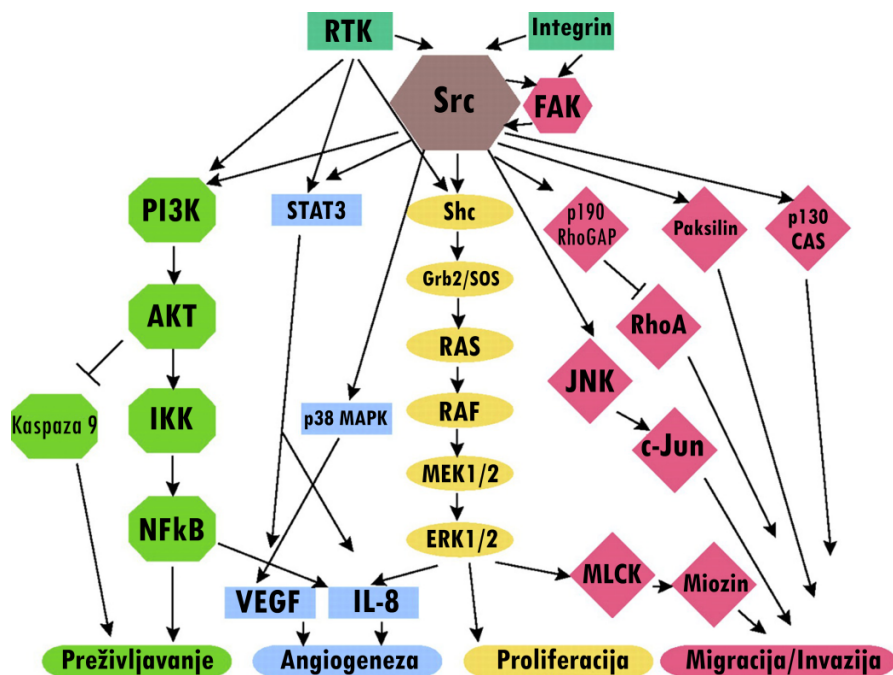


Slika 3. Transport tirozin-kinaznih inhibitora ATP-vezujućim (ABC) transporterima. Tirozin-kinazni inhibitori (TKI) u niskim koncentracijama pokazuju osobine supstrata ABC transporterera. Tirozin-kinazni inhibitori u visokim koncentracijama pokazuju osobine inhibitora ABC transporterera. Preuzeto i izmenjeno prema (Kretniakova i sar., 2020).

1.2.3. Potencijal inhibicije Src tirozin-kinaze u terapiji malignih tumora

Src tirozin-kinaza (poznata i kao c-Src) je membranska ne-receptorska tirozin-kinaza i član familije Src tirozin-kinaza (engl. *Src family kinase* - SFK) koje regulišu ćelijsku proliferaciju, preživljavanje, invaziju i angiogenezu (Belli i sar., 2020). Src je važan regulator prenosa signala unutar ćelije od receptora sa površine ćelijske membrane. U normalnim ćelijama integrini aktiviraju Src tirozin-kinazu i fokalnu adhezionu kinazu (FAK) koje formiraju dvojni kinazni kompleks koji potom promoviše ćelijsku pokretljivost, progresiju i preživljavanje (Mitra i Schlaepfer, 2006). Pored toga, Src fosforiliše tirozinske ostatke EGFR i tako povećava mitogeni odgovor ćelije indukovane epidermalnim faktorom rasta (Bagnato i sar., 2020; Z. Chen i sar., 2018). Pored toga što Src utiče na njegovu aktivnost, sam EGFR takođe može da poveća aktivnost Src tirozin-kinaze (Goi i sar., 2000). FAK i EGFR pozitivnim uticajem na aktivaciju Src tirozin-kinaze pozitivno utiču i na nishodne članove Src signalnog puta (Slika 4). Fosforilisan Src dalje vodi ka RAS/RAF/MEK/ERK tj. MAPK signalnoj kaskadi, kao i aktivaciji PI3K/AKT signalnog puta što pozitivno utiče na preživljavanje, proliferaciju i rast ćelija (Song i sar., 2017). Pored toga, sam aktiviran Src pozitivno utiče na migraciju i invaziju ćelija (Wheeler i sar., 2009).

Src tirozin-kinaza je često nepravilno regulisana u humanim malignim tumorima, a povišena fosforilacija njenih tirozinskih ostataka promoviše ćelijsku transformaciju i tumorogenezu (Hsu i sar., 2020; Jin, 2020; Sirvent i sar., 2020; Voisset i sar., 2020). Povišena aktivnost Src tirozin-kinaze u tumorskim ćelijama je često posledica nepravilno regulisane signalizacije tirozin-kinaznih receptora (Cirotti i sar., 2020). Ovako pozitivno regulisana, tj. aktivna Src tirozin-kinaza može dalje da fosforiliše članove signalnih puteva RTK, čak i u odsustvu faktora rasta (Z. Chen i sar., 2018). Navedene karakteristike čine Src važnom terapijskom metom u lečenju humanih malignih tumora (Sirvent i sar., 2015).



Slika 4. Ushodni i nishodni Src signalni putevi koji dovode do preživljavanja, angiogeneze, proliferacije, migracije i invazije ćelija. Preuzeto i izmenjeno prema (Wheeler i sar., 2009).

Trenutno se u kliničkim studijama nalazi pet ATP-kompetitivnih Src tirozin-kinaznih inhibitora, odobrenih od strane Američke uprave za hranu i lekove za upotrebu u nekoliko različitih tipova malignih tumora, a najviše za lečenje hematoloških maligniteta (Belli i sar., 2020). Ovi Src inhibitori uključuju dasatinib, bosutinib, ponatinib, vandetanib i sarakatanib, a trenutno se ispituju na tumorima pluća, pankreasa, debelog creva i dojke (Belli i sar., 2020).

1.3. Glioblastomi

Glioblastomi su najčešći i najagresivniji maligni tumori mozga. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji glioblastomi su okarakterisani kao tumori mozga gradusa IV. Povezani su sa veoma lošom kliničkom slikom pacijenata čije je prosečno preživljavanje i pored terapije oko 15 meseci (Balca-Silva i sar., 2019). Glioblastomi su tumori neuroektodermalnog porekla koji nastaju od glijskih ćelija, astrocita ili oligodendrocita, ili njihovih manje diferenciranih prekursora (Huse i Holland, 2010).

Prema histološkim osobinama i genetskim promenama glioblastomi se mogu klasifikovati u dva tipa: primarne, koji nastaju *de novo* (Louis i sar., 2016) i sekundarne koji nastaju iz glioblastoma nižeg gradusa (astrocitoma gradusa II i III i oligodendroglioma gradusa II i III) (Aldape i sar., 2015). Najagresivniji su primarni glioblastomi koji poseduju neizrođen gen za izocitrat-dehidrogenazu (IDH) (Louis i sar., 2016; White i sar., 2020). Sekundarni glioblastomi poseduju mutaciju *IDH1/2*, povezanu sa povećanom hipermetilacijom DNK i smanjenom agresivnošću tumora (Khan i sar., 2017; Louis i sar., 2016). *IDH1/2* mutacije se najčešće rano javljaju i zbog toga su češće u sekundarnim glioblastomima (80%) u odnosu na primarne glioblastome (5%) (Balca-Silva i sar., 2019; Jue i McDonald, 2016).

Glioblastome karakteriše morfološka različitost, visok nivo genetskih mutacija, proliferacija, invazivnost i migracija tumorskih ćelija u normalno tkivo, što dovodi do nastanka difuznih,

infiltrirajućih tumora koji ne mogu biti u potpunosti odstranjeni hirurškim putem (Fathi Kazerooni i sar., 2020; Jovčevska, 2019). Invazivnost i migracija ćelija glioblastoma u normalno moždano tkivo, kao i urođena rezistencija ćelija glioblastoma na terapiju su glavni razlozi što je aktuelni pristup lečenju i dalje neuspešan (Ou i sar., 2020). Aktuelna terapija glioblastoma uključuje Stupov protokol koji se nije menjao prethodnih 16 godina i obuhvata hirurško odstranjivanje tumora, nakon kojeg pacijenti primaju terapiju zračenjem i u isto vreme hemioterapiju temozolomidom u periodu od 6 nedelja. Nakon ove terapije, pacijenti u narednih 6 do 12 meseci primaju dodatnu terapiju temozolomidom (Stupp i sar., 2005). Recidivi koji se jave nakon terapije često imaju još agresivniji i rezistentniji fenotip (Campos i sar., 2016). Ponovan nastanak tumora ukazuje na rezistenciju glioblastoma na aktuelnu terapiju i neophodnost razvoja novih terapijskih pristupa u njihovom lečenju.

Genomske studije su pokazale da je jedna od glavnih osobina glioblastoma izmenjena aktivnost EGFR, koji je konstitutivno aktivan u oko 57% glioblastoma (Cirotti i sar., 2020; Rutkowska i sar., 2019). U normalnim uslovima EGFR se aktivira nakon vezivanja liganda, kao što je epidermalni faktor rasta. U glioblastomima je ova regulacija izgubljena i EGFR signalizacija može biti regulisana nezavisno od liganda. Takođe, ekspresija *EGFR* gena može biti uvećana zbog umnožavanja regiona na hromozomu 7 koji uključuje *EGFR* gen, ili može biti konstitutivno aktivna usled specifičnih mutacija. Najzastupljeniji *EGFR* mutant je *EGFR* varijanta (*v*) III, koja ima krnji vanćelijski domen kodiran sekvencom od 2. do 7. egzona i konstitutivno je aktivna nezavisno od epidermalnog faktora rasta (Thorne i sar., 2016). *EGFRvIII*, vodi ka sintezi i stalnoj aktivaciji disfunkcionalnog receptora koji aktivira PI3K (Eskilsson i sar., 2018). PI3K dalje može da aktivira AKT koji pozitivno deluje na rast i preživljavanje ćelija glioblastoma (Balca-Silva i sar., 2019). Delovanje PI3K može biti suzbijeno aktivnošću PTEN tumor supresora (Ludwig i Kornblum, 2017), koji je povezan sa zaustavljanjem progresije ćelijskog ciklusa u G₁ fazi i apoptozom koja se dešava paralelno sa ćelijskom diferencijacijom (Balca-Silva i sar., 2019). Međutim, kod 70% primarnih glioblastoma dolazi do delecije hromozomskog regiona u kom se nalazi *PTEN*. Prethodno opisane mutacije dovode do promena u putevima molekularne signalizacije, a javljaju se u 90% primarnih i oko 10% sekundarnih glioblastoma (Balca-Silva i sar., 2019).

Pored nepravilne regulacije EGFR, glioblastome karakteriše i nepravilna aktivnost ostalih RTK (Cirotti i sar., 2020). U 67,3% glioblastoma je izmenjen bar jedan tirozin-kinazni receptor i u nekim slučajevima se heterogenost glioblastoma može objasniti nepravilnom regulacijom dva različita RTK (Thorne i sar., 2016). S obzirom na to da različiti RTK dele nekoliko nishodnih efekatora koji učestvuju u njihovoj signalizaciji, alternativa ciljanja EGFR u terapiji glioblastoma bi mogla biti identifikacija nekog nishodnog člana signalnih puteva koji aktiviraju RTK, a koji bi odrađovao na terapiju.

Src tirozin-kinaza, uključena u nekoliko signalnih puteva nishodno od RTK, mogla bi biti potencijalna meta ciljanje terapije glioblastoma. Kao i u drugim tumorima, Src podstiče proliferaciju ćelija glioblastoma, tako što prima signale od membranskih proteina kao što su integrini i receptori faktora rasta (Cirotti i sar., 2020). Aktivacija Src tirozin-kinaze dalje dovodi do aktivacije RAS/MAPK i PI3K/AKT puteva koji podstiču preživljavanje, proliferaciju i invaziju ćelija glioblastoma (Matozaki i sar., 2021).

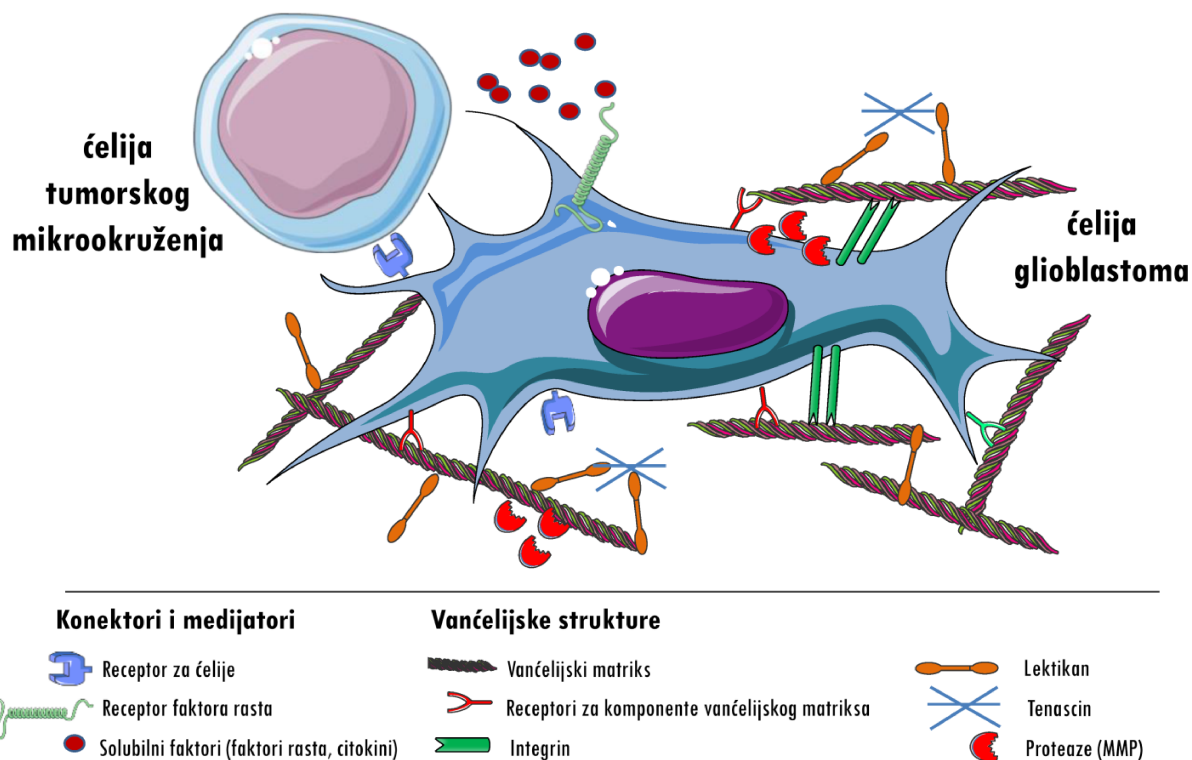
U glioblastomima ne postoje promene u genskoj amplifikaciji i ekspresiji iRNK *Src* gena, kao ni prisustvo mutacija u genima članova SFK, već se smatra da je povišena aktivnost Src tirozin-kinaze posledica povišene aktivacije receptora faktora rasta i integrina na membrani ćelija (Kato, 2020).

1.3.1. Invazivnost glioblastoma

Uprkos radio- i hemioterapiji koje se primenjuju nakon hirurškog odstranjivanja glioblastoma, većina recidiva se javlja na mestu primarnog tumora. To se dešava zato što maligne ćelije, pored toga što ne reaguju na terapiju, pojedinačno invadiraju u okolni normalni moždani parenhim odakle ih je nemoguće hirurški odstraniti (Chouleur i sar., 2020). Iako drugi maligni tumori često metastaziraju tako što se kreću kroz krvotok ili limfni sistem, glioblastomi retko metastaziraju u druge organe. Oni aktivno migriraju kroz perivaskularni prostor koji okružuje krvne sudove i prostor između neurona i glijskih ćelija koji gradi moždani parenhim i traktove bele mase (Paw i sar., 2015). Da bi migrirale, ćelije glioblastoma moraju da steknu pokretljivost i sposobnost razgradnje vanćelijskog matriksa i da ispolje fenotip matičnih ćelija (Paw i sar., 2015).

Ćelije glioblastoma su primarno adherentne i vezane za susedne ćelije kao što su neuroni, astrociti i endotelske ćelije, kao i vanćelijski matriks (Slika 5) (Vollmann-Zwerenz i sar., 2020). Da bi ostvarile pokretljivost, ćelije glioblastoma takođe moraju da komuniciraju sa različitim komponentama vanćelijskog matriksa. Pored fizičke veze koje ćelije glioblastoma ostvaruju sa vanćelijskim matriksom, one s njim komuniciraju i hemijskim putem dovodeći do reorganizacije njegove strukture i sastava (Belousov i sar., 2019). Razgradnja vanćelijskog matriksa zavisi od proteolitičkih enzima koje luče same ćelije glioblastoma, kao što su matriksne metaloproteinaze. Pokazano je da MMP-2 i MMP-9 promovišu invaziju ćelija glioblastoma. Naime, njihova ekspresija je povišena u glioblastomima u odnosu na normalno moždano tkivo i povezana je sa progresijom tumora *in vivo* (Belousov i sar., 2019). MMP-2 i MMP-9 omogućavaju ćelijama glioblastoma da se odvoje od mikrookruženja i povećaju pokretljivost kroz vanćelijski matriks (Chouleur i sar., 2020).

Invazivne ćelije glioblastoma postaju morfološki polarizovane i razvijaju membranska izbočenja, invadopodije, koje im omogućavaju da se kreću napred i tako prolaze kroz vanćelijski matriks. Tokom ovog procesa ćelije glioblastoma menjaju svoj oblik i zapreminu radi kretanja kroz prostore različitih veličina u normalnom moždanom tkivu (Cuddapah i sar., 2014). Dok migriraju kroz moždani parenhim ćelije glioblastoma menjaju i sastav svoje membrane (Picariello i sar., 2019). Takođe, ćelije glioblastoma privlače mikrogliju i astrocite, a endotelne ćelije luče proteaze i pomažu im da povećaju svoju pokretljivost (Schiffer i sar., 2018). Otkriveno je i da mikrotubule imaju značajnu ulogu u komunikaciji ćelija glioblastoma i njihovih susednih ćelija, omogućavajući im dodatnu pokretljivost (Venkataramani i sar., 2019).



Slika 5. Mehanizmi invazije ćelija glioblastoma. Pored ćelija glioblastoma, u proces invazije su uključeni i vanćelijski matriks, receptori, proteaze, solubilni faktori kao i druge ćelije iz njihovog mikrookruženja. Preuzeto i izmenjeno prema (Vollmann-Zwerenz i sar., 2020).

Inhibicija Src tirozin-kinaze u ćelijama glioblastoma smanjuje njihovu invazivnost (Cirotti i sar., 2020). U *in vitro* studijama je pokazna uloga Src tirozin-kinaze u formiranju invadopodija koje razgrađuju vanćelijski matriks i na taj način omogućavaju kretanje tumorskih ćelija. Inhibicija Src tirozin-kinaze dovodi do gubitka aktina u invadopodijama i njihove smanjene aktivnosti (Cirotti i sar., 2020). Da bi ćelije glioblastoma invadirale u normalno tkivo nije dovoljna samo povećana aktivnost Src tirozin-kinaze u ovim ćelijama. Naime, pokazano je da Src signalizacija u normalnom tkivu tj. tumorskom mikrookruženju pomaže invazivnost ćelija glioblastoma u normalno moždano tkivo (Lund i sar., 2006).

Za pojavu invazivnosti su odgovorne i matične ćelije glioblastoma. Ove ćelije su višestruko potentne i poseduju kapacitet iniciranja i samoobnavljanja tumora (Suvà i Tirosh, 2020). Matične ćelije glioblastoma takođe poseduju veći invazivni potencijal od diferenciranih ćelija glioblastoma, a u njihov invazivni fenotip su uključeni unutarćelijski signalni putevi PI3K/AKT i RAS/RAF/MEK/ERK (L. Cheng i sar., 2011; Molina i sar., 2010).

1.3.2. Rezistencija glioblastoma na terapiju

Rezistentan fenotip je jedan od glavnih uzročnika neefikasne terapije glioblastoma (Ou i sar., 2020). Ćelije glioblastoma su rezistentne na veliki broj hemioterapeutika uključujući temozolomid, paklitaksel, karboplatin, etoposid, vinkristin i irinotekan (Jiang i sar., 2014). Ćelije glioblastoma mogu da razviju rezistentan fenotip kao odgovor na terapiju ili mogu da poseduju urođenu

rezistenciju. U oba slučaja izmenjena ekspresija gena koja dovodi do pojave višestruke rezistencije na lekove je povezana sa smanjenim odgovorom tumorskih ćelija na terapiju (Ou i sar., 2020).

Nastanak i razvoj glioblastoma utiče na integritet KMB, ali i pored toga pacijenti sa glioblastomom poseduju intaktne delove KMB koji onemogućavaju anti-tumorskim lekovima da dopru do tumorskih ćelija (Da Ros i sar., 2018). U intaktnim delovima, KMB onemogućava difuziju 98% malih molekula što je omogućeno prisustvom tesne veze endotelskih ćelija kapilara i radom ABC transportera (Sweeney i sar., 2019). Kao posledica povećane ekspresije ABC transportera koja dovodi do MDR fenotipa, anti-tumorski lekovi ne dopiru do ćelija glioblastoma u dovoljnim koncentracijama da bi ispoljili svoju efikasnost (Da Ros i sar., 2018). MDR fenotip uzrokovan prekomernom ekspresijom P-glikoproteina je jedan od glavnih razloga za neuspeh u lečenju glioblastoma (Bukowski i sar., 2020). Dalji napredak u terapiji glioblastoma trebalo bi omogućiti uspešniji način isporuke terapijskih agenasa kroz KMB do tumorskih ćelija.

Heterogenost samih glioblastoma, ali i različitost tumorskog mikrookruženja sa kojim oni uspostavljaju kompleksnu komunikaciju, igra jednu od glavnih uloga u malignitetu, invazivnosti, kao i neuspehu terapije (Da Ros i sar., 2018). Rezistentnom fenotipu glioblastoma doprinosi mikrookruženje koje se sastoji od stromalnih, endotelskih i ćelija imunskog sistema, kao i citokina i faktora rasta, koji dovode do specifičnih uslova kao što su hipoksija ili zakišeljavanje sredine (De Vleeschouwer i Bergers, 2017; Seano, 2018). Interakcija tumorskih ćelija sa glijskim ćelijama je takođe povezana sa rezistentnim fenotipom glioblastoma (G. Li i sar., 2017).

Pored toga što su uključene u invaziju i migraciju, matične ćelije glioblastoma su takođe odgovorne za radio- i hemiorezistenciju (Seano, 2018; Uribe i sar., 2017). Tumorsko mikrookruženje komunicira sa matičnim ćelijama glioblastoma i stimuliše njihov uticaj na razvoj, progresiju i rezistentan fenotip tumora (Prager i sar., 2020). Zbog toga što su izuzetno rezistentne na terapiju, matične ćelije glioblastoma su još jedan bitan uzročnik javljanja recidiva.

1.4. Terapija glioblastoma

Trenutno su tri jedinjenja odobrena od strane Američke uprave za hranu i lekove kao hemioterapeutici u terapiji glioblastoma: bevacizumab, karmustin i temozolomid (Rajaratnam i sar., 2020).

Bevacizumab deluje tako što se selektivno vezuje za VEGF u cirkulaciji, čime inhibira vezivanje VEGF za njegove receptore na ćelijskoj površini. Usled toga je inhibiran nastanak krvnih sudova tumora, što ograničava snabdevanje krvlju tumorskih tkiva (Kazazi-Hyseni i sar., 2010). Karmustin se vezuje za molekule DNK i RNK, što onemogućava njihovu replikaciju odnosno, transkripciju, kao i sintezu proteina (Xiao i sar., 2020). Ovaj terapeutik se takođe vezuje za i modifikuje glutation-reduktazu što dovodi do ćelijske smrti. Temozolomid je alkilirajući agens koji izaziva citotoksičnost, tako što indukuje formiranje O⁶-metilguanina (O6MeG) koji uzrokuje dvolančane prekide tokom replikacije DNK, zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G₂/M fazi i apoptozu (Strobel i sar., 2019).

Stupov protokol je trenutno najzastupljeniji vid lečenja glioblastoma (Stupp i sar., 2005), ali zbog urođene rezistencije glioblastoma na temozolomid vrlo često se javljaju recidivi (Ou i sar., 2020). Jedan od prvih otkrivenih mehanizama rezistencije glioblastoma na temozolomid je povišena aktivnost enzima za popravku DNK, O6MeG-DNK metiltransferaze (engl. *O6 methylguanine-DNA methyltransferase*). Ovaj enzim uklanja metil grupu sa DNK i tako omogućava popravku oštećenja

DNK i njenu dalju replikaciju u ćelijama glioblastoma (Butler i sar., 2020). Dalje studije su ukazale i na druge mehanizme popravke DNK ćelija glioblastoma koji dovode do rezistencije na temozolomid kao što su deficijencija enzima za popravku DNK MSH6 kao i smanjena regulacija MLH1 i PMS2 (Stark i sar., 2015).

Još jedan mehanizam koji utiče na rezistenciju glioblastoma na temozolomid uključuje dugu nekodirajuću RNK, SNHG12, čija je ekspresija povišena u rezistentnim glioblastomima (Chang i sar., 2017). SNHG12 vezuje mikroRNK miR-129-5p, povećavajući ekspresiju MAPK1 i E2F7, što suzbija apoptozu i pospešuje ćelijsku proliferaciju i razvoj rezistencije na temozolomid u ćelijama glioblastoma. Pored toga, pokazano je da utišavanje ekspresije SNHG12 povećava osetljivost rezistentnih glioblastoma na temozolomid (Chang i sar., 2017; Lu i sar., 2020).

Studije su pokazale i da je NF- κ B signalizacija uključena u hemiorezistenciju glioblastoma, pri čemu je ovaj signalni faktor povezan sa rezistencijom na temozolomid pre svega zbog uloge u sprečavanju apoptoze (Kapoor i sar., 2004). Pored toga je pokazano da ćelije tumorskog mikrookruženja rezistentnih glioblastoma sekretuju faktor nekroze tumora TNF α (engl. *tumor necrosis factor α*) koji dodatno dovodi do hemio- i radiorezistencije ćelija glioblastoma (Huang i sar., 2019).

Posle hirurškog odstranjivanja tumora, uz adjuvantnu radioterapiju primenjenu zajedno sa temozolomidom, još jedan vid aktuelne terapije predstavlja lečenje naizmeničnim električnim poljem (engl. *tumor-treating fields* - TTFields) (Lukas i sar., 2019). TTFields terapija podrazumeva primenu naizmeničnog električnog polja niskog intenziteta koje uzrokuje poremećaje u mitozu što dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, aneuploidije i apoptoze (Lukas i sar., 2019).

1.4.1. Novi terapijski pristupi u lečenju glioblastoma

Ciljana terapija predstavlja novi pristup i standard u lečenju malignih tumora, uključujući i glioblastome. Ciljana terapija glioblastoma otvara nove mogućnosti u lečenju ukoliko se primenjuje samostalno, ali i u kombinaciji sa tradicionalnim hemioterapeutikima. Mnoge studije su pokazale sinergističko dejstvo dva različita leka u odnosu na pojedinačne tretmane. Kombinacija ciljane terapije sa tradicionalnim hemioterapeutikom ili drugim agensom koji ima mogućnost inhibicije dve ili više meta u jednom ili više komplementarnih signalnih puteva može da poboljša efikasnost terapije (Y. T. Lee i sar., 2018). Brz razvoj novih tehnologija i molekularne medicine omogućava otkrivanje i predviđanje bioloških markera čak i za heterogene malignitete kao što su glioblastomi. To pruža mogućnost predviđanja molekularnih meta na individualnom nivou za svakog pacijenta.

Ipak, heterogenost glioblastoma predstavlja jedan od najvećih izazova u njihovom lečenju. Tumorska heterogenost dovodi do razvoja različitih populacija ćelija sa različitim genomom u okviru samog tumora što može dovesti do slabog kliničkog odgovora usled selektivnog pritiska tokom terapije (Y. T. Lee i sar., 2018). Zbog toga, dobro predviđanje prognostičkih markera unutartumorske heterogenosti i identifikacija novih terapijskih meta predstavlja osnovni cilj u razvoju lekova koji ciljaju i rezistentne tumorske ćelije (Dagogo-Jack i Shaw, 2018).

Poslednjih godina su se intenzivirala preklinička, ali i klinička ispitivanja sa ciljem poboljšanja terapije glioblastoma. U periodu od 2017. do 2019. godine kliničke studije u terapiji glioblastoma obuhvatale su 17 malih molekula, samostalno i u kombinaciji sa drugim malim molekulima ili tradicionalnim hemioterapeutikima (Rajaratnam i sar., 2020). Međutim, nijedan od ovih pristupa nije dao zadovoljavajuće rezultate. Tirozin-kinazni inhibitori su do sada pokazali slabu

efikasnost u kliničkim istraživanjima usled rezistencije na lekove, agresivne prirode i heterogenosti glioblastoma (G. Kim i Ko, 2020). Trenutno se u kliničkim studijama u terapiji glioblastoma (i primarnih tumora i recidiva) nalazi 43 jedinjenja od kojih većina predstavlja male molekule, tirozin-kinazne inhibitore uključujući alektinib, lafatinib, levnotinib, tesevatinib i pazopanib (Rajaratnam i sar., 2020). U fazi II kliničke studije nalazi se 28 inhibitora.

1.4.2. Src tirozin-kinazni inhibitori u lečenju glioblastoma

Kao što je već pomenuto, Src tirozin-kinaza učestvuje i interaguje sa signalnim putevima uključenim u preživljavanje, proliferaciju, invazivnost i interakciju ćelija glioblastoma sa vanćelijskim matriksom (Calgani i sar., 2016). Takođe, Src tirozin-kinaza pomaže održavanje mikrookruženja ćelija glioblastoma pogodnog za progresiju tumora (Cirotti i sar., 2020; S. T. Liu i sar., 2013). Stoga, ciljanje Src tirozin-kinaze predstavlja perspektivnu strategiju u terapiji glioblastoma.

Većina Src tirozin-kinaznih inhibitora vezuje se za ATP-vezujuće mesto na kinazi (Cirotti i sar., 2020). Ovo mesto vezivanja je strogo konzervirano među kinazama i zbog toga može biti potencijalni uzrok ukrštene reaktivnosti (Roskoski, 2020). Src tirozin-kinazni inhibitori mogu biti različito selektivni kada je u pitanju njihova primena u kliničkoj praksi (Sen i Johnson, 2011). Na primer, mali molekuli odobreni od FDA, kao što su dasatinib, bosutinib, sarakatinib i ponatinib su našli primenu samo u terapiji hematoloških tumora, jer nisu dali dobre rezultate u terapiji solidnih tumora, posebno glioblastoma (Roskoski, 2020). Trenutna istraživanja su fokusirana na dizajniranje i razvoj novih inhibitora Src tirozin-kinaza, koji mogu da prođu kroz KMB, ali nisu supstrati ABC transportera, niti ih inhibiraju, što im omogućava primenu sa tradicionalnim hemioterapeuticima koji nisu uspešni u terapiji glioblastoma zbog svojih nepovoljnih farmako-kinetičkih svojstava.

Poslednjih godina ispitani su mnogi mali molekuli, a neki su selektovani kao dobri kandidati za inhibiciju Src tirozin-kinaze i ostalih članova SFK (Rivera-Torres i San José, 2019). Među njima je bio i dasatinib, koji je pored značajnog potencijala za inhibiciju BCR-ABL kompleksa (Hořínková i sar., 2019), pokazao i sposobnost inhibicije još 30 različitih kinaza, uključujući i Src tirozin-kinazu (Martellucci i sar., 2020). Iz tog razloga je primena dasatiniba u terapiji glioblastoma delovala obećavajuće u cilju inhibiranja signalizacije posredovane tirozin-kinazama i povećanja osetljivosti ćelija glioblastoma na standardnu hemioterapiju (Cirotti i sar., 2020). *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da dasatinib inhibicijom aktivnosti Src tirozin-kinaze utiče na migraciju, proliferaciju i morfologiju ćelija glioblastoma (Fathi Kazerooni i sar., 2020; Han i sar., 2014). Takođe je pokazano da dasatinib u kombinaciji sa temozolomidom dovodi do autofagije u ćelijama glioblastoma i na taj način povećava njihovu osetljivost na temozolomid (Milano i sar., 2009). Pored toga, u mišijem modelu je pokazano da primena dasatiniba uz bevacizumab značajno smanjuje invaziju inkulisanih ćelija glioblastoma rezistentnih na temozolomid (Ou i sar., 2020). Ipak, pored pozitivnih rezultata iz prekliničkih ispitivanja, faza II kliničke studije NCT00892177 nije pokazala uspeh zajedničkog tretmana dasatiniba i bevacizumaba kod pacijenata sa recidivom glioblastoma. Rezultati ove studije su pokazali da kombinacija ova dva inhibitora nije poboljšala ishod terapije u odnosu na samostalno primenjen bevacizumab (Galanis i sar., 2019). Pored toga, faza II kliničke studije NCT00423735 je pokazala slabu efikasnost dasatiniba u terapiji pacijenata sa recidivom glioblastoma (Lassman i sar., 2015; Schiff i Sarkaria, 2015). Osnovni razlozi neefikasnosti primene dasatiniba u terapiji glioblastoma su njegovo aktivno izbacivanje membranskim transporterima i nemogućnost prolaska kroz KMB i dopremanja do tumorskih ćelija (Agarwal i sar., 2012).

Pored dasatiniba, postoje i drugi Src tirozin-kinazni inhibitori koji su potencijalni kandidati za terapiju glioblastoma (Cirotti i sar., 2020). **PP2** ima inhibitorno dejstvo na neke članove SFK, među kojima je i Src. Preko delovanja na Src signalni put, ovaj inhibitor utiče na proliferaciju i migraciju ćelija glioblastoma (Park i sar., 2018). PP2 povećava osetljivost U257 i T98G ćelija glioblastomana radioterapiju tako što smanjuje lučenje matriksne metaloproteinaze MMP-2 (Eom i sar., 2016). Pored toga, kombinacija PP2 sa standardnom terapijom glioblastoma (radioterapijom i temozolomidom) inhibira rast tumora u imunodeficientnom mišijem modelu (Eom i sar., 2016).

SI221 je derivat pirazolo[3,4-*d*]pirimidina i inhibitor članova SFK koji smanjuje ćelijsku migraciju i uzrokuje ćelijsku smrt kod glioblastoma. Značajna citotoksičnost, bolja metabolička stabilnost i mogućnost prolaska kroz KMB daju prednost ovom inhibitoru u odnosu na PP2 (Ceccherini i sar., 2015).

