

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Julijana M. Radović

ISPITIVANJE UTICAJA ALOE EMODINA NA  
ĆELIJE MELANOMA B16 I A375 I NJIHOVU  
OSETLJIVOST NA CITOSTATIKE I  
IMUNSKI ODGOVOR

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Julijana M. Radovic

EVALUATION OF ALOE EMODIN EFFECT  
ON B16 AND A375 MELANOMA CELLS  
AND THEIR SENSITIVITY TO  
ANTICANCER DRUGS AND IMMUNE  
RESPONSE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

## MENTORI

dr Danijela Maksimović Ivanić, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Milena Kataranovski, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## KOMISIJA

dr Danijela Maksimović Ivanić, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Milena Kataranovski, redovni profesor,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Sanja Mijatović, viši naučni saradnik,  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Stanislava Stošić-Grujičić, naučni savetnik,  
Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković”,  
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Božić, vanredni profesor,  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta “Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br.173013) finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Dr Danijeli Maksimović Ivanić dugujem veliku zahvalnost za pomoć koju mi je pružila u pravljenju prvih koraka na naučno-istraživačkom putu i sa beskrajnim strpljenjem vodila kroz faze koje su prethodile izradi ove disertacije.

Dr Sanji Mijatović dugujem posebnu zahvalnost na podršci, razumevanju, nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, na tome što me je naučila da pitam, da mislim, da razumem...

Zahvaljujem se koleginicama Mariji Mojić i Gordani Timotijević na pomoći koju su mi pružile u izvođenju eksperimenata.

Zahvaljujem se dr Mileni Kataranovski na korisnim savetima pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Stanislavi Stošić-Grujičić koja je omogućila izvođenje eksperimentalnog dela disertacije i čiji su saveti prilikom pisanja značajno pomogli.

Dr Biljani Božić se zahvaljujem na sugestijama i oceni ovog rada.

*Posebno se zahvaljujem mojoj porodici na beskonačnom razumevanju, mome suprugu na bezgraničnoj podršci i mojim devojkicama na inspiraciji koja me vodi.*

## **Ispitivanje uticaja aloe emodina na ćelije melanoma B16 i A375 i njihovu osetljivost na citostatike i imunski odgovor**

### **SAŽETAK**

Aloe emodin (AE) spada u biljne molekule antraciklinskog tipa koji zahvaljujući reaktivnim grupama na atomima ugljenika benzenovih prstenova pokazuje izrazitu reaktivnost i posledično široki spektar biološke aktivnosti poput baktericidnog, fungicidnog, viricidnog, imunosupresivnog, antiinflamatornog, hepatoprotektivnog, laksativnog i vazorelaksirajućeg delovanja. Istraživanja novijeg datuma stavljaju u žižu interesovanja njegova antitumorska dejstva.

Ciljevi koji su postavljeni u ovoj tezi podrazumevali su utvrđivanje tumoricidnog delovanja AE-a na ćelije mišjeg, B16 i humanog, A375 melanoma koje se inicijalno razlikuju u redoks statusu i aktivnosti signalnih puteva uključenih u kancerogenezu. Uz uporednu analizu unutarćelijskog odgovora pomenutih linija na tretman AE-om, ispitivan je i uticaja AE-a na osetljivost melanoma na imunski odgovor usmeren protiv transformisane ćelije kao i na efikasnost konvencionalne citostatske terapije.

AE je snažno inhibirao rast obe ćelijske linije posredstvom različitih mehanizama. U slučaju A375 ćelija, AE je doveo do indukcije apoptoze zavisne od aktivnosti kaspaza uz smanjenje nivoa antiapoptotskih proteina XIAP i Bcl-2. Suprotno, tretman AE-om je indukovao ireverzibilnu diferencijaciju B16 ćelija u smeru primarnog fenotipa manifestovanog povećanom ekspresijom enzima tirozinaze i naknadnom produkcijom melanina. Opisana promena B16 ćelija bila je praćena brzom akumulacijom p53, ciklina D1 i D3. Ključni događaj u diferencijaciji B16 ćelija je, najverovatnije, povećana produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukovana AE-om. U osnovi heterogenih ishoda tretmana istovetnim agensom je recipročna regulacija aktivnosti ERK1/2 i Akt. Poseban značaj ima podatak da se apoptoza pokrenuta AE-om u A375 ćelijama odvija u uslovima prekomerne aktivnosti Akt. Analiza paralelnog tretmana ćelija melanoma AE-om i konvencionalnim citostaticima (doksorubicin i paklitaksel) pokazala je da pomenuta supstanca umanjuje efikasnost hemioterapije. Nekonzistentnost ishoda ko-tretmana AE-a i medijatora imunskog odgovora

iz familije TNF molekula ukazala je na kompleksnost uticaja mikrosredine na učinak AE-a. U celini, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju kako specifičnost ćelija melanoma definiše mehanizam delovanja AE-a iako ne ugrožava njegov antitumorski potencijal. S druge strane, opisani rezultati upozoravaju na opasnost kombinovanja biljnih preparata sa konvencionalnim terapeutima usled mogućeg neutrališućeg efekta.

Ključne reči: Aloe emodin, melanom, ERK1/2, Akt, apoptoza, diferencijacija

Naučna oblast: Biologija tumora

Uža naučna oblast: Imunoonkologija

UDK broj: 616-006.81 (043.3)

**Evaluation of aloe emodin effect on B16 and A375 melanoma cells and their sensitivity to anticancer drugs and immune response**

ABSTRACT

Aloe emodin is an herbal anthraquinone that, due to reactive groups on the carbon atoms of benzene rings, possesses a strong reactivity and consequently shows a wide range of biological activities such as antibacterial, antifungal, antiviral, diuretic, immunosuppressive, anti-inflammatory, hepatoprotective, laxative and vasorelaxant. Recent studies put the focus on its antitumor effects. The aim of this thesis was to determine and evaluate antitumor activity of AE on two melanoma cell lines that initially differs in redox status and activities of signaling pathways involved in carcinogenesis: mouse melanoma B16, and human melanoma A375 cells. Together with comparative analysis of the intracellular responses of two lines to the AE treatment, the impact of AE on the sensitivity of melanoma to antitumor immune response as well as the efficiency of conventional cytostatic therapy, were examined.

AE decreased the growth of both cell lines through different mechanisms. In the case of A375 cells, AE induced caspase dependent apoptosis by reducing protein levels of antiapoptotic molecules XIAP and Bcl-2. In contrast, treatment with AE promoted irreversible differentiation of B16 cells towards its primary phenotype manifested through increased expression of the tyrosinase and the subsequent production of melanin. Described change in B16 cells was accompanied by a rapid accumulation of p53, cyclin D1 and D3. Increased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> triggered by AE is probably first in a line of events responsible for induction of differentiation of B16 cells. Opposite regulation of two main signaling pathways involved in cell proliferation, differentiation and death- MEK-ERK1/2 and PI3K-Akt in tested cell lines could be essential for different outcome of the treatment with single agent. Furthermore, analysis of the parallel treatment of melanoma cells with the AE and conventional cytostatics (doxorubicin and paclitaxel) showed that introduced substance decreases the effectiveness of chemotherapy. Incoherent outcome of co-treatment of AE and TNF, FasL or TRAIL, the most relevant mediators of nonspecific immune response against tumor cells, points to the complexity of the influence of microenvironmental factors to the effect of AE. In general, the results of this PhD thesis show that cell specificity of melanomas defines the mechanism of AE action, while it does not jeopardize its anticancer potential. On the other hand, presented results point to a danger of combining herbal medicines with conventional therapeutics due to their possible neutralizing effects.

**Key words:** Aloe emodin, melanoma, ERK1/2, Akt, apoptosis, differentiation

Area of research: Tumor biology

Area of special interest: Immunooncology

UDC number: 616-006.81 (043.3)

# *SADRŽAJ*



<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Kancer .....	1
1.2. Terapija kancera.....	5
1.3. Melanom i aktuelna terapija melanoma .....	7
1.4. Fitoterapija .....	13
1.5. Aloe emodin .....	15
<b>2. Ciljevi istraživanja</b> .....	21
<b>3. Materijal i metode</b> .....	22
3.1. Regensi i rastvori .....	22
3.1.1. Reagensi .....	22
3.1.2. Rastvori .....	24
3.2. Čelijske linije .....	24
3.2.1. Čelijske linije mišjeg melanoma B16 i humanog melanoma A375.....	24
3.3. Primjenjene metode .....	25
3.3.1. Tripsinizacija .....	25
3.3.2. Određivanje broja živih ćelija .....	26
3.3.3. Priprema ćelija za eksperimente .....	26
3.3.4. MTT test .....	27
3.3.5. Kolorimetrijski test kristal violetom .....	27
3.3.6. Detekcija nekroze testom oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH).....	28
3.3.7. Detekcija autofagije bojenjem ćelija akridin oranžom .....	28
3.3.8. Detekcija rane apoptoze dvostrukim bojenjem aneksin- propidijum jodidom.....	29
3.3.9. Detekcija apoptoze bojenjem propidijum jodidom .....	29
3.3.10. TUNEL test .....	30

3.3.11. Detekcija nivoa proliferacije ćelija .....	30
3.3.12. Analiza ćelijskog ciklusa .....	31
3.3.13. Western blot .....	32
3.3.14. Detekcija aktivnosti kaspaza .....	32
3.3.15. Bojenje ćelija Majerovim hematoksilinom .....	33
3.3.16. Analiza aktivnosti tirozinaze i količine melanina kod B16 ćelija .....	33
3.3.17. <i>In vivo</i> primena B16 ćelija .....	34
3.3.18. Analiza unutarćelijske produkcije H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kod B16 ćelija .....	34
3.3.19. Analiza izobologramom .....	35
3.4. Statistička obrada podataka .....	35
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>36</b>
4.1. Direktni efekti Aloe emodina na B16 i A375 ćelije .....	36
4.1.1. Aloe emodin inhibira rast B16 i A375 ćelija .....	36
4.1.2. Aloe emodin indukuje apoptozu A375 ali ne i B16 ćelija .....	38
4.1.3. Aloe emodin ne dovodi do nekroze ćelija melanoma .....	41
4.1.4. Aloe emodin ne indukuje autofagiju ćelija melanoma .....	42
4.1.5. Aloe emodin indukuje zastoj ćelija melanoma u G2/M fazi ćelijskog ciklusa .....	43
4.1.6. Aloe emodin indukuje transformaciju B16 ćelija praćenu gubitkom proliferativnih svojstava.....	45
4.1.6.1. Aloe emodin inhibira proliferaciju B16 ćelija.....	45
4.1.6.2. Aloe emodin indukuje diferencijaciju B16 ćelija .....	46
4.1.6.3. Aloe emodin indukuje permanentne promene B16 ćelija .....	48
4.1.7. Unuterćelijski odgovor ćelija melanoma na tretman Aloe emodinom .....	49
4.1.7.1. Aloe emodin utiče na MAPK signalni put .....	49
4.1.7.2. Aloe emodin deluje na PI3K signalni put .....	50
4.1.7.3. Aloe emodin pozitivno reguliše ekspresiju molekula relevantnih za proces diferencijacije B16 ćelija .....	52

4.1.7.4. Aloe emodin utiče na ekspresiju molekula relevantnih za indukciju apoptoze A375 ćelija .....	55
4.2. Indirektni efekti Aloe emodin na B16 i A375 ćelije .....	58
4.2.1. Aloe emodin neutrališe aktivnost citostatika .....	58
4.2.2. Aloe emodin utiče na imunski odgovor na melanom .....	60
<b>5. Diskusija</b> .....	<b>62</b>
<b>6. Zaključci</b> .....	<b>76</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>77</b>

## *1. UVOD*

## 1.1 Kancer

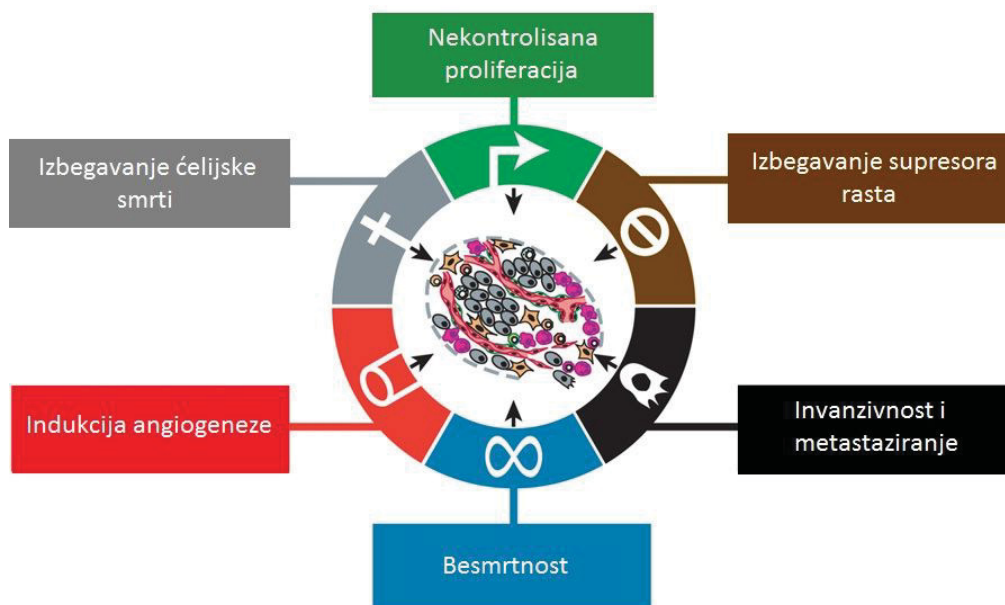
Tumorigeneza je višestepeni proces koji podrazumeva sukcesivnu akumulaciju genetskih promena u ćelijama. Danas je opšte prihvaćena hipoteza o genetskoj nestabilnosti kao endogenom mehanizmu nagomilavanja mutacija (Li i sar., 2009). Nepravilnosti u procesima koji održavaju integritet genoma, kakvi su replikacija, popravka grešaka u DNK molekulu, zastoje u S fazi ćelijskog ciklusa, ali i postojanje faktora koji doprinose nestabilnosti, kao što su osetljiva mesta u hromozomu i sekvence DNK sa visokim nivoom transkripcije, uslovljavaju pojavu mutacija (Aguilera i Gómez-González, 2008). Nastale promene u genomu, od tačkastih mutacija do velikih hromozomskih rearanžmana, imaju za posledicu aktivaciju onkogenata, inaktivaciju tumor supresor gena ili nove izmene u genima stabilnosti genoma. Progresija tumora, preko preneoplazije do jasnog maligniteta, rezultat je ekspanzije klonova ćelija koje su, navedenim genetskim promenama, selektovane za sve veći proliferativni potencijal (Coleman i Tsongalis, 2006; Bertram, 2000; Weinberg, 1989).

Transformisane ćelije odlikuju određene karakteristike koje ne pronalazimo kod normalnih ćelija (Hanahan i Weinberg, 2000):

- **nekontrolisana proliferacija**, pri čemu se ćelije kancera ne dele brže od normalnih ćelija, već njihovu proliferaciju ne kontrolišu postojeći regulatorni procesi. Tako, autokrinom proizvodnjom faktora rasta, povećanjem nivoa njihovih membranskih receptora ili konstitutivnom aktivacijom nekog od nishodnih elemenata signalnog puta koji promoviše rast, tumorska ćelija postiže neprekidnu proliferaciju. S druge strane, inaktivacijom tumor-supresor proteina uključenih u kontrolu rasta (Rb, p53) ali i gubitkom mehanizama kontaktne inhibicije, tumor izbegava programe koji negativno regulišu ćelijsku proliferaciju (Hanahan i Weinberg, 2011; Rang i sar., 2005; Varagić i sar., 2004).
- **razvoj strategija za izbegavanje ćelijske smrti**. Noviji podaci pokazuju da autofagija uglavnom deluje citoprotektivno na tumorsku ćeliju (White i Di Paola,

2009), dok regrutacija inflamatornih ćelija tokom nekroze može dovesti do neoangiogeneze, proliferacije tumorskih ćelija i invazije okolnog tkiva (Grivennikov i sar., 2010). S druge strane, da bi izbegao apoptozu ili smanjio njen nivo, tumor je razvio mehanizme kakvi su gubitak funkcije p53 proteina, povećanje ekspresije antiapoptotskih molekula ali i smanjenje ekspresije molekula koji promovišu apoptozu (Hanahan i Weinberg, 2011).

- **besmrtnost** - sposobnost tumorske ćelije da konstantno prolifериše bez ulaska u stanje mirovanja ili krizno stanje koje vodi u smrt. Ova osobina se pripisuje aktivnosti telomeraze, enzima koji dodaje protektivne, telomerne nastavke na krajeve DNK, a koji je, za razliku od normalnih ćelija gde je skoro odsutan, prekomerno eksprimiran kod tumora (Blasco, 2005).
- **indukcija angiogeneze**. Tokom progresije tumora, kako bi se ispunile potrebe neoplastičnog tkiva za kiseonikom i hranljivim materijama, dolazi do aktivacije procesa angiogeneze. Mehanizmima kao što su povećanje ekspresije faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) i smanjenje ekspresije trombospondina-1 (TSP-1), tumor indukuje stalno stvaranje novih krvnih sudova koji prate njegov rast (Ferrara, 2009; Hanahan i Folkman, 1996).
- **Invanzivnost** - aktivacijom određenih gena, nedostupnih ćeliji pre maligne transformacije, tumorske ćelije stiču osobine koje im omogućuju naseljavanje okolnih tkiva. Tako sintezom i oslobađanjem matriksnih metaloproteinaza razaraju se komponente ekstraćelijskog matriksa što tumorskim ćelijama olakšava kretanje preko tkivnih barijera (Hua i sar., 2011);
- **metastaziranje** - odvajanjem jedne ili grupe ćelija i njihovim transportom putem krvi ili limfe, maligne ćelije dospevaju u različite delove organizma gde kreiraju sekundarne tumore koji predstavljaju najveći problem u terapiji kancera (Liotta i Stetler-Stevenson, 1991; Rang i sar., 2005).