SU6656 je mali molekul, inhibitor Src tirozin-kinaze, koji inhibira rast i invazivnost U257 ćelija glioblastoma (Touat i sar., 2017). Pored toga, pokazano je da ovaj inhibitor povećava osetljivost ćelija glioblastomana radioterapiju *in vitro* i *in vivo*, inhibirajući fosforilaciju AKT kinaze i indukujući apoptozu (Cirotti i sar., 2020).

Panatinib je odobren od strane FDA 2012. godine kao inhibitor treće generacije, koji cilja BCR-ABL1, Src, EGFR, PDGFR, FGFR i VEGFR (Cirotti i sar., 2020). Ipak, panatinib je naredne godine privremeno povučen iz kliničkih ispitivanja zbog neželjenih dejstava (Miller i sar., 2014). *In vitro*, panatinib je značajno smanjio vijabilnost, migraciju i invaziju U87 ćelija glioblastoma. Pored toga, uzrokovao je apoptozu ovih ćelija *in vitro*, kao i smanjenje rasta tumora *in vivo* (Laramy i sar., 2017).

Bosutinib (SKI-606) pripada trećoj generaciji tirozin-kinaznih inhibitora i cilja Src tirozin-kinazu i onkogen ABL1. Međutim, u fazi II kliničkih ispitivanja bosutinib, primenjen samostalno, nije pokazao izrazitu efikasnost kod pacijenata sa recidivom glioblastoma (Taylor i sar., 2015). Loš uspeh terapije bosutinibom nije poznat, ali je moguće da je povezan sa statusom aktivacije Src tirozin-kinaze ovih pacijenata ili slabim dopremanjem ovog leka do tumora, što predstavlja najveći problem u primeni tirozin-kinaznih inhibitora (Cirotti i sar., 2020).

Krizotinib, tirozin-kinazni inhibitor, je u kombinaciji sa dasatinibom smanjio aktivnost Src tirozin-kinaze u U87 ćelijama *in vitro* (Taylor i sar., 2015). Takođe, krizotinib u niskim koncentracijama povećava osetljivost rezistentnih ćelija tako što inhibira aktivnost P-gp transportera (G. Kim i Ko, 2020) i smanjuje rezistenciju glioblastoma na dasatinib dovodeći do apoptoze nakon kombinovanog tretmana (Nehoff i sar., 2015).

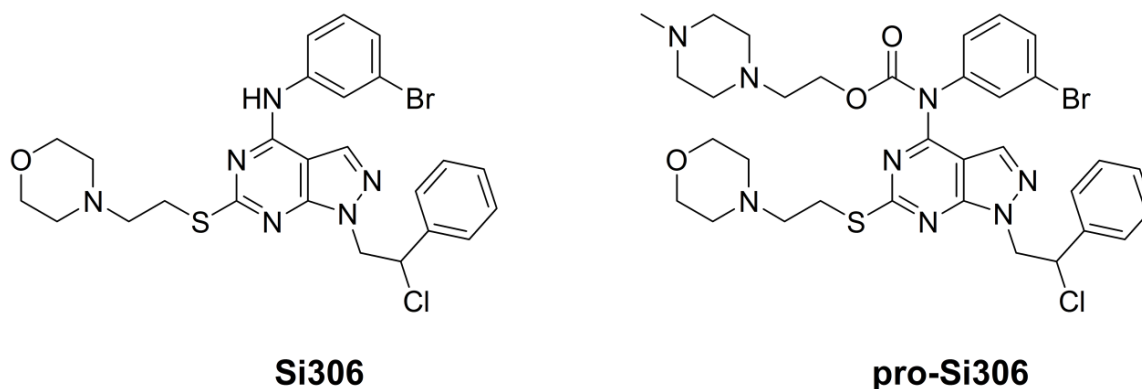
1.4.2.1. Src tirozin-kinazni inhibitori Si306 i pro-Si306

U svrhu ciljane terapije glioblastoma poslednjih godina razvijana su nova jedinjenja sa pirazolo[3,4-*d*]pirimidinskom strukturom (Schenone i sar., 2014). Ova jedinjenja ispoljavaju svoje dejstvo kompetitivnim vezivanjem za ATP-vezujuće mesto na SFK, što dovodi do inhibicije njihove fosfotransferazne aktivnosti (Schenone i sar., 2014).

Derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidina su pokazali anti-tumorsku aktivnost u nekoliko ćelijskih linija, uključujući ćelije osteosarkoma (Spreafico i sar., 2008), malignog tumora prostate (Angelucci i sar., 2006), neuroblastoma (Navarra i sar., 2010), glioblastoma (Calgani i sar., 2016; Ceccherini i sar., 2015), rbdmiosarkoma (Casini i sar., 2015), mezotelioma (Indovina i sar., 2012), meduloblastoma

(Rossi i sar., 2010), medularnog karcinoma štitaste žlezde (Morisi i sar., 2007), leukemije (Radi i sar., 2013) i Burkittovog limfoma (Cozzi i sar., 2012). Efikasnost ovih pirimidinskih derivata potvrđena je u mišijim modelima neuroblastoma (Tintori i sar., 2015), leukemije (Radi i sar., 2013) i glioblastoma (Vignaroli i sar., 2017) *in vivo*.

Zbog svoje lipofilne prirode pirazolo[3,4-*d*]pirimidini su slabo rastvorljivi u vodi, što može nepovoljno da utiče na njihovu biološku aktivnost i farmakokinetičke parametre (apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju), i da uzrokuje prekid u daljem razvoju ovih supstanci kao potencijalnih terapeutika u lečenju glioblastoma (Dreassi i sar., 2010; Radi i sar., 2012). Zato su pored optimizacije biološke aktivnosti i farmakokinetičkih svojstava derivata pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, paralelno razvijani i njihovi prolekovi, kao potencijalni terapeutici. Prolekovi su hemijski modifikovane neaktivne verzije farmakološki aktivnih lekova koje kada prođu *in vivo* transformaciju (enzimskim i/ili hemijskim reakcijama), prelaze u aktivan lek (Huttunen i sar., 2011; Rautio i sar., 2008). Prolekovi imaju veću rastvorljivost u vodi u odnosu na lek, što poboljšava njihova farmakokinetička svojstva i bio-raspoloživost aktivnog leka *in vivo* (Greco i sar., 2020; Tintori i sar., 2015; Vignaroli i sar., 2017).



Slika 6. Strukturne formule Src tirozin-kinaznog inhibitora Si306 i njegovog proleka pro-Si306.

U ovoj doktorskoj studiji ispitivani su mali molekuli i derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, Si306 i njegov prolek pro-Si306 (Slika 6). Si306 i pro-Si306 su ATP-kompetitivni inhibitori Src tirozin-kinaze i drugih članova SFK (Schenone i sar., 2014). Pokazano je da Si306, u nanomolarnim koncentracijama, inhibira aktivnost izolovane Src tirozin-kinaze (Calgani i sar., 2016). Takođe, prethodna istraživanja pokazala su da kod imunokompromitovanih miševa, kombinacija Si306 i radioterapije značajno smanjuje veličinu tumora poreklom od inokulisanih U87 ćelija glioblastoma u odnosu na kontrolu i pojedinačan tretman (Vignaroli i sar., 2017). Pored toga, pokazano je da je koncentracija Si306 u mozgu, nakon njegovog intraperitonealnog ubrizgavanja, značajno veća i nakon 24 h. Oralni tretman Si306 produžava preživljavanje miševa sa ortotopskim U87 ksenograftima za 30% (Vignaroli i sar., 2017), što je dodatno potvrdilo efikasnost dopremanja Si306 do mozga. Prolek pro-Si306 je sintetisan radi poboljšanja farmakoloških svojstava parentalne supstance (Slika 6). Pokazano je da se procesom hidrolize u plazmi pro-Si306 prevodi u Si306 (Vignaroli i sar., 2017). U poređenju sa Si306, pro-Si306 je ispoljio bolju rastvorljivost i efikasnost u ortotopskom modelu glioblastoma (Vignaroli i sar., 2017). Da bi se ispitala bezbednost Si306 *in vivo*, na miševima je sprovedena studija toksičnosti uz intravensku primenu supstance (Fallacara i sar., 2019). Sve životinje su dobro podnele čak i visoke doze Si306 (100 mg/kg) i primena ovog inhibitora nije uzrokovala smrtni ishod nijedne životinje niti dovela do promena u njihovom ponašanju. Takođe, mikroskopska analiza nije otkrila promene u strukturi glavnih metaboličkih tkiva, što ukazuje na dobru toleranciju i

odsustvo akutne toksičnosti Si306. Kada su u pitanju istraživanja na primarnim ćelijama glioblastoma, pokazano je da Si306 dovodi do apoptotske smrti u ćelijama poreklom iz invazivnog regiona i jezgra glioblastoma pacijenata (Greco i sar., 2020). Na kraju, skorašnja studija je pokazala da Si306 i pro-Si306 imaju značajan pro-oksidativni potencijal u primarnim ćelijama glioblastoma (Kostić i sar., 2021). Ovi inhibitori Src tirozin-kinaza su povećali nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta i ekspresiju antioksidativnih enzima, što je bilo praćeno dvolančanim prekidima DNK i nekrozom (Kostić i sar., 2021).

2. CILJEVI

U skladu sa predstavljenim literaturnim podacima i potrebom da se ispituju novi terapijski pristupi u lečenju glioblastoma, postavljeni su sledeći ciljevi za čije postizanje su korišćeni različiti modeli (komercijalna humana ćelijska linija glioblastoma U87, njena višestruko-rezistentna varijanta U87-TxR, primarne ćelije glioblastoma poreklom od pacijenata GBM-4, GBM-5 i GBM-6, kao i ksenograft model U87 ćelija u embrionima zebrića *Danio rerio*).

Glavni cilj ove doktorske disertacije je da se ispita potencijal Src tirozin-kinaznih inhibitora, Si306 i pro-Si306, za smanjenje invazivnosti i rezistencije ćelija glioblastoma.

Za ispunjenje glavnog cilja disertacije definisani su specifični ciljevi:

- 1) Izolovanje, uspostavljanje i karakterizacija primarnih kultura ćelija glioblastoma poreklom od pacijenata određivanjem prisustva markera glioblastoma: ko-ekspresija vimentina i kiselog glijalnog fibrilarnog proteina
- 2) Uspostavljanje ksenografta U87 ćelija u embrionima zebrića (inokulacijom U87 ćelija u žumančanu kesu embriona) radi praćenja invazivnog potencijala ćelija glioblastoma
- 3) Upoređivanje efekata Si306, pro-Si306, dasatiniba (referentni Src tirozin-kinazni inhibitor) i temozolomida (aktuelni hemioterapeutik za lečenje glioblastoma) na vijabilnost ćelija glioblastoma (U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6) primenom MTT testa
- 4) Ispitivanje dejstva Si306 i pro-Si306 na invazivni potencijal ćelija glioblastoma (U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6) u testovima razlaganja želatina i invazivnosti
- 5) Ispitivanje dejstva Si306 i pro-Si306 na invazivni potencijal *in vivo* (U87 ksenograft u embrionima zebrića) praćenjem rasejavanja fluorescentno obeleženih U87 ćelija u organe embriona zebrića na fluorescentnom mikroskopu
- 6) Upoređivanje efekata Si306, pro-Si306 i dasatiniba na ekspresiju i aktivnost proteina Src signalnog puta ćelija glioblastoma (U87 i U87-TxR) metodom „Western blot“ (engl.)
- 7) Ispitivanje efekta Si306 i pro-Si306 na ekspresiju i aktivnost Src tirozin-kinaze u primarnim ćelijama glioblastoma (GBM-4, GBM-5 i GBM-6) metodom imunobojenja i analize na protočnom citofluorimetru
- 8) Utvrđivanje dejstva Si306, pro-Si306 i dasatiniba na aktivnost P-glikoproteina u višestruko-rezistentnoj U87-TxR ćelijskoj liniji pomoću akumulacije fluorescentnog supstrata P-glikoproteina – rodamina 123 i analize na protočnom citofluorimetru
- 9) Ispitivanje dejstva Si306, pro-Si306 i dasatiniba na ekspresiju P-glikoproteina u višestruko-rezistentnoj U87-TxR ćelijskoj liniji metodom imunobojenja i analize na protočnom citofluorimetru

- 10) Upoređivanje efikasnosti inhibicije P-glikoproteina kod U87-TxR ćelija ispitivanjem dozno-zavisnog efekta Si306, pro-Si306, deks-verapamila (predstavnik druge generacije inhibitora P-glikoproteina) i tarikvidara (predstavnik treće generacije inhibitora P-glikoproteina)
- 11) Ispitivanje potencijala Si306 i pro-Si306 za reverziju rezistencije na paklitaksel kod U87-TxR ćelija

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Lekovi i farmakološki inhibitori

U ovoj studiji su korišćeni tirozin-kinazni inhibitori, derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidina, Si306 i njegov prolek pro-Si306. Ova jedinjenja su dobijena na poklon ljubaznošću dr Silvie Schenone sa Odeljenja za Farmaciju, Univerziteta u Đenovi u Italiji, gde su jedinjenja sintetisana i opisana (Vignaroli i sar., 2017). Dasatinib, paklitaksel, tarikvidar i deks-verapamil su kupljeni od Sigma-AldrichChemie GmbH, Nemačka. Sve supstance sem paklitaksela i deks-verapamila su rastvorene u dimetilsufoksidu (DMSO). Si306, pro-Si306 i dasatinib su rastvoreni u koncentraciji od 20 mM i njihovi alikvoti su čuvani na sobnoj temperaturi. Alikvoti tarikvidara od 10 μ M su čuvani na -20 °C. Alikvoti paklitaksela su čuvani na -20 °C u apsolutnom etanolu (1 mM), dok je rastvor deks-verapamila u sterilnoj vodi čuvan na sobnoj temperaturi. Pre tretmana, sve supstance sem paklitaksela i deks-verapamila su razblažene u sterilnom fosfatnom puferu (PBS) do željene koncentracije. Deksverapamil i paklitaksel su pre tretmana razblaženi u sterilnoj vodi.

3.2. Hemikalije i reagensi

U eksperimentalnom delu ove studije su korišćene sledeće hemikalije i reagensi: minimalni esencijalni medijum – MEM (Capricorn Scientific GmbH, Nemačka), Dulbeko modifikovani minimalni esencijalni medijum sa Hamovim F-12 medijumom - DMEM/F12 (Biowest, Francuska), L-glutamin, tripsin/EDTA fetalni govedi serum (engl. *fetal bovine serum* - FBS), smeša penicilin-streptomycin, amfotericin B, rodamin 123, Hoechst 33342, DMSO, Accumax™ rastvor, albumin govedeg seruma (engl. *bovine serum albumin* - BSA), 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), RNKza A, TRIzol®, B-27 suplement, epidermalni faktor rasta (EGF), bazalni faktor rasta fibroblasta (bFGF), CellTracker™ CM-DiI boja (Thermo Fisher Scientific, SAD), etidijum bromid (Merck, Nemačka), agaroz (Applichem GmbH, Nemačka) i matrigel (Corning®, SAD).

3.3. Čelijske linije

U87 čelijska linija humanog glioblastoma je kupljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD). U87-TxR, višestruko-rezistentna čelijska linija humanog glioblastoma je selektovana od U87 ćelija nakon kontinuiranog izlaganja ćelija rastućim koncentracijama paklitaksela (Podolski-Renic i sar., 2011). Obe čelijske linije su gajene u MEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 10000 U/mL penicilina i 10 mg/mL streptomicina. Čelije su gajene u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na 37 °C u vlažnoj atmosferi (90%) sa 5% CO₂. Pasaža ćelija je vršena jednom nedeljno do dostizanja 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 i 75 cm² (Sarstedt, Nemačka). Nakon tripsinizacije, ćelije su brojane pomoću hemocitometra na invertnom svetlosnom mikroskopu (Leica, Nemačka), nakon čega su zasejavane u svežem medijumu u nove flaskove u gustini od 8 000 ćelija/cm².

3.4. Određivanje broja ćelija

Tačan broj ćelija određivan je bojenjem tripan plavim (engl. *trypan blue*, TB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka). TB ne prodire u unutrašnjost živih ćelija sa neoštećenom čelijskom membranom, te one ostaju nebojene. TB prodire u mrtve i oštećene ćelije, koje se boje plavom bojom i na taj način se mogu razlikovati od živih ćelija. Brojanje ćelija je vršeno pod svetlosnim mikroskopom na hemocitometru. Za brojanje ćelija je korišćen 1:1 odnos razblaženja 0,4% TB

rastvora u $1 \times$ PBS puferu i ćelija u medijumu. Da bi TB obojio mrtve ćelije, ćelije su ostavljane u rastvoru sa bojom 5 min. Nakon toga je po $10 \mu\text{L}$ obojene ćelijske suspenzije naneto pipetom u obe komorice hemocitometra. Ćelije su brojane u 5 polja u svakoj komorici hemocitometra. Nakon brojanja, ukupan broj živih ćelija je računat po sledećem obrascu: ukupan broj živih ćelija/mL = prosečan broj živih ćelija po kvadratu komorice \times razblaženje ćelija $\times 10^4$, gde je 10^4 faktor komorice.

3.5. Uzorci tkiva

Uzorci tkiva pacijenata sa glioblastomom gradusa IV, koji definiše Svetska zdravstvena organizacija, sakupljeni su od aprila 2018. do maja 2019. godine na Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije. Histološki gradus uzoraka ustanovljen je histopatološkom analizom. Uzorci su sakupljeni i korišćeni u ovoj studiji nakon što je dobijen informisani pristanak pacijenata i odobrenje Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije (broj rešenja: 586/4), u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije iz 1964. godine.

3.6. Uspostavljanje primarnih ćelijskih kultura glioblastoma

Uzorci tkiva su sakupljeni tokom operacija i obrađeni odmah nakon sakupljanja. Tkivo je prvo usitnjeno hirurškim nožem u Petri šolji u sterilnim uslovima. Usitnjeno tkivo je prekrivano Accumax rastvorom (1-2 mL) na 15 min radi hemijskog razbijanja tkiva na ćelije, pri čemu je dodatno usitnjavano hirurškim nožem i blago mućkano u rastvoru. Nakon disocijacije, tkivo je centrifugirano da bi se odstranio Accumax rastvor. Ćelije su zatim prebačene u flaskove površine 25 cm^2 sa 5 mL DMEM/F12 medijuma u koji je dodato 10% FBS-a, 2 mM L-glutamin, 10000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomicina i 25 $\mu\text{g/mL}$ antimikotika amfotericina B. Medijum je dodatno obogaćen faktorima rasta B-27 (20 $\mu\text{L/mL}$), EGF (40 ng/mL) i bFGF (20 ng/mL). Komadići tkiva i pojedinačne ćelije su kultivisani u inkubatoru na 37°C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 , a medijum je promenjen 48 h kasnije pošto je utvrđeno da su se ćelije zalepile za donju površinu flaska. Ćelije zalepljene za podlogu flaska su gajene do 80-90% konfluentnosti pre daljih studija. Ćelije su prošle kroz mali broj pasaža da bi se sprečile genetske i epigenetske promene u ćelijama i očuvale karakteristike primarnih kultura bliske originalnim tumorima *in vivo* (Vogel i sar., 2005), što je presudno da se osigura translacioni potencijal rezultata dobijenih u primarnim kulturama (Ledur i sar., 2017).

3.7. Imunocitohemijska analiza primarnih ćelijskih kultura glioblastoma

Nakon uspostavljanja primarnih ćelijskih kultura glioblastoma, 25 000 ćelija po komorici je sejano na adherentne ploče sa 4 komorice (Nunc, Nalgene, Danska) u 500 μL DMEM/F12 medijuma sa dodatim suplementima. Nakon 24 h, ćelije su ispirane PBS puferom, fiksirane 4% paraformaldehidom (PFA) 15 min na sobnoj temperaturi, i na kraju inkubirane 1 h u 0,5% BSA u PBS puferu radi blokiranja nespecifičnih mesta za vezivanje antitela. Da bi se potvrdilo da su ćelije izolovane i umnožene iz posle-operativnih uzoraka zaista ćelije glioblastoma, ćelije su inkubirane sa primarnim monoklonskim mišjim antitelom za vimentin (DAKO, SAD) i poliklonskim zečjim antitelom za GFAP (DAKO, SAD) razblaženja 1:500, preko noći na 4°C . Nakon ispiranja primarnog antitela PBS puferom, fluorescentno obeležena sekundarna antitela, kozje anti-mišje Alexa Fluor 488 IgG (H+L) (Cell Signaling Technology, SAD) i kozje anti-zečje Alexa Fluor 555 IgG (H+L) (Cell Signaling Technology, SAD) su dodata ćelijama u razblaženju 1:1 000 u 0,5% BSA u PBS puferu 1 h na sobnoj temperaturi. Ćelije su takođe bojene fluorescentnom DNK bojom Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, SAD) 15 min na sobnoj temperaturi i na kraju montirane u rastvoru Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) u glicerolu i pokrivene pokrovnim staklom za mikroskopiranje. Ćelije su vizualizovane na invertnom fluorescentnom mikroskopu Zeiss Axiovert

(Carl Zeiss Foundation, Nemačka), i slikane pomoću AxioVision 4.8 softvera. Čelijske kulture kod kojih je utvrđena ekspresija oba proteina, što odgovara fenotipskim karakteristikama glioblastoma, su smatrane čelijskim kulturama glioblastoma. Uspostavljene primarne čelijske kulture nazvane su GBM-4, GBM-5 i GBM-6.

3.8. MTT test vijabilnosti ćelija

MTT testom vijabilnosti ćelija su ispitivani efekti inhibitora Si306 i pro-Si306, kao i dasatiniba i paklitaksela na čelijsku vijabilnost. Ovu metodu je prvi opisao Tim Mosmann (Mosmann, 1983) i ona predstavlja kalorimetrijski test zasnovan na sposobnosti vijabilnih ćelija da u svojim mitohondrijama redukuju tetrazolijumovu so žute boje (MTT) u formazan ljubičaste boje (Berridge i sar., 2005). Nakon ove reakcije potrebno je rastvoriti kristale formazana u DMSO i izmeriti apsorbancu na 540 nm pomoć čitača mikrotitar ploča. Izmerena apsorbancu se nakon toga koreliše sa brojem vijabilnih ćelija.

MTT test je rađen na sledeći način:

1. Posle perioda predviđenog za tretman ćelija, u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) je sipano po 100 μ L MTT rastvora u odgovarajućem medijumu finalnog razblaženja 2 mg/mL.
2. Nakon toga su ćelije inkubirane 3 h na temperaturi od 37° C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, da bi se omogućilo stvaranje formazana u vijabilnim ćelijama.
3. Naredni korak je predstavljao odlivanje medijuma i rastvaranje formazana u DMSO (200 μ L po bunariću) 10 min na sobnoj temperaturi.
4. Potom je određivana apsorbancu pomoću čitača mikrotitar ploča (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija) na talasnoj dužini 540 nm, sa korekcijom na 670 nm.

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbance određena je IC₅₀ vrednost, kao koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se detektuje 50% inhibicije čelijskog rasta. IC₅₀ vrednosti supstanci su izračunate nelinearnom regresionom analizom u GraphPad Prism 6.0 softveru (GraphPad Software, SAD). Testovi vijabilnosti su rađeni u triplikatu. Efekat tretmana je poreden sa netretiranim kontrolnim uzorkom, koji je arbitrarno definisan kao 100%.

3.8.1. *Pojedinačni i kombinovani tretmani ćelija*

Za test vijabilnosti, U87 i U87-TxR ćelije, kao i primarne ćelije glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Sarstedt, Nemačka) u gustini od 4 000 ćelija po bunariću u 100 μ L odgovarajućeg medijuma. Čelije su zasejavane 24 h pre tretmana radi adaptacije. Da bi se ispitao jednokratni efekat Si306 inhibitora i pro-Si306 na čelijsku vijabilnost, ćelije su podvrgnute tretmanu od 72 h. Poređenja radi, analizirana je i osetljivost ćelija na klinički odobren Src tirozin-kinazni inhibitor dasatinib. Inhibitori Si306, pro-Si306 i dasatinib su primenjeni u rastućim koncentracijama (1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M i 25 μ M). Takođe, analizirana je i osetljivost ćelija na aktuelni hemioterapeutik za lečenje glioblastoma temozolomid, koji je primenjen u rastućim koncentracijama (50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M i 1000 μ M). U kontrolnom uzorku zasejane su ćelije u istom broju, ali nisu bile tretirane. U test je takođe bila uključena i kontrola DMSO rastvarača. Pored efekta pojedinačnih tretmana, ispitan je i efekat kombinovanih tretmana Si306 ili pro-Si306 sa paklitakselom u rezistentnim U87-TxR ćelijama. Dve koncentracije inhibitora Si306 i pro-Si306 (0,2

μM i $0,5 \mu\text{M}$) su kombinovane sa rastućim koncentracijama paklitaksela ($0,1 \mu\text{M}$, $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ i $2 \mu\text{M}$) u zajedničkom tretmanu od 72 h.

MTT test je takođe korišćen da bi se isključila mogućnost uticaja Si306 i pro-Si306 na vijabilnost U87 i U87-TxR ćelija u testovima degradacije želatina i invazije. Ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče 24 h pre tretmana radi adaptacije, a tretman Src tirozin-kinaznim inhibitorima je trajao 24 h koliko traju i sami testovi degradacije želatina i invazije. U ovom eksperimentu Si306 i pro-Si306 su primenjivani u sledećim koncentracijama: $1 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ i $10 \mu\text{M}$.

3.9. Izolacija RNK i reakcija reverzne transkripcije

3.9.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana iz U87 i U87-TxR ćelija uz pomoć TRIzol® reagensa po uputstvima proizvođača:

Liziranje i homogenizacija – ćelijske linije U87 i U87-TxR su zasejane u flaskove površine 25 cm^2 u gustini od 1×10^6 ćelija po flasku, inkubirane preko noći radi adaptacije i potom tretirane sa $5 \mu\text{M}$ Si306 ili pro-Si306. Nakon 72 h, ćelije su tripsinizovane i centrifugirane 3 min na 2 000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta i ispiranja ćelija u PBS puferu, ćelije su lizirane 5 min u 1 mL TRIzol® reagensa. Lizirani i homogenizovani uzorci su odmah korišćeni ili čuvani na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do mesec dana.

Razdvajanje faza – Ukoliko su zamrzavani, homogenizovani uzorci su otapani na sobnoj temperaturi. Na taj način nukleinski kompleksi mogu u potpunosti da disosuju. U uzorke se dodaje po 200 μL hloroforma, nakon čega se svaki uzorak snažno protrese i inkubira 2-3 min na sobnoj temperaturi. Uzorci se posle toga centrifugiraju 15 min na $12\,000 \times g$ na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u centrifugi sa hlađenjem (Centrifuge 5427R, Eppendorf, Nemačka). Smeša se na ovaj način razdvaja na tri faze: donju crvenu fenol-hlorofomsku, srednju i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Zapremina vodene faze predstavlja oko 60% zapremine TRIzol® reagensa koji je korišćen za liziranje.

Precipitacija RNK – Vodenu fazu je potrebno veoma pažljivo preneti u nove tubice u koje se nakon toga dodaje po 500 μL izopropanola. Posle toga se uzorci ostave na sobnoj temperaturi 10 min, pa se centrifugiraju 10 min na $12\,000 \times g$ na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u centrifugi sa hlađenjem. Na ovaj način RNK precipitira, tako što formira beli talog na dnu tubica.

Ispiranje RNK – Nakon uklanjanja supernatanta, RNK se ispira sa 1 mL 75% etanola u 0,1% DEPC vodi. Posle toga se uzorci centrifugiraju 5 min na $7\,500 \times g$ na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ u centrifugi sa hlađenjem.

Rastvaranje RNK – Nakon centrifugiranja, iz uzoraka se pažljivo odliva etanol i talog se suši na sobnoj temperaturi. Posle toga se RNK rastvara u 0,1% DEPC vodi koja predstavlja potentni inhibitor RNKaze. Na kraju se koncentracija RNK meri na spektrofotometru (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

3.9.2. Provera kvaliteta RNK

Kvalitet RNK je proveren elektroforezom uzoraka na 1,3% agaroznom gelu (1,3 g agaroze u 100 mL 1 x TBE pufera) sa $0,4 \mu\text{g/mL}$ etidijum bromida. Svaki RNK uzorak je pre nanošenja na gel mešan sa 0,4% rastvorom bromfenol plavog u 50% glicerolu u zapreminskom odnosu 1:1.

Posle elektroforeze u $1 \times$ TBE puferu na 100 V, RNK je vizuelizovana na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1 000, Bio Rad, SAD). Upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S traka, utvrđen je kvalitet izolovane RNK.

3.9.3. Reakcija reverzne transkripcije

Ukupna RNK (2 μ g) u koju je dodata DNKaza I ($1 \times$ finalno), 10x pufer ($1 \times$ finalno) i DEPC voda (do 9 μ L finalne zapremine) inkubirana je 30 min na 37 °C. Reakcija je prekinuta dodavanjem 1 μ L EDTA (ukupna zapremina 10 μ L), inkubiranjem smeše na 65 °C 10 min i hlađenjem na ledu. Reakcija je prekidana dodavanjem 1 μ L EDTA (ukupna zapremina 10 μ L), inkubiranjem smeše na 65 °C 10 min i hlađenjem na ledu. Dalje je reakcionoj smeši dodavano 10 μ L smeše za reverznu transkripciju po uputstvu proizvođača (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, SAD). Smeša za reverznu transkripciju se sastoji od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama: $1 \times$ nasumičnih prajmera, $1 \times$ pufera, 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 20 U RNK-aznog inhibitora i 50 U MultiScribeTM reverzne transkriptaze. Reakcija reverzne transkripcije je trajala 2 h na 37 °C. Nakon toga, uzorci su inkubirani 5 min na 85 °C i ohlađeni na ledu. Dobijena cDNK koncentracije 100 ng/ μ L je čuvana na -20 °C.

3.10. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR) služi za određivanje nivoa PCR proizvoda u toku svakog PCR ciklusa. Tokom PCR reakcije detektuje se signal poreklom od fluorescentne probe, čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u svakom pojedinačnom ciklusu. Na početku reakcije, intenzitet fluorescence u ciklusima ne prelazi bazalni nivo. Izdvaja se ciklus u kom fluorescentni signal uzorka ima značajno viši intenzitet od bazalnog signala i on se naziva graničnim ciklusom (engl. *threshold cycle* - Ct). Ct vrednost je obrnuto proporcionalna početnom broju kopija ciljane sekvence u uzorku.

Ova metoda je korišćena za detekciju ekspresije *MDR1* iRNK sa odgovarajućim prajmerom (Bosch i sar., 1997; NicAmhlaoihb i sar., 1999) u U87-TxR ćelijama koje su tretirane 24 h sa 5 μ M Si306, pro-Si306 ili dasatiniba. Pored toga, analizirana je i ekspresija *MMP2* i *MMP9* iRNK sa odgovarajućim prajmerima (Stojkovic i sar., 2016) u U87 i U87-TxR ćelijskim linijama nakon istih tretmana. Dobijena i pripremljena cDNK je amplifikovana uz pomoć Maxima SYBR Green/ROX qPCR Taster Mix kita (Thermo Fisher Scientific, SAD), po preporukama proizvođača. SYBR Green je interkalirajuća fluorescentna boja koja se nespecifično vezuje za dvolančani molekul DNK. PCR reakcije su izvođene na aparatu ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) u ukupnoj zapremini od 20 μ L koristeći 100 ng cDNK i prajmere za *MDR1*, *MMP2* ili *MMP9* gene. Za svaki uzorak su korišćeni i prajmeri za gen *ACTB*, koji je služio kao endogena kontrola (NicAmhlaoihb i sar., 1999). Za amplifikaciju gena su korišćeni sledeći uslovi: inicijalni korak u trajanju od 5 min na 50 °C, potom korak denaturacije od 10 min na 95 °C i 40 ciklusa na 95 °C 15s i 60 °C 60s. Po završetku amplifikacije, rezultati su analizirani u 7000 System softveru (Applied Biosystems, SAD). Svaki uzorak je testiran u tplikatu i relativna ekspresija svakog pojedinačnog gena je analizirana $2^{-\Delta Ct}$ metodom (Livak i Schmittgen, 2001), u kojoj ΔCt predstavlja razliku Ct vrednosti svakog specifičnog gena u odnosu na endogenu kontrolu.

3.11. Analiza ćelija protočnom citofluorimetrijom

3.11.1. Akumulacija rodamina 123

Rodamin 123 je fluorescentni supstrat P-glikoproteina. Protočnom citofluorimetrijom je analiziran intenzitet fluorescence koju emituje rodamin 123 akumuliran u vijabilnim ćelijama (Zheng i sar., 2009), koji je obrnuto proporcionalan aktivnosti P-gp transportera. U87-TxR ćelije su gajene u flaskovima površine 25 cm² do 80-90% konfluentnosti, tripsinizirane i resuspendovane u tubama u 1 mL MEM medijuma koji sadrži 5 µM rodamina 123. Ćelije su potom tretirane sa 5 µM Si306, pro-Si306 ili dasatiniba. Da bi se odredila IC₅₀ vrednost inhibicije P-glikoproteina, ćelije su tretirane rastućim koncentracijama Si306, pro-Si306 i deks-verapamila (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM i 20 µM) i tarikvidara (1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM i 20 nM). Deksi-verapamil i tarikvidar, poznati inhibitori P-glikoproteina, korišćeni su kao pozitivna kontrola. Uzorci su inkubirani 30 min na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Uzorci su zatim centrifugirani, isprani i potom resuspendovani u hladnom PBS puferu i čuvani na ledu u mraku do analize. Intenzitet fluorescence rodamina 123 je izmeren na protočnom citofluorimetru CyFlow Space Partec u FL1 kanalu na 530 nm. U svakom uzorku je prikupljeno najmanje 10 000 pojedinačnih događaja i dobijeni rezultati su analizirani Summit 4.3 softverom. IC₅₀ vrednosti inhibicije P-glikoproteina su izračunate nelinearnom regresionom analizom u GraphPad Prism 6.0 softveru (GraphPad Software, SAD).