Slika 1. Obeležja kancera (Preuzeto od Hanahan i Weinberg, 2011)

Osim prethodno opisanih karakteristika tumorske ćelije (slika 1), Hanahan i Weinberg sugerišu postojanje još dve osobine koje se kroz literaturu u poslednjoj deceniji nameću kao jednako važne (Hanahan i Weinberg, 2011). Tako je opisana sposobnost tumorske ćelije da reprogramira svoj energetski metabolizam, kako bi se ispratila potreba za brzom proizvodnjom energije koju nameće stalna proliferacija. Metabolizam glukoze, umesto oksidativne fosforilacije piruvata dobijenog glikolizom u ugljen dioksid, kod tumorske ćelije podrazumeva samo glikolizu. Smanjena proizvodnja ATP-a (adenozin tri fosfata) u odnosu na onu dobijenu u mitohondrijama, kompenzuje se povećanjem broja glukoznih transportera u membrani i posledičnim povećanjem unosa glukoze u ćeliju. Kao poslednju zajedničku karakteristiku tumorskih ćelija, Hanahan i Weinberg predlažu njihovu, u velikom broju radova dokumentovanu (Teng i sar., 2008; Kim i sar., 2007; Schuster i sar., 2006), sposobnost izbegavanja imunskog odgovora (Hanahan i Weinberg, 2011). Naime, iako postoje mehanizmi kojima imunski sistem odgovara na prisustvo transformisanih ćelija, ne retki su slučajevi u kojima se specifični imunski odgovor pokazao potpuno irelevantnim (Ciampricotti i sar, 2010). Tumorski imunitet se pre svega odnosi na

citotoksičnu aktivnost CD8<sup>+</sup> T limfocita koji prepoznaju antigen poreklom iz tumorske ćelije prezentovan u okviru MHC molekula klase I. Aktivnost CD4<sup>+</sup> limfocita putem produkcije citokina ili pružanjem odgovarajućeg kostimulatornog signala važna je za uspešno pokretanje efekorskog imunskog odgovora na tumor posredovanog CD8 T limfocitima adekvatne specifičnosti. Antitela, aktivacijom komplementa ili posredstvom NK ćelija ili makrofaga koji nose Fc receptor, doprinose odbrani od tumora, dok je odgovor NK ćelija usmeren na tumore koji neeksprimiraju ili u manjoj meri ekspimiraju MHC molekule klase I. Sa druge strane, konstantna proliferacija tumora uslovljava visok stepen mutacija koje, ukoliko ćeliji daju prednost u rastu, ostaju fiksirane u genomu transformisane ćelije. Osobine, na ovaj način selektovane, između ostalog osposobljavaju tumor u pokušaju da izbegne imunski odgovor. Tako, smanjenjem ekspresije MHC molekula klase I, maskiranjem ili čak gubljenjem antigena specifičnih za tumor, smanjenjem produkcije kostimulatora i MHC molekula klase II, tumor postaje manje uočljiv imunskom sistemu, dok proizvodnjom supresora imunskog odgovora kakav je TGF- $\beta$ , tumor inhibira proliferaciju i efekorsku funkciju limfocita i makrofaga (Abbas i sar., 2012). I konačno, maligna ćelija je sposobna da, direktnim kontaktom ili putem medijatora, funkcionalno onesposobi efektorske ćelije ili indukuje njihovu smrt (Topfer 2011). U osnovi "besmrtnog" fenotipa ćelija kancera najčešće jeste rezistencija na apoptozu uspostavljena na unutarćelijskom nivou (Kelly i Strasser, 2011). Ovakva ćelija neće adekvatno odgovoriti na signale smrti u okruženju tako da će čak i jedan snažan imunski odgovor biti onemogućen da izvrši svoju biološku funkciju.

Tumori nastaju od različitih specijalizovanih ćelija u organizmu i mogu se podeliti prema embrionalnom poreklu tkiva iz koga su nastali. Najveći broj tumora kod ljudi nastaje iz epitelnog tkiva, nazivaju se karcinomima i odgovorni su za preko 80% smrti uslovljene kancerom u svetu. U drugu grupu tumora spadaju sarkomi, tumori mezodermalnog porekla koji nastaju iz vezivnih tkiva i čine 1% svih dijagnostikovanih maligniteta. Treću grupu čine tumori nastali iz hematopoetskih tkiva sa incidencom od 9 %, dok su u četvrtu grupu svrstani neuroektodermalni tumori koji uzrokuju 2.5% smrtnosti (Weinberg, 2008).



## 1.2 Terapija kancera

U pokušaju lečenja kancera trenutno se primenjuju tri osnovna pristupa: hirurška ekscizija, zračenje i hemioterapija pri čemu strategija zavisi od tipa kancera i stadijuma u kome je dijagnostikovano (Rang i sar., 2005).

Osnovni lekovi koji se koriste u borbi protiv kancera, mogu se podeliti u nekoliko opštih kategorija (Rang i sar., 2005):

### 1. Citotoksični lekovi u koje spadaju:

-alkilirajući agensi i slične supstance – deluju stvaranjem kovalentnih veza sa DNK molekulom čime sprečavaju replikaciju. Osnovni korak u njihovom delovanju je stvaranje karbonijum jona (atoma ugljenikasa samo 6 elektrona u spoljnjem omotaču) koji je izuzetno reaktivan i čija je meta najčešće azot na poziciji 7 kod guanina (mada i N1 i N3 adenina i N3 citozina mogu biti mete alkilacije). Većina ovih lekova ima dve alkilirajuće grupe što uzrokuje veze unutar ili između DNK lanaca (Pourquier, 2011);

-antimetaboliti, koji blokiraju ili ometaju jedan ili više metaboličkih puteva uključenih u sintezu DNK. Tako antifolati remete sintezu timidina jer inhibiraju enzim koji prevodi folate u formu neophodnu za sintezu timidina, dok se analozi purina i pirimidina konvertuju u „lažne“ nukleotide čime inhibiraju sintezu DNK (Lansiaux, 2011);

-citotoksični antibiotici odnosno supstance poreklom iz mikroorganizama koje sprečavaju deobu ćelija tako što inhibiraju topoizomerazu II, umeću se između nukleotida te ometaju prolazak RNK polimeraze ili čak razgrađuju DNK do nivoa slobodnih baza (Lansiaux i Pourquier, 2011);

-agensi koji deluju na funkciju mikrotubula i stvaranje deobnog vretena (Dumontet, 2011);

2. Hormoni i lekovi koji suprimiraju sekreciju hormona i antagonizuju delovanje hormona (koriste se kod hormon zavisnih tumora) (de Cremoux, 2011);
3. Ostali agensi koji ne spadaju u navedene kategorije (Rang i sar.,2005).

U novije vreme se uz pomenute oblike terapije izdvojila i imunoterapija. Strategija na kojoj se zasniva imunoterapija sastoji se u stimulaciji organizma nosioca tumora da prepozna tumor kao "stran" i da razvije imunski odgovor na njega (Schuster i sar., 2006). Po svojoj prirodi imunoterapija može biti pasivna ili aktivna. U pasivnoj imunoterapiji koriste se antitela, dobijena rekombinantnim DNK tehnikama, specifična za jedan određeni epitop tumorskih antigena. Citotoksičnost ovakvih antitela se dodatno povećava vezivanjem radioaktivnih izotopa, citotoksičnih lekova ili toksina (Bertolaccini i Olivero, 2001). Još jedan vid pasivne imunoterapije podrazumeva korišćenje *in vitro* kultivisanih i aktiviranih, velikim dozama citokina, vlastitih limfocita čime se dobijaju ćelije sa daleko većim citocidnim kapacitetom od originalne populacije (Yoshida i sar., 2011). Dok pasivnom terapijom pacijent dobija gotov proizvod, tako da se organizam aktivno ne angažuje, cilj aktivne imunoterapije je da izazove imunski odgovor samog organizma, nosioca tumora (Bertolaccini i Olivero, 2001). U tu svrhu koristi se nespecifična terapija, koja podrazumeva aktivaciju ćelija imunskog sistema određenim bakterijama ili citokinima kakvi su interleukin-2 (IL-2), faktor nekroze tumora-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i interferoni (Hurley i Chapman, 2005; Yang i sar., 2003), kao i specifična aktivna imunoterapija koja podrazumeva korišćenje tumorskih vakcina (Costelo i sar., 2004; Mitra i sar., 2003). Relativno slab učinak imunoterapije se objašnjava time što je maligna ćelija već stekla rezistenciju na imunske mehanizme u trenutku kada je tumor dijagnostikovao.

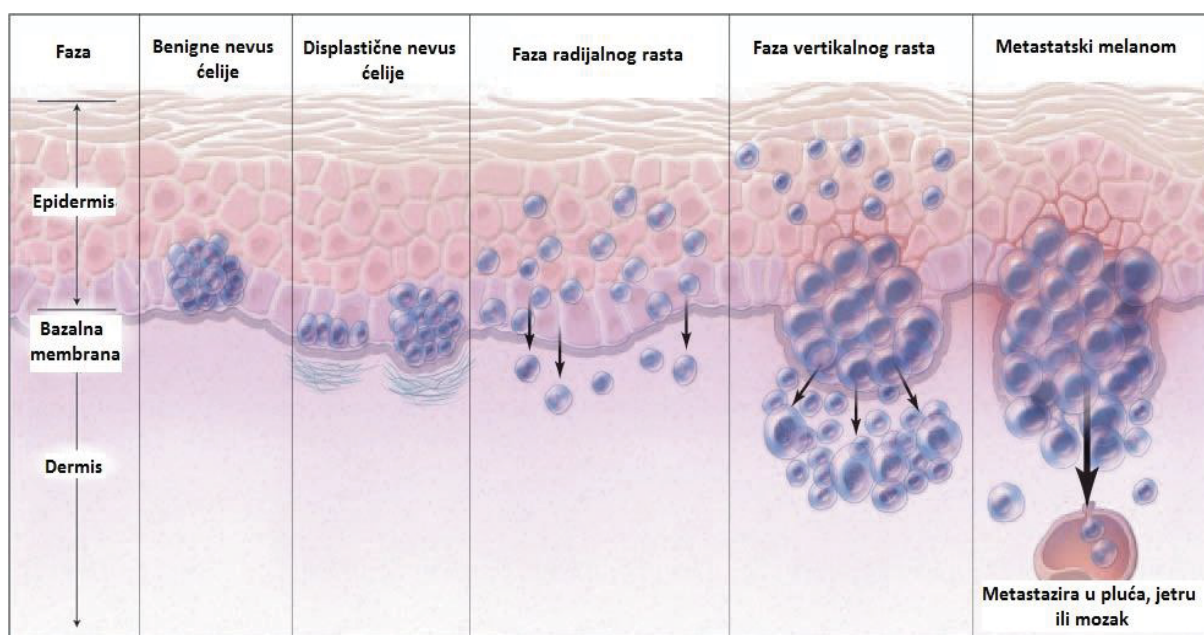
### 1.3 Melanom i aktualna terapija melanoma

Melanociti su specijalizovane pigmentne ćelije koje se uglavnom nalaze u koži i u očima gde proizvode melanin, pigment odgovoran za boju kože i kose. Melanociti potiču od izrazito pokretljivih progenitora iz nervne kreste koji migriraju u kožu tokom embriogeneze. U koži melanociti naseljavaju bazalni sloj epidermisa i folikul dlake gde je njihova homeostaza regulisana epidermalnim keratinocitima (Slominski i sar., 2004). Kao odgovor na UV zračenje keratinociti oslobađaju faktore koji regulišu preživljavanje melanocita, njihovu diferencijaciju, proliferaciju i pokretljivost. Takođe, oni stimulišu melanocite da sintetišu melanin, što rezultira tamnjenjem kože. Na ovaj način melanociti štite kožu od štetnog efekta UV radijacije u genezi kancera, što je paradoksalno jer su upravo melanociti prekursori melanoma, najsmrtonosnijeg tumora kože (Gray-Schopfer i sar., 2007).

Rak kože spada u treći najčešći humani malignitet čija incidenca dodatno raste alarmantnim stepenom. Najčešće forme raka kože su kancer bazalnih ćelija, kancer skvamoznih ćelija i melanom. Procena svetske zdravstvene organizacije je da se u svetu svake godine pojavi 2-3 miliona novih slučajeva raka kože, gde je i pored činjenice da je melanom prisutan u svega oko 132000 slučajeva, ova forma svakako najopasnija sa najvećim procentom smrtnih ishoda (Gray-Schopfer i sar., 2007). Ukoliko se melanom dijagnostikuje u dovoljno ranoj fazi moguće ga je izlečiti hirurškim odstranjivanjem. Metastatski melanom je, s druge strane otporan na postojeće terapije i sa vrlo lošom prognozom- stopa preživljavanja za period od 6 meseci do 5 godina je svega 5% (Cummins i sar., 2006).

Prilikom maligne transformacije melanocita dolazi do poremećaja u regulaciji rasta, produkciji autokrinih faktora, ekspresiji različitih molekula na membrani i promena u prenošenju unutarćelijskih signala. Kao posledica nastalih promena melanociti postaju neosetljivi na sopstvene i spoljašnje regulatorne signale i podležu nekontrolisanoj proliferaciji (Haass i sar., 2004). Njihova proliferacija može biti ograničena na epidermis, dermis ili može da zahvati obe vrste tkiva. Postoji nekoliko stadijuma u genezi melanoma

pri čemu se svaki odlikuje novim klonom ćelija sa sve većim proliferativnim kapacitetom u odnosu na okolna tkiva. Kod normalne kože melanociti su ravnomerno distribuirani na bazalnoj membrani epidermisa. Inicijalna faza u nastanku melanoma je predstavljena nevus ćelijama, grupacijama benignih melanocita pri čemu su prisutne i morfološki atipične ćelije (slika 2). Sledeća faza se naziva “faza radijalnog rasta melanoma“ i smatra se prvim stupnjem maligniteta. Ovu fazu odlikuje epidermalna lezija sa mikroinvazijama ćelija u dermis. Tzv. „faza vertikalnog rasta“ podrazumeva postojanje nodulusa ili gnezda ćelija koje su zahvatile dermis. Ćelije imaju maligni potencijal i direktno dovode do metastatskog malignog melanoma koji infiltrira vaskularni i limfni sistem (Miller i sar., 2006).



Slika 2. Faze rasta melanoma (Preuzeto od Miller i sar., 2006)

Poznato je da su tumorske ćelije meta specifičnog, ali i nespecifičnog imunskog odgovora. U mnogokomponentnom sistemu gde je sudbina maligne ćelije određena složenim interakcijama između tumorske ćelije, ekstraćelijskog matriksa, okolnog tkiva i imunskog

odgovora, sposobnost tumorske ćelije da izbegne imunski odgovor je prednost koja joj omogućava preživljavanje i upravo je pritisak imunskog sistema ono što selektuje ovakve ćelije (Mitra i sar., 2003). Tako, iako intenzivan imunski odgovor u nekim slučajevima rezultira destrukcijom tumora, slab imunski odgovor može da stimuliše njegov rast. Dalje, danas je uglavnom prihvaćeno da je visoka infiltracija makrofaga u tumorsko tkivo vezana za lošiju prognozu bolesti, što se objašnjava sposobnošću tumora ne samo da suprimira antitumorsku aktivnost ovih ćelija, već i da indukuje sekreciju supstanci koje će da promovišu proliferaciju tumorskih ćelija (Condeelis i Pollard, 2006; Talmadge i sar., 2007). S druge strane, prisustvo visokog procenta limfocita koji infiltriraju tumor (engl. *tumor-infiltrating lymphocyte*, TIL) govori o prognozi zavisno od tipa tumora: kod melanoma i kancera ovarijuma povezan je sa boljim ishodom, dok kod kancera želuca, visoka infiltracija TIL, sugerise lošiju prognozu (Solinas i sar., 2009).

Kako melanom raste, klonovi ćelija razvijaju strategije za izbegavanje citotoksičnog delovanja T limfocita. Brojni podaci u literaturi opisuju prestanak ili neadekvatnu ekspresiju tumorskih antigena koje prepoznaju citotoksični T limfociti (Schuster i sar., 2006), smanjenje ekspresije transporter peptida 1 (engl. *Transporter asociated protein 1*, TAP-1) (Dissemond i sar., 2003) ali i sposobnost ćelija melanoma da inhibiraju ekspresiju adhezivnog molekula vaskularnih ćelija 1 (engl. *Vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) od strane endotela čime se otežava migracija T ćelija iz krvi u tumor (Thompson i sar., 2004). Takođe, pokazano je da CD40-CD40L interakcija, važan kostimulatorni signal u aktivaciji T limfocita, nezavisnim mehanizmom pozitivno reguliše rast melanoma (Lode i sar., 2000). Dalje, opisana je inaktivacija Fas receptora kao odgovor melanoma na komponente nespecifičnog imuniteta, mehanizam kojim tumor postaje neosetljiv na FasL pokrenutu apoptozu (Ferrarini i sar., 1999). Iako humani melanom eksprimira TNF receptor što ga čini potencijalno senzitivnim na ovaj citokin, ćelije tumora oslobađaju i solubilni receptor koji vezivanjem TNF-a inhibira njegovu aktivnost (Viac i sar., 1996). Kako je pokazano da TNF ne remeti rast humanog melanoma kod imunodeficientnih miševa, može se zaključiti da ovaj citokin ima ulogu u aktivaciji imunskog sistema pre nego indukciji ćelijske smrti (Thompson i sar., 2004).

Melanom je kompleksna genetska bolest. U pokušaju da se identifikuju mehanizmi koji leže u osnovi njegove inicijacije i progresije, učinjen je napredak u razumevanju ključnih signalnih puteva kod ove bolesti. Tako je pokazano da su brojni molekuli, učesnici signalnog puta regulisanog protein kinazama aktiviranim mitogenom (engl. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK) ali i fosfoinozitol-3-kinaznog (engl. *phosphoinositide-3-kinases*, PI3K) signalnog puta, pogođeni mutacijama koje vode u kancerogeni profil. Tako je u čak 90% slučajeva humanog melanoma uočena povećana aktivnost kinaze regulisane ekstracelularnim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinases*, ERK) (Cohen i sar., 2002). Razlog ovakve prekomerne aktivacije može biti produkcija autokrinih faktora rasta, kakav je osnovni faktor rasta fibroblasta (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) ali i povećana ekspresija njegovog receptora od strane ćelija melanoma (Satyamoorthy i sar., 2003) ili, u retkim slučajevima, mutacija koja dovodi do aktivacije receptora za faktore rasta, kakva je mutacija c-Kit receptora (Willmore- Payne i sar., 2005). Ipak, najčešći mehanizam prekomerne aktivacije ERK-a je mutacija u neuroblastoma RAS (NRAS) genu koja se javlja kod 15-30% humanih melanoma (Davies i sar., 2002). Dalje, pokazano je da je najčešća mutacija u MAPK signalnom putu supstitucija glutamata valinom na poziciji 600 kod BRAF gena koja je prisutna kod čak 70% humanih melanoma (Davies i sar., 2002). Mutirani BRAF stimuliše konstitutivnu aktivnost ERK-a, proliferaciju, preživljavanje ćelija i omogućava rast tumora. BRAF doprinosi i angiogenezi stimulacijom autokrine sekrecije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Sharma i sar., 2005). Pored toga, novija istraživanja su ukazala na nekoliko gena čija je ekspresija regulisana aktivnošću<sup>V600E</sup> BRAF-a. U njih spadaju transkripcioni faktor mikroftalmije (engl. *microphthalmia-associated transcription factor*, MITF) (Wellbrock i Marais, 2005), geni za regulatore ćelijskog ciklusa ciklin D1 i p16<sup>INK4a</sup> (Bhatt i sar., 2005; Gray-Schopfer i sar., 2006), gen za matriksnu metaloproteinazu (MMP)1 (Huntington i sar., 2004) kao i gen za inducibilnu sintazu azot monoksida (iNOS) (Ellerhorst i sar., 2006). PI3K put reguliše preživljavanje ćelija, proliferaciju, rast i pokretljivost ćelija i u velikom broju melanoma ovaj signalni put je prekomerno aktiviran (Stahl i sar., 2004). Potreba da se inhibiraju oba, MAPK i PI3K, signalna puta za supresiju rasta melanoma, potvrđuje njihov značaj. Konačno, postoji nekoliko genetskih promena,

uobičajenih za melanom, koje redukuju apoptozu, a u njih spadaju povećana ekspresija gena Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), nuklearnog faktora- $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B) i Akt3 (protein kinaza B) kao i gubitak PTEN gena (engl. *phosphatase and tensin homolog*) (Gray-Schopfer i sar., 2007).

Interesantno je zapažanje da je p53 gen retko mutiran kod melanoma kao i da je njegova povećana ekspresija vezana za progresiju tumora (Sauroja i sar., 2000; Box i Terzian, 2008). Noviji podaci ukazuju na ulogu endogenog azot monoksida (NO) u regulaciji aktivnosti p53. Naime, primećeno je da je ekspresija kod melanoma koji konstitutivno ekspimiraju iNOS povezana sa pojačanom otpornošću na terapiju i lošijom prognozom bolesti nego u slučaju melanoma koji ne ekspimiraju ovaj enzim (Ekmekcioglu i sar., 2000). Molekularne analize sugeriraju da endogeni NO negativno reguliše apoptozu indukovanu cisplatinom što se, između ostalog, objašnjava pokrenutom aktivacijom p53 proteina koja dovodi do pojačane transkripcije p21 što rezultira zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, popravkom DNK oštećenja i preživljavanjem ćelije (Tang i Grimm, 2004.)

Melanom je izuzetno agresivno oboljenje sa visokim metastatskim potencijalom i izrazitom rezistentnošću na citotoksične agense. Pretpostavlja se da je razlog tome činjenica da melanociti potiču od vrlo pokretljivih ćelija koje imaju pojačanu sposobnost preživljavanja (Gray-Schopfer i sar., 2007). Osim toga, reaktivne kiseonične vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su izrazito uključene u metabolizam i fiziološke procese melanocita. Naime, ROS se generišu kao odgovor na UV radijaciju dok je vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) uobičajeni sporedni proizvod u melanogenezi (Nappi i Vass, 1996) ali, funkcioniše i kao sekundarni glasnik u propagaciji signala pokrenutog TNF $\alpha$  i transformišućim faktorom rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor beta*, TGF $\beta$ ) citokina koji inhibiraju proces sinteze melanina (Meier i sar., 1989; Thannickal i sar., 1993). Dalje, Peinado i sar. (1992) su pokazali da ćelije melanoma odgovaraju na oksidativni stres povećanjem unutarćelijske koncentracije glutationa, kao i to da slabo podležu lizi nakon oksidativnog šoka. Opisana neosetljivost ćelija melanoma na oksidativno oštećenje korelira sa činjenicom da su ROS normalno prisutni u koži i sugeriraju da ćelije melanoma, kao i sami melanociti, poseduju aktivne odbrambene mehanizme za sprečavanje oštećenja ćelija indukovana reaktivnim kiseoničnim vrstama. Izgleda da ova osobina čini melanom rezistentnim na radijacionu

terapiju ali i na hemioterapiju lekovima koji zasnivaju svoje dejstvo na promeni redoks statusa ćelije (Jimenez- Cervantes i sar., 2001). Takođe, ćelije melanoma, u poređenju sa drugim tipovima tumora, imaju nisku stopu spontane apoptoze *in vivo* i relativno su otporne na agense koji indukuju apoptozu *in vitro* (Soengas i Lowe, 2003). Već nekoliko decenija se u postoperativnoj terapiji malignih melanoma koriste interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) (Richtig i sar., 2004), visoke doze IL-2 (Dillman i sar., 2000), dekarbazin (Eggermont i sar., 2004), temozolomid (Patel i sar., 2011), paklitaksel i cisplatina (Attalah i sar., 2005), pri čemu sve terapije jako malo doprinose ukupnoj stopi preživljavanja pacijenata sa melanomom (Eggermont i sar., 2011). Identifikacija signalnih puteva koji su uključeni u inicijaciju i progresiju tumora, otvara novo područje za njegov tretman i daje priliku da se kreiraju ciljane terapije zavisno od genetskih lezija koje leže u osnovi individualne bolesti. U ovome trenutku, nekoliko novih ciljajućih agenasa se testira samostalno i u kombinaciji sa konvencionalnom terapijom (Gonzales i sar., 2009). Tako selektivni BRAF inhibitor - Vemurafenib daje ohrabrujuće rezultate kod pacijenata koji imaju metastatski melanomom sa V600E mutacijom BRAF gena, čak i u poređenju sa, do sada najefikasnijim antimelanoma agensom- dekarbazinom (Chapman i sar., 2011). U novije vreme, predloženo je i eventualno kombinovanje Vemurafenib sa MEK inhibitorima (Eggermont i sar., 2011). Agensi koji deluju na komponente PI3K signalnog puta, kakav je temserolimus koji inhibira mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) ili MK-2206, inhibitor Akt-a (Eggermont i sar., 2011), kao i agensi koji deluju na nekoliko unutaćelijskih puteva preko inhibicije molekula kakav je Hsp90 (engl. *heat-shock protein 90*) koji reguliše zauzimanje konformacije novosintetisanih proteina (Sharp i Workman, 2006), mogli bi kod precizno selektovanih pacijenata dati pozitivan ishod. Nedavno je od strane FDA odobrena imunoterapija humanim IgG1 monoklonskim antitelima (ipilimumab) koja blokiraju CTLA-4 antigen, negativni regulator aktivnosti T limfocita (Inman i sar., 2007), čime se uspostavlja povoljan imunski odgovor na tumor kod pacijenata sa melanomom u odmaklom stadijumu (Scheier i sar., 2011).

Neosetljivost ili slaba osetljivost melanoma ali i drugih tumora na primenjenu terapiju, danas se dovodi u vezu sa postojanjem kancer inicirajućih ćelija (engl. *cancer initiating*



*cell*, CIC), koje predstavljaju jedno od najinteresantnijih otkrića u onkologiji u posljednje vreme (Lapidot i sar., 1994; Lawson i sar., 2007; Marian i sar., 2009). Naime, pokazano je da ove ćelije čine malu frakciju tumora koja je odgovorna za njegovu propagaciju. CIC podsećaju na matične ćelije, jer se nalaze u stanju mirovanja ili su sa izrazito niskom stopom deobe (Mc Cubrey i sar., 2010), imaju sposobnost samoobnavljanja, ali mogu i da diferenciraju u ćelije originalnog tumora ili one koje su rezistentne na terapiju primenjenu na kancer (Ailles i Weissman, 2007; Clarke i sar., 2006; Dick, 2008). Za razliku od okolnih ćelija istog tumora, CIC su uglavnom neosetljive na konvencionalne pristupe terapiji kancera kakvi su hemioterapija i radioterapija. Tako je sugerisano da CIC opstaju, pritajene, tokom terapije i da, po uklanjanju hemioterapeutskog agensa, diferenciraju u populaciju ćelija koje su neosetljive na primenjeni tretman i koje će popuniti mesto originalnog tumora ili metastazirati u drugo tkivo (Mc Cubrey i sar., 2010).

## **1.4 Fitoterapija**

Kao alternativa konvencionalnoj medicini, izdvaja se tradicionalna medicina različitih nacija i, kao najpoznatija i najintrigantnija za nauku, u okviru nje - fitoterapija, odnosno lečenje lekovitim biljem. Primena lekovitog bilja je već 3000 godina prisutna u alternativnoj medicini pri čemu su vremenom stečena saznanja objavljena u više od hiljadu knjiga u kojima je opisano preko 5.000 lekovitih biljaka (Hartwell, 1982; Chang, 1986; Kapoor, 1990; Schultes, 1990; Ravelo i sar., 2004).

Iako zvanični statistički podaci potvrđuju izvestan procenat uspešnosti metoda fitoterapije u lečenju hroničnih, neurodegenerativnih bolesti i kancera (Ravelo i sar., 2004), još uvek ne postoji adekvatna interakcija između saznanja moderne i iskustava tradicionalne medicine. Do danas je pokazano da delotvornost fitoterapije počiva na sinergizmu različitih komponenata koje ulaze u sastav biljnih ekstrakata (Zhang i sar., 2003; Tse, 2003), ali ne postoji dovoljno naučnih dokaza o prirodi ovih molekula, mehanizmima njihovog

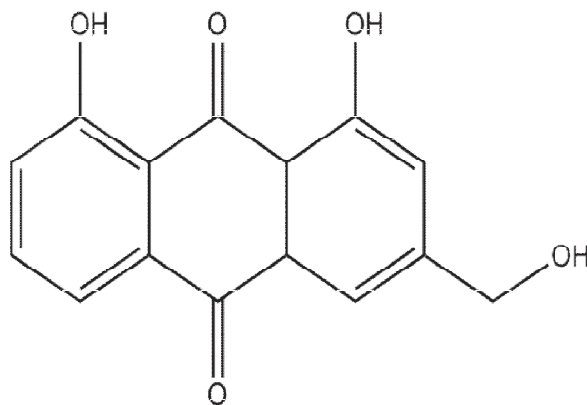
delovanja kada se nađu u ćeliji, kao ni posledicama njihove međusobne ili interakcije sa konvencionalnim lekovima prilikom eventualnih kombinacija.

Ono što se zna jeste to da su biljke izvor molekula male molekulske mase koji po ulasku u ćeliju deluju kao modulatori, ali i kao inhibitori brojnih signalnih puteva (Ravelo i sar., 2004). Neki od ovih puteva su prekomerno aktivirani kod kancera i mogu biti uzrok sticanja kancerogenog profila ćelije ili njegovog održavanja. Ova činjenica inicirala je ispitivanje eventualnih antitumorskih efekata pojedinih molekula izolovanih iz biljaka pa, iako se o njihovom učešću u inhibiciji rasta tumora još uvek ne zna dovoljno, postojeći podaci sugerišu moguću ulogu pomenutih molekula u terapiji tumora. Tako su, danas, neki od molekula poreklom iz biljaka u fazi prekliničkog [bruceantin (Cuendet i sar., 2004), indirubins (Galmozzi i sar, 2006), olomucin (Cragg i Newman, 2009), betulinska kiselina (Mullauer i sar., 2010),...] ili kliničkog ispitivanja [vinblastin (Gueritte i Fahi, 2005), irinotecan (Shah i sar., 2005), topotecan (Cragg i sar., 2009), etoposid (Hofle i Reinchebach, 2005), flavopiridol (Dispenzieri i sar., 2006)...]. Noviji rezultati pokazuju izvesnu osetljivost prethodno pomenutih CIC ćelija na prirodne agense. McCubrey i sar. (2010) opisuju nepostojanje razlike u osetljivosti na genistein (inhibitor protein kinaza i topoizomeraze II) između CIC i BC (engl. *bulk cell*) ćelija kancera prostate. Takođe, isti autori sugerišu da kombinovana terapija sa genisteinom značajno pojačava efekat konvencionalnih terapeutika.

Postojanje CIC ćelija donekle objašnjava neuspešnost konvencionalne terapije. S druge strane, rezultati dobijeni na njima, ali i na mnogim tumorskim linijama (Lampronti i sar., 2006; Ligresti 2006), ukazuju na neosporni značaj fitoterapeutika kao i na potrebu zaotvorenijim pristupom nauke prema iskustvima fitoterapije, kada je kancer u pitanju.

## 1.5 Aloe emodin

Aloe emodin (1,8-dihidroksi-3-hidroksimetil-antrahinon, AE) je supstanca biljnog porekla koja se u visokoj koncentraciji nalazi u korenu, rizomui/ili kori lista biljaka iz rodova *Aloe*, *Senna* i *Rheum* (Reynolds, 1985; Yang i sar., 1999; Wang i sar., 1997). Aloe emodin spada u biljne pigmente antraciklinskog tipa koji zahvaljujući reaktivnim grupama (hidroksilna, hidroksimetil) na atomima ugljenika benzenovih prstenova pokazuje izrazitu reaktivnost i posledično široki spektar biološke aktivnosti u kontaktu sa animalnim i humanim ćelijama (slika 3) (Lee i sar., 2006; Park i sar., 2009).



Slika 3. Struktura Aloe emodina

Ogroman biološki potencijal AE-a ishoduje brojnim terapijskim efektima od kojih su među prvima prepoznati laksativni i diuretski efekat (Yagi i sar., 1997; Krumbiegel i sar., 1993). Do danas je u literaturi opisano baktericidno, fungicidno, viricidno, imunosupresivno, antiinflamatorno, hepatoprotektivno i vazorelaksirajuće dejstvo AE-a (Anderson i sar., 1991; Huang i sar., 1991; Barnard i sar., 1992; Huang i sar., 1992; Kumar i sar., 1998; Arosio i sar., 2000; Lee i sar., 2001; Kim i sar., 2004; Basu i sar., 2005; Chiu i sar., 2009). Istraživanja novijeg datuma stavljaju u žižu interesovanja njegova antitumorska dejstva. Opseg antitumorskih dejstava AE-a je širok, s tim što je pokazano da supstanca ispoljava poseban afinitet prema tumorima neuroektodermalnog porekla poput karcinoma

Merkelovih ćelija, glioma i neuroblastoma (Pecere i sar., 2000; Wasserman i sar., 2002; Mijatović i sar., 2004). Pecere i sar. su pokazali da je u osnovi ovakve selektivne toksičnosti AE-a specifičan način ulaska molekula u ćeliju. Naime, ovo je energetski zavisian proces koji podrazumeva prepoznavanje supstance od strane receptora specifičnog za tumore neuroektodermalnog tipa (Pecere i sar., 2000). Mehanizam delovanja AE-a nije uniforman već je uslovljen specifičnošću tumorske ćelije ali i njenim neposrednim okruženjem.

Antitumorska svojstva AE-a bi mogla da se klasifikuju kao direktna i indirektna. U direktne efekte pomenute supstance spadali bi: indukcija apoptoze, indukcija ćelijske smrti autofagijom, diferencijacija maligne ćelije i povećanje osetljivosti tumorske ćelije na hemioterapiju, dok bi se indirektna antitumorska svojstva AE-a odnosila na njegovu sposobnost da inhibira angiogenezu i formiranje metastaza.