3.11.2. Analiza ekspresije P-glikoproteina

Da bi se detektovao nivo ekspresije P-glikoproteina u višestruko-rezistentnoj ćelijskoj liniji glioblastoma U87-TxR, korišćena je metoda protočne citofluorimetrije. Ćelije su zasejavane u adherentne mikrotitar ploče sa 6 bunarića (Sarstedt, Nemačka) u gustini od 200 000 ćelija po bunariću, inkubirane preko noći u 1 mL MEM medijuma radi adaptacije i potom tretirane sa 5 µM Si306, pro-Si306 ili dasatiniba u periodu od 72 h. Nakon tripsinizacije, ćelije su prebačene u tube, centrifugirane i isprane u PBS puferu. Ćelije su potom direktno bojene FITC-konjugovanim mišjim antitelom za P-gp (BD Biosciences, Ujedinjeno Kraljevstvo) u zapreminskom odnosu 1:10 u PBS puferu, 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Da bi se isključilo prisustvo nespecifične fluorescence korišćena je izotipska kontrola IgG2bk (Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo). Pre analize, ćelije su centrifugirane i ispirane 3 puta u PBS puferu. Fluorescencija FITC-konjugovanog antitela za P-gp je detektovana u FL1 kanalu na talasnoj dužini od 530 nm na protočnom citofluorimetru CyFlow Space Partec (Sysmex Partec GmbH, Nemačka). Nakon izuzimanja ćelijskih ostataka i mrtvih ćelija iz analize, po uzorku je analizirano minimum 10 000 ćelija. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je Summit 4.3 softver (DAKO, SAD).

3.11.3. Analiza ekspresije Src tirozin-kinaze

Nivo ekspresije Src tirozin-kinaze i njene aktivne fosforilisane forme (pSrc) je analiziran protočnom citofluorimetrijom u U87 i U87-TxR ćelijama i primarnim ćelijama glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6. Ćelije su zasejavane u gustini od 200 000 ćelija po bunariću u adherentnim mikrotitar pločama sa 6 bunarića (Sarstedt, Nemačka) 24 h pre tretmana radi adaptacije. Primarne ćelije su tretirane sa 10 µM Si306, pro-Si306 ili dasatiniba, dok su ćelijske linije U87 i U87-TxR tretirane istim supstancama u koncentraciji od 5 µM. Nakon tripsinizacije, ćelije su prebačene u tube, centrifugirane, ispirane u PBS puferu i fiksirane sa 4% PFA 10 min na sobnoj temperaturi. Ćelije su dalje permeabilizovane dodavanjem 90% hladnog metanola 30 min na 4 °C. Nakon ispiranja u PBS puferu, ćelije su dalje inkubirane u 0,5% BSA u PBS puferu 1 h na sobnoj temperaturi radi blokiranja nespecifičnog vezivanja antitela. Ćelije su zatim inkubirane sa primarnim zečjim monoklonskim

antitelima na Src i pSrc (Cell Signaling Technology, SAD) razblaženja 1:100 u 0,5% BSA u PBS puferu preko noći na 4 °C. Nakon ispiranja u PBS puferu, ćelije su inkubirane sa fluorescentno obeleženim sekundarnim kozjim anti-zečjim Alexa Fluor 488 IgG(H+L) antitelom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), razblaženja 1:1 000 u 0,5% BSA u PBS puferu 30 min na sobnoj temperaturi. Na kraju su ćelije ispirane i resuspendovane u 1 mL PBS pufera. Intenzitet fluorescence koji je proporcionalan količini analiziranih proteina je meren na FL1 kanalu na talasnoj dužini od 488 nm protočnog citofluorimetra CyFlow Space Partec (Sysmex Partec GmbH, Nemačka). Rezultati su analizirani uz pomoć softvera FCSalyzer 0.9.17 (<https://sourceforge.net/projects/fcsalyzer/>) i Summit 4.3 (DAKO, SAD).

3.12. Izolacija proteina i „Western blot“ analiza

3.12.1. Izolacija proteina

U87 i U87-TxR ćelije su zasejavane u flaskove površine 25 cm² u MEM medijumu u gustini od 1×10^6 ćelija i odmah tretirane sa 5 μM Si306, pro-Si306 ili dasatiniba u periodu od 24 h. Za izolaciju proteina, 1×10^6 ćelija po uzorku je homogenizovano na ledu u Leammli puferu za liziranje (40% glicerol, 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, Milli-Q H₂O). Leammli puferu je neposredno pred upotrebu dodat β-merkaptetanol (finalno razblaženje u rastvoru 20%). Homogenati su promešani uz pomoć vorteksa i kratko centrifugirani (6-7 sekundi), nakon čega su denaturisani kuvanjem 5 min na 95 °C. Uzorci su čuvani na -80 °C do dalje analize.

3.12.2. Elektroforeza proteina

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Gel za razdvajanje je, pored akrilamida/bisakrilamida (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) u finalnoj koncentraciji 8% ili 12%, sadržao i 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8) i 10% SDS. Gel za koncentrisanje je bio sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1), 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) i 10% SDS. Za polimerizaciju gelova, kao i za razdvajanje i koncentrisanje, korišćeno je 100 μl 10% amonijum persulfata i 4 μl tetrametiletilendiamina - TEMED (Serva Electrophoresis GmbH, Nemačka) na 10 mL smeše.

Količina proteina koja je nanošena na gel je optimizovana eksperimentalno za svaki uzorak. Pošto je izolacija proteina vršena iz istog broja ćelija po uzorku, nalivan je isti volumen izolata (10 μL) po bunariću. Posle prve puštene elektroforeze po izolaciji proteina, gelovi su bojeni Coomassie Brilliant Blue bojom (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; destilovana voda) radi standardizacije količine proteina koja se nanosi na gel po uzorku. U odnosu na informaciju dobijenu bojenjem prvog gela po izolaciji, količine izolata koje se nalivaju po uzorku su korigovane da bi se ujednačila količina proteina koja se nanosi u bunariće pri daljim puštanjima elektroforeze. Kao standard za molekularnu masu proteina korišćen je obojeni marker širokog opsega PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, SAD). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris, pH 8,3; 0,1% SDS) pod konstantnim naponom od 120 V na sobnoj temperaturi.

3.12.3. Elektrotransfer proteina

Prenos (transfer) proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu je vršen sistemom za transfer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon završene

elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3), gde je ostavljen narednih 15 min radi ekvibracije. PVDF membrane (Hybond-P, GE Healthcare, Ujedinjeno Kraljevstvo) su prvo aktivirane u metanolu 20 sekundi, a zatim isprane u destilovanoj vodi 5 min. Nakon toga su prebačene u posudu sa puferom za transfer gde su ekvilibrisane narednih 15 min. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sunđer) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 20 min. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i postavljanja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen preko noći, pod konstantnim naponom od 30 V. Po završenom transferu, membrane su isprane dejonizovanom vodom i potapane u Ponceau S boju (1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda) radi vizuelizacije proteinskih traka. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi. Do imunološkog bojenja proteina, membrane su čuvane na 4 °C u TBS-T puferu sledećeg sastava: 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 137 mM natrijum hlorid i 0,05% Tween 20.

3.12.4. Imunološka detekcija imobilizovanih proteina

Detekcija je rađena na membranama koje su blokirane u rastvoru 5% BSA u TBS-T puferu. Blokiranje membrane je trajalo 1 h na sobnoj temperaturi, a rađeno je u cilju smanjivanja nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja, membrane su ispirane u TBS-T puferu 5 min, koji je zatim odliven i zamenjen rastvorom za blokiranje u koji su dodata primarna antitela. Korišćena su sledeća primarna antitela: zečje poliklonsko antitelo za EGFR (Thermo Fisher Scientific, SAD; razblaženje 1:750), zečje monoklonsko antitelo za FAK (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:1 000), zečje monoklonsko antitelo za pFAK (Invitrogen, SAD; razblaženje 1:1 000), zečje monoklonsko antitelo za Src (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:5 000), zečje monoklonsko antitelo za pSrc (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:1 000), zečje monoklonsko antitelo za ERK (Thermo Fisher Scientific, SAD; razblaženje 1:5 000), zečje monoklonsko antitelo za pERK (Thermo Fisher Scientific, SAD; razblaženje 1:500), zečje monoklonsko antitelo za AKT (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:1 000), zečje monoklonsko antitelo za pAKT (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:750), zečje monoklonsko antitelo za β -tubulin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka; razblaženje 1:50 000). Nakon inkubacije sa primarnim antitelom preko noći na 4 °C, membrane su ispirane 6 puta po 5 min u TBS-T puferu da bi se uklonila primarna antitela koja se nisu specifično vezala, i potom inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa HRP-konjugovanim poliklonskim anti-zečjim IgG antitelom (Santa Cruz Biotechnology, SAD; razblaženja 1:10 000). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 6 puta po 5 min u TBS-T puferu, a zatim izložene dejstvu luminola (Western Blotting Chemi luminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Membrane su inkubirane u supstratu 2 min, ocedene i izložene autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u trajanju od 1 do 15 min. Filmovi su razvijeni odmah po završetku ekspozicije membrane i skenirani radi dalje analize.

3.12.5. Semikvantitativna analiza imunoblotova

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski u ImageJ softveru (U.S. National Institutes of Health, SAD). Ekspresija ciljnih proteina je izražena relativno u odnosu odgovarajući β -tubulin, koji je služio kao kontrola za nanetu količinu ukupnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje. Odnos optičke gustine ciljnog proteina prema optičkoj gustini interne kontrole (β -tubulin) u netretiranim kontrolnim uzorcima je arbitrarno definisan kao 1.0 i služio je kao osnov za poređenje tretiranih uzoraka sa kontrolom.

3.13. Analiza invazivnog potencijala ćelija

3.13.1. Metoda degradacije želatina

Merenjem stepena razlaganja želatina utvrđuje se sposobnost ćelija da razgrađuju vanćelijski matriks. Kao model korišćen je želatin svinjske kože konjugovan sa zelenom fluoroforom Oregon Green® 488 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Ovaj želatin je supstrat za matriksne metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9. Stepenn razlaganja želatina analiziran je kod ćelijskih linija U87 i U87-TxR i primarnih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 sledećom procedurom:

1. Pokrovna stakla su sterilisana 70% etanolom pre početka eksperimenta i postavljena na dno adherentne mikrotitar ploče sa 6 bunarića (Sarstedt, Nemačka).
2. Želatin je prethodno zagrejan 10 min na 37°C i rastvoren u PBS puferu u odnosu 1:8. Na svako pokrovno staklo je sipano 50 µL ovako pripremljenog želatina (0,625 mg/µL finalno), a potom je dodato 30 µL 0,25% gluteraldehida koji služi za umrežavanje želatina i stvaranje njegove nerastvorljive varijante.
3. Pokrovna stakla su postavljena u bunariće tako da želatin bude sa donje strane što obezbeđuje ravnomerno raspoređivanje želatina tokom umrežavanja. Adherentna mikrotitar ploča je potom inkubirana 15 min na 4°C nakon čega su pokrovna stakla prebačena u novu mikrotitar ploču sa 6 bunarića tako da umreženi želatin bude sa gornje strane pokrovnog stakla.
4. Prethodno umnožene U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6 ćelije su prebrojane i zasejane na pokrovna stakla u gustini od 50 000 ćelija po bunariću u 1 mL odgovarajućeg medijuma.
5. Nakon što su se zalepile za pokrovna stakla, ćelije su tretirane Src tirozin-kinaznim inhibitorima Si306 i pro-Si306 u koncentracijama od 5 µM i 10 µM za ćelijske linije i 10 µM i 20 µL za primarne ćelije.
6. Ćelije su inkubirane 24 h na 37°C, potom je odliven medijum i ćelije su isprane PBS puferom i fiksirane sa 500 µL 4% rastvora PFA. Nakon 10 min, ćelije su ponovo isprane PBS puferom i obojene fluorescentnim bojama ActinRed™ 555 (Thermo Fisher Scientific, SAD) i Hoechst 33342 30 min na sobnoj temperaturi. Pokrovno staklo je fiksirano na mikroskopsku pločicu u rastvoru Mowiol® 4-88 u glicerolu. ActinRed™ 555 služi za vizuelizaciju aktinskih filamenata, a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara. Pločice su slikane na 20x uveličanju na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) pomoću AxioVision 4.8 softvera.
7. Mikrografije su analizirane u ImageJ softveru (U.S. National Institutes of Health, SAD). Sa mikrografija je utvrđivan broj ćelija i površina razgrađene oblasti u želatinu. Računat je odnos površine razgrađene oblasti u odnosu na broj ćelija što predstavlja stepenn razgradnje želatina u uzorku. Analizirano je najmanje 100 ćelija po uzorku.

3.13.2. Test invazivnosti ćelija

Metastatski potencijal tumorske ćelije ogleđa se, između ostalog, i u njenoj sposobnosti da se kreće ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa (migracija) i da tom prilikom enzimatski razgradi

prepreke u vidu komponenti vanćelijskog matriksa ili prođe bazalnu membranu (invazija). Sposobnost invazije ćelija utvrđena je ispitivanjem migracije ćelija kroz poroznu membranu obloženu matrigelom. U tu svrhu je korišćen komercijalno dostupan matrigel koji predstavlja smešu vanćelijskih proteina koje sekretuju Engelbret-Holm-Svarm (EHS) ćelije mišjeg sarkoma. Za procenu invazije U87 i U87-TxR ćelija *in vitro* korišćene su komorice čije dno čini membrana prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 µm (BD Labware, SAD). Procedura se sastojala iz sledećih faza:

1. Komorice su stavljane u adherentne mikrotitar ploče sa 24 bunarića (Sarstedt, Nemačka). Gornja površina membrana ovih komorica bila je obložena tankim slojem matrigela rastvorenog u MEM medijumu bez FBS u razblaženju 1:10. Sipano je ukupno 50 µL rastvora matrigela po komorici, kome je dozvoljeno da polimeriše 3 h na 37° C.
2. U bunariće mikrotitar ploče je prvo sipano 500 µL MEM medijuma (za pozitivnu kontrolu i tretmane sipan je medijum sa 10% FBS, za negativnu kontrolu sipan je medijum bez FBS), a zatim su postavljene komorice sa pripremljenim matrigelom.
3. U same komorice, direktno na sloj matrigela, zasejavano je 150 000 ćelija po uzorku u 200 µL MEM medijuma bez FBS. U87 i U87-TxR ćelije su tretirane Src tirozin-kinaznim inhibitorima Si306 i pro-Si306 u koncentraciji od 5 µM. Pozitivnu kontrolu su predstavljale ćelije u medijumu bez FBS koje se kroz poroznu membranu kreću ka hemoatraktantima (medijum sa FBS).
4. Ovako pripremljen eksperiment je inkubiran 24 h na 37° C.
5. Nakon inkubacije, ćelije sa gornje strane membrane koje nisu migrirale su odstranjene špatulicom i komorice sa membranama su fiksirane 10 min na sobnoj temperaturi u bunarićima sa 500 µL 4% PFA rastvora.
6. Komorice su potom bojene u bunarićima Hoechst 33342 bojom 15 min na sobnoj temperaturi radi vizualizacije ćelijskih jedara.
7. Nakon toga, membrane su isprane PBS puferom, isečene sa komorica skalpelom i fiksirane na mikroskopsku pločicu u rastvoru Mowiol® 4-88 u glicerolu.
8. Svaka membrana je slikana na 5x uvećanju na Zeiss Axiovert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) pomoću AxioVision 4.8 softvera.
9. Mikrografije su analizirane u ImageJ softveru (U.S. National Institutes of Health, SAD). Broj ćelija na svakoj membrani je normalizovan u odnosu na broj ćelija u pozitivnoj kontroli što ukazuje na stepen invazije ćelija. Eksperiment se smatrao uspešnim ukoliko je u negativnoj kontroli kroz membranu migriralo manje od 15% ćelija u odnosu na broj ćelija koje su migrirale u pozitivnoj kontroli. Eksperiment je ponovljen tri puta za svaku ćelijsku liniju.

3.14. Životinjski model zebriće

3.14.1. Uzgajanje i mrešćenje zebrića

Za ispitivanje invazivnog potencijala ćelija glioblastoma *in vivo*, uspostavljeni su ksenografti U87 ćelija u modelu zebriće. Za potrebe ovih eksperimenata korišćene su zebriće divljeg tipa (*Danio rerio*) Tübingen soja. Svi eksperimenti na zebrićama su urađeni na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Sva postupanja sa životinjama bila su u skladu sa lokalnim i nacionalnim propisima uz pribavljenu etičku saglasnost Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (broj rešenja: 323-07-02116/2020-05/1).

Zebriće su gajene u skladu sa standardnom procedurom na temperaturi od 28 °C, uz kontinuiranu aeraciju i filtriranje vode, pod veštačkim svetlom uz održavanje ciklusa svetlo/mrak u

odnosu 14:10 h i hranjenje dva puta dnevno komercijalno dostupnom suvom hranom TetraMin™ flakes (Tetra Melle, Germany) uz dodatak živih račića, artemija (*Artemia nauplii*). Gajenje i mrest zebrića, kao i gajenje embriona nakon mresta su vršeni u vodi za embrione koja sadrži 0,073 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 0,5 mM MgSO₄ uz dodatak 0,0002% metilensko plavog koji se koristi kao agens za dezinfekciju i natrijum bikarbonata do finalne koncentracije od 0,75 mM.

Da bi prinos jaja prilikom mresta bio veći, mužjaci i ženke su gajeni odvojeno. Mrešćenje je vršeno jednom nedeljno istim danom, tri nedelje za redom. Četvrte nedelje se pravila pauza do novog mresta. U mrestilicu su stavljana 2 mužjaka i 3 ženke tako što su bili odvojeni pregradom. Narednog dana, posle paljenja svetla sklanjane su pregrade iz mrestilica. Jaja su sakupljana najkasnije 1 h posle mresta u staklenu Petri šolju napunjenu vodom za embrione sa dodatkom metilensko plavog. U slučaju da je više od 10% jaja ostalo neoplođeno, mrest je bio odbacivan. Pod stereo mikroskopom PXS-VI Optica (Shanghai Deilun Optical Instrument, Kina) su uklanjana neoplođena jaja ili jaja sa nedostatkom u razviću, a ostala su čuvana u inkubatoru na 28 °C do daljeg korišćenja 48 h nakon oplodjenja. U vodu za embrione je u periodu između 16 h i 24 h posle oplodjenja dodavana feniltiourea (N-phenylthiourea - PTU) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) u finalnoj koncentraciji od 0,003%, kako bi se sprečio razvoj pigmenta kod embriona.

3.14.2. Inokulacija ćelija glioblastoma u embrione zebrića

Inokulacija ćelija glioblastoma u embrione zebrića je vršena 48 h nakon oplodjenja. Ukoliko nisu sami izašli iz horiona, embrioni su prvo dehorionizovani pincetama. Zatim su anestetizirani u rastvoru Tricaine-S (Western Chemicals Inc, SAD) u koncentraciji od 50 mg/L i pozicionirani na vlažnoj 1% agaroznoj ploči, pripremljenoj posebno za inokulaciju ćelija.

U87 ćelije su gajene u flaskovima površine 75 cm² u MEM medijumu do dostizanja konfluentnosti. Nakon tripsinizacije ćelije su ispirane u PBS puferu na sobnoj temperaturi. Posle brojanja, ćelije su bojene fluorescentnom bojom CellTracker™ CM-DiI razblaženom u PBS puferu u koncentraciji od 2,5 µg/mL. Ćelije su inkubirane u mraku 4 min na 37 °C, zatim 15 min na 4 °C, nakon čega su ispirane 2 puta u PBS puferu. Fluorescentno obojene ćelije su potom resuspendovane u MEM medijumu i oko 125 ćelija je inokulisano u središte žumančane kese embriona pomoću FemtoJet 4i mikroinjektora (Eppendorf, Nemačka) opremljenog borosilikatnim staklenim kapilarama (Femtotips, Eppendorf, Nemačka) i mikromanipulatorom (MM-3, Narishige, Japan).

Nakon izvršene inokulacije, embrioni su vizualizovani pod fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus Corporation, Japan) pomoću TRITC filtera i samo uspešno inokulisani embrioni su dalje korišćeni u eksperimentu. Uspešno inokulisani embrioni su prebačeni u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (jedan embrion po bunariću) u 200 µL vode za embrione sa 0,003% PTU. Embrioni su čuvani na 32° C, što je samo 5° C niža temperatura od temperature tela kod ljudi, ali je gornja granična temperatura pogodna za razvoj embriona zebrića. Na taj način je omogućen neometani razvoj embriona zebrića, ali i preživljavanje inokulisanih ćelija kao i njihova invazija u udaljene organe (Teng i sar., 2013).

Nakon 24 h, dan nakon inokulacije, embrioni su slikani na fluorescentnom mikroskopu Olympus BX51 korišćenjem TRITC filtera kao i u svetlom polju da bi se dokumentovao izgled U87 ksenografta u žumančanoj kesi embriona pre tretmana. U87 ćelije su inokulisane u žumančanu kesu embriona zebrića jer tako nemaju mogućnost pasivnog transporta u vaskulaturu (Haldi i sar., 2006; L. M. Lee i sar., 2005). Da bi se osiguralo da inokulisane ćelije aktivno migriraju u udaljene organe, iz eksperimenta su izbačeni embrioni kod kojih su inokulisane ćelije dospele do udaljenih organa za

manje od 24 h od inokulacije, što je jedino moguće ako se tokom inokulacije pogodi krvni sud (Teng i sar., 2013).

Nakon slikanja, embrioni su podeljeni u tri grupe: netretirana kontrola i embrioni tretirani sa 2,5 μM Si306 ili 2,5 μM pro-Si306. Svaka grupa je sadržala 32 embriona. Eksperiment je takođe obuhvatio i embrione zebrića u koje je ubrizgan samo MEM medijum, a koji predstavljaju kontrolu preživljavanja samog procesa inokulacije. Nakon 72 h tretmana, četvrtog dana od inokulacije, svaki embrion je ponovo slikan na fluorescentnom mikroskopu. Procenat embriona kod kojih se javila diseminacija tumorskih ćelija od mesta inokulacije, broj diseminovanih ćelija kao i intenzitet fluorescence u ksenograftima obeleženim CellTracker™ CM-DiI bojom su kvantifikovani u ImageJ softveru. Ukoliko je u embrionu uočeno 5 ili više diseminovanih U87 ćelija koje se nalaze izvan vaskulature, smatrano je da je došlo do invazije (Drabsch i sar., 2013; Teng i sar., 2013). Eksperiment je ponavljen tri puta.

Posle završetka eksperimenta, embrioni su eutanazirani dodavanjem 6,15% natrijum hipohlorita u vodu u odnosu 1:5. Embrioni su ostavljani 5 min u ovom rastvoru i potom odlagani u odgovarajući otpad.

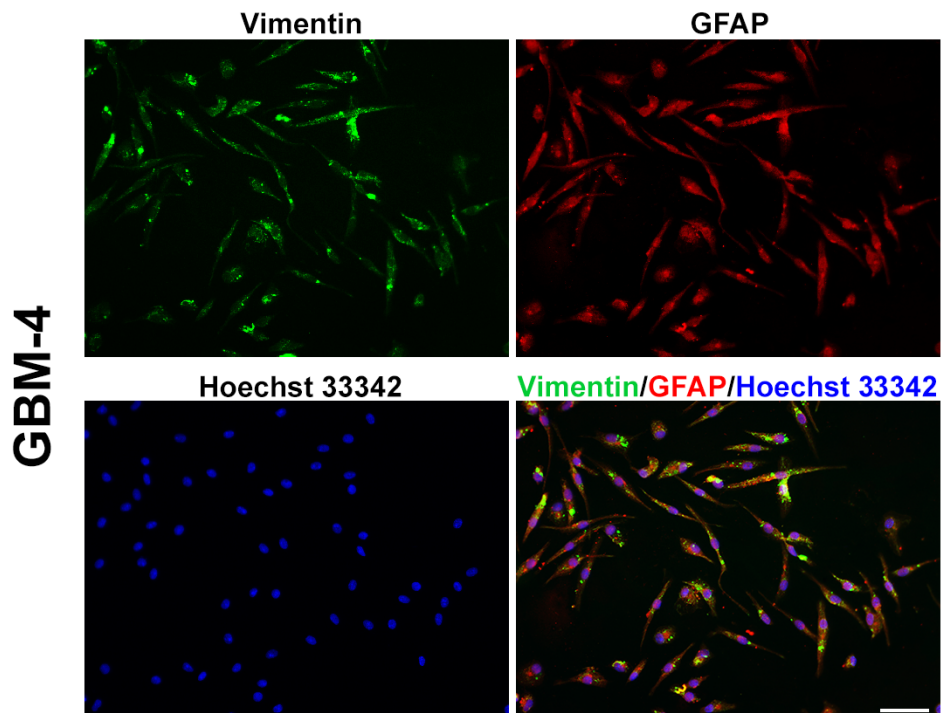
3.15. Statistička obrada rezultata

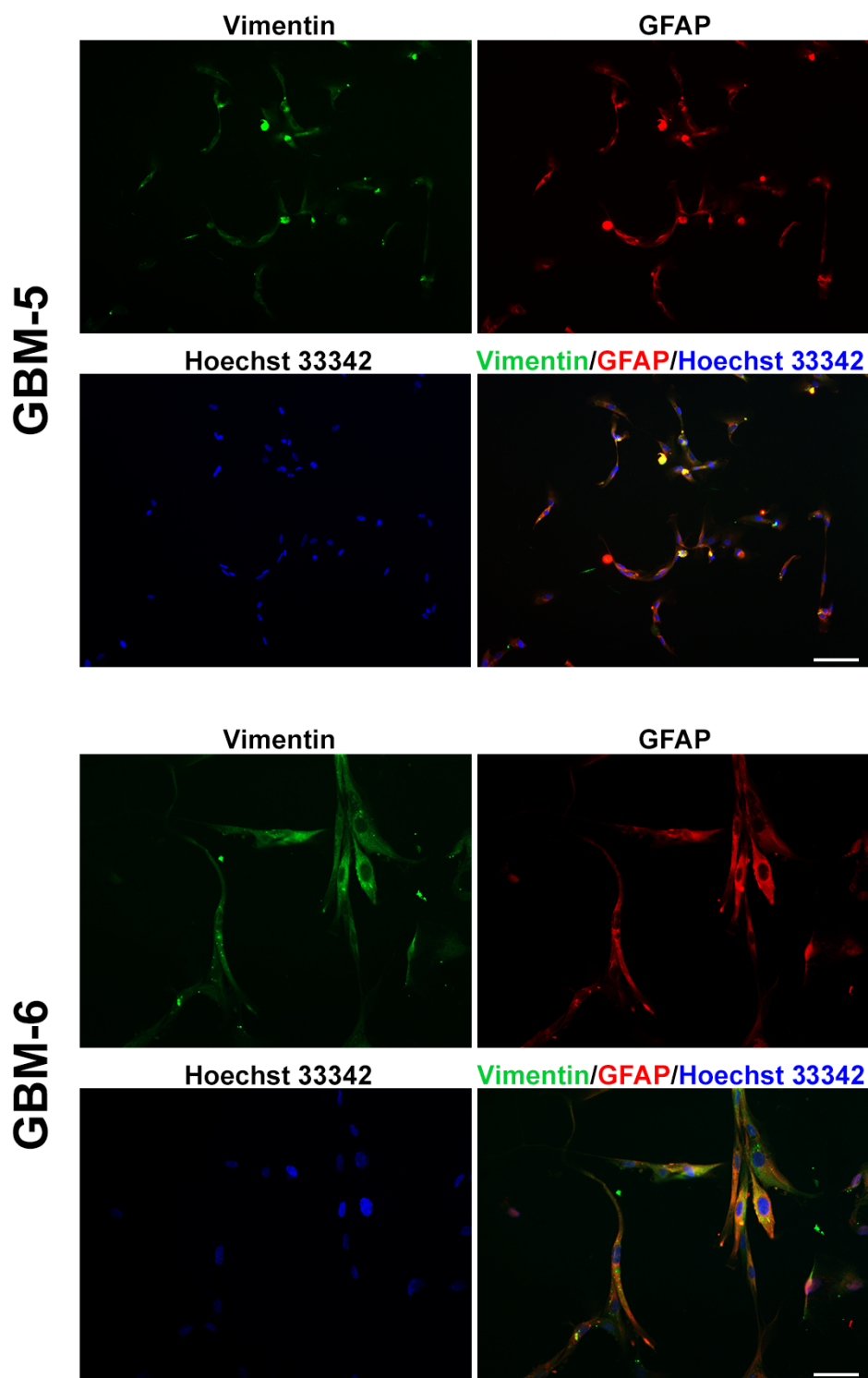
Eksperimentalni rezultati dobijeni u ovoj studiji su statistički obrađeni korišćenjem programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., SAD) i Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software, SAD). Normalnost distribucije podataka je procenjena Shapiro-Wilk testom. Podaci koji su pokazali normalnu distribuciju, dalje su analizirani parametarskom statističkom analizom. Statistička obrada rezultata dobijenih određivanjem akumulacije rodamina 123 protočnom citofluorimetrijom i MTT testom vijabilnosti je vršena dvofaktorskim ANOVA testom, uz Dunnett-ov test višestrukog poređenja. Rezultati testa degradacije želatina nisu pokazali normalnu distribuciju, pa je za statističku analizu korišćen Mann-Whitney test. Podaci dobijeni u testu invazivnosti kao i podaci dobijeni određivanjem ekspresije Src i pSrc protočnom citofluorimetrijom su analizirani neuparenim Studentovim t-testom, dok su rezultati dobijeni „Western blot“ (engl.) i qPCR metodama, kao i rezultati dobijeni u eksperimentima modelu zebriće, obrađeni uparenim Studentovim t-testom. Statistički značajnim su smatrane samo one razlike u kojima je stepen verovatnoće bio $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija primarnih ćelijskih kultura glioblastoma

Tri primarne ćelijske kulture: GBM-4, GBM-5 i GBM-6 su uspostavljene iz sveže operisanih hirurških uzoraka pacijenata kod kojih je histopatološki utvrđen primarni glioblastom. Imunocitohemijskim bojenjem na vimentin i GFAP protein, pokazano je da su ćelije izolovane i umnožene iz posle-operativnih uzoraka zaista ćelije glioblastoma. Kod sve tri primarne ćelijske kulture uočena je ekspresija oba proteina što odgovara fenotipskim karakteristikama glioblastoma (Slika 7).





Slika 7. Imunocitohemijsko bojenje primarnih ćelijskih kultura glioblastoma. Reprezentativne slike imunocitohemijskog bojenja kojim su obeležene primarne ćelije glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 koje ekspimiraju vimentin (zeleni signal) i GFAP (crveni signal). Ćelijska jedra obeležena su Hoechst 33342 fluorescentnom bojom (plavi signal). Skala = 50 μ m.

4.2. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na inhibiciju vijabilnosti glioblastoma

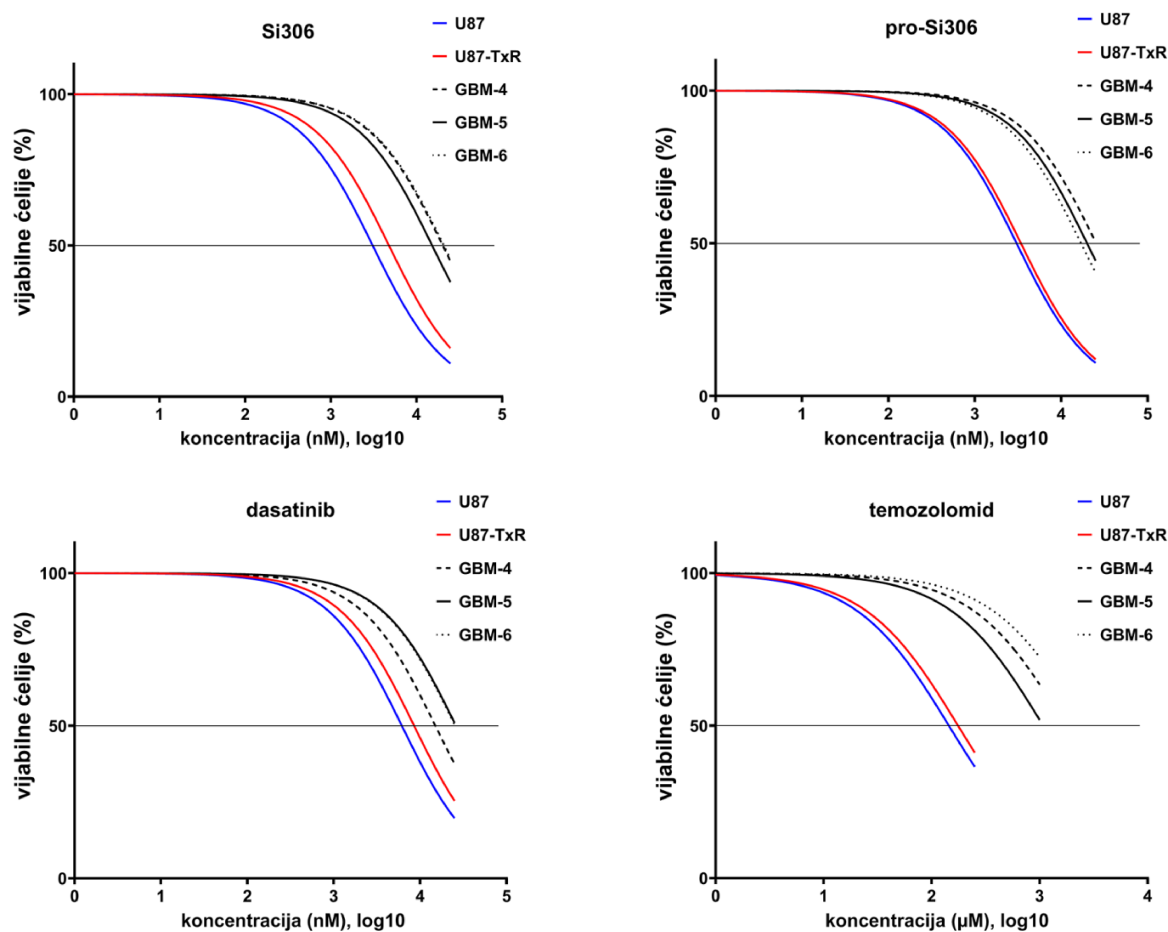
Uticaj Src tirozin-kinaznih inhibitora, Si306 i pro-Si306, na vijabilnost senzitivnih i rezistentnih ćelija humanog glioblastoma U87 i U87-TxR, kao i primarnih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 upoređen je sa dasatinibom (klinički odobrenim Src tirozin-kinaznim inhibitorom) i temozolomidom (trenutno aktuelnim hemioterapeutikom u lečenju glioblastoma). IC₅₀ vrednosti dobijene MTT testom nakon 72 h tretmana pomenutim supstancama su prikazane u Tabeli 1. Dozno-zavisne krive inhibitornog efekta dobijene nelinearnom regresionom analizom iz kojih su izračunate IC₅₀ vrednosti supstanci su prikazane na Slici 8.