Apoptoza je tip programirane ćelijske smrti koji je esencijalan za normalno razviće i održavanje homeostaze ali je ujedno i fiziološki mehanizam eliminacije transformisanih ćelija bez oštećenja zdravih ćelija ili okolnog tkiva (Hotchkiss i sar., 2009). Tako se indukcija apoptoze u ciljnoj ćeliji smatra ključnim mehanizmom terapije protiv kancera. Brojni podaci u literaturi govore u prilog sposobnosti AE-a da pokrene apoptozu kod različitih tumorskih linija. Tako je na humanom kanceru bešike opisano da AE dovodi do apoptoze povećanjem nivoa p53, p21, Fas/APO-1 receptora, redukcijom odnosa Bax (engl. *BCL2-associated X protein*) / Bcl-2 i posledičnom aktivacijom kaspaze-3 (Lin i sar., 2006). Kuo i sar. (2002) su ispitivali antitumorsku aktivnost AE-a kod dve ćelijske linije humanog kancera jetre: p53- pozitivne Hep G2 i p53-deficijentne Hep 3B. U slučaju Hep G2 linije AE je doveo do nagomilavanja ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa i akumulacije p53 što je rezultiralo povećanom ekspresijom p21/WAF1, Fas/APO1 i Bax proteina i posledičnom apoptozom. S druge strane, apoptoza indukovana AE-om kod Hep 3B ćelija je posredovana promocijom Bax i p21/WAF1 ekspresije koja je nezavisna od p53 (Kuo i sar., 2002). Dalje je pokazano da AE indukuje apoptozu ćelija humanog planocelularnog karcinoma pluća, CH27, sličnim mehanizmom koji uključuje povećanje nivoa proapoptotskog Bax proteina, uslovljava oslobađanje citohroma C iz mitohondrija i posledičnu aktivaciju kaspaza-9 i -3.

S druge strane, povećana aktivnost kaspaze-8 nakon tretmana CH27 ćelija AE-om, sugeriraju učešće Fas puta u pokretanju apoptoze kod ovih ćelija (Lee i sar., 2001). Iako je opšte prihvaćeno mišljenje da indukcija apoptoze aktivacijom kaspaze-8 podrazumeva stimulaciju nekog od receptora smrti, izgleda da AE dovodi do apoptoze direktnom aktivacijom kaspaze-8, bez učešća Fas ili TNF receptora. Lin i sar. sugeriraju da u ćelijama humanog nazofaringealnog karcinoma AE aktivira kaspazu-8 što za posledicu ima indukciju mitohondrijalnog puta smrti (Lin i sar., 2010). Interesantno je da AE pokrene čak nekoliko proapoptotskih puteva u ćelijama humanog kancera jezika, SSC-4. AE dovodi do produkcije ROS, oslobađanja  $Ca^{2+}$ , pada membranskog potencijala mitohondrija praćenog oslobađanjem faktora indukcije apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor*, AIF), endonukleaze G i citohroma C iz mitohondrija i posledične aktivacije kaspaza-9 i -3. Paralelno, kao rezultat tretmana AE-om remeti se balans Bax/Bcl-2i dolazi do povećane ekspresije p53, p21 kao i Fas receptora i FasL proteina (Chiu i sar., 2009).

Aloe emodin je kroz literaturu kontradiktorno opisan kao „sakupljač“ slobodnih radikala, ali i kao molekul koji je zahvaljujući svojoj hinonskoj strukturi u stanju da generiše slobodne radikale u ćeliji (Huang i sar., 1992). Noviji podaci ukazuju na sposobnost AE-a da produkcijom ROS dovede do oštećenja DNK molekula kod humanog karcinoma pluća (Lee i sar., 2006). Na ćelijama humanog hepatoma pokazano je da AE generiše  $H_2O_2$ , ali i druge reaktivne kiseonične vrste, što dovodi do oksidacije ćelijskih proteina uglavnom na cisteinskim ostacima (Lu i sar., 2007). Neki od takvih proteina su glutation S- transferaza pi (GST-pi) - inhibitora subjedinica c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) i inhibitora subjedinica tireodoksina ASK1 (engl. *Apoptosis signal-regulating kinase 1*), gde opisana oksidacija rezultira njihovom aktivacijom. Aktivirana ASK1 dovodi do odložene i trajne aktivacije JNK što, za razliku od rane prolazne aktivacije indukovane citokinima koja ima anti-apoptotski efekat, uvodi ćeliju u apoptozu (Lu i sar., 2007). Rezultati dobijeni na dve različite ćelijske linije, AGS i NCI-N87, humanog karcinoma želuca, ukazuju da AE indukuje apoptozu inhibicijom kazein kinaze II, enzima koji fosforilacijom Bid proteina sprečava vezivanje kaspaze-8 i isecanje ovog proteina što je signal za apoptozu. Takođe je pokazano da AE ispoljava manju toksičnost prema diferenciranim, NCI-N87, nego prema

manje diferenciranim, AGS, ćelijama (Chen i sar., 2007). Efekat AE na cikline i ciklin zavisne kinaze se takođe dovodi u vezu sa njegovom sposobnošću da indukuje apoptozu. Kod HL-60, humane promijelocitne leukemije, AE povećava nivo p57, inhibitora kompleksa ciklin B1/ Cdk1 koji reguliše G2/M tranziciju u ćelijskom ciklusu. Kod ovih ćelija povećanje nivoa Cdk1, nakon tretmana AE-om, može biti ključno za uvođenje ćelije u apoptozu (Chen i sar., 2004). Kod U-373MG glioma ćelija, indukcija apoptoze AE-om se dovodi u vezu sa redukcijom ekspresije i inhibicijom aktivnosti protein kinaza C (PKC) izozima (Acevedo-Duncan i sar., 2004). Kako proteini iz PKC familije fosforilacijom različitih molekula regulišu brojne ćelijske funkcije, od interesa je definisati agens koji bi delovanjem na ove proteine uticao na progresiju tumora.

Autofagija je proces uklanjanja dugoživećih proteina i oštećenih organela putem lizosomalne degradacije, ali i proces koji omogućava ćeliji da preživi u odsustvu hrane i/ili faktora rasta (Hotchkiss i sar., 2009). Ipak noviji podaci opisuju da prenaplašena autofagija kao odgovor na neke hemioterapeutske agense dovodi do smrti tumorske ćelije, kao što je slučaj sa autofagijom indukovanom temozolomidom kod ćelija glioma (Kanzawa i sar., 2004). Tako je pokazano da i AE pokreće ćelijsku smrt autofagijom u kulturama humanog, U251 i pacovskog, C6, glioma (Mijatović i sar., 2005).

Brojni podaci u literaturi govore o sposobnosti AE-a da stimuliše diferencijaciju različitih tumorskih linija. Ovaj efekat podrazumeva fenotipsku transformaciju tumorske ćelije, promene u unutarćelijskoj signalizaciji i gubitak malignih svojstava. Tako je pokazano da kod ćelija astrocitoma pacova, C6, AE tretman dovodi do dramatične morfološke promene ćelija praćene povećanom ekspresijom glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), molekula koji se smatra markerom astrocita, što ukazuje na opredeljenost ovih ćelija da pod dejstvom AE-a diferenciraju put astrocitne loze. Takođe, AE inhibira aktivnost ERK-a (ali ne i drugih MAPK ili NF- $\kappa$ B) što ukazuje da bi supresija ERK aktivacije mogla bar delom biti u osnovi diferencijacije pokrenute AE-om (Mijatović i sar., 2005). Na ćelijskoj liniji humanog oralnog kancera (KB), pokazano je da je diferencijacija pokrenuta AE-om praćena zastojem ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i pojačanom aktivnošću alkalne fosfataze (ALP) koji se smatra pouzdanim markerom

diferencijacije (Xiao i sar., 2007). Inhibicija rasta HeLa ćelijske linije humanog cervikalnog karcinoma nakon AE tretmana takođe je praćena G2/M blokom i diferencijacijom potvrđenom povećanom aktivnošću ALP. U ovoj ćelijskoj liniji opisana je supresija aktivnosti PKC $\alpha$  i smanjena ekspresija njegove nishodne mete, DNK vezujućeg proteina, c-myc, što ukazuje na ulogu PKC u opisanom efektu AE-a (Guo i sar., 2007).

Pored napred pomenutih direktnih efekata AE-a na tumorske ćelije, poznato je da supstanca indirektno utiče na progresiju tumora različitim mehanizmima. Iako je u više navrata opisana izuzetno niska toksičnost AE-a prema normalnim ćelijama u organizmu, uključujući humane fibroblaste (Pecere i sar., 2000), hematopoetske progenitorske ćelije (Acevedo-Duncan i sar., 2004) kao i primarne astrocite (Mijatović i sar., 2004), noviji podaci govore o osetljivosti endotelnih ćelija (endotelne ćelije humane umbilikalne vene i endotelne ćelije aorte govečeta) prema dejstvu AE-a (Cardenas i sar., 2006). Opisana sposobnost AE-a da inhibira proliferaciju endotelnih ćelija, ali i sintezu urokinaze, kao i finalni korak u procesu angiogeneze- formiranje tubula, sugerise da bi modulacijom angiogeneze AE mogao da deluje na rast tumora (Cardenas i sar., 2006). Na ćelijama humanog kancera jezika pokazano je da AE inhibira nivo proteina i aktivnost matriks metaloproteinaze-2 (MMP-2) ali i ekspresiju gena MMP-9, čiji proteinski proizvod (želatinaza-B, proteolitički enzim koji iseca tkivne barijere tokom migracije) ima izuzetno bitnu ulogu u migraciji tumora, invaziji i formiranju metastaza kod različitih humanih kancera (Chen i sar., 2010). Kod ćelija hepatocelularnog karcinoma pokazano je da AE pojačava aktivnost inhibitora metastaza, nukleozid difosfat kinaze A (NDKA ili nm23), proteina čija niska ekspresija korelira sa lošim prognozama kod pacijenata sa različitim tipovima kancera (Lu i sar., 2007). Tretman visoko metastatske linije B16-F10, mišjih melanoma ćelija, AE-om dovodi do izrazitog povećanja aktivnosti transglutaminaze 2 (TG2), enzima odgovornog za formiranje veza između proteina ekstraćelijskog matriksa što uslovljava pojačanu adhezivnost ćelija, ali i do vezivanja aktina i fibronektina za integrine čime se gubi dinamičan citoskelet neophodan u migraciji (Tabolacci i sar., 2010). Pored toga, pokazano je da i zahvaljujući antiinflamatornoj aktivnosti, AE posredno utiče na progresiju tumora. Tako u slučaju mišjeg fibrosarkoma L929, AE inhibira ekspresiju gena

za iNOS čime negativno reguliše produkciju endogenog azot monoksida što rezultira oporavkom ćelija od citocidnog delovanja citokina (Mijatović i sar., 2004).

Značaj informacijakoje nedvosmisleno ukazuju na antitumorski potencijal AE-a relativizovan je kontraverznim podacima o njegovoj genotoksičnosti. Genotoksičnost supstance je pokazana *in vitro*, pri čemu su hromozomske aberacije i tačkaste mutacije, primećene u bakterijskim kulturama, ali i kulturama primarnih sisarskih ćelija, bile kompletno redukovane u prisustvu S9-metaboličkog sistema (Heidemann i sar., 1996). Pored toga, teratogenost AE-a nije potvrđena *in vivo* na potomcima gravidnih jedinki miševa tretiranih dozama AE-a koje su nakon resorpcije, u krvi višestruko prevazilazile doze koje su u *in vitro* uslovima ispoljile visok nivo genotoksičnosti (Heidemann i sar., 1996). Analiza kinetike oralno unetog C<sup>14</sup>AE-a ukazuje na to da se ovaj molekul u organizmu već nakon nekoliko sati metaboliše u rein koji nije mutagenog karaktera, što barem delimično, objašnjava odsustvo genotoksičnosti u kulturi hepatocita, kulturama primarnih ćelija u prisustvu, ranije pomenutog, S9 metaboličkog sistema kao i u *in vivo* eksperimentima (Mueller i sar., 1998).

Aloe emodin se, kao komponenta određenih biljaka, već vekovima primenjuje u kineskoj tradicionalnoj medicini, ali i u tradicionalnoj medicini koja se bavi fitoterapijom sa ovih prostora. Uloga AE-a u modernoj medicini je još uvek sporna.

Nedostatak dovoljno uspešnog pristupa u lečenju melanoma sa jedne i obilje podataka o antitumorskom dejstvu AE-a sa druge strane, učinilo je pomenutu supstancu interesantnom u kontekstu eventualne terapije melanoma. Upravo zato je neophodno ispitati efekat koji AE ispoljava na ćelijama melanoma. Kako je specifičnost tumorske ćelije ono što uslovljava terapiju, interesantno je ispratiti potencijalne razlike u osetljivosti dve linije melanoma na tretman AE-om.



## *2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA*

Obilje podataka u literaturi govori o antitumorskom potencijalu AE-a, sa posebnim akcentom na afinitet prema tumorima neuroektodermalnog porekla kakvi su i melanomi. Ovi podaci su mahom fokusirani na sposobnost AE da indukuje apoptozu menjajući aktivnost MAP signalnog puta i odnos pro/antiapoptotskih molekula. Međutim, nedovoljno je poznato koliko heterogenost u okviru istog tipa tumora može usloviti način delovanja AE, pa se mehanizam njegovog delovanja ne može generalizovati. Specifičnost unutarćelijskog odgovora se takođe može odraziti na osetljivost maligne ćelije na signale smrti iz okruženja, bilo da su posredovani ćelijama imunskog sistema ili citostatskim lekom. Stoga bi uporedna analiza dve linije melanoma različitog porekla, mišjeg B16, i humanog A375 melanoma, koji pored različitog porekla imaju drugačiji molekularni profil, mogla ukazati na značaj finih razlika između ćelija u odgovoru na primenjeni agens.

Na osnovu svega navedenog, ciljevi postavljeni u ovoj tezi su:

1. Utvrđivanje tumoricidnog delovanja AE-a na ćelijskim linijama mišjeg, B16 i humanog, A375 melanoma
2. Uporedna analiza unutarćelijskog odgovora pomenutih linija na tretman AE-om
3. Ispitivanje uticaja AE-a na osetljivost melanoma na imunski odgovor usmeren protiv maligno transformisane ćelije
4. Analiza efekata kombinovane primene AE-a i konvencionalnih citostatika na ćelije melanoma

### *3. MATERIAL I METODE*

## 3.1. Reagensi i rastvori

### 3.1.1. Reagensi

U eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći reagensi:

Medijum za uzgajanje ćelija RPMI –1640, serum fetusa govečeta (FCS, od engl. *Fetal Calf Serum*), fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (PBS, od engl. *Phosphate Buffer Saline*), HEPES (Flow Laboratories, Irvine, Velika Britanija), tripsin (Difco, Detroit, MI, SAD), tripan plavo (BDSL Kilmarnock, Velika Britanija), kristal-violet (Mol, Beograd, Srbija), penicilin, streptomycin (Galenika, Beograd, Srbija), L-glutamin, natrijum-piruvat, L-mlečna kiselina, fenazin metosulfat, p-jodonitrotetrazolijum,  $\beta$ -nikotin amid adenin dinukleotid ( $\beta$ NAD), propidijum jodid (PI), etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA, od engl. *Ethylenediamin Tetra-Acetic Acid*), 3 - 4,5'- dimetiltiazol - 2,5 difeniltetrazolijum bromid (MTT), RNaza (Sigma, St. Louis, MO, SAD), dimetil-sulfoksid (DMSO) (Superlab, Novi Beograd, Srbija), hlorovodonična kiselina, sirćetna kiselina, metanol, etanol (Zorka, Šabac, Jugoslavija), goveđi albumin iz seruma (BSA od eng *Bovine Serum Albumine*) (Rehis Chemical Company, Chicago, Illinois, SAD), karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estar (CFSE od engl. *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (Molecular Probes, Eugene, SAD), Majerov hemotoksilin (BioOptica, Milano, Italija), vodonik peroksid (Beolab, Zemun, Srbija), diaminobenzidin (DAB) (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), paraformaldehid, akridin oranž (Labo-Moderna, Pariz, Francuska), Tris (La chema, Republika Češka), ApoAlert®AnnexinV-FITC kit (Clonotech Laboratories, Mountain View, CA, SAD), paklitaksel (Sigma), doksorubicin (Sigma), TNF (eBioscience, San Diego, SAD), TRAIL (Peprotech, London, UK), FasL (eBioscience), 2',7'-dihlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCFDA) (R&D), apopstat (R&D), komplet za detekciju prekida u DNK molekulu (sadrži enzim terminalnu deoksinukleotid transferazu, fluorescein-dUTP i anti-fluorescein antitelo za koga je vezana peroksidaza) (Roche, Indianapolis, USA).

Pregled antitela korištenih u eksperimentima su prikazani u sledećoj tabeli:

<b>Primarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>
Anti-pERK1/2	miš	Cell Signaling Tehnology
Anti-p53	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-p-p53	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-cyclin D3	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-cyclin D1	miš	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology
Anti-p-Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology
Anti –Bcl-2	kunić	eBioscience
Anti-XIAP	kunić	Cell Signaling Tehnology
Anti-pIκB	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
Anti-iNOS	kunić	Sigma, St. Louis, MO
β-aktin	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Sekundarna antitela:

ECL, magarac anti-kunić HRP (engl. *horseradish peroxidase*) vezano (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

ECL, ovca anti-miš HRP vezano (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

### 3.1.2. Rastvori

Za gajenje ćelija korišćen je RPMI-1640 obogaćen sa 20 mM puferom HEPES, 2 mM L-glutaminom, 100 IU/ml penicilina, 60 mg/ml gentamicina, 10 mM natrijum piruvatom. Komponente sistema komplementa koje su se nalazile u FCS-u su inaktivisane na 56°C u trajanju od 30 minuta. Ćelije tumora B16 i A375 su kultivisane u medijumu suplementiranom sa 5%, odnosno 10% FCS-a.

Za pripremanje ćelija korišćen je PBS bez dvovalentnih katjona Ca i Mg. Rastvor tripsina (0,25%) u PBS-u uz dodatak 0,02% EDTA je korišćen za odlepljivanje adherentnih ćelija od podloge. Za brojanje ćelija korišćen je rastvor boje tripan plavo (0,1%) u PBS-u. Akridin oranž boja je rastvarana u PBS u finalnoj koncentraciji 1 µg/ml. Rastvori korišćeni za Western blot analizu su lizirajući pufer (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-Cl pH 7,6, 0,001 M EDTA pH 8, 100 µg/ml PMSF i 1 µg/ml aprotinin), 6x koncentrovan pufer za razdvajanje (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 na 25° C, 2% w/v SDS, 10% glicerol, 50 mM ditioneitol i 0,01% w/v bromfenol plavo), 5x koncentrovan TGB za elektroforezu (0,01 M Tris-Cl, 20% SDS, glicin), pufer za transfer (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10% metanol, 0,1% SDS).

Aloe emodin (Sigma) je čuvan na -20 °C rastvoren u DMSO, u koncentraciji 200 µM, dok su radni rastvori pravljani razblaživanjem u medijumu za kultivaciju neposredno pre upotrebe.

## 3.2. Ćelijske linije

### 3.2.1. Ćelijske linije mišjeg melanoma B16 i humanog melanoma A375

U ovom radu su korišćene dve ćelijske linije melanoma:

- A375 linija humanog melanoma, koja konstitutivno eksprimira iNOS i prekomerno eksprimira MEK/ERK1/2 (Grimm i sar., 2008);

- B16 linija mišjeg melanoma. Ova linija ne eksprimira iNOS, nije metastatska i za razliku od humanog melanoma nema BRAF mutaciju i eksprimira PTEN protein. Nivo MEK1 i ERK1/2 fosforilacije kod B16 ćelija je nizak što ukazuje na nisku aktivnost ovih kinaza. S druge strane B16 ćelije ne ekspimiraju ni p19<sup>Arf</sup>, niti p16<sup>Ink4a</sup>, što sugerije da inaktivacija lokusa *Ink4a/Arf* ima bitnu ulogu u genezi spontanog mišjeg melanoma (Melnikova i sar., 2004).

Ćelijska linija mišjeg melanoma B16 je dobijena ljubaznošću dr. Siniše Radulovića sa Instituta za Onkologiju i Radiologiju Republike Srbije u Beogradu, dok je linija humanog melanoma A375 (velikodušan poklon prof. Ferdinanda Nikoletti-ja sa Univerziteta u Kataniji, Sicilija, Italija) nabavljena iz American Type Culture Collection (Rockville, MD, SAD). Ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašicama - falkonima (25cm<sup>3</sup>) u hranljivom medijumu RPMI 1640, obogaćenim sa 5% inaktivisanog FCS u slučaju B16 ćelija, odnosno 10% inaktivisanog FCS u slučaju A375 ćelija. Uslovi u inkubatoru su precizno definisani i podrazumevaju temperaturu od 37° C, vlažnu atmosferu i koncentraciju CO<sub>2</sub> od 5%.

### **3.3. Primenjene metode**

#### *3.3.1. Tripsinizacija*

B16 i A375 su adherentne ćelije koje rastu formirajući veze sa dnom posude u kojoj se gaje. Stoga je pred početak rada neophodno raskinuti ove veze kako bi se ćelije prikupile za potrebe eksperimenta.

Proces tripsinizacije otpočet je tako što je medijum u kojem su ćelije gajene prosut, falkoni su oprani 2 puta sa po 5 ml PBS kako bi se uklonile sve mrtve i neadherirane ćelije, uklonio FCS kao i višak preostalog medijuma. Kulturi ćelija je dodavan 500-1000 µl rastvora tripsina koji je raskinuo međućelijske veze ali i veze ćelija sa podlogom. Proces tripsinizacije je zaustavljen dodavanjem medijuma za kultivaciju u falkone sa odlepljenim

ćelijama. Ovako prikupljene ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g pri temperaturi od 4° C, talog je resuspendovan u 1 ml svežeg medijuma za kultivaciju i pristupilo se brojanju ćelija.

### *3.3.2. Određivanje broja živih ćelija*

Broj ćelija je određivan bojenjem tripan plavim. Tripan plavo ulazi u citoplazmu ćelija sa oštećenom membranom dok žive ćelije ostaju nebojene. Ćelije su mešane sa tripan plavim u odnosu 1:1 ili 1:10 i brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Bürker-Türk-u. Broj ćelija po ml suspenzije je računat kao: broj ćelija / broj polja x 25 x faktor razblaženja x 10<sup>6</sup>. Po određivanju broja raspoloživih ćelija, podešavan je njihov broj potreban za eksperimentalni rad.

### *3.3.3. Priprema ćelija za eksperimente*

Za potrebe eksperimenta u kome se ispituje vijabilitet ćelija kao i u slučaju LDH testa ćelije su ravnomerno sađene u sterilnim pločama za mikrokulture sa 96 bunarića ravnog dna zapremine 350 µl (Sarstedt, Newton, NC, SAD) pri gustini od 1 x 10<sup>4</sup> ćelija po bunariću u 100 µl medijuma za uzgajanje. Kulture su inkubirane preko noći, što je vreme neophodno za adheriranje ćelija za dno i njihove dalje deobe. Nakon 24 h ćelije su tretirane hemikalijama, a bunarići su dopunjavani medijumom za kultivaciju do zapremine od 200 µl. Za analize na aparatu za sortiranje ćelija protočnom citofluorimetrijom (FACS od engl. *Flow Cytometer Cell Sorter*) ćelije tumora su sađene u sterilnim pločama sa 6 bunarića ravnog dna zapremine 3500 µl (Sarstedt, Newton, NC, SAD) pri gustini od 2,5 x 10<sup>5</sup> po bunariću u 1 ml medijuma za uzgajanje. Za detekciju autofagije bojenjem akridin oranž bojom kao i u slučaju određivanja aktivnosti tirozinaze, ćelije su ravnomerno sađene u sterilnim pločama sa 6 bunarića ravnog dna zapremine 3500 µl (Sarstedt, Newton, NC, SAD) pri gustini od 4 x 10<sup>5</sup> po bunariću u 1 ml medijuma za uzgajanje. Za TUNEL analizu



i bojenje propidijum jodidom, ćelije su sađene na sterilnim mikroskopskim pločicama sa 4 komorice (Lab-Tek, Nalge Nunc International, IL, SAD) pri gustini od  $3 \times 10^4$  ćelija po bunariću u 300  $\mu\text{l}$  medijuma za uzgajanje. Za Western blot analizu ćelije su sađene u falkonima u broju  $1 \times 10^6$  ćelija/falkon i finalnoj zapremini od 5 ml. Svaki od tretmana bio je urađen u triplikatu kultura, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija triplikata.

#### *3.3.4.MTT test*

MTT test je korišćen za utvrđivanje relativnog broja živih ćelija u kulturi. MTT (3–4,5'-dimetiltiazol–2,5 difeniltetrazolijum bromid, tetrazolijumska so) je supstanca žute boje, koja se u živim ćelijama pod dejstvom mitohondrijalnih reduktaza redukuje u purpurni formazan.

Na tretirane ćelije je, po završetku tretmana, dodavan rastvor MTT (0,5 mg/ml) u zapremini od 100  $\mu\text{l}$ . Ćelije su inkubirane u trajanju od 30 min do 3 sata, nakon čega je produkt redukcije MTT soli, formazan, rastvaran u 50  $\mu\text{l}$  DMSO. Absorbancija je merena na 570 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (Titertrek Multiscan PLUS MK II 314, ICN, Costa Mesa, CA, SAD). Vrednosti dobijene merenjem na konkretnoj talasnoj dužini proporcionalne su intenzitetu ćelijske respiracije, odnosno broju vijabilnih ćelija.

#### *3.3.5.Kolorimetrijski test kristal violetom*

Kristal violet test je korišćen za određivanje relativnog broja adherentnih ćelija. Na tretirane ćelije je nakon odlivanja supernatanta, dodavano 50  $\mu\text{l}$  metanola radi fiksiranja za podlogu. Proces fiksiranja traje 10 minuta, nakon čega se pristupa bojenju ćelija rastvorom kristal violeta (1%) u trajanju od 15 minuta. Nakon toga su bunarići sa obojenim ćelijama intenzivno ispirani vodom. Vezana boja je rastvarana u 33% sirćetnoj kiselini dok je

intenzitet rastvorene boje određivan merenjem apsorbancije svetlosti na talasnoj dužini od 570 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče.

### *3.3.6. Detekcija nekroze testom oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH)*

Za određivanje broja nekrotičnih ćelija u kulturi korišćen je test oslobađanja laktat dehidrogenaze (LDH), enzima koji se nalazi u citoplazmi svih tipova ćelija. Usled narušavanja integriteta ćelijske membrane dolazi do oslobađanja ovog enzima u medijum u kome se gaje ćelije, te je njegova detekcija u medijumu pouzdan indikator prisustva nekroze. Dodavanje supstrata u kombinaciji sa odgovarajućim reagensom rezultira pojavom boje čiji je intenzitet proporcionalan količini LDH, odnosno broju nekrotičnih ćelija. Korišćeni reagens je sastava: L-mlečna kiselina 5,9 mg/ml; fenazin metosulfat 0,086 mg/ml; p-jodonitrotetrazolijum 0,33 mg/ml i  $\beta$ -nikotin amid adenin dinukleotid 0,862 mg/ml u 0,2 M Tris puferu pH 8.2.

Ćelije ( $1 \times 10^4$ /kulturi) su kultivisane u neobojenom medijumu u prisustvu ili odsustvu AE-a. Nakon 24 h inkubacije mešane su iste zapremine supernatanata kultura i reagensa i apsorbancija razvijene narandžasto crvene boje očitana je na 450 nm. Kao pozitivna kontrola korišćene su ćelije tretirane Tritonom-X100, dok negativnu kontrolu čine netretirane kulture. Broj nekrotičnih ćelija izračunavan je po formuli  $(E-C / T-C) \times 100$  gde je E - apsorbancija tretmana, C - apsorbancija netretiranih kultura, T - apsorbancija kultura tretiranih tritonom).

### *3.3.7. Detekcija autofagije bojenjem ćelija akridin-oranžom*

Akridin-oranž je boja koja se visokim afinitetom vezuje za acidofilne strukture u citoplazmi. U eksperimentu je korišćena za detekciju autofagozoma, kiselih vezikula koje okružuju organele i delove citoplazme tokom autofagije. U zavisnosti od aciditeta vezikule se boje narandžasto crvenim tonovima.

Ćelije su sađene u pločama sa 6 bunarića ravnog dna i gajene u hranjivom medijumu do postizanja željene gustine. Nakon tretmana u određenom terminu, ćelije su oprane u PBS-u i tripsinizirane uz praćenje tog procesa pod invertnim mikroskopom. Bojenje rastvorom koncentracije 1 µg/ml akridin-oranža u PBS-u se odvijalo na 37° C u trajanju od 15 minuta. PBS je korišćen za pranje ćelija radi odstranjivanja viška boje i za konačno resuspendovanje ćelija pred merenje crvene (FL3) fluorescence FACSCalibur protočnim citofluorimetrom. Dobijeni rezultati su analizirani CellQuest programom (BD, Hajdelberg, Nemačka).

### 3.3.8. Detekcija rane apoptoze dvostrukim bojenjem aneksin- propidijum jodidom

Fosfatidil serin je molekul koji je kod živih ćelija lokalizovan u citoplazmatskom sloju ćelijske membrane. Rane faze apoptotskog procesa karakteriše premeštanje molekula fosfatidil serina u spoljašnji sloj plazma membrane. Aneksin V detektuje ovakvu promenu što je pokazatelj da je ćelija ušla u apoptozu. Propidijum jodid se koristi kao kontrastna boja, jer ulazi samo u ćelije kojima je narušen integritet ćelijske membrane.

Nakon tretmana AE-om koncentracije 40 µM u trajanju 24 h i 48 h, ćelije su tripsinizirane i oprane u PBS-u. Pristupano je detekciji rane apoptoze korišćenjem ApoAlert®AnnexinV-FITC kita za bojenje sledeći uputstva proizvođača (Clonotech Laboratories, Mountain View, CA). Ćelije su najpre jedanput oprane aneksin vezujućim puferom, centrifugiranjem 3 minuta na 500 g. Talog ćelija je resuspendovan u 100 µl vezujućeg pufera, kome je dodato 5 µl aneksin V-FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate, FITC*) i 10 µl propidijum jodida. Ćelije su inkubirane 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi i po završetku bojenja analizirane FACSCalibur protočnim citofluorimetrom. Rane apoptotične ćelije su detektovane kao aneksin V pozitivne - propidijum jodid negativne. Dvostruko pozitivne ćelije (aneksin V pozitivne - propidijum jodid pozitivne) su u kasnoj apoptozi, primarno ili sekundarno nekrotične.

### 3.3.9. Detekcija apoptoze bojenjem propidijum jodidom

Propidijum jodid je boja koja se vezuje za DNK umećući se između baza, bez većeg afiniteta za određene sekvence. Kada se boja jednom veže za nukleinsku kiselinu, njena fluorescenca se pojača 20 do 30 puta. Na ovaj način se jasno mogu ispratiti promene na nivou jedra kao parametar apoptoze.

Nakon 48 h inkubacije na sterilnim mikroskopskim pločicama sa 4 komorice, u prisustvu 40  $\mu\text{M}$  AE-a, ćelije su fiksirane 4% paraformaldehidom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Proces je prekinut pranjem u PBS-u, a kulture su inkubirane u rastvoru koncentracije 25  $\mu\text{g/ml}$  Rnaze, 20 minuta na 37° C. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su obojene, u mraku, propidijum jodidom (20  $\mu\text{g/ml}$ ) u trajanju od 3 minuta. Boja je temeljno isprana PBS-om, a na mikroskopske pločice sa kojih su skinute komorice, nanet je medijum za pokrivanje fluorescentnih preparata (DAKO). Ovako pripremljeni preparati su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom Axiolab (Zeiss, Jena, Nemačka).

### 3.3.10. TUNEL test

TUNEL (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)- mediated dUTP nick end labeling*) testom se detektuje apoptoza. Na 3'-OH kraj jednolančanog prekida u DNK molekulu enzim terminalna dezoksinukleotidil transferaza (TdT) ugrađuje modifikovane nukleotide. Inkorporirani nukleotidi se detektuju sekundarnim antitelima konjugovanim peroksidazom, po reakciji sa supstratom, pod svetlosnim mikroskopom.

Ćelije su inkubirane na sterilnim mikroskopskim pločicama sa 4 komorice u prisustvu AE-a koncentracije 40  $\mu\text{M}$  u trajanju od 24 h. TUNEL test je izveden korišćenjem komercijalnog kita za detekciju (Roche) prema instrukcijama proizvođača. Kao pozitivna kontrola apoptoze, korišćene su ćelije tretirane 24 h, 60  $\mu\text{M}$  cisplatinom.

### *3.3.11. Detekcija nivoa proliferacije ćelija*

CFSE (karboksifluorescein diacetat) boja (Molecular Probes, Eugene, SAD) je derivat fluoresceina koji sam po sebi nije fluorescentan. Boja lako difunduje kroz ćelijske membrane i ravnomerno se raspoređuje u citoplazmi ne remeteći ćelijske funkcije. Kada se nađe u ćeliji, ćelijske esteraze seku acetatne grupe, a preostali deo molekula ostaje vezan za ćelijske proteine i počinje da fluorescira. Nakon svake deobe intenzitet fluorescence se smanjuje. Ovom metodom je moguće identifikovati i do 15 sukcesivnih generacija ćelija.

Ćelije su inkubirane sa 1,5  $\mu\text{M}$  CFSE bojom 15 minuta na 37°C. Višak boje, koja nije difundovala u citoplazmu, ostaje nakon centrifugiranja u supernatantu. Ćelije su oprane 2 puta u PBS i posađene u pločama sa 6 bunarića ravnog dna. Zalepljene ćelije su tretirane 40  $\mu\text{M}$  AE-om 48 h. Po isteku vremena kultivacije, ćelije su tripsinizirane i oprane 2 puta u PBS-u. Za merenje zelene fluorescence FACSCalibur protočnim citofluorimetrom ćelije su resuspendovane u PBS-u. Dobijeni rezultati su analizirani CellQuest programom.

### *3.3.12. Analiza ćelijskog ciklusa*

Osobina propidijum jodida da interkalira u DNK molekul je iskorišćena za analizu ćelijskog ciklusa. Naime količina vezane boje je proporcionalna količini DNK što je dovoljna informacija da se ćelije razvrstaju po fazama ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije, dok se njihova distribucija determiniše Cell Quest Pro softverom.

Ćelije su gajene u pločama za kultivaciju sa 6 bunarića. Nakon tretmana u trajanju od 24 h supernatanti kultura su sakupljeni u epruvete, a potom su ćelije odlepljene tripsinizacijom.

Sakupljene ćelije su centrifugirane 5 min na 700 g, a potom oprane u PBS 3 min na 250 g. Supernatant je odlivan, a ćelijski talog fiksiran u 70% etanol-PBS 30 min na 4°C. Fiksirane ćelije su najpre oprane 2 x 3 min na 250 g, a onda inkubirane 30 min na 37°C u prisustvu 10  $\mu\text{g/ml}$  prodijum jodida i 1 mg/ml RNaze. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su

FACSCalibur protočnim citofluorimetrom i dobijeni rezultati su analizirani CellQuest programom.

### *3.3.13. Western blot*

Ova metoda omogućuje da se detektuje i kvantifikuje prisustvo proteina u ćeliji, a u ovom radu je primenjena u svrhu detekcije ciklina D1 i D3, ERK1/2 MAP kinaze, Akt, p53, XIAP i Bcl-2 proteina.