Tabela 1. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze i temozolomida na vijabilnost ćelija glioblastoma nakon 72 h tretmana izražen kao IC₅₀ ± SD (µM) (n = 3)

Supstance	U87	U87-TxR	GBM-4	GBM-5	GBM-6
Si306	3,081 ± 0,260	4,775 ± 0,322	20,270 ± 0,322	15,250 ± 1,207	19,120 ± 1,652
pro-Si306	3,045 ± 0,343	3,419 ± 0,359	25,390 ± 1,159	19,920 ± 1,196	18,280 ± 1,696
dasatinib	6,143 ± 0,464	8,516 ± 0,691	18,600 ± 1,259	25,610 ± 1,216	25,350 ± 1,199
temozolomid	144,38 ± 28,06	175,58 ± 26,68	1737,8 ± 1,2	1076,5 ± 1,2	2624,2 ± 1,2

Src inhibitori, Si306 i pro-Si306, su pokazali sličan efekat na smanjenje vijabilnosti U87 i U87-TxR ćelija sa IC₅₀ vrednostima između 3 i 5 µM. Dasatinib je ostvario nešto slabiji efekat kod U87 i U87-TxR ćelija sa IC₅₀ vrednostima između 6 µM i 8,5 µM. Temozolomid je pokazao znatno slabiji efekat na smanjenje vijabilnosti istih ćelija i znatno više IC₅₀ vrednosti (od 30 do 50 puta) u odnosu na Si306 i pro-Si306 (Tabela 1).

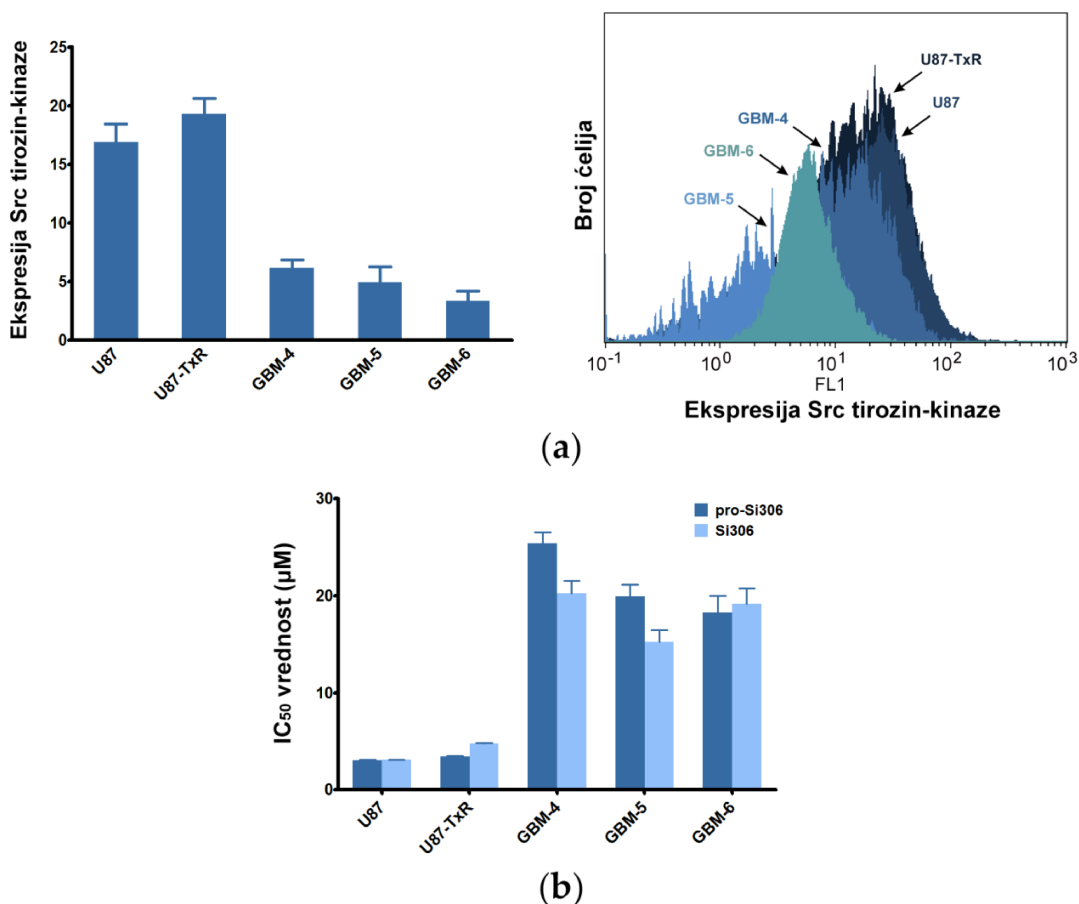
Primarne ćelije GBM-4, GBM-5 i GBM-6 su bile manje osetljive na Si306 i pro-Si306 u odnosu na komercijalne ćelije U87 i U87-TxR. Src inhibitori, uključujući i dasatinib, efikasno su smanjili vijabilnost primarnih kultura u opsegu između 15 i 25,5 µM. Primarne ćelije su najmanje bile osetljive na primenu temozolomida, sa više desetina puta višim IC₅₀ vrednostima u odnosu na Src inhibitore (Tabela 1).



Slika 8. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze i temozolomida na vijabilnost ćelija glioblastoma nakon 72 h tretmana. Vijabilnost U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6 ćelija glioblastoma nakon tretmana Src tirozin-kinaznim inhibitorima, Si306, pro-Si306 i dasatinibom, kao i hemioterapeutikom temozolomidom određena je MTT testom. Dozno-zavisne krive inhibitornog efekta dobijene su nelinearnom regresionom analizom u GraphPad Prism 6.0 softveru.

4.2.1. Zavisnost osetljivosti ćelija glioblastoma na Si306 i pro-Si306 od nivoa ekspresije Src tirozin-kinaze

Osetljivost ćelija glioblastoma na ispitivane inhibitore, što se reflektuje kroz determinisanu vrednost IC_{50} , u negativnoj je korelaciji sa nivoom ekspresije Src tirozin-kinaze (Slika 9a i 9b). Ćelije glioblastoma sa većom osetljivošću na Src inhibitore, imaju višu ekspresiju ciljnog molekula.

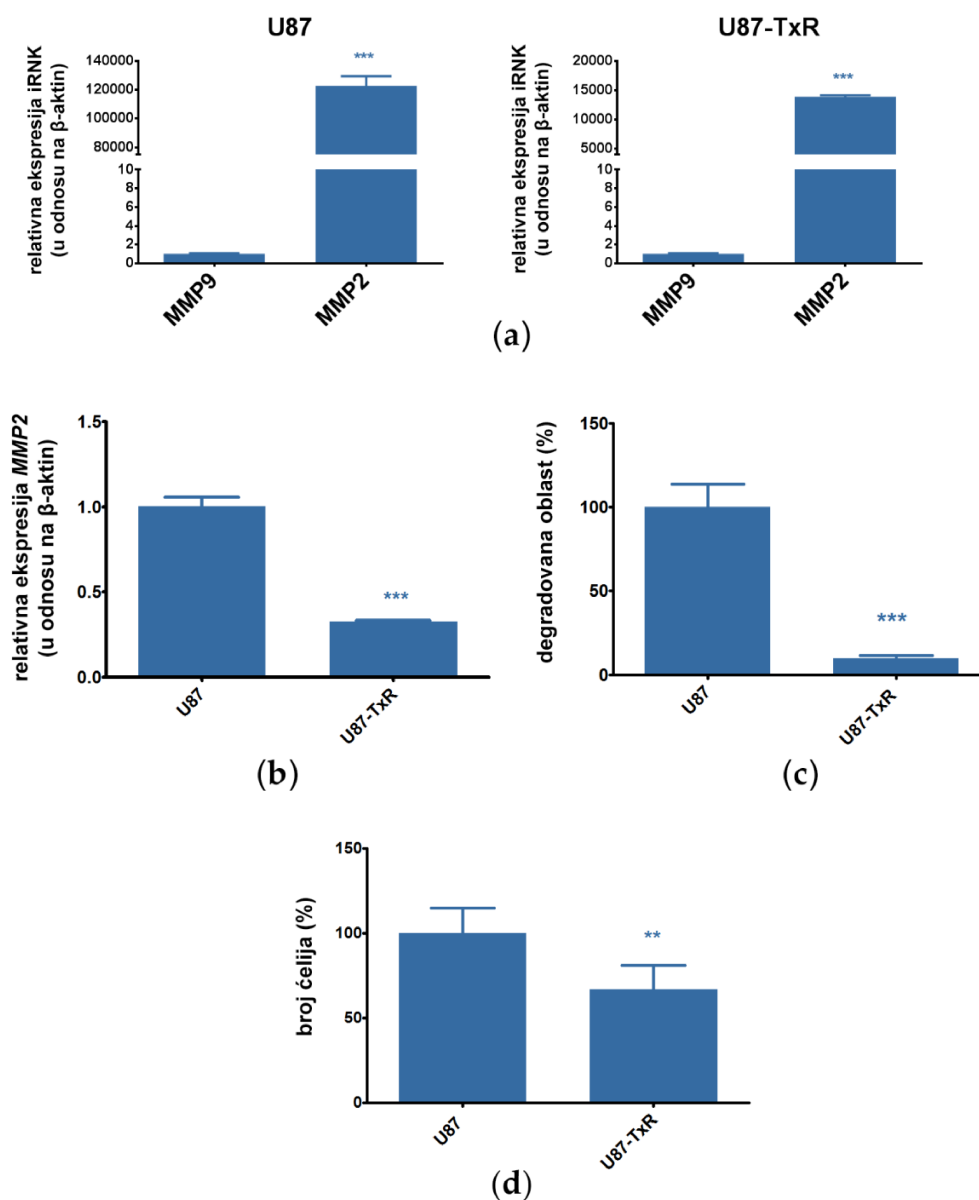


Slika 9. Osetljivost ćelija glioblastoma na Si306 i pro-Si306 zavisi od nivoa ekspresije Src proteina. (a) Histogram i profili protočne citofluorimetrije prikazuju nivo ekspresije Src u ćelijskim linijama glioblastoma (U87 i U87-TxR) i primarnim ćelijama glioblastoma (GBM-4, GBM-5, GBM-6). Histogram pokazuje srednju vrednost intenziteta fluorescencije (arbitrarne jedinice) dobijene protočnom citofluorimetrijom kod ćelija imuno-obeležanih antitelom na Src tirozin-kinazu. Vrednosti na histogramu predstavljaju srednju vrednost \pm SEM ($n=3$). **(b)** Osetljivost ćelijskih linija glioblastoma (U87 i U87-TxR) i primarnih ćelija glioblastoma (GBM-4, GBM-5 i GBM-6) na Src inhibitore Si306 i pro-Si306 izražene kao IC₅₀ vrednosti \pm SD ($n=3$). IC₅₀ vrednosti su dobijene MTT testom.

4.3. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na invazivni potencijal ćelija glioblastoma *in vitro*

4.3.1. Invazivni potencijal ćelija glioblastoma

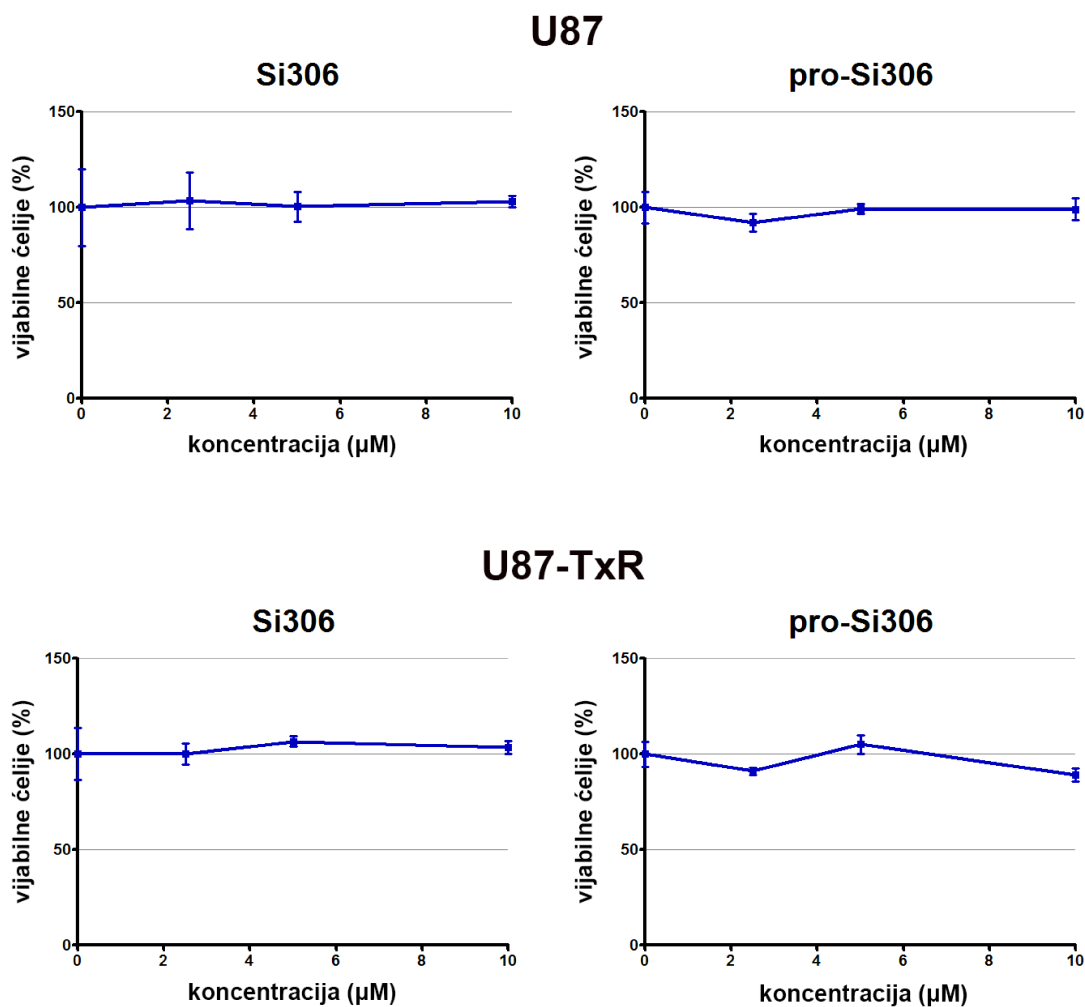
Nivo ekspresije iRNK za MMP-2 i MMP-9, enzima odgovornih za razgradnju želatina, ispitana je metodom qPCR u U87 i U87-TxR ćelijama. U obe ćelijske linije zastupljenost iRNK za *MMP9* značajno je niža od zastupljenosti iRNK za *MMP2* (Slika 10a), dok je nivo ekspresije *MMP2* u U87 ćelijama značajno viši u poređenju sa U87-TxR ćelijama (Slika 10b), što je u skladu sa njihovom većom sposobnošću da razgrađuju želatin (Slika 10c). Poređenje efikasnosti senzitivne i rezistentne ćelijske linije glioblastoma da razgrađuju želatin pokazalo je da je U87 ćelijska linija 10 puta invazivnija od U87-TxR (Slika 10c). Poređenjem invazivnosti senzitivne U87 i rezistentne ćelijske linije U87-TxR je pokazano da U87 ćelije poseduje veći potencijal za intravazaciju i ekstravazaciju u poređenju sa U87-TxR ćelijama (Slika 10d).



Slika 10. Karakterizacija invazivnih sposobnosti U87 i U87-TxR ćelija. (a) Relativna ekspresija *MMP2* i *MMP9* u U87 i U87-TxR ćelijama. β -aktin je korišćen kao interna kontrola. Relativna ekspresija je izračunata iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistički značajne razlike između grupa su predstavljene kao *** (p<0,001). **(b)** Relativna ekspresija *MMP2* u U87 i U87-TxR ćelijama. Relativna ekspresija *MMP2* je utvrđena metodom qPCR. β -aktin je korišćen kao interna kontrola. Relativna ekspresija je izračunata iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistički značajna razlika između U87 i U87-TxR ćelija je predstavljena kao *** (p<0,001). **(c)** Sposobnost ćelija U87 i U87-TxR da razgrađuju vanćelijski matriks izražena kao procenat degradovane oblasti želatina. Površina degradovane oblasti želatina je ustanovljena analizom mikrofografija nakon testa degradacije želatina. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistički značajna razlika je prikazana kao *** (p<0,001). **(d)** Invazivna sposobnost U87 i U87-TxR ćelija je predstavljena kao procenat ćelija koje invadiraju kroz matrigel i prolaze membranu u testu invazivnosti ćelija. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajna razlika je predstavljena kao ** (p<0,01).

4.3.2. Si306 i pro-Si306 smanjuju invazivni potencijal U87 i U87-TxR ćelija

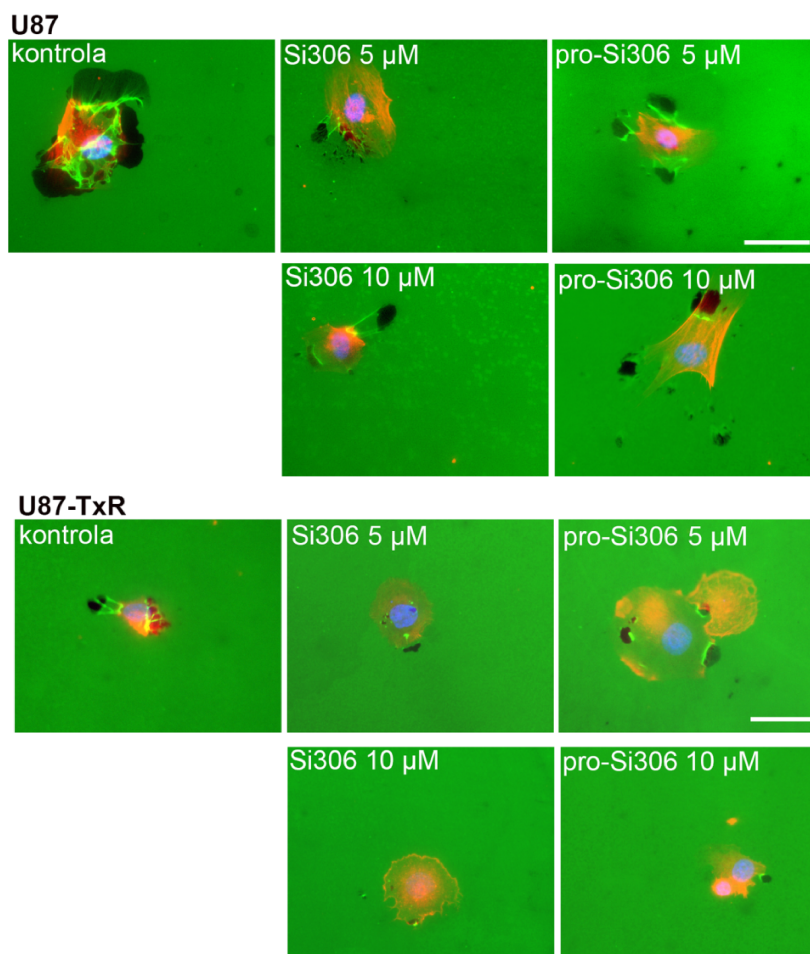
Za ispitivanje uticaja Src inhibitora na invazivni potencijal U87 i U87-TxR ćelija, bilo je neophodno izabrati koncentraciju inhibitora koja ne narušava vijabilnost ćelija u tretmanu koji traje 24 h (period izlaganja ćelija inhibitorima u testovima degradacije želatina i invazivnosti). MTT testom je utvrđeno da 2,5, 5 i 10 μM Si306 i pro-Si306 ne utiču na ćelijsku vijabilnost nakon 24 h (Slika 11). Koncentracije 5 i 10 μM su izabrane za dalje ispitivanje u pomenutim testovima.



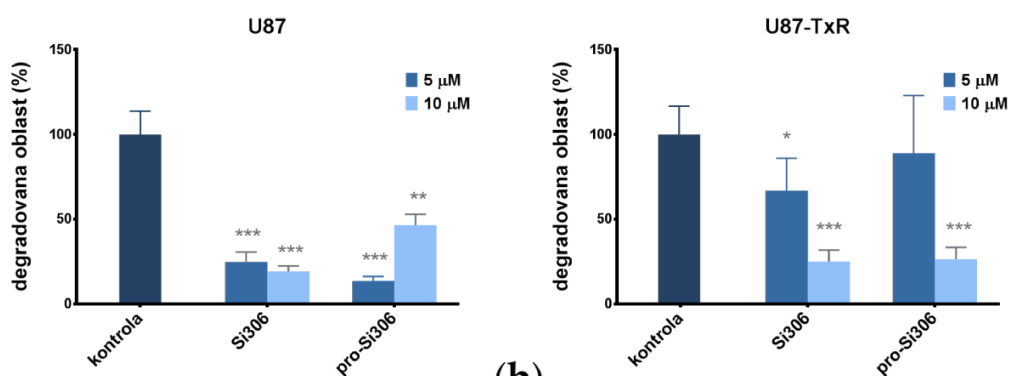
Slika 11. Uticaj Src inhibitora Si306 i pro-Si306 na vijabilnost U87 i U87-TxR ćelija nakon 24 h tretmana. Ćelijska vijabilnost je određena MTT testom. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD (n = 3).

4.3.2.1. Degradacija želatina

Testom degradacije želatina je proučavan efekat 5 i 10 μM Si306 i pro-Si306 na invazivni potencijal U87 i U87-TxR ćelija. Si306 i pro-Si306 su već pri koncentraciji od 5 μM statistički značajno smanjili potencijal U87 ćelija za degradaciju želatina za oko 80% ($p < 0,001$, Slika 12), dok su kod U87-TxR ćelija inhibitori pokazali statistički značajan efekat pri 10 μM ($p < 0,001$, Slika 12).



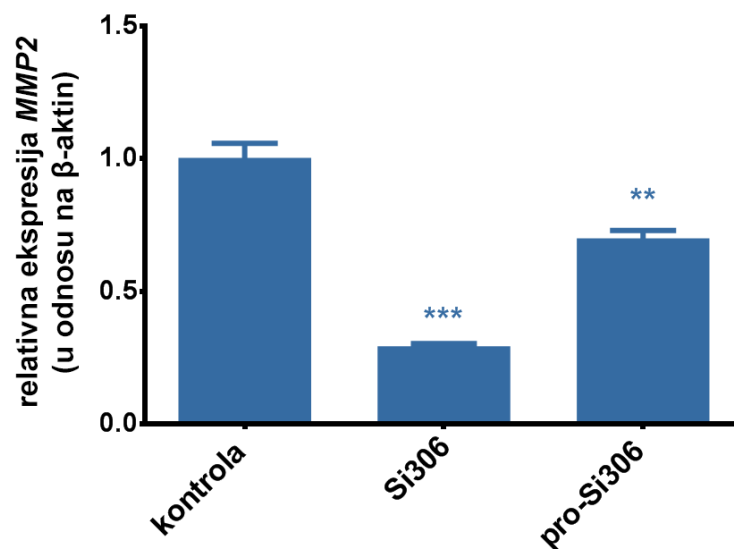
(a)



(b)

Slika 12. Uticaj Src inhibitora Si306 i pro-Si306 na sposobnost U87 i U87-TxR ćelija da razgrade želatin. Metodom degradacije želatina je ispitan efekat Si306 i pro-Si306 na invazivni potencijal U87 i U87-TxR ćelija. (a) Reprerzentativne slike razgradnje želatina kod U87 i U87-TxR ćelija nakon tretmana sa Si306 i pro-Si306. Aktinski filamenti su obeleženi ActinRed™ 555 bojom (crveno). Jedra su obeležena Hoechst 33342 bojom (plavo). Želatin je obeležen FITC fluoroforom (zeleno). Skala = 30 μm . (b) Procenat degradovane oblasti u želatinu nakon 24 h tretmana u odnosu na kontrolu. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajna razlika je prikazana kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

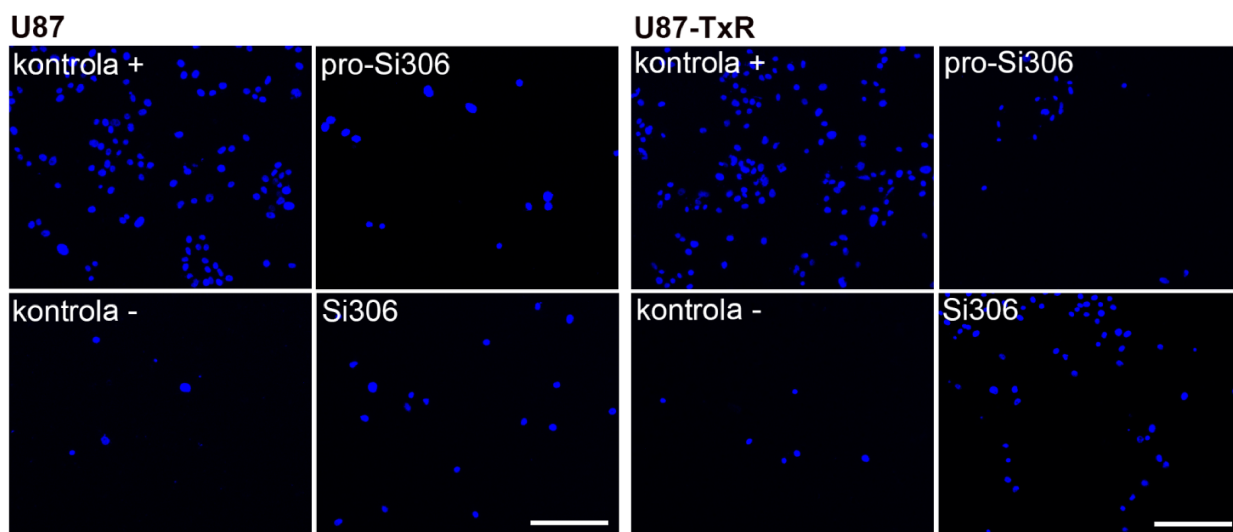
qPCR metodom je, takođe, pokazano da je tretman sa 5 μ M Si306 i pro-Si306 značajno smanjio ekspresiju *MMP2* iRNK u U87 ćelijskoj liniji (Slika 13), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim metodom degradacije želatina (Slika 12).



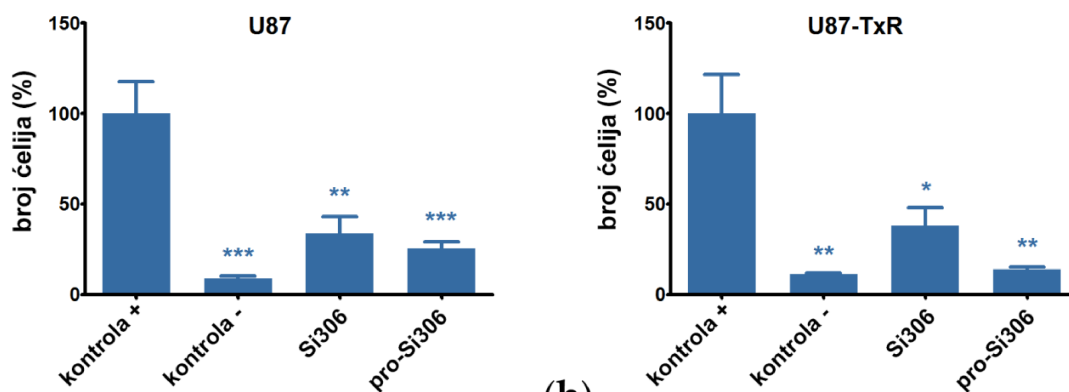
Slika 13. Relativna ekspresija *MMP2* u U87 ćelijama nakon tretmana Src inhibitorima Si306 i pro-Si306. Relativna ekspresija *MMP2* je utvrđena qPCR metodom nakon 24 h tretmana sa 5 μ M Si306 i pro-Si306. β -aktin je korišćen kao interna kontrola. Relativna ekspresija je izračunata iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistički značajne razlike između tretmana i kontrole su predstavljene kao ** (p<0,01) i *** (p<0,001).

4.3.2.2. Invazija kroz membranu

Testom invazivnosti pokazano je da Si306 i pro-Si306 smanjuju potencijal U87 i U87-TxR ćelija da invadiraju kroz bazalnu membranu (Slika 14). Bez obzira na razlike u njihovom invazivnom potencijalu, tretmani sa 5 μ M Si306 i pro-Si306 su smanjili invazivnost U87 i U87-TxR ćelija za preko 50% (Slika 14).



(a)

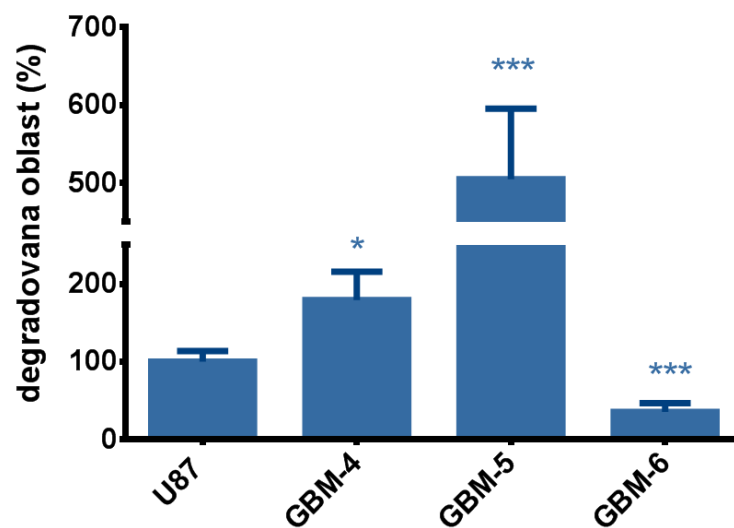


(b)

Slika 14. Uticaj Src inhibitora Si306 i pro-Si306 na invadiranje U87 i U87-TxR ćelija kroz bazalnu membranu. Praćena je sposobnost ćelija tretiranih sa 5 μ M Si306 i pro-Si306 da invadiraju kroz bazalnu membranu. (a) Reprerzentativne slike ćelija koje su prošle kroz matrigel i poroznu membranu. Jedra ćelija su obeležena Hoechst 33342 bojom (plavo). Skala = 200 μ m. (b) Procenat ćelija koje su prošle kroz matrigel i poroznu membranu. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i izražene su kao srednja vrednost \pm SEM. Kontrola + je pozitivna kontrola (sa FBS kao hemoatraktantom), a Kontrola - negativna kontrola (bez hemoatraktanta). Statistički značajne razlike u poređenju sa pozitivnom kontrolnom grupom su predstavljene kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.3.3. Si306 i pro-Si306 smanjuju invazivni potencijal primarnih ćelija glioblastoma u testu degradacije želatina

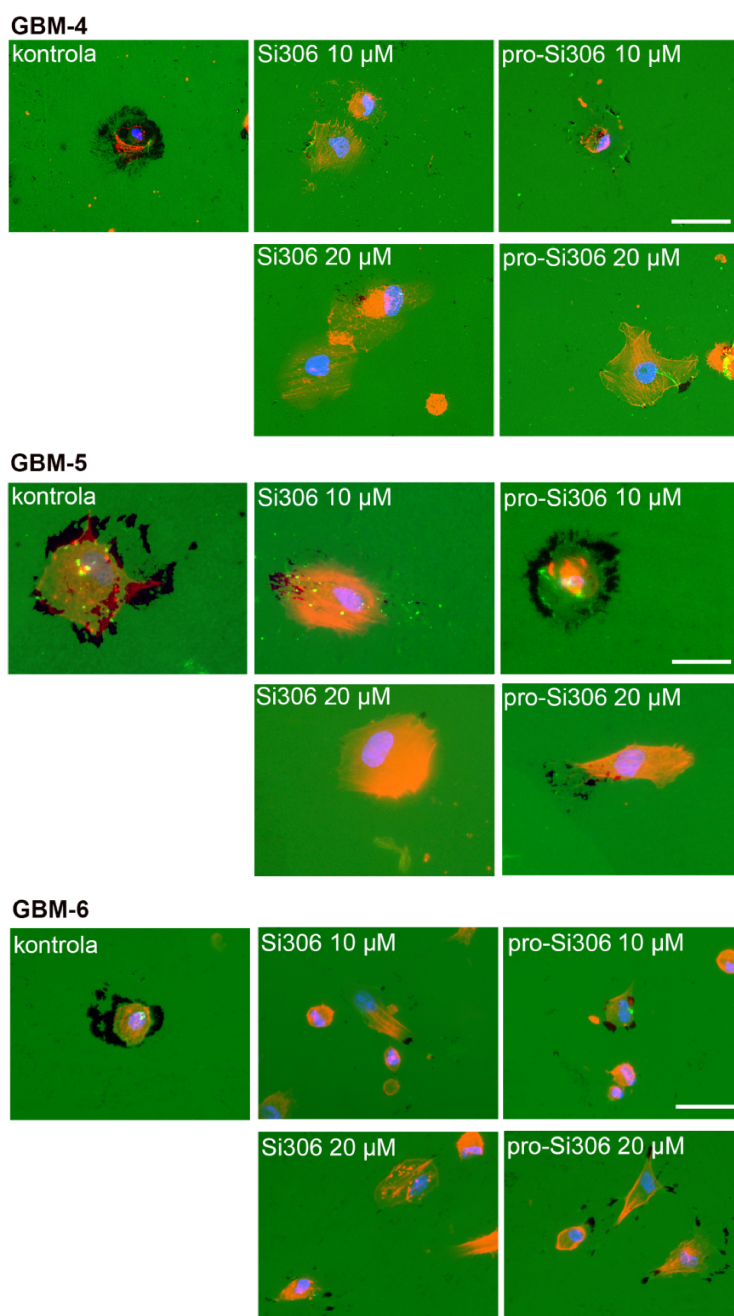
Poređenjem efikasnosti senzitivne ćelijske linije glioblastoma da razgrađuju želatin sa primarnim ćelijama GBM-4, GBM-5, GBM-6 pokazano je da primarne ćelije GBM-4 i GBM-5 efikasnije razgrađuju želatin i time pokazuju značajnije invazivne sposobnosti u odnosu na komercijalnu U87 ćelijsku liniju glioblastoma (Slika 15).