Ćelije su po isteku tretmana lizirane u hladnom puferu (0,1 M NaCl, 0,01 M Tris-Cl pH 7,6, 0,001 M EDTA pH 8, 100 µg/ml PMSF (fenil metil sulfonil fluorid) i 1 µg/ml aprotinin), nakon čega su uzorci mešani sa 6 x koncentrovanim puferom za razdvajanje (62.5 mM Tris-HCl pH 6,8 na 25° C, 2% w/v SDS, 10% glicerol, 50 mM dititritol i 0,01% w/v bromfenol plavo) i denaturisani 5 min u ključaloj vodi. Potom su proteini razdvajani na 12% SDS-poliakrilamid gelu, paralelno sa obojenim markerom definisanih proteinskih težina. Sledio je transfer na polivinilidin difluorid membrane u uslovima transfera 5 mA/cm<sup>2</sup> pri čemu je korišćen polusubi sistem za transfer. Membrane su blokirane sa 5% nemasnim mlekom u PBS-u sa 0,1% Tween 20 nakon čega je rađena inkubacija na 4°C preko noći najpre sa antitelima za p53, Akt, XIAP, Bcl-2, D1, D3, ERK1/2, a onda i sa sekundarnim antitelima konjugovanim peroksidazom, 2 h na sobnoj temperaturi. Između inkubacija, ćelije su oprane 3 puta u PBS-0,1% Tween rastvoru. Trake su detektovane hemiluminiscencom.

### *3.3.14. Detekcija aktivnosti kaspaza*

Apostat je pan-kaspazni inhibitor konjugovan FITC-om koji ulazi u ćelije i vezuje se za aktivirane kaspaze.

Ćelije su gajene u sterilnim pločama sa 6 bunarića i tretirane 24 h u prisustvu AE-a. Nakon isteka tretmana, ćelije su oprane, tripsinizirane i sakupljene u epruvete. Ćelije su oborene centrifugiranjem, supernatant je odliven, a one su resuspendovane u 100 µl 5% medijuma za kultivaciju u koji se doda 1 µl apostata. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37° C, ćelije su oprane, resuspendovane u 300 µl PBS-a i analizirane na FACSCalibur protočnom citofluorimetru. Rezultati su analizirani CellQuest programom.

### *3.3.15. Bojenje ćelija Majerovim hematoksilinom*

Ćelije su gajene na staklenim mikroskopskim pločicama sa komorama 24 h u prisustvu ili odsustvu AE-a. Nakon toga fiksirane su u 4% paraformaldehidu 20 minuta na sobnoj temperaturi, oprane 2 puta u PBS-u i obojene Majerovim hematoksilinom 30 sekundi. Ćelije su oprane vodom sa česme i analizirane pod svetlosnim mikroskopom.

### *3.3.16. Analiza aktivnosti tirozinaze i količine melanina kod B16 ćelija*

Tirozinaza je membranski vezan glikoprotein lociran u specijalizovanim organelama, melanozomima, koji katalizuje konverziju L-tirozina u L-dopakinon, što je prvi i limitirajući korak u melanogenezi. Njegovu aktivnost određujemo merenjem nivoa oksidacije 3,4-dihidroksi-L-fenilalanina.

Ćelije, gajene u pločama sa 6 bunarića su kratko lizirane u 100 µl fosfatnog pufera pH 6,8 - 1% Triton X-100 i centrifugirane na 10000 opm 5 minuta. Po 40 µl lizata iz svakog bunarčića je pomešano sa 100 µl rastvora L-dopa supstrata (2mg/ml). Enzimatska reakcija se odvijala na 37° C dok je absorbanca čitana na 570 nm svakih 10 minuta tokom jednog sata. Finalna aktivnost je korigovana totalnom količinom proteina određenom Bradfordovim testom.

Za određivanje količine melanina ćelije su inkubirane 24 h, tripsinizirane, izbrojane i lizirane u 100  $\mu$ l 1M NaOH. Nakon toga uzorcima je dodato po 400  $\mu$ l destilovane vode i inkubirani su 1 h na 60° C. Absorbanca je merena na 492 nm.

### 3.3.17. In vivo primena B16 ćelija

Za *in vivo* primenu B16 ćelije su gajene 24 h u prisustvu ili odsustvu 40  $\mu$ m AE, tripsinizirane, izbrojane i na kraju resuspendovane u PBS-u. Primarni tumori su indukovani subkutanom injekcijom  $0.5 \times 10^6$  ćelija melanoma u dorzalni desni lumbosakralni region C57BL/6 miševa. Rast tumora je pažljivo praćen dok je veličina tumora merena u tri dimenzije. Zapremina tumora je određivana prema formuli  $0.52 \times$  najduži dijametar  $\times$  najkraći dijametar<sup>2</sup>.

### 3.3.18. Analiza unutarćelijske produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod B16 ćelija

Prisustvo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je određivano DAB (diaminobenzidin) i H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dihlorofluorescin diacetat) bojenjem B16 ćelija tretiranih AE-om. B16 ćelije su gajene na staklenim pločicama sa komorama i tretirane AE-om. DAB u prisustvu oslobođenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksiduje i daje tamno braon precipitate koji se detektuju svetlosnom mikroskopijom u citoplazmi ćelija.

Merenje produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je određivano i analizom protočnim citofluorimetrom ćelija obojenih H<sub>2</sub>DCFDA, što je diacetatna forma DCFH. Boja biva deacetilovana unutarćelijskim esterezama što dovodi do toga da DCFH ostaje zarobljen u citoplazmi i oksidovan od strane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u fluorescentan DCF (dihlorofluorescein). B16 ćelije su inkubirane 30 minuta u prisustvu H<sub>2</sub>DCFDA i tretirane AE-om u određenim terminima. Nakon tretmana ćelije su sakupljene i oprane u PBS-u. Intenzitet fluorescence je meren protočnom citofluorimetrijom.



### 3.3.19. Analiza izobologramom

Za utvrđivanje efekata kombinovane primene AE-a i citostatika, kao i AE-a i citokina na ćelije melanoma, korišćena je analiza izobologramom. Izobologram (Berenbaum, 1981) je grafik koji se konstruiše u cilju utvrđivanja interakcije dva agensa.

Ćelije su inkubirane 24 h u prisustvu različitih koncentracija AE-a (40, 20, 10  $\mu\text{M}$ ), doksorubicina (0,125 - 1  $\mu\text{M}$  za A375 i 0,015-0,1  $\mu\text{M}$  za B16), paklitaksela (3,7 - 25  $\mu\text{M}$  za A375 i 0,38 - 3  $\mu\text{M}$  za B16), TNF-a (6,25 – 50 ng/ml za obe linije), TRAIL-a (1,25 – 20 ng/ml za A375) ili FasL (5 – 20  $\mu\text{g/ml}$  za B16), i u istom vremenskom intervalu paralelno tretirane kombinacijama AE-a i svakog od navedenih agenasa. Kombinacije agenasa koje su indukovale  $30 \pm 5\%$  citotoksičnosti su prikazane kao procenat svakog pojedinačnog agensa koji je rezultirao istim procentom citotoksičnosti. Ove vrednosti se nazivaju FIC (engl. *fractional inhibitory concentration*). Kada je suma FIC jednaka jedinici, efekat dva kombinovana agensa je aditivan, što je na grafiku geometrijski pokazano kao prava linija; kada je suma ovih vrednosti  $< 1$ , agensi u kombinaciji deluju sinergistički i grafik pokazuje konkavnu krivu, dok kada je suma FIC  $> 1$ , odnos ispitivane kombinacije je antagonistički i grafik je konveksnog oblika.

## 3.4. Statistička obrada podataka

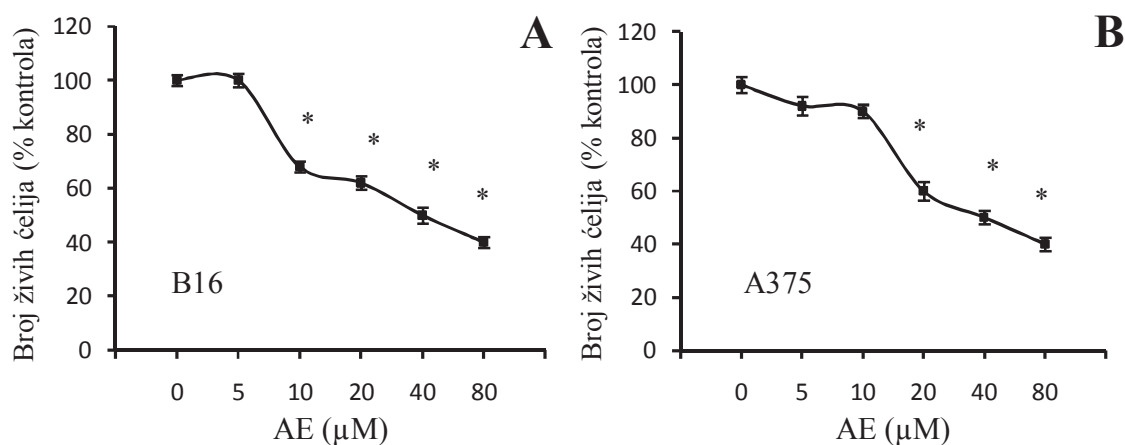
Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$  triplikata kultura jednog, reprezentativnog od najmanje tri izvedena, ili  $\text{SV} \pm \text{SD}$  više istih eksperimenata. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poredjenja. Vrednost parametra  $p$  manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

## *4. REZULTATI*

## 4.1. Direktni efekti AE-a na B16 i A375 ćelije

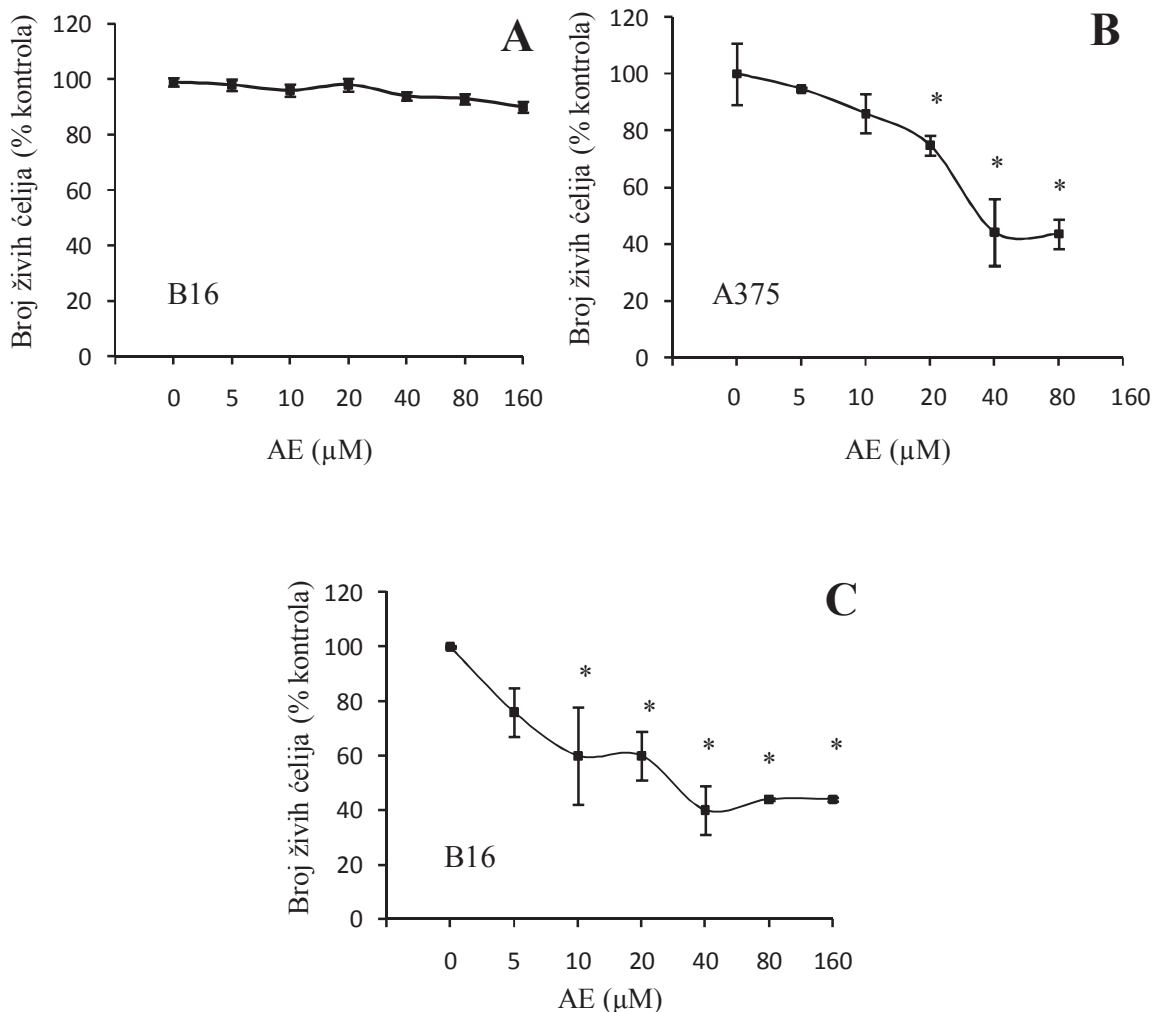
### 4.1.1. Aloe emodin inhibira rast B16 i A375 ćelija

Kako bi se ispitaio efekat AE-a na rast tumorskih linija B16 i A375, ćelije su tretirane različitim koncentracijama pomenute supstance 24 h. Relativni broj živih ćelija određivan je kolorimetrijskim metodama - MTT testom (graf. 1) i bojenjem kristal violetom (graf. 2A i 2B). Kao što se može videti, AE je doveo do pada vijabiliteta A375 ćelija na dozno zavisian način. Na B16 ćelijama, MTT testom je pokazan pad vijabiliteta pod tretmanom AE-om, dok je ovakav rezultat izostao kod istih ćelija obojenih kristal violetom. Neusklađenost rezultata dobijenih sa dva testa vijabiliteta nametnula je potrebu da se uradi i treći, pa su B16 ćelije, tretirane AE-om, obojene tripan plavim (graf. 2C). Dobijeni rezultati koreliraju sa rezultatima MTT testa i potvrđuju pad vijabiliteta pod tretmanom AE-om kod B16 linije.



**Grafik1. AE smanjuje rast B16 i A375 ćelija melanoma.**

B16 (A) i A375 (B) ćelije ( $1 \times 10^4$  po bunariću) su tretirane različitim koncentracijama AE-a. Kulture koje su služile kao kontrole uzgajane su u medijumu bez AE-a. Nakon 24 sata, relativni broj živih ćelija određivan je MTT testom. Broj živih ćelija u tretiranim kulturama izražen je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim (netretiranim) kulturama koji je arbitrarno uzet kao 100%. Podaci predstavljaju srednju vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke.

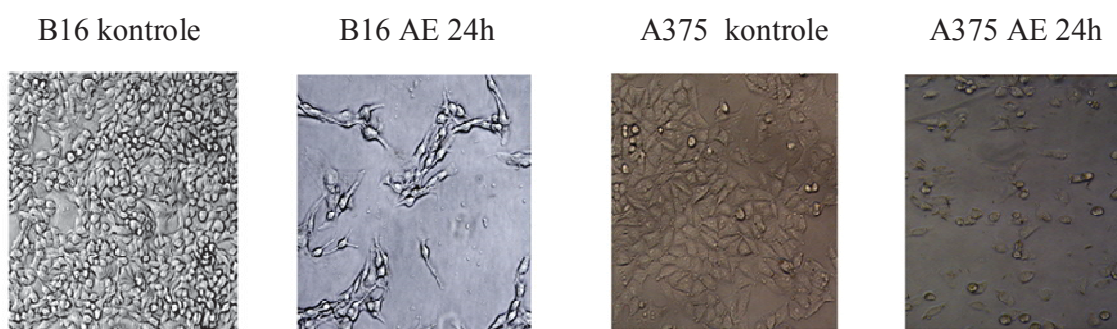


**Grafik 2. AE smanjuje rast B16 i A375 ćelija melanoma.**

B16 (A) i A375 (B) ćelije ( $1 \times 10^4$  po bunariću) su tretirane različitim koncentracijama AE-a. Kulture koje su služile kao kontrole uzgajane su u medijumu bez AE-a. Nakon 24 sata, relativan broj živih ćelija određivan je bojenjem kristal violetom.

B16 ćelije ( $1 \times 10^4$  po bunariću) su tretirane različitim koncentracijama AE-a. Kulture koje su služile kao kontrole uzgajane su u medijumu bez AE-a. Nakon 24 sata, relativan broj živih ćelija određivan je bojenjem tripan plavim (C). Broj živih ćelija u tretiranim kulturama izražen je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim (netretiranim) kulturama koji je arbitrarno uzet kao 100%. Podaci predstavljaju srednju vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke.

Kako bi se i vizuelno potvrdio pokazani efekat AE-a na B16 i A375 linijama, ćelije su tretirane 24 h pomenutom supstancom u koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  i analizirane pod svetlosnim mikroskopom (slika 4). U kulturama je detektovana redukcija broja ćelija u odnosu na kontrole, pri čemu se u B16 kulturi uočavaju sporadične plivajuće, naizgled mrtve ćelije, dok je broj ovakvih ćelija u A375 kulturi značajno veći. Takođe, na B16 ćelijama primećena je izrazita promena u obliku ali i u veličini tretiranih ćelija u odnosu na kontrole, dok je u kulturi A375 ćelija, ovakva promena izostala.



**Slika 4. AE smanjuje rast B16 i A375 ćelija melanoma.**

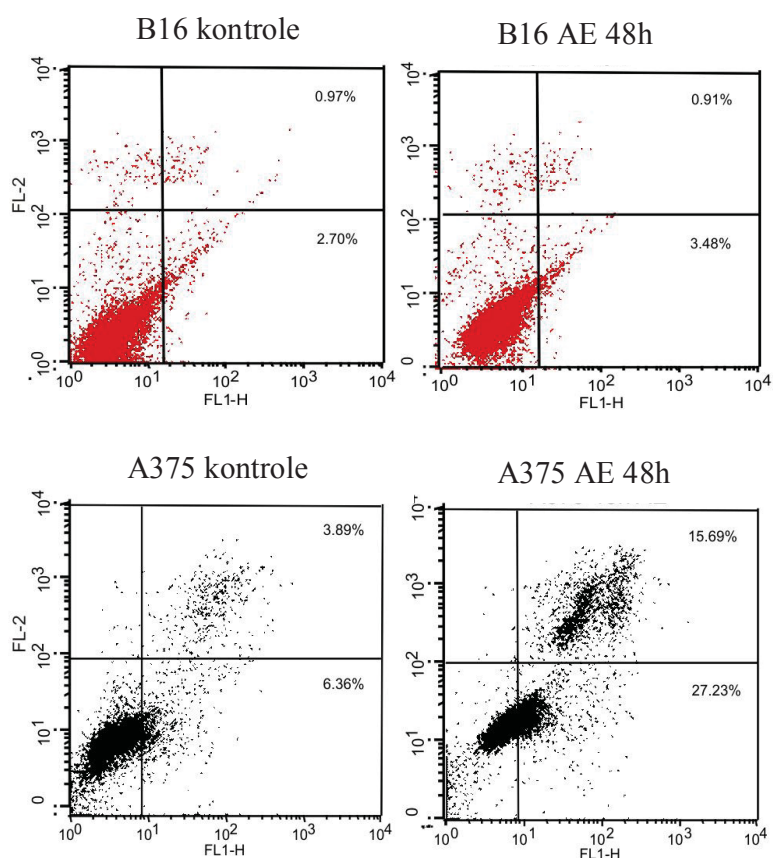
B16 (A) i A375 (B) ćelije ( $1 \times 10^4$  po bunariću) su tretirane koncentracijom AE-a od 40  $\mu\text{M}$ . Kulture koje su služile kao kontrole uzgajane su u medijumu bez AE-a. Nakon 24 sata, kulture su analizirane pod svetlosnim mikroskopom.

Podaci dobijeni na ovaj način nedvosmisleno pokazuju da pod uticajem AE-a dolazi do dozno zavisnog pada vijabilneta B16 i A375 ćelija, manifestovanog redukcijom broja ćelija u kulturama obe tumorske linije.

#### 4.1.2. Aloe emodin indukuje apoptozu A375 ali ne i B16 ćelija

Prethodni rezultati su pokazali da AE inhibira rast mišjeg i humanog melanoma u *in vitro* uslovima. Kako smanjenje broja vijabilnih ćelija može biti rezultat citotoksičnog ili citostatskog efekta ispitivane supstance, sledeći korak u analizi efekata AE-a na ćelije melanoma, bio je ispitivanje mehanizama njegovog delovanja. Najveći broj podataka u

literaturi opisuje apoptozu kao mehanizam antitumorskog delovanja AE-a (Lin i sar., 2006; Kuo i sar., 2002; Lee i sar., 2001; Lin i sar., 2010; Chiu i sar., 2009), te se u tom smislu pristupilo analizi prisustva apoptoze do koje navedena supstanca potencijalno može dovesti kod B16 i A375 ćelija. U tu svrhu korišćeno je dvostruko bojenje aneksin/propidijum jodidom. Aneksin markira izvrtanje molekula fosfatidil serina u spoljašnji sloj membrane, što je odlika rane apoptoze, dok se propidijum jodid interkalira između lanaca DNK molekula, u uslovima gde je narušen permeabilitet membrane te je moguć njegov ulazak u ćeliju, što karakteriše kasnu apoptozu (Vermes i sar., 2000).



**Grafik 3. AE indukuje apoptozu kod A375 ćelija**

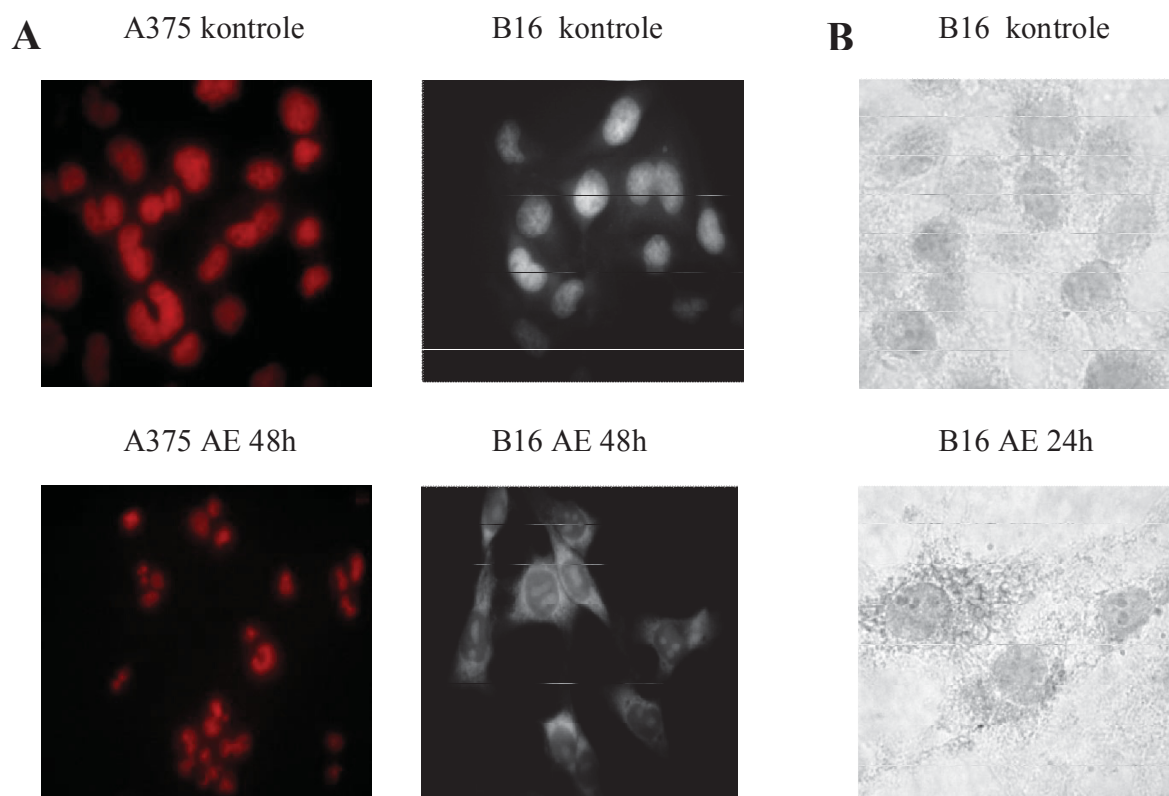
Ćelije su tretirane AE-om (40 $\mu$ M) u trajanju od 48 sati za bojenje aneksin-propidijum jodidom. Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez AE-a. Degradacija DNK i translokacija molekula fosfatidil serina je analizirana metodom protočne citofluorimetrije.

B16 i A375 ćelije su tretirane AE-om u koncentraciji od 40  $\mu\text{M}$  u trajanju od 24 h i 48 h, nakon čega su obojene aneksin/propidijum jodidom i analizirane protočnim citofluorimetrom (graf.3).

Na B16 ćelijama, analiza je u oba termina pokazala prisustvo dvostruko negativnih ćelija, dok je tretman A375 ćelija AE-om rezultirao porastom u procentu aneksin<sup>+</sup> / propidijum jodid<sup>-</sup> ćelija kao i porastom dvostruko pozitivnih ćelija 48-og sata. Detekcija dvostruko negativnih ćelija na B16 liniji ukazuje na odsustvo apoptoze nakon tretmana AE-om kod ovih ćelija. S druge strane, 48 h po tretmanu AE-om, kod A375 linije prisutne su dve populacije: ćelije u ranoj fazi apoptoze kod kojih se detektuje izvrtnje molekula fosfatidil serina i populacija ćelija kod kojih je pored pomenutog fenomena narušen i permeabilitet membrane, što ih može klasifikovati kao kasno apoptotske, sekundarno nekrotične, ali i primarno nekrotične.

Kako bi se i vizuelno ispitalo prisustvo apoptoze, B16 i A375 ćelije su tretirane AE-om 48 h, nakon čega su obojene propidijum jodidom i analizirane pod fluorescentnim mikroskopom.

Tipične morfološke karakteristike ćelija u apoptozi poput kondenzacije hromatina, formiranja apoptotskih tela i smanjenja volumena bile su jasno uočljive u kulturama A375 ćelija (slika 5A) što je nedvosmisleno ukazalo da je AE indukovao apoptozu kod ćelija humanog melanoma. S druge strane, analiza fluorescentnom mikroskopijom je u kulturi mišjeg melanoma pokazala sporadične ćelije sa kondenzovanim hromatinom (slika 5A) što sugeriše da apoptoza nije dominantan oblik aktivnosti AE-a kod B16 ćelija. Kako bi se potvrdilo da B16 ćelije nakon tretmana AE-om ne podležu apoptozi, urađen je i TUNEL test. B16 ćelije su tretirane 24 h dozom AE-a od 40 $\mu\text{M}$ , nakon čega se pristupilo detektovanju apoptoze TUNEL testom. Analiza ovako pripremljenih ćelija svetlosnom mikroskopijom, pokazala je odsustvo prekida u DNK molekulu kod B16 ćelija tretiranih AE-om, čime je potvrđeno da AE ne dovodi do apoptoze u kulturi mišjeg melanoma (slika 5B).



**Slika 5. AE indukuje apoptozu kod A375 ali ne i B16 ćelija**

A375 i B16 ćelije su tretirane AE-om ( $40\mu\text{M}$ ) u trajanju od 48 sati, obojenje propidijum jodidom i analizirane pod fluorescentnim mikroskopom. Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez AE-a (A). B16 ćelije su tretirane AE-om ( $40\mu\text{M}$ ) 24 sata za analizu TUNEL testom, dok su kontrole uzgajane u medijumu bez AE-a. Odsustvo prekida u DNK molekulu je detektovano svetlosnim mikroskopom (B).

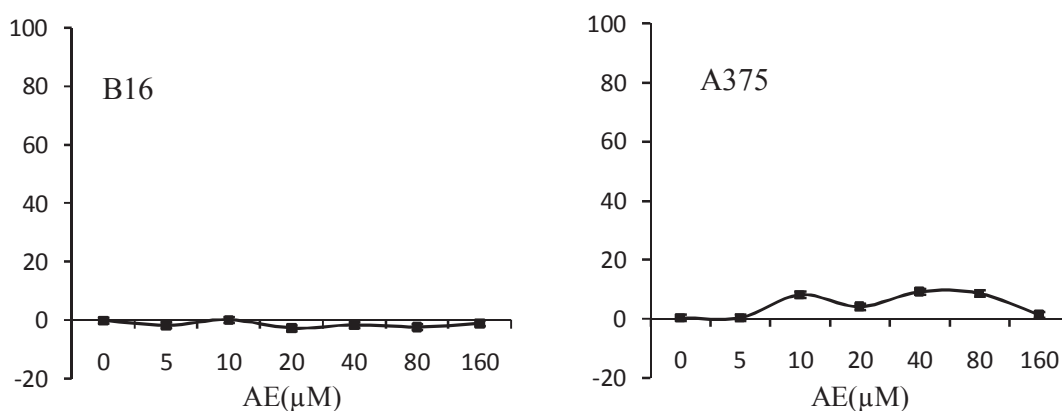
#### 4.1.3. Aloe emodin ne dovodi do nekroze ćelija melanoma

Kako je već 24h po aplikaciji AE-a detektovan pad vijabiliteta kod obe linije melanoma, a prethodni eksperimenti nisu pokazali prisustvo apoptoze u pomenutom terminu, sledeći korak bio je ispitivanje prisustva nekroze kao eventualnog mehanizma delovanja AE-a, LDH testom.

B16 i A375 ćelije su tretirane različitim dozama AE-a u trajanju od 24 sata. Nakon inkubacije ćelija u prisustvu AE-a, određivana je količina oslobođene laktat dehidrogenaze u supernatantu kultura. Kod nekrotičnih ćelija, usled narušenog permeabiliteta membrane,



dolazi do oslobađanja laktat dehidrogenaze (Giordano i sar., 2011). Detekcija pomenutog enzima u supernatantu govori o prisustvu nekroze u kulturi. Rezultati su pokazali odsustvo značajnijeg oslobađanja LDH u svim testiranim dozama primenjene supstance (graf. 4). Na ovaj način je potvrđena irelevantnost nekroze kao mehanizma kojim AE inhibira rast ćelija melanoma. Dalje, činjenica da AE nije u ispitivanom terminu indukovao nekrozu kod A375 ćelija, sugerira da je udeo primarno nekrotičnih ćelija u populaciji aneksin<sup>+</sup> / propidijum jodid<sup>+</sup> ćelija, zanemarljiv.



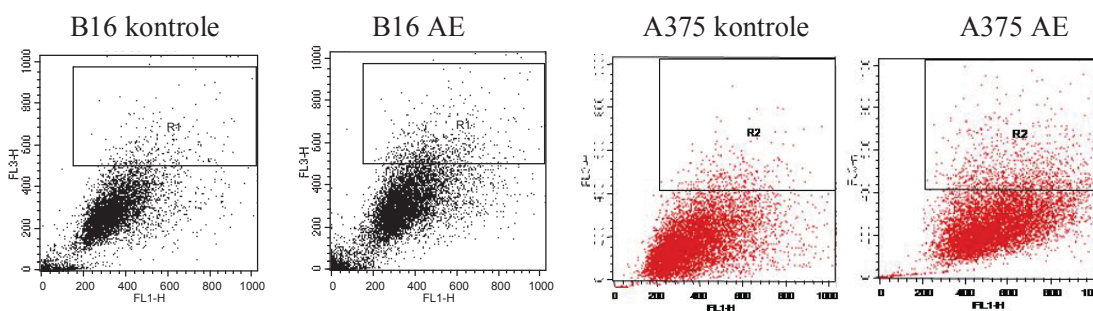
**Grafik 4. AE ne indukuje nekrozu kod ćelija melanoma**

B16 i A375 ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su različitim koncentracijama AE-a, dok je kontrolni uzorak bio bez tretmana. Nakon 24 sata mereno je oslobađanje LDH u supernatantu tretiranih i netretiranih ćelija, a broj nekrotičnih ćelija je računat primenom formule  $(E-C / T-C) \times 100$  gde je E - absorbancija tretmana, C - absorbancija netretiranih kultura, T - absorbancija koja odgovara maksimalnom (100%) otpustanju LDH kod ćelija liziranih tritonom. Rezultati reprezentativnog eksperimenta izraženi kao procenat kontrolne vrednosti su  $SV \pm SD$  triplikata kultura.

#### 4.1.4. Aloe emodin ne indukuje autofagiju ćelija melanoma

Kako se ćelijska smrt autofagijom dovodi u vezu sa citotoksičnim delovanjem AE-a (Kanzawa i sar., 2004; Mijatović i sar., 2005), pristupilo se ispitivanju eventualnog pokretanja autofagije u kulturama ćelija melanoma tretiranim AE-om.

B16 i A375 ćelije su tretirane 24 h AE-om (40 $\mu$ M), nakon čega su obojene akridin-oranžom. Akridin-oranž je supravitalna boja koja markira kisele vezikule u citoplazmi, gde se, zavisno od pH, vezikule boje narandžastim do crvenim tonovima. Morfološki markeri autofagije su upravo kisele vezikule- autofagozomi (Paglin i sar., 2001), čije se prisustvo detektuje merenjem crvene (FL3) fluorescencije na protočnom citofluorimetru. Rezultati opisanog eksperimenta su pokazali da nema značajne razlike u intenzitetu fluorescencije između tretiranih i netretiranih ćelijani kod jedne linije melanoma (graf. 5). Dobijeni podatak je sugerisao da u ćelijama melanoma AE ne intenzivira proces autofagije, a samim tim je isključena mogućnost da je opaženi pad vijabiliteta uzrokovan ćelijskom smrću autofagijom.