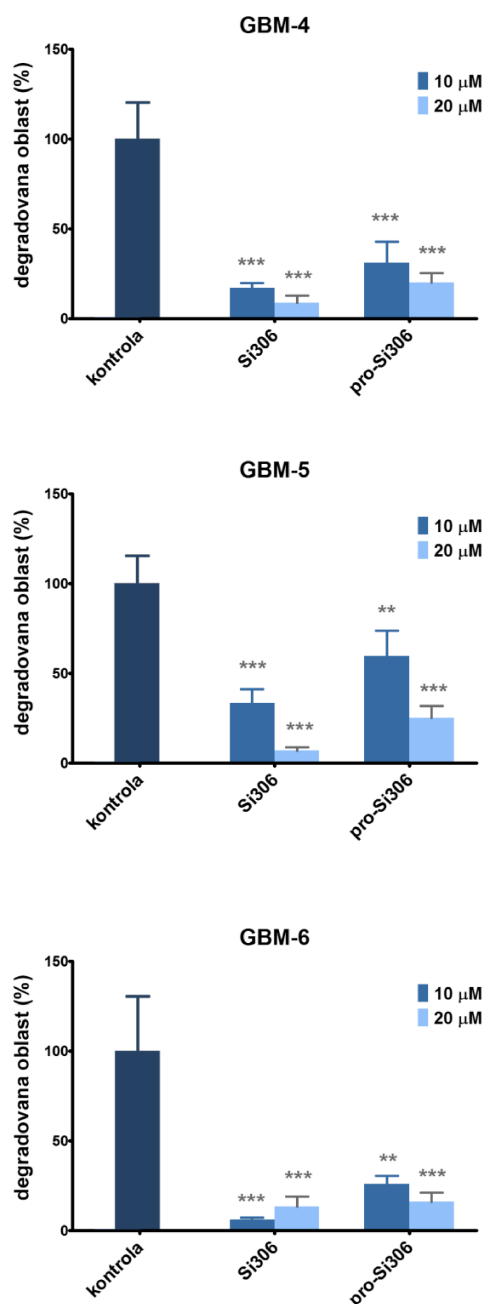
Slika 15. Invazivni potencijal ćelija glioblastoma. Sposobnost primarnih ćelija glioblastoma (GBM-4, GBM-5 i GBM-6) da razgrađuju vanćelijski matriks u poređenju sa ćelijskom linijom U87 izražena kao procenat degradovane oblasti. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistički značajne razlike između primarnih ćelija i ćelijske linije U87 su prikazane kao * ($p < 0,05$) i *** ($p < 0,001$).

Metodom degradacije želatina je takođe proučavana efikasnost Si306 i pro-Si306 da spreče razgradnju vanćelijskog matriksa od strane primarnih ćelijskih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6. Ćelije su tretirane sa 10 μ M Si306 i pro-Si306 pošto ova koncentracija nije imala značajnog uticaja na vijabilnost primarnih ćelija nakon 72 h. Nakon 24 h tretmana sa 10 μ M Si306 i pro-Si306, razgradnja želatina se kod svih primarnih ćelija glioblastoma značajno smanjila (Slika 16). Efekat primene veće koncentracije inhibitora (20 μ M) je takođe ispitan u svim primarnim kulturama, ali osim kod GBM-6 ćelija nije zabeležen značajan dozno-zavisni efekat na razgradnju želatina primenom inhibitora Si306 (Slika 16).

(a)



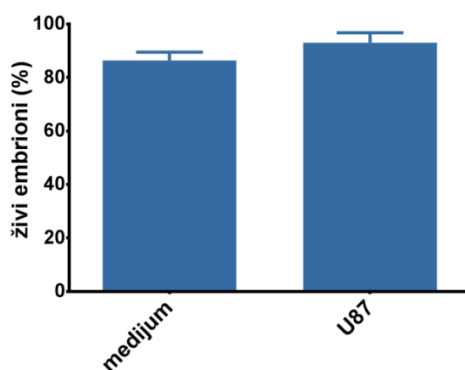
(b)



Slika 16. Uticaj Src inhibitora Si306 i pro-Si306 na sposobnost primarnih ćelija glioblastoma da razgrade želatin. Metodom degradacije želatina je ispitan efekat Si306 i pro-Si306 na invazivni potencijal GBM-4, GBM-5 i GBM-6 ćelija. (a) Reprerzentativne slike razgradnje želatina kod GBM-4, GBM-5 i GBM-6 ćelija tretiranih sa 10 i 20 μ M Si306 i pro-Si306. Aktinski filamenti su obeleženi ActinRedTM 555 bojom (crveno). Jedra su obeležena Hoechst 33342 bojom (plavo). Želatin je obeležen FITC fluoroforom (zeleno). Skala = 30 μ m. (b) Procenat degradovane oblasti u želatinu nakon 24 h tretmana u odnosu na kontrolu. Vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajna razlika je prikazana kao ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

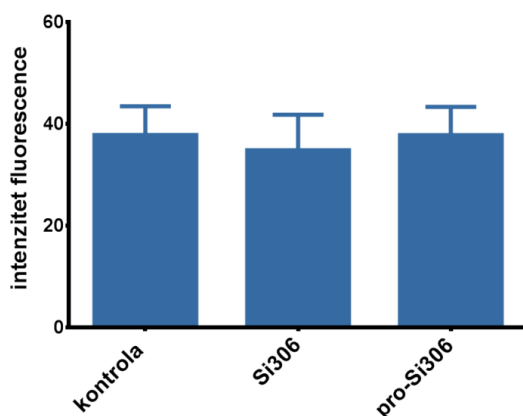
4.4. Uticaj inhibitora Src tirozin-kinaze na invazivni potencijal ćelija glioblastoma *in vivo*

Uticaj Si306 i pro-Si306 na invaziju glioblastoma *in vivo* je ispitan u modelu embriona zebriće. U tu svrhu uspostavljeni su ksenografti U87 ćelija koje su pokazale snažan invazivni potencijal *in vitro*. Grupa embriona kojoj su inokulisane U87 ćelije nije pokazala razliku u preživljavanju u poređenju sa kontrolnom grupom embriona kojoj je ubrizgan samo medijum. Procenat preživljavanja 4 dana nakon inokulacije u obe grupe embriona iznosio je preko 85% (Slika 17).



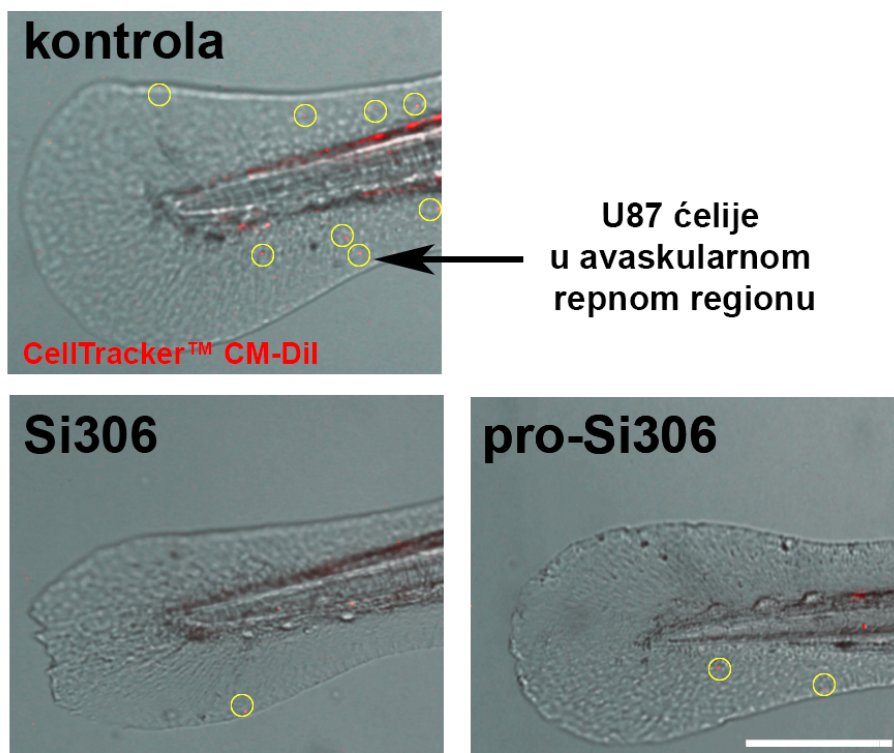
Slika 17. Preživljavanje embriona zebrića nakon inokulacije. Histogram predstavlja procenat živih embriona zebrića 4 dana nakon inokulacije U87 ćelijama ili medijumom.

Kod ksenografta embriona zebrića koji su tretirani sa 2,5 μM Si306 ili pro-Si306 dan posle inokulacije, tretman inhibitorima nakon 72 h nije doveo do gubitka U87 ćelija, odnosno do citotoksičnog efekta u ksenograftima u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 18). Intenzitet fluorescence CellTracker™ CM-DiI boje, kojom su obeležene U87 ćelije pre inokulacije u embrione zebrića, je ostao konstantan u svim grupama embriona (Slika 18). Zato je koncentracija 2,5 μM nadalje korišćena za proučavanje anti-invazivnog efekta Si306 i pro-Si306 *in vivo*.



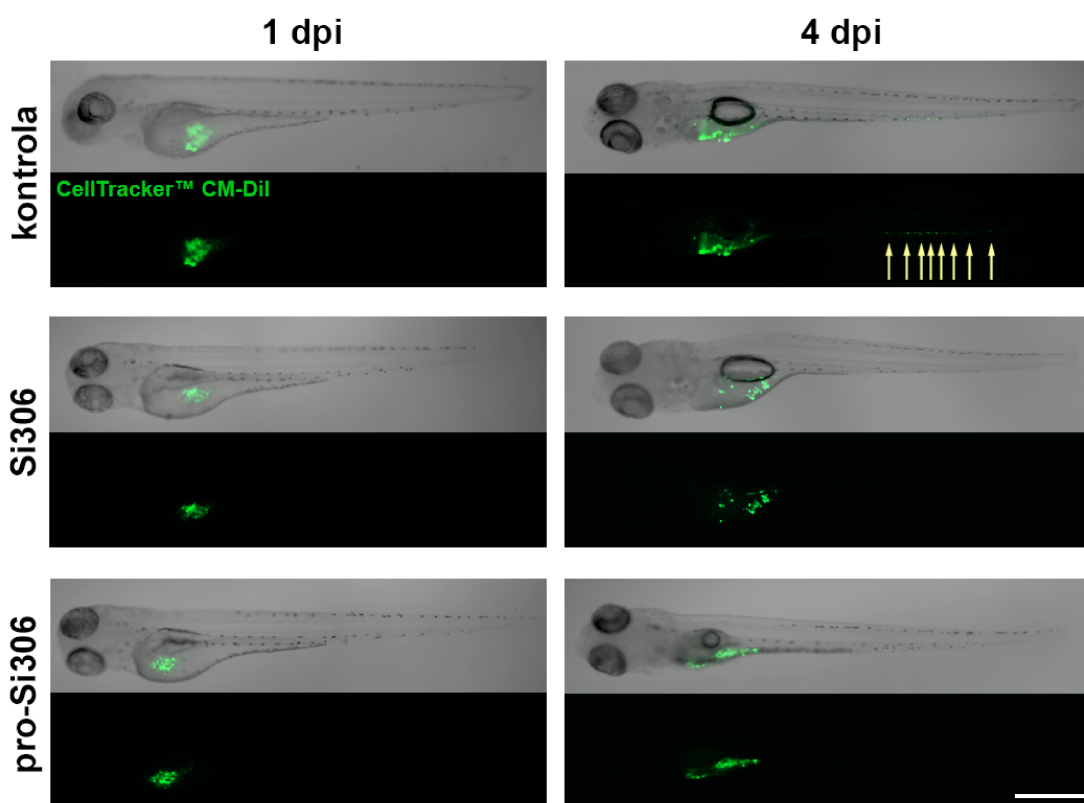
Slika 18. Src inhibitori Si306 i pro-Si306 pri izabranoj koncentraciji 2,5 μM nemaju citotoksični efekat na U87 ćelije u ksenograftima embriona zebrića. Citotoksični efekat Si306 i pro-Si306 je ispitan merenjem intenziteta fluorescence CellTracker™ CM-DiI boje kojom su obeležene U87 ćelije. Embrioni zebrića su tretirani sa 2,5 μM Si306 i pro-Si306 dan posle inokulacije obeleženih U87 ćelija, a tretman je trajao 72 h. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SD.

Diseminacija U87 ćelija od mesta inokulacije vizualizovana je četvrtog dana od inokulacije ćelija (Slika 19 i Slika 20a). Ćelije ksenografta su pokazale invazivno ponašanje što se ogledalo u njihovoj sposobnosti da napuste vaskulaturu i invadiraju u avaskularni repni region embriona zebrića (Slika 19). Invazivni potencijal U87 ćelija je značajno smanjen nakon tretmana Si306 i pro-Si306 inhibitorima u trajanju od 72 h (Slika 19 i Slika 20).

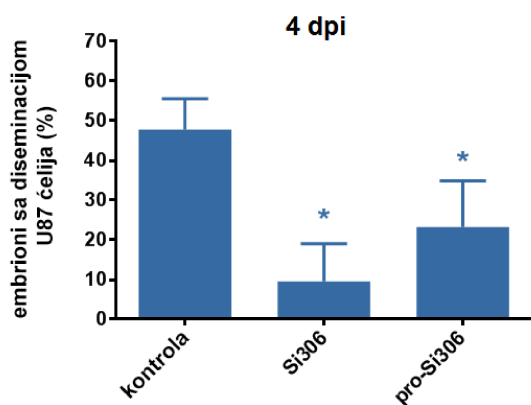


Slika 19. Uticaj Src inhibitora Si306 i pro-Si306 na invaziju U87 ćelija u avaskularni repni region embriona zebrića. Prikazane su reprezentativne slike U87 ksenografta u embrionima zebrića (4 dana nakon inokulacije). Strelica i žuti krugovi pokazuju U87 ćelije koje su migrirale van vaskulature u avaskularni repni region. Skala = 500 μ m.

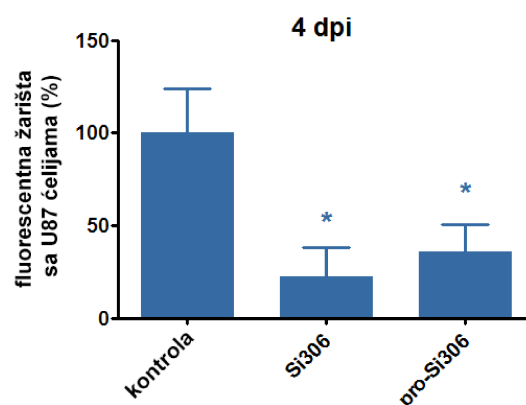
Posle tretmana sa Si306, procenat embriona zebrića kod kojih je zabeležena invazija U87 ćelija u repni region, smanjio se gotovo pet puta u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 20b). Isti trend je primećen i nakon tretmana sa pro-Si306, gde je procenat embriona sa ćelijskom diseminacijom smanjen više od dva puta. Takođe, nakon tretmana Src tirozin-kinaznim inhibitorima značajno je smanjen broj fluorescentnih žarišta koja sadrže diseminovane ćelije (Slika 20c).



(a)



(b)

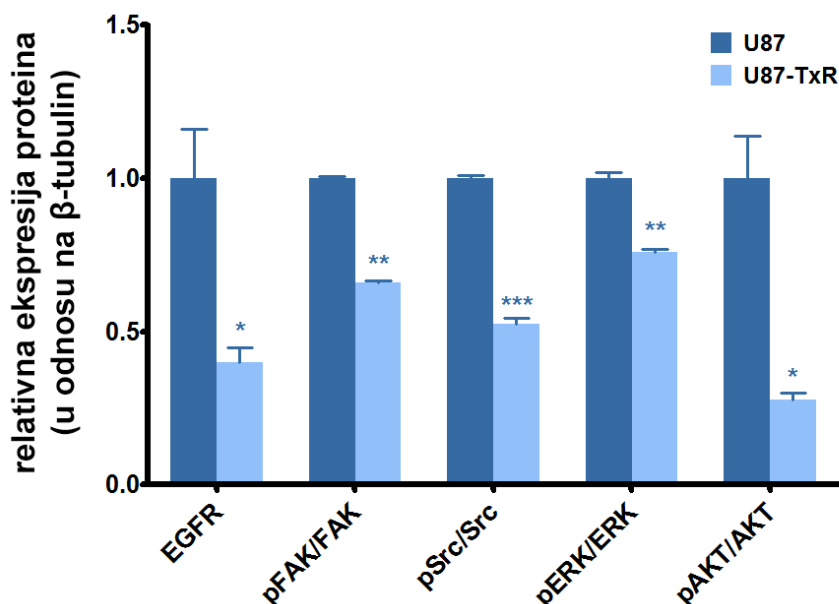


(c)

Slika 20. Src inhibitori Si306 i pro-Si306 sprečavaju diseminaciju U87 ćelija u embrionima zebrića. Embrioni su tretirani 72 h (dan posle inokulacije U87 ćelija) sa 2,5 μ M Si306 i pro-Si306. **(a)** Reprerzentativne panoramske slike embriona sa inokulisanim U87 ćelijama jedan dan posle inokulacije – 1 dpi (pre tretmana) i četiri dana posle inokulacije - 4 dpi (posle tretmana). U87 ćelije su obeležene fluorescentnom CellTracker™ CM-Dil bojom. Strelice ukazuju na ćelije koje su diseminovale izvan mesta inokulacije. Skala = 500 μ m. **(b)** Procenat embriona sa diseminacijom U87 ćelija nakon tretmana Src inhibitorima. **(c)** Broj fluorescentnih žarišta koja sadrže diseminovane U87 ćelije nakon tretmana Src inhibitorima u embrionima kod kojih je uočena invazija. Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajna razlika između tretirane i kontrolne grupe je predstavljena kao * ($p < 0,05$).

4.5. Inhibicija komponenti Src tirozin-kinaznog signalnog puta u ćelijama glioblastoma

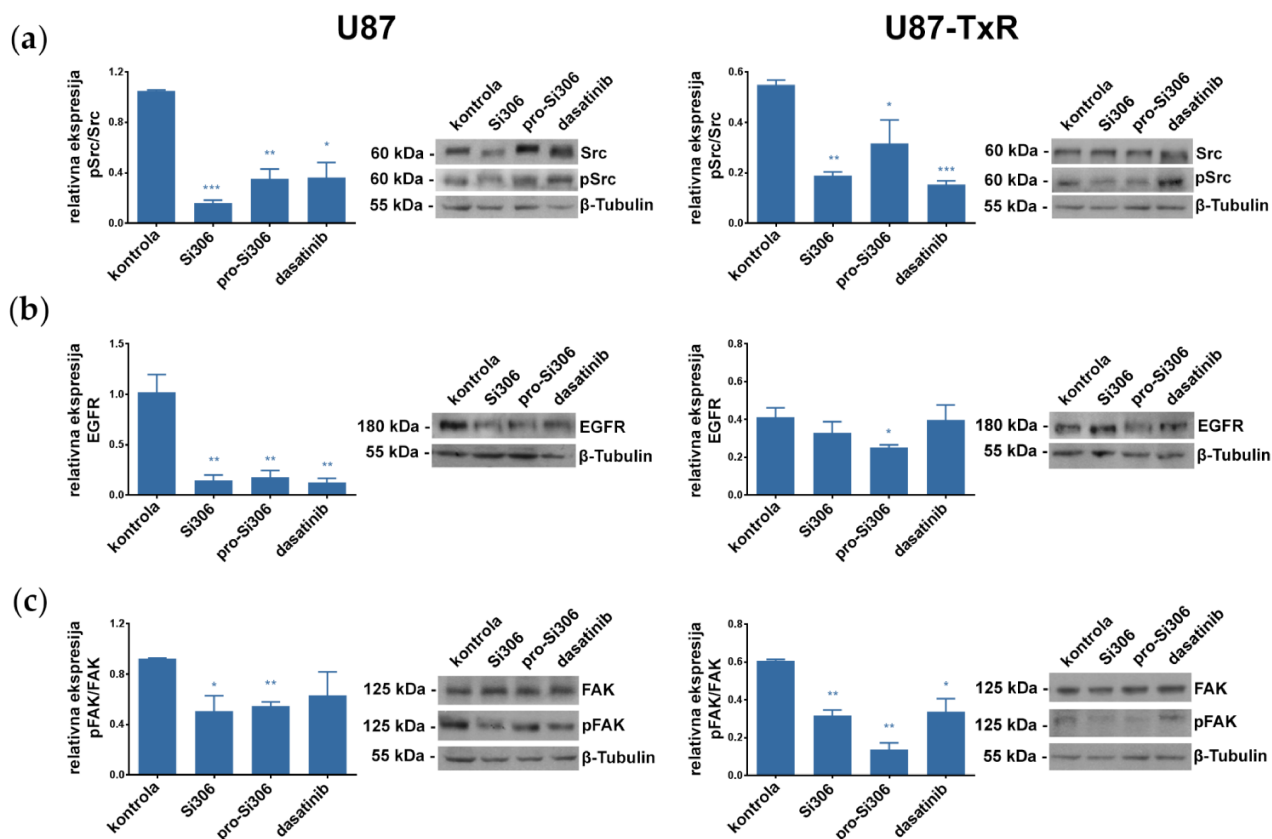
U87 i U87-TxR ćelije su okarakterisane u odnosu na ekspresiju proteina koji učestvuju u regulaciji Src tirozin-kinaznog signalnog puta. Utvrđeno je da u poređenju sa U87 ćelijama, U87-TxR ćelije imaju nižu ekspresiju EGFR proteina, kao i aktivne fosforilisane forme Src i drugih članova Src signalnog puta (FAK, ERK i AKT) (Slika 21).



Slika 21. Ekspresija proteina Src signalnog puta u U87 i U87-TxR ćelijama. „Western blot“ (engl.) metodom je ispitana ekspresija EGFR, pFAK, FAK, pSrc, Src, pERK, ERK, pAKT i AKT proteina u U87 i U87-TxR ćelijama. Relativna ekspresija EGFR proteina je određena u odnosu na β -tubulin, koji predstavlja internu kontrolu. Relativne ekspresije ostalih proteina su predstavljene kao odnos njihovih aktivnih (fosforilisanih) formi i ukupnog nivoa ciljnog proteina, normalizovan u odnosu na internu kontrolu (β -tubulin). Sve vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajne razlike su predstavljene kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.5.1. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost Src tirozin-kinaze i ushodnih članova njenog signalnog puta (FAK i EGFR)

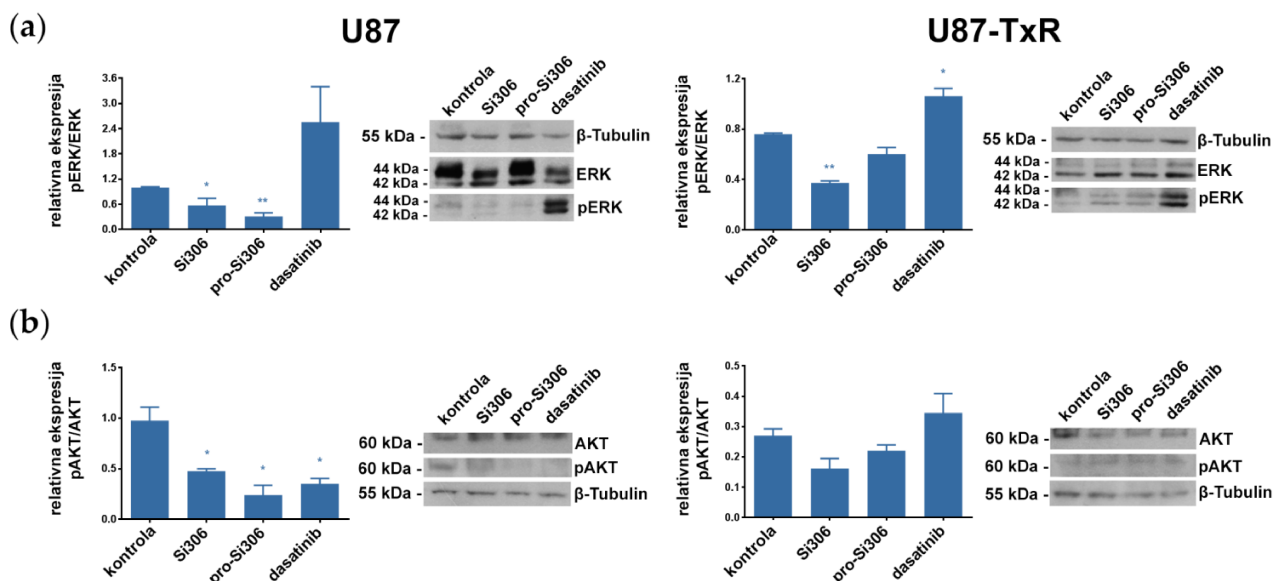
Da bi se ispitalo da li je anti-invazivni uticaj Si306 i pro-Si306 na U87 i U87-TxR ćelije povezan sa Src signalizacijom, članovi Src tirozin-kinaznog signalnog puta su analizirani „Western blot“ (engl.) metodom. Prvo je ispitan nivo ekspresije Src tirozin-kinaze i njene aktivne fosforilisane forme pSrc, kao i nivo ekspresije ushodnih članova Src signalnog puta: EGFR, FAK i njegove aktivne fosforilisane forme pFAK nakon 24 h tretmana Src inhibitorima (Slika 22). Kao referentna supstanca, korišćen je dasatinib. Aktivnost Src tirozin-kinaze, prikazana kao relativna ekspresija pSrc/Src, značajno je smanjena nakon tretmana sa 5 μ M Si306, pro-Si306 i dasatiniba u obe ćelijske linije (Slika 22a). Posle tretmana svim Src inhibitorima relativna ekspresija EGFR smanjena je 80% u U87 ćelijama (Slika 22b). Značajan efekat na smanjenje ekspresije EGFR u U87-TxR ćelijama je ostvaren samo sa pro-Si306 (Slika 22b). Relativna ekspresija pFAK/FAK u U87 ćelijama smanjena je nakon tretmana sa Si306 i njegovim prolekom, dok dasatinib nije ostvario značajan efekat (Slika 22c). U U87-TxR ćelijama, efekat sve tri supstance na smanjenje aktivnosti FAK je bio veoma izražen (Slika 22c).



Slika 22. Uticaj Si306 i pro-Si306 na aktivnost Src tirozin-kinaze i ushodnih članova Src signalnog puta u U87 i U87-TxR ćelijama. Reprezentativne slike dobijene „Western blot“ (engl.) metodom prikazuju ekspresiju (a) pSrc, Src, (b) EGFR, (c) pFAK i FAK proteina u U87 i U87-TxR ćelijama nakon 24 h tretmana sa 5 μ M Si306, pro-Si306 i dasatiniba. Vrednosti na histogramima su izražene kao nivo fosforilisanog proteina u odnosu na nivo ukupnog proteina (Src i FAK) ili ukupna ekspresija proteina (EGFR), i normalizovane na β -tubulin. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajna razlika između tretirane i kontrolne grupe prikazana je kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

4.5.2. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost nishodnih članova Src tirozin-kinaznog signalnog puta (AKT i ERK)

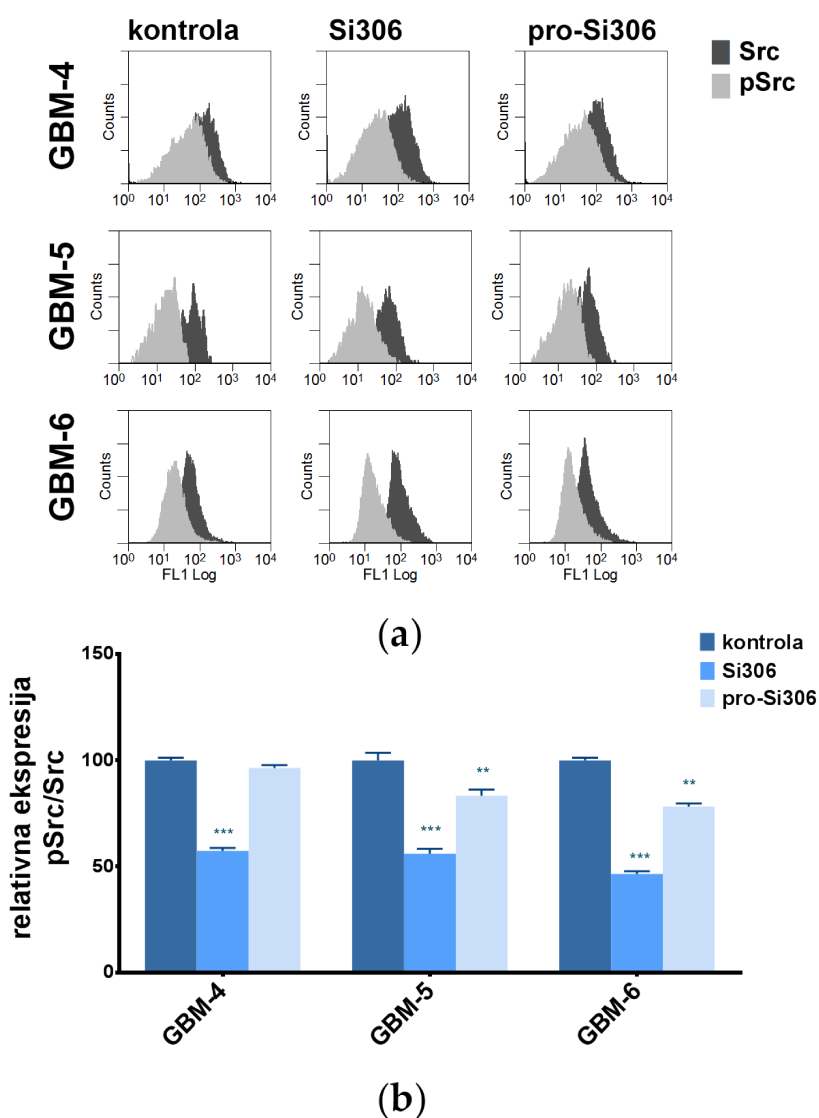
Dalje je ispitan nivo ekspresije nishodnih članova Src signalnog puta: ERK, AKT i njihovih aktivnih formi pERK i pAKT nakon 24 h tretmana Src inhibitorima (Slika 23). Nakon što su tretirane sa 5 μ M Si306 i pro-Si306, aktivnost ERK u U87 ćelijama smanjena je značajno smanjena, dok je u U87-TxR ćelijama, efekat oba jedinjenja na relativnu ekspresiju pERK/ERK bio je manje izražen (Slika 23a). Dasatinib je povećao ekspresiju i aktivnost ERK u obe ćelijske linije. Aktivnost AKT u U87 ćelijama značajno je smanjena nakon primene Si306, pro-Si306 i dasatiniba (Slika 23b). Efekat Si306 i pro-Si306 na smanjenje relativne ekspresije pAKT/AKT bio je manje izražen u U87-TxR ćelijama (Slika 23b).



Slika 23. Uticaj Si306 i pro-Si306 na aktivnost nishodnih članova Src signalnog puta u U87 i U87-TxR ćelijama. Rezentativne slike dobijene „Western blot“ (engl.) metodom prikazuju ekspresiju **(a)** pERK, ERK, **(b)** pAKT i AKT proteina u U87 i U87-TxR ćelijama nakon 24 h tretmana sa 5 μ M Si306, pro-Si306 i dasatiniba. Vrednosti na histogramima su izražene kao nivo fosforilisanog proteina u odnosu na nivo ukupnog proteina i normalizovane na β -tubulin. Vrednosti su dobijene iz najmanje tri nezavisna eksperimenta i izražene kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajna razlika između tretirane i kontrolne grupe prikazana je kao * ($p < 0,05$) i ** ($p < 0,01$).

4.5.3. Si306 i pro-Si306 inhibiraju aktivnost Src u primarnim ćelijama glioblastoma

Nivo ekspresije Src proteina i njegove fosforilisane aktivne forme pSrc je određen protočnom citofluorimetrijom kod primarnih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6. Primarne ćelije su tretirane 24 h inhibitorima Src tirozin-kinaze pri koncentraciji 10 μ M. Relativna ekspresija pSrc/Src smanjena je za 40% nakon tretmana sa Si306 u GBM-4 i GBM-5 ćelijama (Slika 24). Ista supstanca takođe je smanjila aktivnost Src tirozin-kinaze u GBM-6 ćelijama za preko 50% (Slika 24). Prolek je ostvario manje izražen efekat u odnosu na lek iako je značajno smanjio relativnu ekspresiju pSrc/Src u GBM-5 i GBM-6 ćelijama (Slika 24).

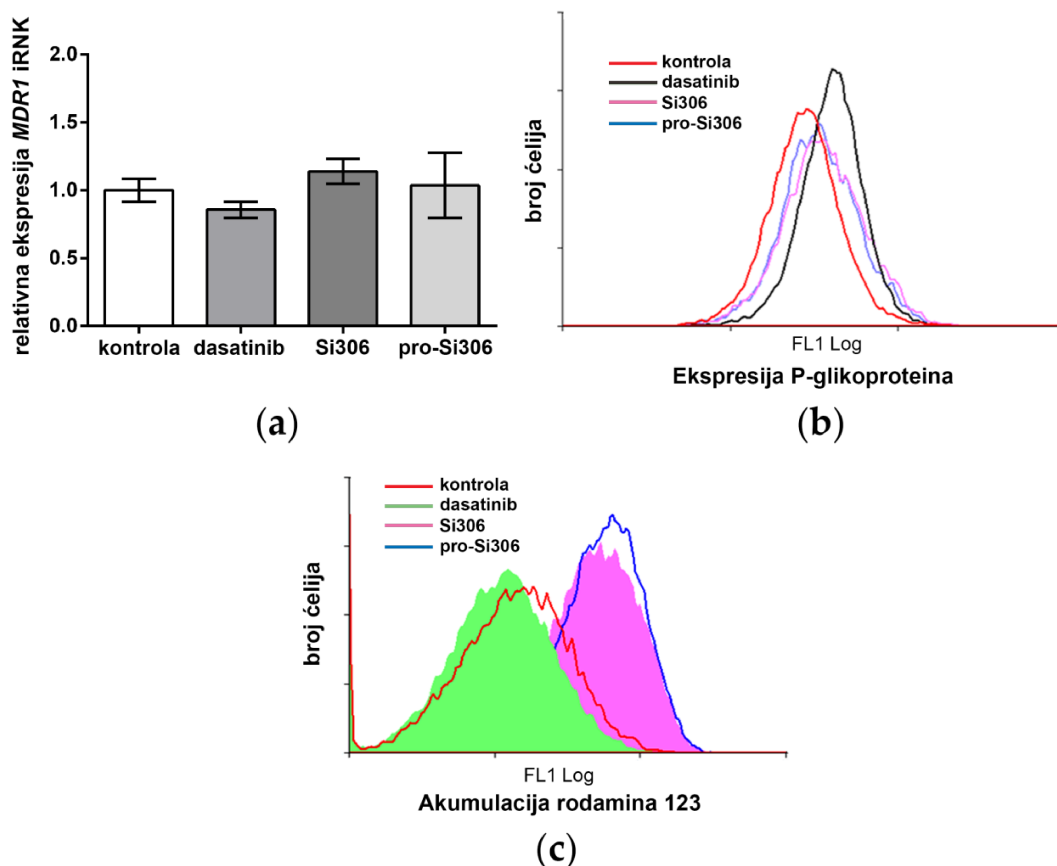


Slika 24. Uticaj Si306 i pro-Si306 na aktivnost Src tirozin-kinaze u primarnim ćelijama glioblastoma. (a) Prikazani su citofluorimetrijski profili ekspresije Src i pSrc proteina u primarnim ćelijama glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 nakon tretmana Src inhibitorima. Y-osa prikazuje broj ćelija, a x-osa prikazuje intenzitet fluorescence imuno-obeženih ćelija koji je proporcionalan količini Src i pSrc. Ćelije su tretirane 24 h sa 10 μ M Si306 i pro-Si306. **(b)** Histogrami predstavljaju relativnu ekspresiju pSrc/Src u primarnim ćelijama glioblastoma nakon 24 h tretmana sa Si306 i pro-Si306. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM (n=3). Statistička značajnost između tretiranih i kontrolnih grupa je prikazana kao ** (p<0,01) i *** (p<0,001).

4.6. Interakcija Src tirozin-kinaznih inhibitora sa P-glikoproteinom u rezistentnim ćelijama glioblastoma

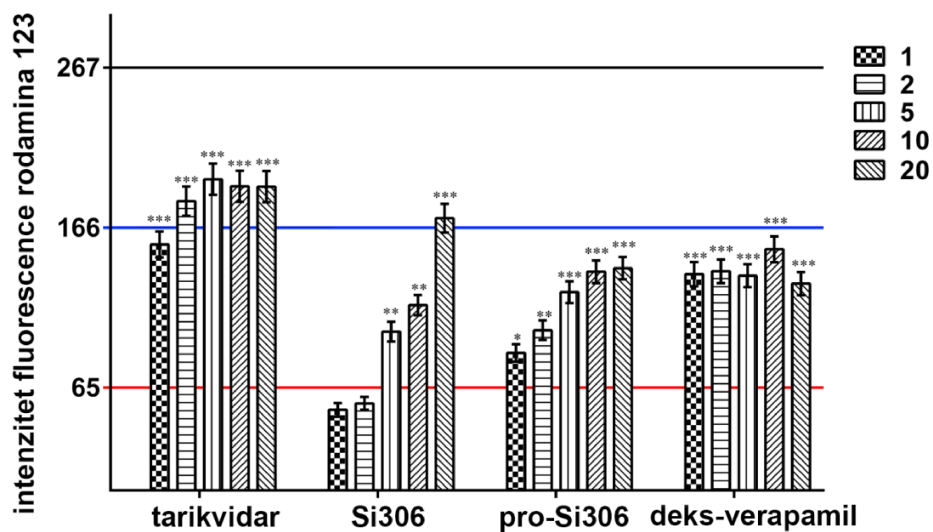
Ispitivanje efekta Si306 i pro-Si306 na višestruko-rezistentni fenotip U87-TxR ćelija započeto je ispitivanjem njihovog efekta na ekspresiju i aktivnost P-glikoproteina. Metodom qPCR utvrđeno je da Si306, pro-Si306 i dasatinib ne menjaju ekspresiju *MDR1* iRNK kod rezistentnih U87-TxR ćelija glioblastoma (Slika 25a). Na proteinskom nivou, metodom protočne citofluorimetrije je pokazano da samo dasatinib utiče i povećava ekspresiju P-gp transportera u ovim ćelijama (Slika 25b).

Unutarćelijska akumulacija fluorescentnog supstrata P-glikoproteina - rodamina 123, određena protočnom citofluorimetrijom, pokazala je da Si306 i pro-Si306 značajno smanjuju aktivnost P-gp transportera, dok dasatinib nije pokazao potencijal za modulaciju aktivnosti P-glikoproteina (Slika 25c).

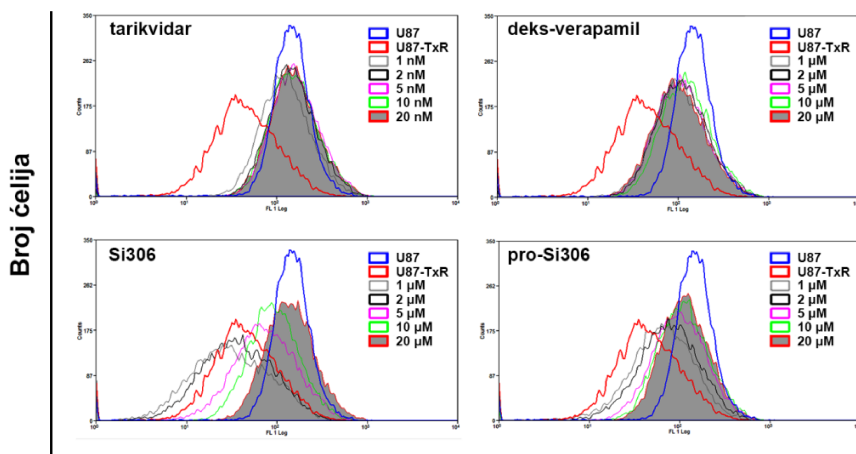


Slika 25. Efekat Src inhibitora na ekspresiju i funkciju P-glikoproteina u U87-TxR ćelijskoj liniji. (a) qPCR analiza ekspresije *MDR1* iRNK (srednja vrednost \pm SD, $n=3$) i **(b)** Reprerentativni profili ekspresije P-glikoproteina dobijeni protočnom citofluorimetrijom nakon 72 h tretmana sa 5 μ M Si306, pro-Si306 i dasatiniba. **(c)** Reprerentativni profili akumulacije rodamina 123 dobijeni protočnom citofluorimetrijom nakon 30 min tretmana sa 5 μ M Si306, pro-Si306 i dasatiniba.

Dalje su određene koncentracije Si306 i pro-Si306 neophodne za inhibiciju 50% aktivnosti P-glikoproteina (IC_{50} inhibicije P-gp), i upoređene u odnosu na P-gp inhibitor druge generacije – deksverapamil i P-gp inhibitor treće generacije - tarikvidar (Slika 26, Tabela 2). Si306 i pro-Si306 dovode do inhibicije aktivnosti P-glikoproteina na dozno-zavisan način što je ilustrovano porastom akumulacije rodamina 123 sa porastom primenjene koncentracije pomenutih supstanci (Slika 26).



(a)



Akumulacija rodamina 123

(b)

Slika 26. Dozno-zavisna inhibicija funkcije P-glikoproteina. (a) Akumulacija rodamina 123 u U87-TxR ćelijama je određena nakon primene rastućih koncentracija Si306, pro-Si306, deks-verapamila (1, 2, 5, 10 i 20 μM) i tarikvidara (1, 2, 5, 10 i 20 nM). Vrednosti su izražene kao srednja vrednost intenziteta fluorescencije \pm SD. Srednja vrednost intenziteta fluorescencije rodamina 123 u senzitivnoj ćelijskoj liniji U87 iznosi 166 (plava linija), dok srednja vrednost intenziteta fluorescencije rodamina 123 u višestruko-rezistentnim U87-TxR ćelijama iznosi 65 (crvena linija). IC_{50} vrednosti su izračunate između ove dve granične vrednosti. Izvedena su dva nezavisna eksperimenta (najmanje 10 000 događaja je prikupljeno za svaki uzorak). Statistički značajna razlika u odnosu na akumulaciju rodamina 123 u U87-TxR ćelijama je predstavljena kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$). (b) Reprerentativni citofluorimetrijski profili akumulacije rodamina 123 u netretiranim U87 i U87-TxR ćelijama i U87-TxR ćelijama tretiranim rastućim koncentracijama tarikvidara, deks-verapamila, Si306, i pro-Si306.

U Tabeli 2 su prikazane IC_{50} vrednosti inhibicije P-glikoproteina za Si306 i pro-Si306 koje se podudaraju sa opsegom koncentracija koje dovode do inhibicije ćelijskog rasta i invazije ćelija glioblastoma. Tarikvidar i deks-verapamil nisu pokazali dozno-zavisni efekat, jer su njihove najniže

primenjene koncentracije nadmašile izračunate IC_{50} vrednosti: 0,3 nM za tarikvidar i 0,7 μ M za deks-verapamil (Slika 26, Tabela 2).

Tabela 2. Inhibicija aktivnosti P-glikoproteina

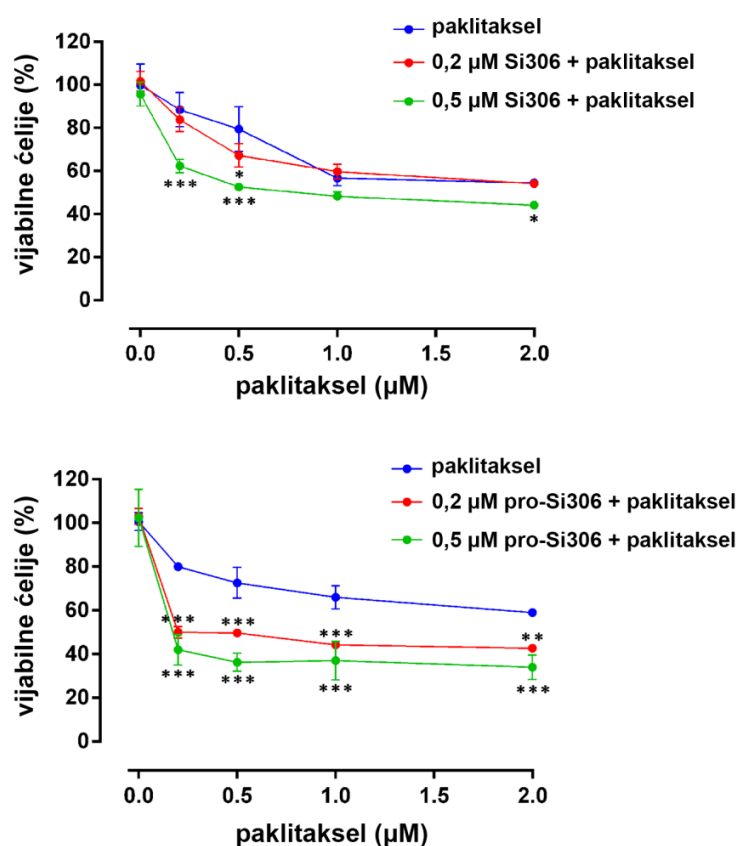
P-gp inhibicija	Tarikvidar ^a	Si306	pro-Si306	Deks-verapamil
IC_{50} (μ M) ^b	0,343 \pm 0,017	8,496 \pm 0,161	3,748 \pm 0,060	0,735 \pm 0,029

^a $IC_{50} \pm SD$ vrednosti za tarikvidar su izražene u nM.

^b IC_{50} vrednosti su izračunate merenjem akumulacije rodamina 123. Rezultati su prikazani kao $IC_{50} \pm SD$ (n=2)

4.7. Reverzija rezistencije na paklitaksel

Ispitivanje efekta Si306 i pro-Si306 na rezistentan fenotip U87-TxR ćelija nastavljeno je proučavanjem sposobnosti ovih supstanci da povećaju osetljivost U87-TxR ćelija na paklitaksel (Slika 27, Tabela 3).



Slika 27. Src inhibitori Si306 i pro-Si306 povećavaju osetljivost U87-TxR ćelija na paklitaksel. Efekti kombinovanih tretmana Si306 i pro-Si306 sa paklitakselom u U87-TxR ćelijama analizirani su MTT testom. Vrednosti su iskazane kao srednja vrednost \pm SD (n = 3). Statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolu je prikazana kao * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) i *** ($p < 0,001$).

Efekat kombinovanih tretmana Si306 i pro-Si306 sa paklitakselom je utvrđen MTT testom nakon 72 h. Oba Src inhibitora, primenjena u niskim koncentracijama (0,2 μ M i 0,5 μ M), su poboljšala efikasnost paklitaksela i dovela do značajne reverzije rezistencije kod U87-TxR ćelija na ovaj hemioterapeutik (Tabela 3). Relativna reverzija rezistencije je dobijena kao odnos IC₅₀ vrednosti za paklitaksel i IC₅₀ vrednosti za paklitaksel u kombinaciji sa određenom koncentracijom Si306 ili pro-Si306.

Tabela 3. Relativna reverzija rezistencije U87-TxR ćelija na paklitaksel indukovana Src inhibitorima Si306 i proSi306.

Supstance	IC ₅₀ \pm SD za paklitaksel (μ M)	Relativna reverzija
	2,840 \pm 0,358	
Si306		
0,2 μ M	2,449 \pm 0,121	1,16 ^{nz}
0,5 μ M	0,850 \pm 0,088	3,34 ^{**}
pro-Si306		
0,2 μ M	0,635 \pm 0,0103	4,47 ^{***}
0,5 μ M	0,356 \pm 0,072	7,98 ^{***}

Statistički značajne vrednosti su prikazane kao: nz, nije statistički značajno, ** (p<0,01), *** (p<0,001).

5. DISKUSIJA

Glioblastomi predstavljaju najagresivnije primarne tumore mozga sa lošom prognozom i izvesnim letalnim ishodom (Mrugala, 2013). Potreba za novim terapijskim pristupima koji bi omogućili duže preživljavanje pacijenata od onog koje obezbeđuje standardni Stupov protokol je velika (Le Rhun i sar., 2019). Ovaj protokol je zasnovan na rezultatima kliničke studije faze 3 objavljene 2005. godine koji su pokazali da istovremena primena temozolomida i radioterapije praćena sa 6 ciklusa samostalne terapije temozolomidom poboljšava preživljavanje pacijenata za samo 2,5 meseca u poređenju sa samostalnom primenom radioterapije (Stupp i sar., 2005). Napori da se uvedu efikasnije terapije koje bi dovele do značajnijeg i kvalitetnijeg produžetka života pacijenata do sada nisu urodili plodom iako su testirani različiti terapijski pristupi, uključujući inovativne pristupe kao što su fotodinamička terapija, ciljana i imunoterapija (Rajaratnam i sar., 2020; Stupp i sar., 2005). Očigledna stagnacija u primeni novih lekova i strategija lečenja glioblastoma delimično je posledica i nedostatka odgovarajućih modela glioblastoma za testiranje novih lekova koji verno oponašaju klinički scenario (Dragoj i sar., 2021; Stanković i sar., 2021). Poseban interes postoji za razvijanjem terapeutika koji prolaze krvno-moždanu barijeru, sprečavaju invadiranje glioblastoma u moždani parenhim nakon hirurške intervencije i na koje ćelije glioblastoma ne razvijaju rezistenciju (Ahluwalia i sar., 2010).

Poslednjih godina u fokusu je inhibicija Src tirozin-kinaze (Calgani i sar., 2016; Jubran i sar., 2020; Smolinski i sar., 2018; Taylor i sar., 2018). Ovaj pristup je pokazao uspeh u terapiji drugih maligniteta (Hsu i sar., 2020; Jin, 2020; Sirvent i sar., 2020; Voisset i sar., 2020), a osnovu za njegovu efikasnost kod glioblastoma predstavlja regulatorna uloga Src tirozin-kinaze u invaziji, migraciji i proliferaciji ćelija glioblastoma (Calgani i sar., 2016). Pored toga, aktivacija Src tirozin-kinaze dovodi do izmenjenih adhezivnih karakteristika i povišene mobilnosti ćelija glioblastoma, kao i do remodelovanja vanćelijskog matriksa (Ahluwalia i sar., 2010). Povišena aktivnost Src tirozin-kinaze je posledica aktivnosti ushodnih članova Src signalnog puta, kao što su FAK, EGFR i integrini (Belli i sar., 2020; Katoh, 2020; Rutkowska i sar., 2019). Src tirozin-kinaza zatim nishodno utiče na aktivnost ERK i AKT i time dovodi do intezivne proliferacije i preživljavanja tumorskih ćelija (Patel i sar., 2016).

Poslednjih godina, mnogi mali molekuli su bili ispitivani i selektovani kao dobri kandidati za inhibiciju Src tirozin-kinaze (De Witt Hamer, 2010; Rivera-Torres i San José, 2019). Među njima istaknuto mesto je imao dasatinib. Međutim, klinička ispitivanja su pokazala da tretman glioblastoma dasatinibom nema perspektivu zbog njegove nepovoljne farmakokinetike (Agarwal i sar., 2012; Galanis i sar., 2019; Lassman i sar., 2015; Schiff i Sarkaria, 2015). Pored dasatiniba, razvijeni su i drugi Src tirozin-kinazni inhibitori kao kandidati za tretman glioblastoma (Cirotti i sar., 2020).

Iako se značajan broj novih tirozin-kinaznih inhibitora svake godine odobrava za terapiju tumora od strane Američke uprave za hranu i lekove, prodor u terapiji glioblastoma nije još uvek napravljen (Roskoski, 2019; P. Wu i sar., 2015). Pokazano je da i tirozin-kinazni inhibitori, kao i hemioterapeutici predstavljaju supstrate za membranske ABC transportere, posebno P-gp i BCRP (Rosenzweig, 2018; Shannon, 2002; Shukla i sar., 2012). Međutim, neki tirozin-kinazni inhibitori mogu delovati i kao inhibitori ABC transportera (Rosenzweig, 2018; Shannon, 2002; Shukla i sar., 2012), što predstavlja povoljnu karakteristiku posebno u slučaju glioblastoma jer je P-gp transporter jedna od komponenti krvno-moždane barijere (Da Ros i sar., 2018), a može biti prisutan i na membrani ćelija glioblastoma (Da Ros i sar., 2018).

Predmet ove doktorske disertacije je ispitivanje potencijala derivata pirazolo[3,4-*d*]pirimidina (Si306 i njegovog proleka pro-Si306) za lečenje glioblastoma. Si306 i pro-Si306 predstavljaju ATP-kompetitivne inhibitore članova Src familije tirozin-kinaza (Schenone i sar., 2014). Posebno je proučavana njihova efikasnost u sprečavanju invazije glioblastoma *in vitro* i *in vivo*. U tu svrhu su korišćeni različiti ćelijski modeli, uključujući i primarne ćelije glioblastoma poreklom od pacijenata, kao i ksenograft model u embrionima zebrića. Proučavan je i njihov potencijal za prevazilaženje rezistencije u modelu senzitivnih i višestruko-rezistentnih ćelija glioblastoma.

5.1. Src tirozin-kinazni inhibitori smanjuju vijabilnost ćelija glioblastoma

Efekat Si306 i pro-Si306 na vijabilnost senzitivne U87 ćelijske linije i njene višestruko-rezistentne varijante U87-TxR, kao i na vijabilnost primarnih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 utvrđen je MTT testom. IC₅₀ vrednosti kod U87 i U87-TxR ćelija su se kretale između 3 i 5 µM, dok su IC₅₀ vrednosti određene kod primarnih kultura bile između 18 i 25 µM. Upoređivanje sa efektom dasatiniba je pokazalo da Si306 i pro-Si306 u ovim ćelijskim modelima imaju nešto bolji efekat. Važno je istaći da razlike u IC₅₀ vrednostima između senzitivnih U87 i višestruko-rezistentnih U87-TxR ćelija nisu bile značajne, te ne mogu ukazivati da prisustvo rezistentnog fenotipa utiče na osetljivost ćelija na Si306 i pro-Si306. Međutim, rezistencija primarnih kultura je bila evidentna kako na Si306 i pro-Si306, tako i na dasatinib. Uporedna analiza ekspresije Src tirozin-kinaze kod U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6 pokazala je da primarne kulture glioblastoma imaju znatno manju količinu ciljnog molekula u odnosu na komercijalne ćelijske linije što svakako predstavlja razlog za uočenu rezistenciju na Src tirozin-kinazne inhibitore.

Takođe, treba naglasiti da su svi *in vitro* modeli glioblastoma pokazali nekoliko desetina puta veću osetljivost na ispitivane Src tirozin-kinazne inhibitore u poređenju sa aktuelnim hemioterapeutikom temozolomidom. Dobijena IC₅₀ vrednost za temozolomid kod U87 ćelija bila u skladu sa prethodno objavljenim podacima (Kanojia i sar., 2015). Veća osetljivost ćelija na ispitivane inhibitore u odnosu na temozolomid, uz ranije pokazanu efikasnost dopreme Si306 do mozga, čine ciljanu inhibiciju Src tirozin-kinaze ovim derivatima pirazolo[3,4-*d*]pirimidina obećavajućim pristupom u lečenju glioblastoma.

Posebno treba istaći izraženu rezistenciju koju su primarne ćelije glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6 pokazale na temozolomid. Podaci iz literature pokazuju širok opseg odgovora na tretman temozolomidom (1000 µM) u trajanju od 72 h kod primarnih ćelija glioblastoma poreklom od različitih pacijenata (Pédeboscq i sar., 2007). Rezultati ove studije su pokazali izuzetan stepen rezistencije primarnih ćelija glioblastoma prevazilazeći opseg testiranih koncentracija u pomenutom radu. U skladu sa literaturom, uočena razlika u odgovoru na temozolomid među primarnim ćelijama dobijenim iz uzoraka različitih pacijenata potvrđuje heterogenost odgovora pacijenata na anti-tumorske lekove.

5.2. Src tirozin-kinazni inhibitori sprečavaju invaziju ćelija glioblastoma

Efekti Si306 i pro-Si306 na invaziju ćelija glioblastoma utvrđeni su *in vitro* u testovima degradacije želatina i migracije kroz matrigel i bazalnu membranu, kao i *in vivo* u embrionima zebrića.

Sposobnost inhibitora Src tirozin-kinaze da smanje razlaganje želatina od strane ćelija glioblastoma je tesno povezana sa njihovom sposobnošću da utiču na razgradnju vanćelijskog matriksa i inhibiraju aktivnost matriksnih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9. Aktivnost MMP-2 i

MMP-9 je u sprezi sa invazivnošću visokogradusnih glioma (Hatoum i sar., 2019; Uhm i sar., 1997). Pokazano je da je aktivnost MMP-2 u glioblastomima pet puta veća u poređenju sa normalnim moždanim tkivom ili sa niskogradusnim gliomima (Hatoum i sar., 2019).

Inhibitorni efekat Si306 i pro-Si306 na invazivnost uočen je kod U87 i U87-TxR, kao i kod primarnih ćelija glioblastoma. Pokazano je da postoji značajna razlika u sposobnosti razlaganja želatina između U87 i U87-TxR ćelija u korist U87 što je u saglasnosti sa višim nivoom ekspresije *MMP-2* u U87 ćelijama. Međutim, oba Src tirozin-kinazna inhibitora su značajano umanjila razlaganje želatina od strane U87 i U87-TxR ćelija. Ovaj efekat je bio praćen i smanjenjem ekspresije *MMP-2* u U87 ćelijama.

Inhibitorni efekat Si306 i pro-Si306 na sve tri primarne kulture glioblastoma je bio veoma izražen u testu degradacije želatina iako su GBM-4 i GBM-5 pokazale značajno višu sposobnost razlaganja želatina u odnosu na U87 ćelije. Treba istaći da je ovaj efekat u primarnim ćelijama glioblastoma postignut i pri 10 μM , koncentraciji znatno nižoj od IC_{50} vrednosti dobijenih MTT testom. Rezultati ukazuju da Src tirozin-kinazni inhibitori mogu efikasno sprečiti invaziju ćelija glioblastoma čak pri koncentracijama koje ne utiču značajno na vijabilnost ćelija.

Anti-invazivni potencijal Si306 i pro-Si306 je dodatno proučavan i testom migracije U87 i U87-TxR ćelija kroz matrigel i bazalnu membranu. Migracija ćelija glioblastoma kroz bazalnu membranu je podstaknuta procesima intravazacije i ekstravazacije koji zavise od dinamike aktinskih filamenata (Chiang i sar., 2016). Ovi procesi su regulisani mehanizmima drugačijim od onih koji učestvuju u razgradnji vanćelijskog matriksa (Chiang i sar., 2016; Hatoum i sar., 2019). Iako U87 ćelije poseduju veću sposobnost migracije kroz matrigel i bazalnu membranu u poređenju sa U87-TxR ćelijama, Src tirozin-kinazni inhibitori Si306 i pro-Si306 su uspešno smanjili migraciju i U87, i U87-TxR ćelija pokazujući veliki potencijal za inhibiciju pokretljivosti ćelija glioblastoma.

Za potrebe *in vivo* studije anti-invazivnog efekta Si306 i pro-Si306 uspostavljen je ksenograft model U87 ćelija u embrionima zebrića. Treba napomenuti da ksenograft model glioblastoma u zebrićama do sada nije bio uspostavljen u Srbiji i da će znanje stečeno u toku izrade ove doktorske disertacije poslužiti za dalje unapređenje modela i razvoj ksenografta glioblastoma poreklom od pacijenata.

Model zebriće se pokazao kao veoma pogodan za ispitivanje invazivnosti, metastaziranja i neoangiogeneze malignih tumora (Yoganantharjah i Gibert, 2017). Takođe, embrioni zebriće su propustljivi za male molekule, tako da predstavljaju pogodan model i za ispitivanje novih lekova, njihove toksičnosti i efekta na inokulisane tumorske ćelije (Jung i sar., 2012). Stoga, ksenograft model U87 ćelija u embrionima zebrića, uspostavljen i okarakterisan u okviru ove doktorske studije, od velikog je značaja za buduća *in vivo* istraživanja anti-invazivnog i anti-proliferativnog potencijala ciljanih terapeutika i drugih potencijalnih anti-tumorskih agenasa. Efekti tirozin-kinaznih inhibitora akitiniba, suntiniba i vatalaniba na sprečavanje angiogeneze već su ispitivani u modelu zebriće sa U87 ćelijama inokulisanim u žumance embriona (X. Yang i sar., 2014). Takođe, u modelu zebriće je pokazano da primena 100 μM temozolomida povećava osetljivost na zračenje U251 ćelija glioblastoma inokulisanih u žumančanu kesu embriona u fazi blastule (Geiger i sar., 2008). Zanimljivo je i veoma značajno da zebriće imaju sličnu osetljivost na toksične i teratogene supstance kao i ljudi (Jung i sar., 2012). Veliku prednost ovog modela predstavlja providnost embriona zebrića što omogućava praćenje intravazacije tumorskih ćelija u krvne sudove i rasejavanje u udaljene organe u realnom vremenu (Jung i sar., 2012; X. J. Yang i sar., 2013).

Prethodno je pokazano da Si306 znatno smanjuje rast U87 ksenografta u imunodeficientnom mišijem modelu, posebno u kombinaciji sa radioterapijom (Calgani i sar., 2016). Rezultati ove doktorske studije su po prvi put pokazali inhibitorski efekat Si306 i njegovog proleka na invaziju glioblastoma *in vivo*. Nakon uspešnog uspostavljanja U87 ksenografta u embrionima zebrica, utvrđena je koncentracija Src tirozin-kinaznih inhibitora (2,5 μM) koja nije bila toksična za embrione i koja nije dovela do smanjenja vijabilnosti inokulisanih U87 ćelija. Trodnevni tretman ksenografta pomenutom koncentracijom Si306 i pro-Si306 je značajno smanjio procenat embriona kod kojih je zabeležena invazija, kao i broj diseminovanih ćelija van krvnih sudova.

Literaturni podaci ukazuju da aktuelni hemioterapeutik temozolomid takođe pokazuje anti-invazivni potencijal kod ćelija glioblastoma, ali isključivo primenom visokih koncentracija. Posle 72 h, primena 100 μM temozolomida je dovela do smanjenja invazije U87 ćelija oko 15% u poređenju sa kontrolom *in vitro* (Pazhouhi i sar., 2018). Takođe, temozolomid je značajno inhibirao invazivnost matičnih ćelija glioblastoma *in vitro* pri koncentraciji od 50 μM (D. Zhang i sar., 2011). Imajući u vidu ove podatke, uspešno sprečavanje invazije ćelija glioblastoma Src inhibitorima Si306 i pro-Si306 *in vivo* niskom koncentracijom od svega 2,5 μM daje ovim supstancama još jednu prednost u odnosu na aktuelnu terapiju.

5.3. Si306 i pro-Si306 menjaju Src-posredovanu signalizaciju u ćelijama glioblastoma

Da bi se utvrdila uloga Src tirozin-kinaze u progresiji tumora, do sada su sprovedena brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja u različitim tumorskim modelima, a literaturni podaci govore u prilog Src tirozin-kinaze i komponenti njenog signalnog puta kao terapeutskih meta za inhibiciju progresije tumora ka agresivnijim i metastatskim stadijumima. Brojni mali molekuli koji ciljaju komponente Src signalnog puta su pokazali anti-invazivni potencijal kod ćelija glioblastoma. Osim dasatiniba (Fathi Kazerooni i sar., 2020; Han i sar., 2014; Ou i sar., 2020), delovanjem na Src signalni put uticaj na migraciju i invaziju ćelija glioblastoma ostvarili su i PP2 (Park i sar., 2018), SI221 (Ceccherini i sar., 2015), SU6656 (Ahluwalia i sar., 2010) i panatinib (Laramy i sar., 2017).

Ciljanje drugih signalnih puteva povezanih sa Src signalizacijom je dovelo do modulacije invazivnog fenotipa i sprečavanja umnožavanja ćelija u brojnim tipovima tumora, uključujući i glioblastome. Na primer, kombinovana primena mTOR inhibitora vistusertiba sa paklitakselom efikasno je inhibirala migraciju i invaziju ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde *in vitro* (Milošević i sar., 2018). Takođe, inhibitori komponenti signalnih puteva RAS/MAPK/ERK i PI3K/AKT/mTOR tipifarnib, vistusertib, GSK690693 i vortmanin značajno su smanjili rast ćelija ovog tipa tumora (Milosevic i sar., 2014). Inhibicija FAK tirozin-kinaze malim molekulom PF-573228 značajno je smanjila migratorni i invazivni potencijal ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća *in vitro* i *in vivo* (Dragoj, Bankovic, i sar., 2017). Primena PF-573228 u kombinaciji sa doksorubicinom dodatno je pojačala anti-invazivni potencijal ovog inhibitora (Dragoj, Milosevic, i sar., 2017). Kada su u pitanju glioblastomi, panatinib, koji pored Src tirozin-kinaze cilja i EGFR, je smanjio vijabilnost, migraciju i invaziju U87 ćelija glioblastoma *in vitro*, kao i rast tumora *in vivo* (Laramy i sar., 2017).

Efekti Si306 i pro-Si306 na ćelije glioblastoma pokazani ovom studijom mogu biti posledica direktnog ili indirektnog uticaja Src tirozin-kinaznih inhibitora na signalne molekule regulisane aktivnošću Src tirozin-kinaze. Prethodno je pokazano da Si306 smanjuje nivo fosforilisane Src tirozin-kinaze u U87 ćelijskoj liniji nakon 48 h (Calgani i sar., 2016). U ovoj doktorskoj studiji ispitivanje je prošireno na ushodne (EGFR i pFAK) i nishodne (pERK i pAKT) članove Src tirozin-

kinaznog puta, a rezultati dobijeni na U87 ćelijskoj liniji su upoređeni sa rezultatima na višestruko-rezistentnim U87-TxR ćelijama.

Karakterizacija U87/U87-TxR ćelijskog modela glioblastoma je pokazala da U87 ćelije imaju značajno višu ekspresiju EGFR i aktivnih fosforilisanih formi Src, FAK, ERK i AKT u odnosu na U87-TxR ćelije. To je u saglasnosti sa invazivnijim fenotipom U87 ćelija potvrđenim u testovima degradacije želatina i migracije kroz matrigel i bazalnu membranu.

Efekat Si306 i pro-Si306 je takođe upoređen sa efektom dasatiniba. Očekivano, izražena inhibicija aktivnosti Src tirozin-kinaze u U87 i U87-TxR ćelijama uočena je nakon tretmana sa Si306, pro-Si306 i dasatinibom. Pored toga, Si306 i pro-Si306 su efikasno inhibirali aktivnost Src tirozin-kinaze i kod primarnih kultura glioblastoma GBM-4, GBM-5 i GBM-6.

Značajno smanjenje ekspresije EGFR je uočeno kod U87 ćelija tretiranih Src tirozin-kinaznim inhibitorima, dok je značajan efekat kod U87-TxR ćelija ostvario samo inhibitor pro-Si306. Poznato je da EGFR signalizacija dovodi do intenzivnog umnožavanja ćelija glioblastoma (Z. Chen i sar., 2018), te je konstitutivno aktivan EGFR prepoznat kao klinički marker glioblastoma za čiju aktivnost nije potrebno prisustvo EGF kao liganda (Rutkowska i sar., 2019). Kako su prekomerna ekspresija i smanjena degradacija EGFR povezane sa aktivnošću Src tirozin-kinaze (Belli i sar., 2020), smanjenje nivoa ekspresije EGFR posle tretmana sa Si306 i pro-Si306 inhibitorima može se objasniti posrednim povećanjem degradacije EGFR zbog smanjene aktivnosti Src tirozin-kinaze.

Anti-invazivni efekti Si306 i pro-Si306 na ćelije glioblastoma mogu biti posledica inhibicije FAK kinaze koja ima ulogu regulatora migracije i invazije ćelija. Prethodna istraživanja su pokazala da je FAK kinaza odgovorna za koordinaciju ćelijske mobilnosti i remodelovanje vanćelijskog matriksa tokom invazije tumorskih ćelija, kao i da doprinosi sekreciji matriksnih metaloproteinaza (Hauck i sar., 2002). U U87 i CCF-STTG1 ćelijama glioblastoma, smanjena ekspresija FAK kinaze je dovela do supresije invazije i smanjene sekrecije MMP-2 i MMP-9 (Kolli-Bouhafs i sar., 2012). Takođe, inhibicija fosforilacije FAK u U373MG i A-172 ćelijama glioblastoma je povezana sa smanjenom migracijom i invazijom, kao i smanjenom aktivnošću i ekspresijom MMP-2 (Cho i sar., 2018). Stoga je inhibicija aktivnosti FAK kinaze pod dejstvom Si306 i pro-Si306 u sprezi sa sniženom ekspresijom *MMP-2* uočenom nakon tretmana kod U87 ćelijske linije.

U literaturi je opširno opisana uloga ERK i AKT tirozin-kinaza u regulaciji transdukcije signala i bioloških procesa kao što su proliferacija i preživljavanje ćelija, apoptoza, metabolizam i angiogeneza (Guo i sar., 2020). Nekontrolisana aktivacija puteva ERK i AKT u tumorskim ćelijama igra važnu ulogu u održavanju njihove proliferacije, sprečavanju apoptoze i podržava procese koji vode malignoj transformaciji i metastaziranju (Ye i sar., 2014), što ih već dugo čini važnim molekularnim metama u ciljanoj terapiji tumora (Cao i sar., 2019). Kada su u pitanju glioblastomi, istraživanja su pokazala da inhibicija AKT kinaze malim molekulom SC66 zaustavlja proliferaciju i progresiju ćelijskog ciklusa i dovodi do apoptoze kod U87 i U251 ćelija glioblastoma (Gao i sar., 2020). Pored toga, primena AKT inhibitora MK2206 u niskoj koncentraciji sprečava rast sferoida glioblastoma i povećava njihovu osetljivost na zračenje i temozolomid (Narayan i sar., 2017). Pored svog dejstva na Src tirozin-kinazu, SU6656 takođe inhibira i fosforilaciju AKT što je dovelo do povećanja osetljivosti ćelija glioblastoma na radioterapiju *in vitro* i *in vivo* (Cirotti i sar., 2020). Takođe, inhibicija ERK malim molekulom AZD9291 sprečila je rast U87, U251, U118, LN229, T98G i LN18 ćelija humanog glioblastoma *in vitro*, kao i *in vivo* kod miševa sa interkranijalnim U87 ksenograftima (X. Liu i sar., 2019).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da Si306 i pro-Si306 uspešno inhibiraju i aktivnosti nishodnih članova Src-posredovane signalizacije, pERK i pAKT, pokazujući zavidan potencijal za sprečavanje umnožavanja i preživljavanja ćelija glioblastoma. Ovo zapažanje je u skladu sa zabeleženim efektom pomenutih Src inhibitora na vijabilnost U87 i U87-TxR ćelija, utvrđenim MTT testom. Važno je napomenuti da dasatinib nije pokazao inhibitorski efekat na aktivnost ERK, dok je ekspresija fosforilisanе forme AKT kinaze bila snižena pod dejstvom dasatiniba samo u U87 ćelijama. Uticaj na smanjenje fosforilacije AKT i ERK u tumorskim ćelijama pokazan je i kod drugih Src tirozin-kinaznih inhibitora uključujući sarakatinib (Nam i sar., 2013), bosutinib (Bieerkehazhi i sar., 2017) i ponatinib (D. H. Kim i sar., 2016).

Si306 i pro-Si306 inhibitori su za razliku od dasatiniba pokazali zadovoljavajuća farmakokinetička svojstva i toleranciju *in vivo* (Vignaroli i sar., 2017; Vignaroli i sar., 2013) što pored ovde prikazanih rezultata, ova dva Src tirozin-kinazna inhibitora čini vrednim kandidatima za klinička ispitivanja.

5.4. Src tirozin-kinazni inhibitori modulišu višestruko-rezistentan fenotip ćelija glioblastoma

Mnogi tirozin-kinazni inhibitori pokazuju izuzetan potencijal inhibicije ABC transportera i reverzije rezistencije tumorskih ćelija. Laboratorija za molekularnu neuro-onkologiju u kojoj je urađena ova doktorska studija ima dugu tradiciju izučavanja dejstva ciljane terapije na rezistentni fenotip malignih tumora. Jedno od tih istraživanja je pokazalo da RAS inhibitor tipifarnib inhibira aktivnost P-glikoproteina kod rezistentnih ćelija glioblastoma, nesitnoćelijskog karcinoma pluća i karcinoma debelog creva, što je potvrđeno povećanjem akumulacije rodamina 123 nakon tretmana ovim inhibitorom (Podolski-Renić i sar., 2013). Ovaj efekat tipifarniba na P-gp dalje doprinosi njegovoj efikasnoj senzitivizaciji ćelija na paklitaksel. Takođe, iako je ispoljio slabiji efekat od tipifarniba, AKT inhibitor GSK690693 je ostvario sinergistički efekat u kombinaciji sa paklitakselom i uspeo da poveća osetljivost ćelija sa rezistentnim fenotipom na ovaj hemioterapeutik (Podolski-Renić i sar., 2013). Pored toga, mTOR inhibitor vistusertib je povećao osetljivost ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde sa povišenom ekspresijom P-gp i BCRP na paklitaksel (Milošević i sar., 2018). Kombinacija vistusertiba i paklitaksela je takođe efikasno potisnula rast ksenografa rezistentnih ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde u imunokompromitovanim miševima (Milošević i sar., 2018). Još jedna studija je pokazala da ciljanje komponenti signalnih puteva RAS/MAPK/ERK ili PI3K/AKT/mTOR povećava osetljivost ćelija anaplastičnog karcinoma štitaste žlezde na klasične hemioterapeutike. Naime, primena tipifarniba, vistusertiba, GSK690693, dabrafeniba (BRAF inhibitora) i vortmanina (PI3K inhibitora) u kombinaciji sa doksorubicinom i paklitakselom dovela je do snažnog sinergističkog dejstva (Milosevic i sar., 2014). Dalje istraživanje je otkrilo da FAK inhibitor PF-573228 ima snažno sinergističko dejstvo sa doksorubicinom na smanjenje vijabilnosti rezistentnih ćelija nesitnoćelijskog karcinoma pluća, zaustavljanje progresije ćelijskog ciklusa i indukovanje senescencije (Dragoj, Milosevic, i sar., 2017).

Efekti Src tirozin-kinaznih inhibitora Si306 i pro-Si306 su posebno proučavani na U87-TxR ćelijama glioblastoma kod kojih je ranije opisan višestruko-rezistentni fenotip sa povišenom ekspresijom i aktivnošću P-gp transportera u odnosu na odgovarajuće senzitivne U87 ćelije (Podolski-Renić i sar., 2011). Sličan profil inhibicije vijabilnosti kod pomenutih ćelijskih linija glioblastoma pokazao je da prisustvo P-gp kod U87-TxR ne utiče na efikasnost Si306 i pro-Si306. Takođe, oba Src tirozin-kinazna inhibitora ne menjaju ekspresiju *MDR1* iRNK, niti ekspresiju P-gp za razliku od dasatiniba koji dovodi do povišene ekspresije P-gp.

Si306 i pro-Si306 inhibitori su pokazali značajan potencijal za modulaciju rezistentnog fenotipa u testu akumulacije fluorescentnog P-gp supstrata – rodamina 123. Naime, 5 μ M Si306 i pro-Si306 efikasno umanjuje aktivnost P-gp što se ogleda u značajnom povećanju akumulacije rodamina 123 u direktnoj interakciji (30 min) sa Src tirozin-kinaznim inhibitorima. Dasatinib nije pokazao efekat na aktivnost P-gp transportera. Dalje, Si306 i pro-Si306 uzrokuju dozno-zavisnu inhibiciju aktivnosti P-gp, a IC_{50} vrednosti inhibicije P-gp se nalaze u istom opsegu kao i IC_{50} vrednosti inhibicije vijabilnosti ćelija glioblastoma. Efekat pro-Si306 na inhibiciju aktivnosti P-gp transportera je bio izraženiji pri nižim koncentracijama u odnosu na Si306.

Uzimajući u obzir sposobnost Si306 i njegovog proleka da smanje aktivnost P-gp transportera, ispitan je njihov potencijal za reverziju rezistencije na paklitaksel kod U87-TxR ćelija.

Iako u U87-TxR modelu rezistentnih ćelija glioblastoma dasatinib nije pokazao potencijal za modulaciju rezistentnog fenotipa, u literaturi postoje podaci da dasatinib dovodi do reverzije rezistencije na doksorubicin kod MCF-7/Adr ćelija raka dojke (T. Chen i sar., 2015). Pored dasatiniba, brojni tirozin-kinazni inhibitori mogu modulirati aktivnost ABC transportera (Krchniakova i sar., 2020). Međutim, neki od njih predstavljaju supstrate za ABC transportere, koji tek pri izuzetno visokim koncentracijama inhibiraju njihovu aktivnost (Krchniakova i sar., 2020). Za razliku od njih, Si306 i pro-Si306 predstavljaju prave inhibitore P-glikoproteina. Posebno vredan rezultat ove studije je reverzija rezistencije na paklitaksel postignuta primenom koncentracija Si306 i pro-Si306 ceo opseg ispod njihovih IC_{50} vrednosti za inhibiciju P-gp (0,2 i 0,5 μ M). Pri koncentraciji 0,5 μ M, pro-Si306 je čak 8 puta smanjio koncentraciju paklitaksela potrebnu da efikasno inhibira vijabilnost U87-TxR ćelija. Si306 je ostvario značajnu reverziju rezistencije smanjivši IC_{50} za paklitaksel oko 3 puta.

Snažniji efekat pro-Si306 na inhibiciju P-gp transportera i povećanje osetljivosti U87-TxR ćelija na paklitaksel ukazuje da pro-Si306 ima znatno veći potencijal za modulaciju višestruke rezistencije u odnosu na Si306 u U87-TxR ćelijama glioblastoma.

Važno je istaći da iako su supstance Si306 i pro-Si306 ispitivane na ćelijama glioblastoma, njihov inhibicioni efekat na funkciju P-glikoproteina ukazuje da imaju potencijal za senzitivizaciju i drugih tipova rezistentnih malignih tumora.

Uprkos tome što prolekovski često imaju znatno slabiju biološku aktivnost u odnosu na parentalni lek (Zawilska i sar., 2013), ovo istraživanje je pokazalo da pro-Si306 ima slično ili bolje dejstvo u poređenju sa svojim parentalnim lekom. Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, uz dobra farmakokinetička svojstva Si306 i pro-Si306, a naročito proleka, otvaraju mogućnost za dalje ispitivanje ovih inhibitora Src tirozin-kinaze kao potencijalnih kandidata za novu ciljanu terapiju glioblastoma.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i ostvarenih rezultata u ovoj studiji, a u skladu sa najnovijim literaturnim podacima, izvedeni su sledeći zaključci:

I Uticaj Si306 i pro-Si306 na invazivnost ćelija glioblastoma

- **Osetljivost ćelija glioblastoma na Si306 i pro-Si306 proporcionalna je nivou ekspresije Src tirozin-kinaze.** Osetljivost ćelija glioblastoma na ove Src tirozin-kinazne inhibitore je srazmerna količini ciljnog molekula u njima što je pokazano upoređivanjem efekta Si306 i pro-Si306 na vijabilnost ćelijskih linija U87 i U87-TxR, kao i uspešno uspostavljenih primarnih kultura GBM-4, GBM-5 i GBM-6 i nivoa ekspresije Src tirozin-kinaze u pomenutim ćelijama. Ćelije U87 i U87-TxR sa većom količinom Src tirozin-kinaze su bile znatno osetljivije na oba inhibitora u odnosu na primarne kulture glioblastoma sa nižim nivoom ekspresije Src tirozin-kinaze.
- **Si306 i pro-Si306 smanjuju invazivnost ćelija glioblastoma nezavisno od njihovog inherentnog invazivnog kapaciteta.** Ustanovljeno je da je invazivni kapacitet, koji je ispitan na U87, U87-TxR, GBM-4, GBM-5 i GBM-6 ćelijama, najniži kod višestruko-rezistentne ćelijske linije U87-TxR, a najviši kod primarnih kultura GBM-4 i GBM-5. Efikasno smanjenje invazije primarnih ćelijskih kultura glioblastoma Src tirozin-kinaznim inhibitorima je postignuto i sa 10 μM , koncentracijom skoro dvostruko nižom od koncentracije koja smanjuje vijabilnost ovih ćelija za 50%.
- **Uticaj Si306 i pro-Si306 na smanjenje invazivnosti ćelija glioblastoma je posledica inhibicije aktivnosti ushodnih i nishodnih članova Src tirozin-kinaznog signalnog puta kod U87 i U87-TxR ćelija.** Posebno je istaknuta inhibicija FAK koja učestvuje u regulaciji matriksne metaloproteinaze-2 čija aktivnost doprinosi invazivnom fenotipu U87 i U87-TxR ćelija. Smanjena ekspresija EGFR, kao i aktivnost AKT i ERK pod dejstvom Si306 i pro-Si306 ukazuje na potencijal ovih supstanci za inhibiciju ćelijskog rasta i preživljavanja.
- **Si306 i pro-Si306 ispoljavaju anti-invazivni efekat na ćelije glioblastoma *in vivo*.** Uticaj Si306 i pro-Si306 na smanjenje invazivnosti je potvrđen na uspešno uspostavljenom ksenograftu U87 ćelija u embrionima zebrića i to pri znatno nižoj koncentraciji (2,5 μM) u odnosu na koncentracije korišćene u *in vitro* studiji (5 i 10 μM).

II Potencijal Si306 i pro-Si306 za prevazilaženje rezistencije kod glioblastoma

- **Uticaj Si306 i pro-Si306 na ćelijsku vijabilnost nije kompromitovan prisustvom višestruke rezistencije na lekove kod U87-TxR ćelija.** Koncentracije pri kojima ove supstance smanjuju ćelijsku vijabilnost za 50% se nisu značajno razlikovale između senzitivnih U87 i višestruko-rezistentnih U87-TxR ćelija, što ukazuje da ispitivani Src tirozin-kinazni inhibitori nisu supstrati za P-glikoprotein prisutan na membrani U87-TxR ćelija.
- **Si306 i pro-Si306 smanjuju aktivnost P-glikoproteina kod U87-TxR ćelija.** Uticaj ispitivanih Src tirozin-kinaznih inhibitora na funkciju ovog membranskog transportera nije praćen promenama u njegovoj ekspresiji, što ove supstance kvalifikuje kao potentne inhibitore P-glikoproteina.

- **Si306 i pro-Si306 dovode do reverzije rezistencije na paklitaksel kod U87-TxR ćelija.** Reverzija rezistencije na paklitaksel je postignuta pri koncentracijama u nanomolarnom opsegu (200 i 500 nM) iako su koncentracije pri kojima ove supstance inhibiraju aktivnost P-glikoproteina za 50% približno 8 μ M za Si306 i 4 μ M za pro-Si306.
- **Pro-Si306 snažnije inhibira aktivnost P-glikoproteina i povećava osetljivost U87-TxR ćelija na paklitaksel u odnosu na Si306.**

Opšti zaključak:

Src tirozin-kinazni inhibitori, Si306 i njegov prolek pro-Si306, pokazuju sposobnost za suzbijanje invazivnosti glioblastoma, kao i za prevazilaženje rezistencije na lekove. Aktivnosti Si306 i pro-Si306 koje dovode do smanjenja vijabilnosti i invazivnosti glioblastoma su posredovane inhibicijom Src tirozin-kinaze i članova Src tirozin-kinaznog signalnog puta. Aktivnosti Si306 i pro-Si306 koje dovode do povećanja osetljivosti glioblastoma na lekove su direktna posledica inhibicije P-glikoproteina. Dobijeni rezultati tako ukazuju da pored Src tirozin-kinaze, postoji i drugi ciljni molekul za dejstvo Si306 i pro-Si306 i da je to upravo P-glikoprotein. Stoga, Si306 i pro-Si306 mogu naći primenu u ciljanoj terapiji glioblastoma samostalno ili u kombinaciji sa drugim lekovima. Pro-Si306 ima sličan anti-invazivni potencijal kao Si306, ali je znatno efikasniji u prevazilaženju rezistencije i inhibiciji P-glikoproteina. Zbog svojih povoljnijih farmakokinetičkih svojstava i nesmanjene efikasnosti u odnosu na Si306, primena pro-Si306 u terapiji glioblastoma može biti svrsishodnija.

7. LITERATURA

- Agarwal, S., Mittapalli, R. K., Zellmer, D. M., Gallardo, J. L., Donelson, R., Seiler, C., Decker, S. A., Santacruz, K. S., Pokorny, J. L., Sarkaria, J. N., Elmquist, W. F., i Ohlfest, J. R. (2012) Active efflux of Dasatinib from the brain limits efficacy against murine glioblastoma: broad implications for the clinical use of molecularly targeted agents. *Mol Cancer Ther.* 11, 2183-2192.
- Ahluwalia, M. S., de Groot, J., Liu, W. M., i Gladson, C. L. (2010) Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Lett.* 298, 139-149.
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., i von Deimling, A. (2015) Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 129, 829-848.
- Alix-Panabieres, C., i Pantel, K. (2016) Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 6, 479-491.
- Amawi, H., Sim, H. M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. V., i Shukla, S. (2019) ABC Transporter-Mediated Multidrug-Resistant Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1141, 549-580.
- Angelucci, A., Schenone, S., Gravina, G. L., Muzi, P., Festuccia, C., Vicentini, C., Botta, M., i Bologna, M. (2006) Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines c-Src inhibitors reduce epidermal growth factor-induced migration in prostate cancer cells. *Eur J Cancer.* 42, 2838-2845.
- Aprile, G., Ongaro, E., Del Re, M., Lutrino, S. E., Bonotto, M., Ferrari, L., Rihawi, K., Cardellino, G. G., Pella, N., Danesi, R., i Fasola, G. (2015) Angiogenic inhibitors in gastric cancers and gastroesophageal junction carcinomas: A critical insight. *Crit Rev Oncol Hematol.* 95, 165-178.
- Bagnato, G., Leopizzi, M., i Urciuoli, E. (2020) Nuclear Functions of the Tyrosine Kinase Src. *Int J Mol Sci.* 21, 2675.
- Balca-Silva, J., Matias, D., Carmo, A. D., Sarmento-Ribeiro, A. B., Lopes, M. C., i Moura-Neto, V. (2019) Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 58, 130-141.
- Baretti, M., i Le, D. T. (2018) DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther.* 189, 45-62.
- Baudino, T. A. (2015) Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol.* 12, 3-20.
- Belli, S., Esposito, D., Servetto, A., Pesapane, A., Formisano, L., i Bianco, R. (2020) c-Src and EGFR Inhibition in Molecular Cancer Therapy: What Else Can We Improve? *Cancers (Basel).* 12, 1489.
- Belousov, A., Titov, S., Shved, N., Garbuz, M., Malykin, G., Gulaia, V., Kagansky, A., i Kumeiko, V. (2019) The Extracellular Matrix and Biocompatible Materials in Glioblastoma Treatment. *Front Bioeng Biotechnol.* 7, 341.

- Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., i Gatti, L. (2017) Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *Eur J Med Chem.* 142, 271-289.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., i Tan, A. S. (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 11, 127-152.
- Bieerkehazhi, S., Chen, Z., Zhao, Y., Yu, Y., Zhang, H., Vasudevan, S. A., Woodfield, S. E., Tao, L., Yi, J. S., Muscal, J. A., Pang, J. C., Guan, S., Zhang, H., Nuchtern, J. G., Li, H., Li, H., i Yang, J. (2017) Novel Src/Abl tyrosine kinase inhibitor bosutinib suppresses neuroblastoma growth via inhibiting Src/Abl signaling. *Oncotarget.* 8, 1469-1480.
- Bosch, S., Siavoshian, S., Jacquot, C., Tomasoni, C., Dabouis, G., Elanbaloussi, Y., Leneel, T., More, M. T., i Roussakis, C. (1997) Correlation between multidrug resistance and the degree of differentiation of non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (NSCLC) in vitro and in vivo. *Anticancer Res.* 17, 4595-4598.
- Braun, T. P., Eide, C. A., i Druker, B. J. (2020) Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell.* 37, 530-542.
- Bukowski, K., Kciuk, M., i Kontek, R. (2020) Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 21, 3233.
- Butler, M., Pongor, L., Su, Y. T., Xi, L., Raffeld, M., Quezado, M., Trepel, J., Aldape, K., Pommier, Y., i Wu, J. (2020) MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. *Trends Cancer.* 6, 380-391.
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., i Alimonti, A. (2019) Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev.* 99, 1047-1078.
- Calgani, A., Vignaroli, G., Zamperini, C., Coniglio, F., Festuccia, C., Di Cesare, E., Gravina, G. L., Mattei, C., Vitale, F., Schenone, S., Botta, M., i Angelucci, A. (2016) Suppression of SRC Signaling Is Effective in Reducing Synergy between Glioblastoma and Stromal Cells. *Mol Cancer Ther.* 15, 1535-1544.
- Campos, B., Olsen, L. R., Urup, T., i Poulsen, H. S. (2016) A comprehensive profile of recurrent glioblastoma. *Oncogene.* 35, 5819-5825.
- Cao, Z., Liao, Q., Su, M., Huang, K., Jin, J., i Cao, D. (2019) AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett.* 459, 30-40.
- Casini, N., Forte, I. M., Mastrogiovanni, G., Pentimalli, F., Angelucci, A., Festuccia, C., Tomei, V., Ceccherini, E., Di Marzo, D., Schenone, S., Botta, M., Giordano, A., i Indovina, P. (2015) SRC family kinase (SFK) inhibition reduces rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo and triggers p38 MAP kinase-mediated differentiation. *Oncotarget.* 6, 12421-12435.
- Ceccherini, E., Indovina, P., Zamperini, C., Dreassi, E., Casini, N., Cutaia, O., Forte, I. M., Pentimalli, F., Esposito, L., Polito, M. S., Schenone, S., Botta, M., i Giordano, A. (2015) SRC family kinase inhibition through a new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivative as a feasible approach for glioblastoma treatment. *J Cell Biochem.* 116, 856-863.

- Celia-Terrassa, T., i Kang, Y. (2016) Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev.* *30*, 892-908.
- Chang, K. Y., Hsu, T. I., Hsu, C. C., Tsai, S. Y., Liu, J. J., Chou, S. W., Liu, M. S., Liou, J. P., Ko, C. Y., Chen, K. Y., Hung, J. J., Chang, W. C., Chuang, C. K., Kao, T. J., i Chuang, J. Y. (2017) Specificity protein 1-modulated superoxide dismutase 2 enhances temozolomide resistance in glioblastoma, which is independent of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase. *Redox Biol.* *13*, 655-664.
- Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., i Ellinger, I. (2018) Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Front Pharmacol.* *9*, 1027.
- Chen, T., Wang, C., Liu, Q., Meng, Q., Sun, H., Huo, X., Sun, P., Peng, J., Liu, Z., Yang, X., i Liu, K. (2015) Dasatinib reverses the multidrug resistance of breast cancer MCF-7 cells to doxorubicin by downregulating P-gp expression via inhibiting the activation of ERK signaling pathway. *Cancer Biol Ther.* *16*, 106-114.
- Chen, Z., Oh, D., Dubey, A. K., Yao, M., Yang, B., Groves, J. T., i Sheetz, M. (2018) EGFR family and Src family kinase interactions: mechanics matters? *Curr Opin Cell Biol.* *51*, 97-102.
- Cheng, L., Wu, Q., Guryanova, O. A., Huang, Z., Huang, Q., Rich, J. N., i Bao, S. (2011) Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* *406*, 643-648.
- Cheng, X., i Cheng, K. (2021) Visualizing cancer extravasation: from mechanistic studies to drug development. *Cancer Metastasis Rev.* *40*, 71-88.
- Chiang, S. P., Cabrera, R. M., i Segall, J. E. (2016) Tumor cell intravasation. *Am J Physiol Cell Physiol.* *311*, C1-c14.
- Cho, H. J., Park, J. H., Nam, J. H., i Chang, Y. C. (2018) Ascochlorin Suppresses MMP-2-Mediated Migration and Invasion by Targeting FAK and JAK-STAT Signaling Cascades. *J Cell Biochem.* *119*, 300-313.
- Chouleur, T., Tremblay, M. L., i Bikfalvi, A. (2020) Mechanisms of invasion in glioblastoma. *Curr Opin Oncol.* *32*, 631-639.
- Cirotti, C., Contadini, C., i Barilà, D. (2020) SRC Kinase in Glioblastoma News from an Old Acquaintance. *Cancers (Basel).* *12*, 1558.
- Cozzi, M., Giorgi, F., Marcelli, E., Pentimalli, F., Forte, I. M., Schenone, S., D'Urso, V., De Falco, G., Botta, M., Giordano, A., i Indovina, P. (2012) Antitumor activity of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine SRC kinase inhibitors in Burkitt lymphoma cell lines and its enhancement by WEE1 inhibition. *Cell Cycle.* *11*, 1029-1039.
- Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S., i Sontheimer, H. (2014) A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci.* *15*, 455-465.

- Da Ros, M., De Gregorio, V., Iorio, A. L., Giunti, L., Guidi, M., de Martino, M., Genitori, L., i Sardi, I. (2018) Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 19, 2879.
- Dagogo-Jack, I., i Shaw, A. T. (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol.* 15, 81-94.
- De Vleeschouwer, S., i Bergers, G. (2017). Glioblastoma: To Target the Tumor Cell or the Microenvironment? In S. De Vleeschouwer (Ed.), *Glioblastoma* (pp. PMID: 29251862). Brisbane (AU): Codon Publications. Copyright: The Authors.
- De Witt Hamer, P. C. (2010) Small molecule kinase inhibitors in glioblastoma: a systematic review of clinical studies. *Neuro Oncol.* 12, 304-316.
- Drabsch, Y., He, S., Zhang, L., Snaar-Jagalska, B. E., i ten Dijke, P. (2013) Transforming growth factor- β signalling controls human breast cancer metastasis in a zebrafish xenograft model. *Breast Cancer Res.* 15, R106.
- Dragoj, M., Bankovic, J., Sereti, E., Stojanov, S. J., Dimas, K., Pesic, M., i Stankovic, T. (2017) Anti-invasive effects of CXCR4 and FAK inhibitors in non-small cell lung carcinomas with mutually inactivated p53 and PTEN tumor suppressors. *Investigational New Drugs.* 35, 718-732.
- Dragoj, M., Milosevic, Z., Bankovic, J., Tanic, N., Pesic, M., i Stankovic, T. (2017) Targeting CXCR4 and FAK reverses doxorubicin resistance and suppresses invasion in non-small cell lung carcinoma. *Cellular Oncology.* 40, 47-62.
- Dragoj, M., Stojkovska, J., Stanković, T., Dinić, J., Podolski-Renić, A., Obradović, B., i Pešić, M. (2021) Development and Validation of a Long-Term 3D Glioblastoma Cell Culture in Alginate Microfibers as a Novel Bio-Mimicking Model System for Preclinical Drug Testing. *Brain Sciences.* 11, 1025.
- Dreassi, E., Zizzari, A. T., Mori, M., Filippi, I., Belfiore, A., Naldini, A., Carraro, F., Santucci, A., Schenone, S., i Botta, M. (2010) 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin strongly improves water solubility and anti-proliferative activity of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines Src-Abl dual inhibitors. *Eur J Med Chem.* 45, 5958-5964.
- Du, Z., i Lovly, C. M. (2018) Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer.* 17, 58.
- Eadie, L. N., Dang, P., Goyne, J. M., Hughes, T. P., i White, D. L. (2018) ABCC6 plays a significant role in the transport of nilotinib and dasatinib, and contributes to TKI resistance in vitro, in both cell lines and primary patient mononuclear cells. *PLoS One.* 13, e0192180.
- Eom, K. Y., Cho, B. J., Choi, E. J., Kim, J. H., Chie, E. K., Wu, H. G., Kim, I. H., Paek, S. H., Kim, J. S., i Kim, I. A. (2016) The Effect of Chemoradiotherapy with SRC Tyrosine Kinase Inhibitor, PP2 and Temozolomide on Malignant Glioma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res Treat.* 48, 687-697.

- Escudier, B., Worden, F., i Kudo, M. (2019) Sorafenib: key lessons from over 10 years of experience. *Expert Rev Anticancer Ther.* 19, 177-189.
- Eskilsson, E., Røsland, G. V., Solecki, G., Wang, Q., Harter, P. N., Graziani, G., Verhaak, R. G. W., Winkler, F., Bjerkvig, R., i Miletic, H. (2018) EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 20, 743-752.
- Fallacara, A. L., Zamperini, C., Podolski-Renić, A., Dinić, J., Stanković, T., Stepanović, M., Mancini, A., Rango, E., Iovenitti, G., Molinari, A., Bugli, F., Sanguinetti, M., Torelli, R., Martini, M., Maccari, L., Valoti, M., Dreassi, E., Botta, M., Pešić, M., i Schenone, S. (2019) A New Strategy for Glioblastoma Treatment: In Vitro and In Vivo Preclinical Characterization of Si306, a Pyrazolo[3,4-d]Pyrimidine Dual Src/P-Glycoprotein Inhibitor. *Cancers (Basel).* 11, 848.
- Fathi Kazerooni, A., Bakas, S., Rad, H. S., i Davatzikos, C. (2020) Imaging signatures of glioblastoma molecular characteristics: A radiogenomics review. *J Magn Reson Imaging.* 52, 54-69.
- Ferrara, N., i Adamis, A. P. (2016) Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 15, 385-403.
- Flynn, J. P., i Gerriets, V. (2021). Imatinib *StatPearls* (pp. PMID: 31869140). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Fouad, Y. A., i Aanei, C. (2017) Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res.* 7, 1016-1036.
- Galanis, E., Anderson, S. K., Twohy, E. L., Carrero, X. W., Dixon, J. G., Tran, D. D., Jeyapalan, S. A., Anderson, D. M., Kaufmann, T. J., Feathers, R. W., Giannini, C., Buckner, J. C., Anastasiadis, P. Z., i Schiff, D. (2019) A phase 1 and randomized, placebo-controlled phase 2 trial of bevacizumab plus dasatinib in patients with recurrent glioblastoma: Alliance/North Central Cancer Treatment Group N0872. *Cancer.* 125, 3790-3800.
- Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D. A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M. C., Martin, S. J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Simon, H. U., Simonsen, A., Thorburn, A. M., Velasco, G., Ryan, K. M., i Kroemer, G. (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *Embo j.* 34, 856-880.
- Gao, L., Liu, J., Xu, P., Deng, G., Liu, B., Yuan, F., Tan, Y., Sun, Q., Xu, Y., Zhang, H., Qi, Y., Han, S., Yang, K., Geng, R., Jiang, H., i Chen, Q. (2020) AKT Inhibitor SC66 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Through Down-Regulating AKT/ β -Catenin Pathway. *Front Pharmacol.* 11, 1102.
- Geiger, G. A., Fu, W., i Kao, G. D. (2008) Temozolomide-mediated radiosensitization of human glioma cells in a zebrafish embryonic system. *Cancer Res.* 68, 3396-3404.
- Goi, T., Shipitsin, M., Lu, Z., Foster, D. A., Klinz, S. G., i Feig, L. A. (2000) An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *Embo j.* 19, 623-630.

- Gotwals, P., Cameron, S., Cipolletta, D., Cremasco, V., Crystal, A., Hewes, B., Mueller, B., Quarantino, S., Sabatos-Peyton, C., Petruzzelli, L., Engelman, J. A., i Dranoff, G. (2017) Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. *17*, 286-301.
- Greco, C., Taresco, V., Pearce, A. K., Vasey, C. E., Smith, S., Rahman, R., Alexander, C., Cavanagh, R. J., Musumeci, F., i Schenone, S. (2020) Development of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Kinase Inhibitors as Potential Clinical Candidates for Glioblastoma Multiforme. *ACS Med Chem Lett*. *11*, 657-663.
- Guo, Y. J., Pan, W. W., Liu, S. B., Shen, Z. F., Xu, Y., i Hu, L. L. (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. *19*, 1997-2007.
- Hadler-Olsen, E., Winberg, J. O., i Uhlin-Hansen, L. (2013) Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour Biol*. *34*, 2041-2051.
- Haldi, M., Ton, C., Seng, W. L., i McGrath, P. (2006) Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*. *9*, 139-151.
- Han, X., Zhang, W., Yang, X., Wheeler, C. G., Langford, C. P., Wu, L., Filippova, N., Friedman, G. K., Ding, Q., Fathallah-Shaykh, H. M., Gillespie, G. Y., i Nabors, L. B. (2014) The role of Src family kinases in growth and migration of glioma stem cells. *Int J Oncol*. *45*, 302-310.
- Hanahan, D., i Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. *100*, 57-70.
- Hanahan, D., i Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. *144*, 646-674.
- Hatoum, A., Mohammed, R., i Zakieh, O. (2019) The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Manag Res*. *11*, 1843-1855.
- Hauck, C. R., Hsia, D. A., i Schlaepfer, D. D. (2002) The focal adhesion kinase--a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life*. *53*, 115-119.
- Hiwase, D. K., White, D., Zrim, S., Saunders, V., Melo, J. V., i Hughes, T. P. (2010) Nilotinib-mediated inhibition of ABCB1 increases intracellular concentration of dasatinib in CML cells: implications for combination TKI therapy. *Leukemia*. *24*, 658-660.
- Hořinková, J., Šíma, M., i Slanař, O. (2019) Pharmacokinetics of Dasatinib. *Prague Med Rep*. *120*, 52-63.
- Hsu, P. C., Yang, C. T., Jablons, D. M., i You, L. (2020) The Crosstalk between Src and Hippo/YAP Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Cancers (Basel)*. *12*, 1361.
- Hua, H., Kong, Q., Zhang, H., Wang, J., Luo, T., i Jiang, Y. (2019) Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. *12*, 71.
- Huang, K., Liu, X., Li, Y., Wang, Q., Zhou, J., Wang, Y., Dong, F., Yang, C., Sun, Z., Fang, C., Liu, C., Tan, Y., Wu, X., Jiang, T., i Kang, C. (2019) Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening

Identifies NF- κ B/E2F6 Responsible for EGFRvIII-Associated Temozolomide Resistance in Glioblastoma. *Adv Sci (Weinh)*. 6, 1900782.

- Hupfeld, T., Chapuy, B., Schrader, V., Beutler, M., Veltkamp, C., Koch, R., Cameron, S., Aung, T., Haase, D., Larosee, P., Truemper, L., i Wulf, G. G. (2013) Tyrosinekinase inhibition facilitates cooperation of transcription factor SALL4 and ABC transporter A3 towards intrinsic CML cell drug resistance. *Br J Haematol*. 161, 204-213.
- Huse, J. T., i Holland, E. C. (2010) Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 10, 319-331.
- Huttunen, K. M., Raunio, H., i Rautio, J. (2011) Prodrugs--from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev*. 63, 750-771.
- Indovina, P., Giorgi, F., Rizzo, V., Khadang, B., Schenone, S., Di Marzo, D., Forte, I. M., Tomei, V., Mattioli, E., D'Urso, V., Grilli, B., Botta, M., Giordano, A., i Pentimalli, F. (2012) New pyrazolo[3,4-d]pyrimidine SRC inhibitors induce apoptosis in mesothelioma cell lines through p27 nuclear stabilization. *Oncogene*. 31, 929-938.
- Jetter, A., i Kullak-Ublick, G. A. (2020) Drugs and hepatic transporters: A review. *Pharmacol Res*. 154, 104234.
- Jha, V., Macchia, M., i Tuccinardi, T. (2020) Three-Dimensional Interactions Analysis of the Anticancer Target c-Src Kinase with Its Inhibitors. 12.
- Jiang, P., Mukthavaram, R., Chao, Y., Bharati, I. S., Fogal, V., Pastorino, S., Cong, X., Nomura, N., Gallagher, M., Abbasi, T., Vali, S., Pingle, S. C., Makale, M., i Kesari, S. (2014) Novel anti-glioblastoma agents and therapeutic combinations identified from a collection of FDA approved drugs. *J Transl Med*. 12, 13.
- Jin, W. (2020) Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications. *Cancers (Basel)*. 12, 1339.
- Jovčevska, I. (2019) Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosn J Basic Med Sci*. 19, 116-124.
- Jubran, M. R., Rubinstein, A. M., Cojocari, I., Adejumobi, I. A., Mogilevsky, M., Tibi, S., Sionov, R. V., Verreault, M., Idbaih, A., Karni, R., i Kravchenko-Balasha, N. (2020) Dissecting the role of crosstalk between glioblastoma subpopulations in tumor cell spreading. *Oncogenesis*. 9, 11.
- Jue, T. R., i McDonald, K. L. (2016) The challenges associated with molecular targeted therapies for glioblastoma. *J Neurooncol*. 127, 427-434.
- Jung, D. W., Oh, E. S., Park, S. H., Chang, Y. T., Kim, C. H., Choi, S. Y., i Williams, D. R. (2012) A novel zebrafish human tumor xenograft model validated for anti-cancer drug screening. *Mol Biosyst*. 8, 1930-1939.
- Kanojia, D., Morshed, R. A., Zhang, L., Miska, J. M., Qiao, J., Kim, J. W., Pytel, P., Balyasnikova, I. V., Lesniak, M. S., i Ahmed, A. U. (2015) β III-Tubulin Regulates Breast Cancer Metastases to the Brain. *Mol Cancer Ther*. 14, 1152-1161.

- Kapoor, G. S., Zhan, Y., Johnson, G. R., i O'Rourke, D. M. (2004) Distinct domains in the SHP-2 phosphatase differentially regulate epidermal growth factor receptor/NF-kappaB activation through Gab1 in glioblastoma cells. *Mol Cell Biol.* 24, 823-836.
- Kartal-Yandim, M., Adan-Gokbulut, A., i Baran, Y. (2016) Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol.* 36, 716-726.
- Kathawala, R. J., Sodani, K., Chen, K., Patel, A., Abuznait, A. H., Anreddy, N., Sun, Y. L., Kaddoumi, A., Ashby, C. R., Jr., i Chen, Z. S. (2014) Masitinib antagonizes ATP-binding cassette subfamily C member 10-mediated paclitaxel resistance: a preclinical study. *Mol Cancer Ther.* 13, 714-723.
- Katoh, K. (2020) FAK-Dependent Cell Motility and Cell Elongation. *Cells.* 9, 192.
- Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H., i Schellens, J. H. (2010) Bevacizumab. *Oncologist.* 15, 819-825.
- Khan, I., Waqas, M., i Shamim, M. S. (2017) Prognostic significance of IDH 1 mutation in patients with glioblastoma multiforme. *J Pak Med Assoc.* 67, 816-817.
- Kim, D. H., Kwak, Y., Kim, N. D., i Sim, T. (2016) Antitumor effects and molecular mechanisms of ponatinib on endometrial cancer cells harboring activating FGFR2 mutations. *Cancer Biol Ther.* 17, 65-78.
- Kim, D. W., Talati, C., i Kim, R. (2017) Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy. *J Gastrointest Oncol.* 8, 256-265.
- Kim, G., i Ko, Y. T. (2020) Small molecule tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma. *Arch Pharm Res.* 43, 385-394.
- Koff, J. L., Ramachandiran, S., i Bernal-Mizrachi, L. (2015) A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci.* 16, 2942-2955.
- Kolli-Bouhafs, K., Boukhari, A., Abusnina, A., Velot, E., Gies, J. P., Lugnier, C., i Rondé, P. (2012) Thymoquinone reduces migration and invasion of human glioblastoma cells associated with FAK, MMP-2 and MMP-9 down-regulation. *Invest New Drugs.* 30, 2121-2131.
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., i Fasoulakis, Z. (2020) Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* 40, 6009-6015.
- Kostić, A., Jovanović Stojanov, S., Podolski-Renić, A., Nešović, M., Dragoj, M., Nikolić, I., Tasić, G., Schenone, S., Pešić, M., i Dinić, J. (2021) Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Tyrosine Kinase Inhibitors Induce Oxidative Stress in Patient-Derived Glioblastoma Cells. *Brain Sciences.* 11, 884.
- Krchniakova, M., Skoda, J., i Neradil, J. (2020) Repurposing Tyrosine Kinase Inhibitors to Overcome Multidrug Resistance in Cancer: A Focus on Transporters and Lysosomal Sequestration. *Int J Mol Sci.* 21, 3157.

- Laramy, J. K., Kim, M., Gupta, S. K., Parrish, K. E., Zhang, S., Bakken, K. K., Carlson, B. L., Mladek, A. C., Ma, D. J., Sarkaria, J. N., i Elmquist, W. F. (2017) Heterogeneous Binding and Central Nervous System Distribution of the Multitargeted Kinase Inhibitor Ponatinib Restrict Orthotopic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Model of Glioblastoma. *J Pharmacol Exp Ther.* 363, 136-147.
- Lassman, A. B., Pugh, S. L., Gilbert, M. R., Aldape, K. D., Geinoz, S., Beumer, J. H., Christner, S. M., Komaki, R., DeAngelis, L. M., Gaur, R., Youssef, E., Wagner, H., Won, M., i Mehta, M. P. (2015) Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro Oncol.* 17, 992-998.
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., i Weller, M. (2019) Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 80, 101896.
- Ledur, P. F., Onzi, G. R., Zong, H., i Lenz, G. (2017) Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget.* 8, 69185-69197.
- Lee, L. M., Seftor, E. A., Bonde, G., Cornell, R. A., i Hendrix, M. J. (2005) The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn.* 233, 1560-1570.
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., i Oon, C. E. (2018) Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol.* 834, 188-196.
- Li, G., Qin, Z., Chen, Z., Xie, L., Wang, R., i Zhao, H. (2017) Tumor Microenvironment in Treatment of Glioma. *Open Med (Wars).* 12, 247-251.
- Li, W., Sparidans, R. W., Wang, Y., Lebre, M. C., Beijnen, J. H., i Schinkel, A. H. (2018) P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict brigatinib brain accumulation and toxicity, and, alongside CYP3A, limit its oral availability. *Pharmacol Res.* 137, 47-55.
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., i Constantin, G. (2018) Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 135, 311-336.
- Liu, S. T., Pham, H., Pandol, S. J., i Ptasznik, A. (2013) Src as the link between inflammation and cancer. *Front Physiol.* 4, 416.
- Liu, X., Chen, X., Shi, L., Shan, Q., Cao, Q., Yue, C., Li, H., Li, S., Wang, J., Gao, S., Niu, M., i Yu, R. (2019) The third-generation EGFR inhibitor AZD9291 overcomes primary resistance by continuously blocking ERK signaling in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 38, 219.
- Liu, Y., i Cao, X. (2016) Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell.* 30, 668-681.
- Livak, K. J., i Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402-408.
- Loibl, S., i Gianni, L. (2017) HER2-positive breast cancer. *Lancet.* 389, 2415-2429.

- Lopez, J., i Tait, S. W. (2015) Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 112, 957-962.
- Lorusso, G., i Rüegg, C. (2012) New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin Cancer Biol*. 22, 226-233.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., i Ellison, D. W. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 131, 803-820.
- Lu, C., Wei, Y., Wang, X., Zhang, Z., Yin, J., Li, W., Chen, L., Lyu, X., Shi, Z., Yan, W., i You, Y. (2020) DNA-methylation-mediated activating of lncRNA SNHG12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Mol Cancer* 19, 28.
- Ludwig, K., i Kornblum, H. I. (2017) Molecular markers in glioma. *J Neurooncol*. 134, 505-512.
- Lukas, R. V., Wainwright, D. A., Ladomersky, E., Sachdev, S., Sonabend, A. M., i Stupp, R. (2019) Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management. *Oncology (Williston Park)*. 33, 91-100.
- Lund, C. V., Nguyen, M. T., Owens, G. C., Pakchoian, A. J., Shaterian, A., Kruse, C. A., i Eliceiri, B. P. (2006) Reduced glioma infiltration in Src-deficient mice. *J Neurooncol*. 78, 19-29.
- Ma, L., Wang, D. D., Huang, Y., Yan, H., Wong, M. P., i Lee, V. H. (2015) EGFR Mutant Structural Database: computationally predicted 3D structures and the corresponding binding free energies with gefitinib and erlotinib. *BMC Bioinformatics*. 16, 85.
- Martellucci, S., Clementi, L., Sabetta, S., i Mattei, V. (2020) Src Family Kinases as Therapeutic Targets in Advanced Solid Tumors: What We Have Learned so Far. *Cancers (Basel)*. 12, 1448.
- Massague, J., i Obenauf, A. C. (2016) Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 529, 298-306.
- Matozaki, T., Kotani, T., Murata, Y., i Saito, Y. (2021) Roles of Src family kinase, Ras, and mTOR signaling in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis. *Cancer Sci*. 112, 16-21.
- Mi, Y. J., Liang, Y. J., Huang, H. B., Zhao, H. Y., Wu, C. P., Wang, F., Tao, L. Y., Zhang, C. Z., Dai, C. L., Tiwari, A. K., Ma, X. X., To, K. K., Ambudkar, S. V., Chen, Z. S., i Fu, L. W. (2010) Apatinib (YN968D1) reverses multidrug resistance by inhibiting the efflux function of multiple ATP-binding cassette transporters. *Cancer Res*. 70, 7981-7991.
- Milano, V., Piao, Y., LaFortune, T., i de Groot, J. (2009) Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol Cancer Ther*. 8, 394-406.
- Miller, G. D., Bruno, B. J., i Lim, C. S. (2014) Resistant mutations in CML and Ph(+)ALL - role of ponatinib. *Biologics*. 8, 243-254.

- Milošević, Z., Banković, J., Dinić, J., Tsimplouli, C., Sereti, E., Dragoj, M., Paunović, V., Milovanović, Z., Stepanović, M., Tanić, N., Dimas, K., i Pešić, M. (2018) Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma. *Cell Oncol (Dordr)*. 41, 409-426.
- Milosevic, Z., Pesic, M., Stankovic, T., Dinic, J., Milovanovic, Z., Stojsic, J., Dzodic, R., Tanic, N., i Bankovic, J. (2014) Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma. *Transl Res*. 164, 411-423.
- Minocha, M., Khurana, V., Qin, B., Pal, D., i Mitra, A. K. (2012) Enhanced brain accumulation of pazopanib by modulating P-gp and Bcrp1 mediated efflux with canertinib or erlotinib. *Int J Pharm*. 436, 127-134.
- Mitra, S. K., i Schlaepfer, D. D. (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*. 18, 516-523.
- Molina, J. R., Hayashi, Y., Stephens, C., i Georgescu, M. M. (2010) Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia*. 12, 453-463.
- Morisi, R., Celano, M., Tosi, E., Schenone, S., Navarra, M., Ferretti, E., Costante, G., Durante, C., Botta, G., D'Agostino, M., Brullo, C., Filetti, S., Botta, M., i Russo, D. (2007) Growth inhibition of medullary thyroid carcinoma cells by pyrazolo-pyrimidine derivatives. *J Endocrinol Invest*. 30, Rc31-34.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- Motofei, I. G. (2018) Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Invest*. 36, 309-317.
- Mowers, E. E., Sharifi, M. N., i Macleod, K. F. (2017) Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*. 36, 1619-1630.
- Mrugala, M. M. (2013) Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov Med*. 15, 221-230.
- Nam, H. J., Im, S. A., Oh, D. Y., Elvin, P., Kim, H. P., Yoon, Y. K., Min, A., Song, S. H., Han, S. W., Kim, T. Y., i Bang, Y. J. (2013) Antitumor activity of saracatinib (AZD0530), a c-Src/Abl kinase inhibitor, alone or in combination with chemotherapeutic agents in gastric cancer. *Mol Cancer Ther*. 12, 16-26.
- Narayan, R. S., Fedrigo, C. A., Brands, E., Dik, R., Stalpers, L. J., Baumert, B. G., Slotman, B. J., Westerman, B. A., Peters, G. J., i Sminia, P. (2017) The allosteric AKT inhibitor MK2206 shows a synergistic interaction with chemotherapy and radiotherapy in glioblastoma spheroid cultures. *BMC Cancer*. 17, 204.
- Navarra, M., Celano, M., Maiuolo, J., Schenone, S., Botta, M., Angelucci, A., Bramanti, P., i Russo, D. (2010) Antiproliferative and pro-apoptotic effects afforded by novel Src-kinase inhibitors in human neuroblastoma cells. *BMC Cancer*. 10, 602.

- Nehoff, H., Parayath, N. N., McConnell, M. J., Taurin, S., i Greish, K. (2015) A combination of tyrosine kinase inhibitors, crizotinib and dasatinib for the treatment of glioblastoma multiforme. *Oncotarget*. 6, 37948-37964.
- NicAmhlaoibh, R., Heenan, M., Cleary, I., Touhey, S., O'Loughlin, C., Daly, C., Nunez, G., Scanlon, K. J., i Clynes, M. (1999) Altered expression of mRNAs for apoptosis-modulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses *mdr1* mRNA. *Int J Cancer*. 82, 368-376.
- Ou, A., Yung, W. K. A., i Majd, N. (2020) Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*. 22, 351.
- Padma, V. V. (2015) An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)*. 5, 19.
- Park, S. Y., Park, J. W., Lee, G. W., Li, L., i Chun, Y. S. (2018) Inhibition of neddylation facilitates cell migration through enhanced phosphorylation of caveolin-1 in PC3 and U373MG cells. *BMC Cancer*. 18, 30.
- Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A., i Somanath, P. R. (2016) Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sci*. 157, 52-61.
- Paw, I., Carpenter, R. C., Watabe, K., Debinski, W., i Lo, H. W. (2015) Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett*. 362, 1-7.
- Pazhouhi, M., Sariri, R., Khazaei, M. R., Moradi, M. T., i Khazaei, M. (2018) Synergistic effect of temozolomide and thymoquinone on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). *J Cancer Res Ther*. 14, 1023-1028.
- Peach, C. J., Mignone, V. W., i Arruda, M. A. (2018) Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci*. 19, 1264.
- Pédeboscq, S., L'Azou, B., Liguoro, D., Pometan, J. P., i Cambar, J. (2007) Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells. *Exp Toxicol Pathol*. 58, 247-253.
- Picariello, H. S., Kenchappa, R. S., Rai, V., Crish, J. F., Dovas, A., Pogoda, K., McMahan, M., Bell, E. S., Chandrasekharan, U., Luu, A., West, R., Lammerding, J., Canoll, P., Odde, D. J., Janmey, P. A., Egelhoff, T., i Rosenfeld, S. S. (2019) Myosin IIA suppresses glioblastoma development in a mechanically sensitive manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116, 15550-15559.
- Podolski-Renic, A., Andelkovic, T., Bankovic, J., Tanic, N., Ruzdijic, S., i Pesic, M. (2011) The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomed Pharmacother*. 65, 345-353.
- Podolski-Renić, A., Andelković, T., Banković, J., Tanić, N., Ruždijić, S., i Pešić, M. (2011) The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomed Pharmacother*. 65, 345-353.

- Podolski-Renić, A., Jadranin, M., Stanković, T., Banković, J., Stojković, S., Chiourea, M., Aljančić, I., Vajs, V., Tešević, V., Ruždijić, S., Gagos, S., Tanić, N., i Pešić, M. (2013) Molecular and cytogenetic changes in multi-drug resistant cancer cells and their influence on new compounds testing. *Cancer Chemother Pharmacol.* 72, 683-697.
- Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., i Rich, J. N. (2020) Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends Cancer.* 6, 223-235.
- Radi, M., Evensen, L., Dreassi, E., Zamperini, C., Caporicci, M., Falchi, F., Musumeci, F., Schenone, S., Lorens, J. B., i Botta, M. (2012) A combined targeted/phenotypic approach for the identification of new antiangiogenics agents active on a zebrafish model: from in silico screening to cyclodextrin formulation. *Bioorg Med Chem Lett.* 22, 5579-5583.
- Radi, M., Tintori, C., Musumeci, F., Brullo, C., Zamperini, C., Dreassi, E., Fallacara, A. L., Vignaroli, G., Crespan, E., Zanolì, S., Laurenzana, I., Filippi, I., Maga, G., Schenone, S., Angelucci, A., i Botta, M. (2013) Design, synthesis, and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines active in vivo on the Bcr-Abl T315I mutant. *J Med Chem.* 56, 5382-5394.
- Rajaratnam, V., Islam, M. M., Yang, M., Slaby, R., Martinez Ramirez, H., i Mirza, S. P. (2020) Glioblastoma: Pathogenesis and Current Status of Chemotherapy and Other Novel Treatments. *Cancers (Basel).* 12, 937.
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., i Savolainen, J. (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discov.* 7, 255-270.
- Rebuzzi, S. E., Pesola, G., Martelli, V., i Sobrero, A. F. (2020) Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Cancers (Basel).* 12, 2584.
- Rivera-Torres, J., i San José, E. (2019) Src Tyrosine Kinase Inhibitors: New Perspectives on Their Immune, Antiviral, and Senotherapeutic Potential. *Front Pharmacol.* 10, 1011.
- Rosenzweig, S. A. (2018) Acquired Resistance to Drugs Targeting Tyrosine Kinases. *Adv Cancer Res.* 138, 71-98.
- Roskoski, R., Jr. (2019) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res.* 144, 19-50.
- Roskoski, R., Jr. (2020) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res.* 152, 104609.
- Roskoski, R., Jr. (2021) Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol Res.* 165, 105463.
- Røslund, G. V., i Engelsen, A. S. (2015) Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 116, 9-18.
- Rossari, F., Minutolo, F., i Orciuolo, E. (2018) Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J Hematol Oncol.* 11, 84.

- Rossi, A., Schenone, S., Angelucci, A., Cozzi, M., Caracciolo, V., Pentimalli, F., Puca, A., Pucci, B., La Montagna, R., Bologna, M., Botta, M., i Giordano, A. (2010) New pyrazolo-[3,4-d]-pyrimidine derivative Src kinase inhibitors lead to cell cycle arrest and tumor growth reduction of human medulloblastoma cells. *Faseb j.* 24, 2881-2892.
- Rutkowska, A., Stoczyńska-Fidelus, E., Janik, K., Włodarczyk, A., i Rieske, P. (2019) EGFR(vIII): An Oncogene with Ambiguous Role. *J Oncol.* 2019, 1092587.
- Schenone, S., Radi, M., Musumeci, F., Brullo, C., i Botta, M. (2014) Biologically driven synthesis of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as protein kinase inhibitors: an old scaffold as a new tool for medicinal chemistry and chemical biology studies. *Chem Rev.* 114, 7189-7238.
- Schiff, D., i Sarkaria, J. (2015) Dasatinib in recurrent glioblastoma: failure as a teacher. *Neuro Oncol.* 17, 910-911.
- Schiffer, D., Annovazzi, L., Casalone, C., i Corona, C. (2018) Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers (Basel).* 11, 5.
- Seano, G. (2018) Targeting the perivascular niche in brain tumors. *Curr Opin Oncol.* 30, 54-60.
- Sen, B., i Johnson, F. M. (2011) Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct.* 2011, 865819.
- Shannon, K. M. (2002) Resistance in the land of molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2, 99-102.
- Shay, J. W. (2016) Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov.* 6, 584-593.
- Shekhawat, P. B., i Pokharkar, V. B. (2017) Understanding peroral absorption: regulatory aspects and contemporary approaches to tackling solubility and permeability hurdles. *Acta Pharm Sin B.* 7, 260-280.
- Shukla, S., Chen, Z. S., i Ambudkar, S. V. (2012) Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updat.* 15, 70-80.
- Shukla, S., Robey, R. W., Bates, S. E., i Ambudkar, S. V. (2009) Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab Dispos.* 37, 359-365.
- Shuman Moss, L. A., Jensen-Taubman, S., i Stetler-Stevenson, W. G. (2012) Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J Pathol.* 181, 1895-1899.
- Sigismund, S., Avanzato, D., i Lanzetti, L. (2018) Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol.* 12, 3-20.
- Sirvent, A., Mevizou, R., Naim, D., Lafitte, M., i Roche, S. (2020) Src Family Tyrosine Kinases in Intestinal Homeostasis, Regeneration and Tumorigenesis. *Cancers (Basel).* 12, 2014.

- Sirvent, A., Urbach, S., i Roche, S. (2015) Contribution of phosphoproteomics in understanding SRC signaling in normal and tumor cells. *Proteomics*. 15, 232-244.
- Smolinski, M. P., Bu, Y., Clements, J., Gelman, I. H., Hegab, T., Cutler, D. L., Fang, J. W. S., Fetterly, G., Kwan, R., Barnett, A., Lau, J. Y. N., i Hangauer, D. G. (2018) Discovery of Novel Dual Mechanism of Action Src Signaling and Tubulin Polymerization Inhibitors (KX2-391 and KX2-361). *J Med Chem*. 61, 4704-4719.
- Song, Z. C., Ding, L., Ren, Z. Y., Sun, X. S., Yang, Q., Wang, L., Feng, M. J., Liu, C. L., i Wang, J. T. (2017) [Effects of Src on cervical cancer cells proliferation and apoptosis through ERK signal transduction pathway]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 38, 1246-1251.
- Spreatico, A., Schenone, S., Serchi, T., Orlandini, M., Angelucci, A., Magrini, D., Bernardini, G., Collodel, G., Di Stefano, A., Tintori, C., Bologna, M., Manetti, F., Botta, M., i Santucci, A. (2008) Antiproliferative and proapoptotic activities of new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivative Src kinase inhibitors in human osteosarcoma cells. *Faseb j*. 22, 1560-1571.
- Stanković, T., Randelović, T., Dragoj, M., Stojković Burić, S., Fernández, L., Ochoa, I., Pérez-García, V. M., i Pešić, M. (2021) In vitro biomimetic models for glioblastoma-a promising tool for drug response studies. *Drug Resist Updat*. 55, 100753.
- Stark, A. M., Doukas, A., Hugo, H. H., Hedderich, J., Hattermann, K., Maximilian Mehdorn, H., i Held-Feindt, J. (2015) Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. *Neurol Res*. 37, 95-105.
- Stojkovic, S., Podolski-Renic, A., Dinic, J., Pavkovic, Z., Ayuso, J. M., Fernandez, L. J., Ochoa, I., Perez-Garcia, V. M., Pesic, V., i Pesic, M. (2016) Resistance to DNA Damaging Agents Produced Invasive Phenotype of Rat Glioma Cells-Characterization of a New in Vivo Model. *Molecules*. 21, 843.
- Strobel, H., Baisch, T., Fitzel, R., Schilberg, K., Siegelin, M. D., Karpel-Massler, G., i Debatin, K. M. (2019) Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines*. 7, 69.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., i Mirimanoff, R. O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 352, 987-996.
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., i Kshitiz. (2019) Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*. 9, 109-127.
- Sun, S. Y. (2021) mTOR-targeted cancer therapy: great target but disappointing clinical outcomes, why? *Front Med*. 15, 221-231.
- Suvà, M. L., i Tirosh, I. (2020) The Glioma Stem Cell Model in the Era of Single-Cell Genomics. *Cancer Cell*. 37, 630-636.

- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., i Zlokovic, B. V. (2019) Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev.* 99, 21-78.
- Taylor, J. W., Dietrich, J., Gerstner, E. R., Norden, A. D., Rinne, M. L., Cahill, D. P., Stemmer-Rachamimov, A., Wen, P. Y., Betensky, R. A., Giorgio, D. H., Snodgrass, K., Randall, A. E., Batchelor, T. T., i Chi, A. S. (2015) Phase 2 study of bosutinib, a Src inhibitor, in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol.* 121, 557-563.
- Taylor, J. W., Parikh, M., Phillips, J. J., James, C. D., Molinaro, A. M., Butowski, N. A., Clarke, J. L., Oberheim-Bush, N. A., Chang, S. M., Berger, M. S., i Prados, M. (2018) Phase-2 trial of palbociclib in adult patients with recurrent RB1-positive glioblastoma. *J Neurooncol.* 140, 477-483.
- Teng, Y., Xie, X., Walker, S., White, D. T., Mumm, J. S., i Cowell, J. K. (2013) Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer.* 13, 453.
- Thandapani, P. (2019) Super-enhancers in cancer. *Pharmacol Ther.* 199, 129-138.
- Thorne, A. H., Zanca, C., i Furnari, F. (2016) Epidermal growth factor receptor targeting and challenges in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 18, 914-918.
- Tintori, C., Fallacara, A. L., Radi, M., Zamperini, C., Dreassi, E., Crespan, E., Maga, G., Schenone, S., Musumeci, F., Brullo, C., Richters, A., Gasparrini, F., Angelucci, A., Festuccia, C., Delle Monache, S., Rauh, D., i Botta, M. (2015) Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma. *J Med Chem.* 58, 347-361.
- Tiwari, A. K., Sodani, K., Dai, C. L., Abuznait, A. H., Singh, S., Xiao, Z. J., Patel, A., Talele, T. T., Fu, L., Kaddoumi, A., Gallo, J. M., i Chen, Z. S. (2013) Nilotinib potentiates anticancer drug sensitivity in murine ABCB1-, ABCG2-, and ABCC10-multidrug resistance xenograft models. *Cancer Lett.* 328, 307-317.
- Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., i Ligon, K. L. (2017) Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann Oncol.* 28, 1457-1472.
- Trenker, R., i Jura, N. (2020) Receptor tyrosine kinase activation: From the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol.* 63, 174-185.
- Uhm, J. H., Dooley, N. P., Villemure, J. G., i Yong, V. W. (1997) Mechanisms of glioma invasion: role of matrix-metalloproteinases. *Can J Neurol Sci.* 24, 3-15.
- Uribe, D., Torres, A., Rocha, J. D., Niechi, I., Oyarzun, C., Sobrevia, L., San Martin, R., i Quezada, C. (2017) Multidrug resistance in glioblastoma stem-like cells: Role of the hypoxic microenvironment and adenosine signaling. *Mol Aspects Med.* 55, 140-151.
- Venkataramani, V., Tanev, D. I., Strahle, C., Studier-Fischer, A., Fankhauser, L., Kessler, T., Körber, C., Kardorff, M., Ratliff, M., Xie, R., Horstmann, H., Messer, M., Paik, S. P., Knabbe, J., Sahm, F., Kurz, F. T., Acikgöz, A. A., Herrmannsdörfer, F., Agarwal, A., Bergles, D. E., Chalmers, A., Miletic, H., Turcan, S., Mawrin, C., Hänggi, D., Liu, H. K., Wick, W., Winkler,

- F., i Kuner, T. (2019) Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*. *573*, 532-538.
- Vignaroli, G., Iovenitti, G., Zamperini, C., Coniglio, F., Calandro, P., Molinari, A., Fallacara, A. L., Sartucci, A., Calgani, A., Colecchia, D., Mancini, A., Festuccia, C., i Dreassi, E. (2017) Prodrugs of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: From Library Synthesis to Evaluation as Potential Anticancer Agents in an Orthotopic Glioblastoma Model. *60*, 6305-6320.
- Vignaroli, G., Zamperini, C., Dreassi, E., Radi, M., Angelucci, A., Sanità, P., Crespan, E., Kissova, M., Maga, G., Schenone, S., Musumeci, F., i Botta, M. (2013) Pyrazolo[3,4-d]pyrimidine Prodrugs: Strategic Optimization of the Aqueous Solubility of Dual Src/Abl Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. *4*, 622-626.
- Vogel, T. W., Zhuang, Z., Li, J., Okamoto, H., Furuta, M., Lee, Y. S., Zeng, W., Oldfield, E. H., Vortmeyer, A. O., i Weil, R. J. (2005) Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. *11*, 3624-3632.
- Voigtlaender, M., Schneider-Merck, T., i Trepel, M. (2018) Lapatinib. *Recent Results Cancer Res*. *211*, 19-44.
- Voisset, E., Brenet, F., Lopez, S., i de Sepulveda, P. (2020) SRC-Family Kinases in Acute Myeloid Leukaemia and Mastocytosis. *12*.
- Vollmann-Zwerenz, A., Leidgens, V., Feliciello, G., Klein, C. A., i Hau, P. (2020) Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *21*.
- Wang, H., i Mao, X. (2020) Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Des Devel Ther*. *14*, 2423-2433.
- Wheeler, D. L., Iida, M., i Dunn, E. F. (2009) The role of Src in solid tumors. *Oncologist*. *14*, 667-678.
- White, K., Connor, K., Clerkin, J., Murphy, B. M., Salvucci, M., O'Farrell, A. C., Rehm, M., O'Brien, D., Prehn, J. H. M., Niclou, S. P., Lamfers, M. L. M., Verreault, M., Idhah, A., Verhaak, R., Golebiewska, A., i Byrne, A. T. (2020) New hints towards a precision medicine strategy for IDH wild-type glioblastoma. *Ann Oncol*. *31*, 1679-1692.
- Winer, A., Adams, S., i Mignatti, P. (2018) Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures Into Future Successes. *Mol Cancer Ther*. *17*, 1147-1155.
- Wu, P., Nielsen, T. E., i Clausen, M. H. (2015) FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. *36*, 422-439.
- Wu, S., i Fu, L. (2018) Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. *Mol Cancer*. *17*, 25.
- Xiao, Z. Z., Wang, Z. F., Lan, T., Huang, W. H., Zhao, Y. H., Ma, C., i Li, Z. Q. (2020) Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Neurol*. *11*, 1036.

- Xuhong, J. C., Qi, X. W., Zhang, Y., i Jiang, J. (2019) Mechanism, safety and efficacy of three tyrosine kinase inhibitors lapatinib, neratinib and pyrotinib in HER2-positive breast cancer. *Am J Cancer Res.* 9, 2103-2119.
- Yang, X., Cui, W., Yu, S., Xu, C., Chen, G., Gu, A., Li, T., Cui, Y., Zhang, X., i Bian, X. (2014) A synthetic dl-nordihydroguaiaretic acid (Nordy), inhibits angiogenesis, invasion and proliferation of glioma stem cells within a zebrafish xenotransplantation model. *PLoS One.* 9, e85759.
- Yang, X., i Han, L. (2019) Roles of Renal Drug Transporter in Drug Disposition and Renal Toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 1141, 341-360.
- Yang, X. J., Cui, W., Gu, A., Xu, C., Yu, S. C., Li, T. T., Cui, Y. H., Zhang, X., i Bian, X. W. (2013) A novel zebrafish xenotransplantation model for study of glioma stem cell invasion. *PLoS One.* 8, e61801.
- Ye, Q., Cai, W., Zheng, Y., Evers, B. M., i She, Q. B. (2014) ERK and AKT signaling cooperate to translationally regulate survivin expression for metastatic progression of colorectal cancer. *Oncogene.* 33, 1828-1839.
- Yoganantharajah, P., i Gibert, Y. (2017) The Use of the Zebrafish Model to Aid in Drug Discovery and Target Validation. *Curr Top Med Chem.* 17, 2041-2055.
- Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Savelieva, O. E., Kaigorodova, E. V., Krakhmal, N. V., i Perelmuter, V. M. (2019) Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry (Mosc).* 84, 762-772.
- Zawilska, J. B., Wojcieszak, J., i Olejniczak, A. B. (2013) Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacol Rep.* 65, 1-14.
- Zeeshan, R., i Mutahir, Z. (2017) Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci.* 17, 172-182.
- Zhang, D., Jing, Z., Qiu, B., Wu, A., i Wang, Y. (2011) Temozolomide decreases invasion of glioma stem cells by down-regulating TGF- β 2. *Oncol Rep.* 26, 901-908.
- Zhang, G. N., Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Barbuti, A. M., Zhu, X. J., Yu, X. Y., Wen, A. W., Wurlpel, J. N. D., i Chen, Z. S. (2017) Modulating the function of ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) with inhibitor cabozantinib. *Pharmacol Res.* 119, 89-98.
- Zhang, H., Kathawala, R. J., Wang, Y. J., Zhang, Y. K., Patel, A., Shukla, S., Robey, R. W., Talele, T. T., Ashby, C. R., Jr., Ambudkar, S. V., Bates, S. E., Fu, L. W., i Chen, Z. S. (2014) Linsitinib (OSI-906) antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2 and subfamily C member 10-mediated drug resistance. *Int J Biochem Cell Biol.* 51, 111-119.
- Zhao, E. Y., Jones, M., i Jones, S. J. M. (2019) Whole-Genome Sequencing in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 9.

- Zhao, H., Huang, Y., Shi, J., Dai, Y., Wu, L., i Zhou, H. (2018) ABCC10 Plays a Significant Role in the Transport of Gefitinib and Contributes to Acquired Resistance to Gefitinib in NSCLC. *Front Pharmacol.* 9, 1312.
- Zhao, X. Q., Xie, J. D., Chen, X. G., Sim, H. M., Zhang, X., Liang, Y. J., Singh, S., Talele, T. T., Sun, Y., Ambudkar, S. V., Chen, Z. S., i Fu, L. W. (2012) Neratinib reverses ATP-binding cassette B1-mediated chemotherapeutic drug resistance in vitro, in vivo, and ex vivo. *Mol Pharmacol.* 82, 47-58.
- Zheng, L. S., Wang, F., Li, Y. H., Zhang, X., Chen, L. M., Liang, Y. J., Dai, C. L., Yan, Y. Y., Tao, L. Y., Mi, Y. J., Yang, A. K., To, K. K., i Fu, L. W. (2009) Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. *PLoS One.* 4, e5172.

BIOGRAFIJA

Marija Nešović (rođ. Stepanović) je rođena 22.10.1987. godine u Beogradu, gde je završila VI beogradsku gimnaziju. Osnovne studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2007. godine, dok je master studije na istom fakultetu, na modulu Genetičko inženjerstvo i biotehnologija upisala 2011. i završila 2013. godine.

Doktorske studije je upisala 2014. godine na smeru Biologija (modul Eksperimentalna neurobiologija) na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, zaposlena je od 2016. godine kao istraživač pripravnik, a od 2019. godine kao istraživač saradnik. Eksperimentalni deo doktorske disertacije Marije Nešović urađen je u Laboratoriji za molekularnu neuro-onkologiju, Odeljenja za neurobiologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, u okviru naučno-istraživačkog projekta III41031, Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj.

Marija Nešović je autor jednog, a koautor još 4 naučna rada objavljenih u časopisima međunarodnog značaja. U svom dosadašnjem radu Marija Nešović je učestvovala sa 16 kongresnih saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Д. Нешовић

број индекса Б3052/2014

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Д. Нешовић

Број индекса Б3052/2014

Студијски програм Биологија/Експериментална неуробиологија

Наслов рада Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома

Ментор Проф. др Надежда Недељковић и др Јелена Динић

Потписани/а Марија Д. Нешовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Улога инхибитора Src тирозин-киназе у превазилажењу урођено резистентног и инвазивног фенотипа глиобластома

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.