**Grafik 5. AE ne indukuje autofagiju kod ćelija melanoma**

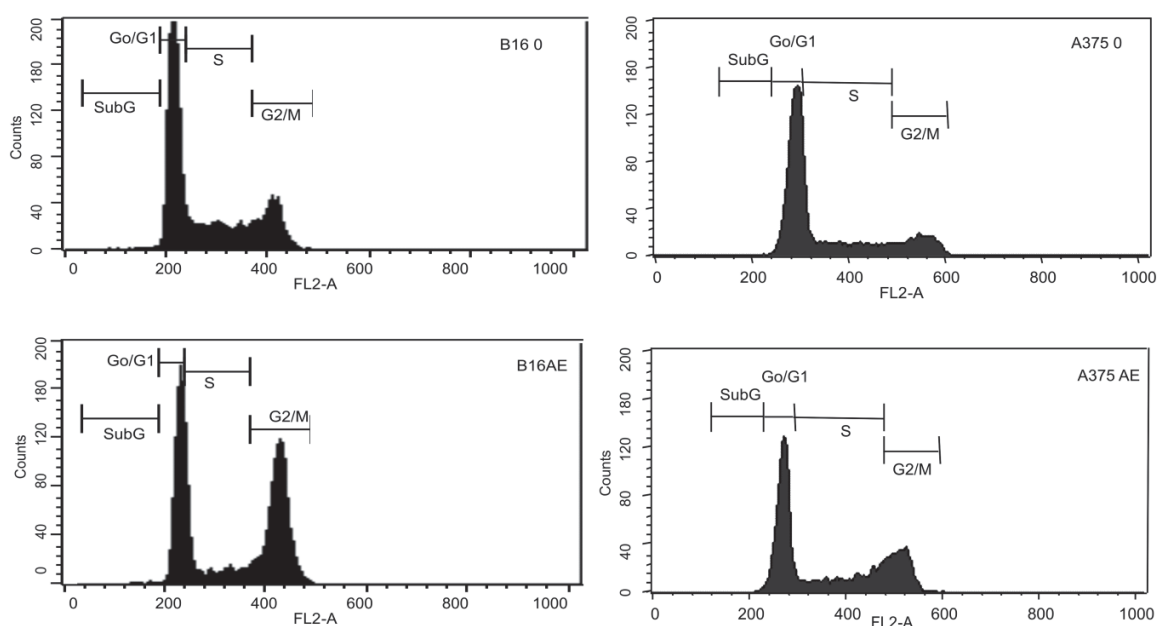
Ćelije B16 i A375 su tretirane 24 sata AE-om (40 $\mu$ M) nakon čega im je ponuđena boja akridin-oranž (1 $\mu$ g/ml). Kontrolne kulture su uzgajane bez AE-a. Protočnom citofluorimetrijom je merena fluorescencija uzoraka, koja je potom analizirana CellQuest programom

#### 4.1.5. Aloe emodin indukuje zastoje ćelija melanoma u G2/M fazi ćelijskog ciklusa

Kako je prethodnim eksperimentima isključen citotoksični efekat AE-a na liniji mišjeg melanoma, ali i pokazano da apoptoza kod A375 ćelija nastupa tek 48-og sata po primeni analizirane supstance, pretpostavljeno je da je u osnovi pada vijabiliteta detektovanog

nakon 24 h zadržavanje ćelija u nekoj od faza ćelijskog ciklusa. U tom cilju, urađena je analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

B16 i A375 ćelije su tretirane dozom AE-a od 40  $\mu$ M u trajanju od 24 h. Po isteku inkubacije, ćelije su pripremljene za analizu distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa koja je sprovedena metodom protočne citofluorimetrije. Kod obe tumorske linije detektovano je zadržavanje ćelija u G2/M fazi, pri čemu je ono bilo izraženije kod B16 linije (graf. 6). Takođe, analiza je pokazala i odsustvo ćelija u sub G fazi, odnosno ćelija sa fragmentisanim DNK materijalom. Kako je fragmentacija DNK molekula karakteristika kasne faze apoptoze (Okada i Mak, 2004), dobijeni rezultat korelira sa prethodno pokazanim izostankom apoptoze 24-og sata kod obe linije melanoma tretirane AE-om.



**Grafik 6. Uticaj AE-a na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.**

B16 i A375 ćelije su tretirane AE-om (40 $\mu$ M) 24 sata; kontrolne kulture su uzgajane bez tretmana. Nakon bojenja propidijum jodidom (10  $\mu$ g/ml) distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je analizirana metodom protočne citofluorimetrije.

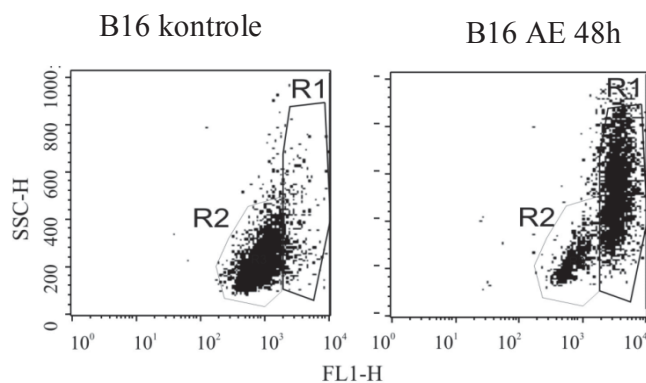
Opisani eksperiment je pokazao da AE dovodi do akumulacije ćelija melanoma u G2/M fazi, što je događaj koji prethodi pokrenutoj apoptozi kod A375 ćelija, ali je i nametnuo

potrebu za istraživanjem posledica opisanog zastoja u ćelijskom ciklusu kod B16 ćelija. Takođe, kako ćelije u G2/M fazi imaju udvostručen DNK materijal, izraženi G2/M blok u B16 kulturi objašnjava nemogućnost da se CV testom detektuje pad vijabiliteta kod ovih ćelija.

#### 4.1.6. Aloe emodin indukuje transformaciju B16 ćelija praćenu gubitkom proliferativnih svojstava

##### 4.1.6.1. Aloe emodin inhibira proliferaciju B16 ćelija

Dobijeni rezultati o tome da AE indukuje zastoj ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa koji nije praćen ćelijskom smrću B16 ćelija, kako slučajnom tako ni programiranom, ukazali su da je inhibicija proliferacije B16 ćelija verovatno odgovorna za zapaženi pad vijabiliteta. U cilju ispitivanja efekata AE-a na proliferativni kapacitet B16 ćelija, one su bojene CFSE bojom i tretirane AE-om (40µM) u trajanju od 48 h. Po isteku vremena kultivacije, urađena je analiza protočnom citofluorimetrijom (graf. 7).



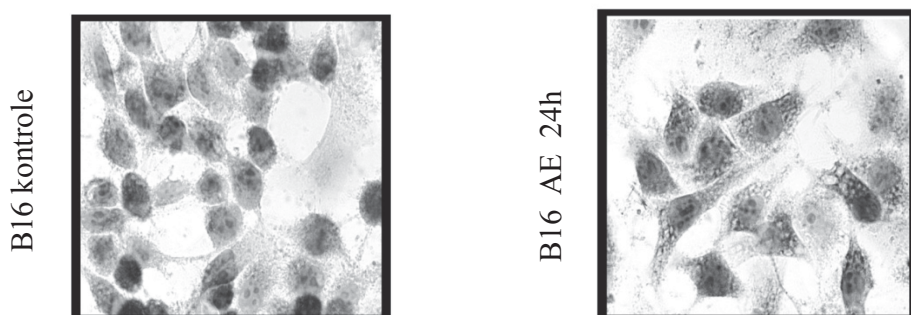
**Grafik 7. AE inhibira proliferaciju kod B16 ćelija**

Kulturama B16 ćelija je najpre ponuđena CFSE boja (1.5µM), nakon čega su tretirane 48 sati AE-om (40µM), dok su kontrole uzgajane bez tretmana. Intenzitet fluorescencije CFSE po ćeliji, obrnuto srazmeran broju ćelijskih deoba, meren je protočnom citofluorimetrijom. R1 odeljak predstavlja nepodeljenu ćelijsku populaciju, dok R2 pretstavlja ćelije nakon prve deobe.

U poređenju sa kontrolama, procenat podeljenih ćelija kod ćelija tretiranih AE-om bio je značajno manji (95% kod netretiranih ćelija u odnosu na 15% kod tretiranih ćelija). Ovakav podatak nedvosmisleno pokazuje da je za redukciju broja B16 ćelija pod tretmanom AE-om, odgovorna blokada proliferacije indukovana pomenutom supstancom.

#### 4.1.6.2. Aloe emodin indukuje diferencijaciju B16 ćelija

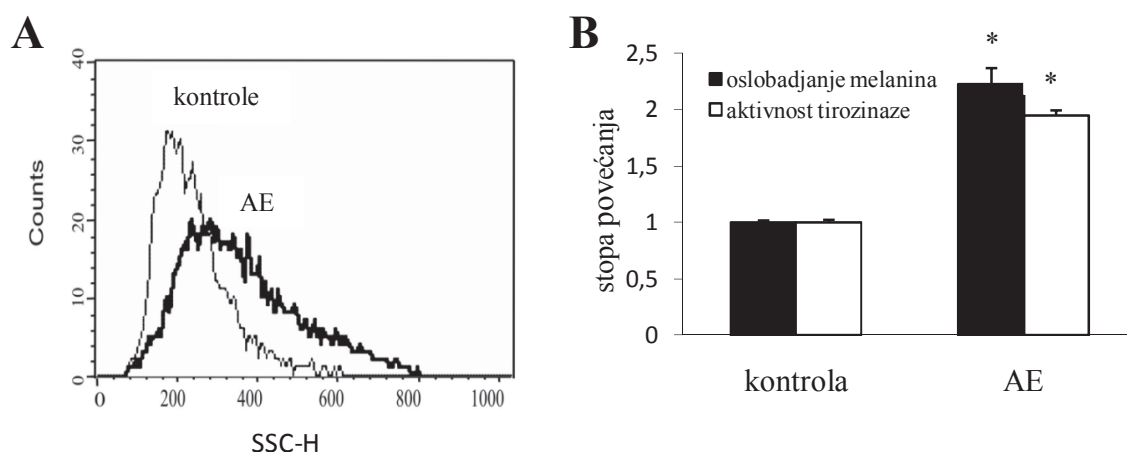
Kako je prethodno pomenuto, tretman B16 tumorske linije AE-om, izazvao je morfološku promenu ovih ćelija. U poređenju sa netretiranim ćelijama koje su imale poligonalnu formu, ćelije inkubirane u prisustvu pomenute supstance zadobile su asimetričan oblik, povećan volumen citoplazme, ali i membranske izraštaje nalik na dendrite (slika 6). Kako je poznato da diferencijaciju melanocita karakterišu pomenute promene, a podaci u literaturi ukazuju da je, pored ćelijske smrti, jedan od mogućih ishoda zaustavljanja ćelija u G2/M fazi njihova diferencijacija (Xiao i sar., 2007; Guo i sar., 2007), pretpostavljeno je da AE indukuje diferencijaciju B16 ćelija ka njihovom izvornom fenotipu-melanocitima.



**Slika 6. AE indukuje diferencijaciju B16 ćelija**

Nakon 24 sata inkubacije u prisustvu ili odsustvu (kontrola) AE-a (40 $\mu$ M), svetlosnim mikroskopom je analizirana morfologija B16 ćelija

Da bi se utrdilo da li morfološka transformacija korelira sa fenotipskim promenama, B16 ćelije tretirane sa 40 $\mu$ M AE-om tokom 24 h, analizirane su protočnim citofluorimetrom. Rezultati su pokazali povećanu granuliranost u citoplazmi ćelija po tretmanu AE-om (graf. 8A). U cilju detekcije eventualnih biohemijskih promena ove ćelijske populacije, B16 ćelije su inkubirane 24 h u prisustvu AE-a (40  $\mu$ M) nakon čega je određivana količina melanina prisutnog u ćelijama, kao i aktivnost tirozinaze, ključnog enzima u procesu melanogeneze. U poređenju sa kontrolama, količina oslobođenog melanina iz liziranih ćelija bila je značajno uvećana kod kultura tretiranih 24 h AE-om (graf. 8B). Dalje, merenjem oksidacije L – DOPA, pokazano je da je tretman AE-om indukovao dvostruko povećanje aktivnosti tirozinaze (graf. 8B). Ovi podaci jasno ukazuju da je AE kod ćelija mišjeg melanoma pokrenuo proces diferencijacije u pravcu melanocita.



**Grafik 8. AE indukuje diferencijaciju B16 ćelija**

B16 ćelije su inkubirane 24 sata u prisustvu ili odsustvu (kontrola) AE-a (40 $\mu$ M) nakon čega je (A) protočnom citofluorimetrijom ispitivana granuliranost citoplazme i (B) merenjem absorbance određivana aktivnost tirozinaze i količina melanina. Rezultati reprezentativnog eksperimenta izraženi kao procenat kontrolne vrednosti su  $SV \pm SD$  triplikata kultura. (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

#### 4.1.6.3. Aloe emodin indukuje permanentne promene B16 ćelija

Pošto je pokazano da AE dovodi do zastoja u ćelijskom ciklusu praćenog diferencijacijom B16 ćelija *in vitro*, naredni eksperimenti imali su za cilj utvrđivanje postojanosti indukovanih promena kao i kapacitet takvih ćelija da generišu tumor u singenim životinjama soja C57BL/6. B16 ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu AE-a tokom 24 h, nakon čega je urađena analiza ćelijskog ciklusa protočnom citofluorimetrijom. Distribucija ćelija je pokazala da je saglasna sa prethodnim rezultatima - oko 50% tretiranih ćelija zaustavljeno je u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Ćelije su pripremljene za *in vivo* davanje i injecirane subkutano u C57BL/6 miševе (5 x 10<sup>5</sup> s.c. po životinji). Rast tumora je ispitivan svakog drugog dana počevši od desetog dana po inokulaciji. Nakon 30 dana životinje su žrtvovane, a tumori izmereni (tabela 1). U poređenju sa životinjama koje su primile netretirane B16 ćelije (12 životinja u grupi), a kod kojih su tumori uočeni četrnaestog dana, kod životinja koje su inokulirane ćelijama tretiranim AE-om (12 životinja u grupi) uočena je kasnija pojava tumora (24 dan). Takođe, kod ovih životinja je veličina tumora statistički značajno smanjena. Naime, kod izvesnog broja životinja, tumori su ostali na nivou inokuluma. Dalje, dok je u kontrolnoj grupi stopa mortaliteta iznosila 30%, životinje koje su primile B16 ćelije pretretirane AE-om, preživele su tokom 30 dana posmatranja. Dobijeni podaci nedvosmisleno ukazuju da AE dovodi do permanentnih promena kod B16 ćelija koje značajno smanjuju njihov maligni potencijal.

Grupa	Dan pojave tumora	Volumen tumora	Stopa mortaliteta
B16	14 ± 1	1.5 ± 0.71	30%
AE- B16	24 ± 4*	0.4 ± 0.36*	0%*

**Tabela 1. B16 ćelije tretirane AE-om nisu generisale tumore kod C57BL/6 miševa**

Tumori su izmereni i zapremine su izračunate na način opisan u "Materijal i Metode". (\* $p < 0,05$  označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

#### 4.1.7. Unutarćelijski odgovor ćelija melanoma na tretman Aloe emodinom

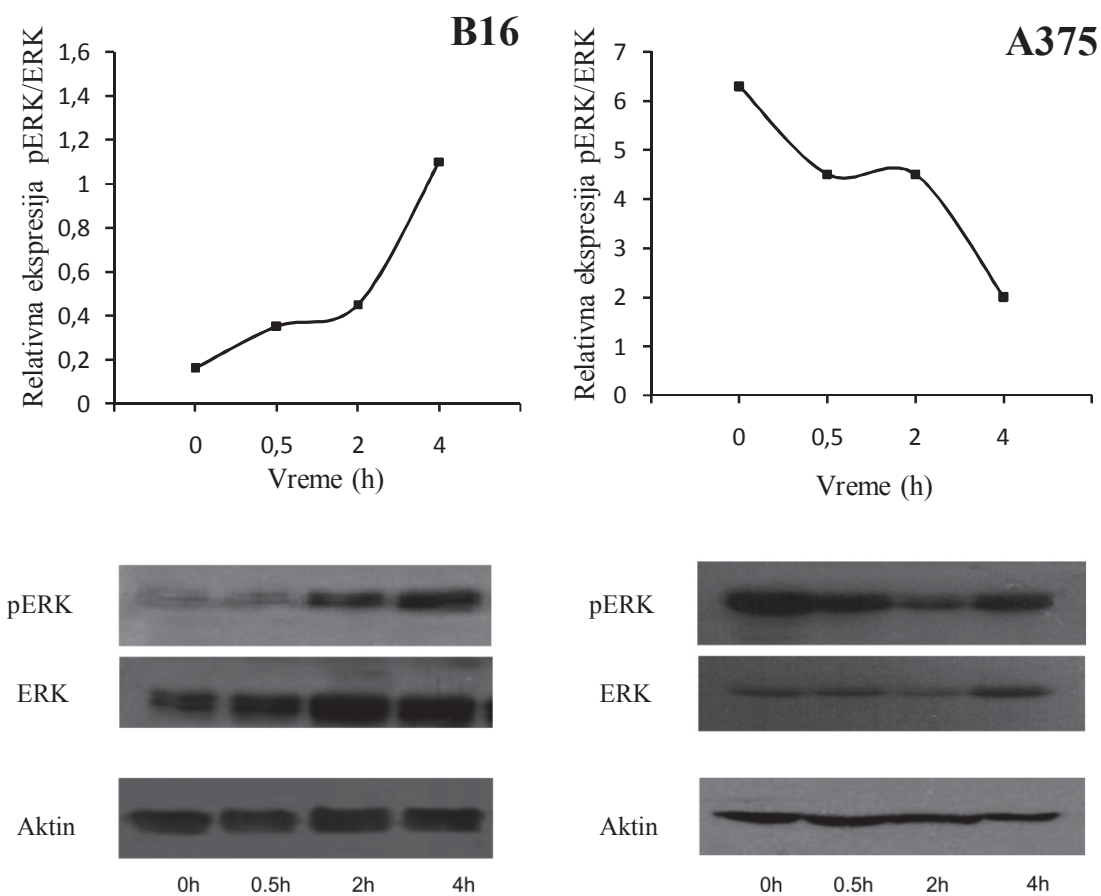
Pošto je pokazano da AE dovodi do diferencijacije B16 ćelija dok, s druge strane, indukuje apoptozu A375 ćelija, naredni eksperimenti su imali za cilj utvrđivanje unutarćelijskih promena indukovanih AE-om koje su eventualno odgovorne za drugačiji ishod AE primene kod dva tipa melanoma.

##### 4.1.7.1. Aloe emodin utiče na MAPK signalni put

Kako je poznato da je kod humanog melanoma ERK1/2 prekomerno aktiviran (Gray-Schopfer i sar., 2007), dok je kod mišjeg melanoma prisutna niska aktivnost pomenutog proteina (Melnikova i sar., 2004), prvi korak u analizi unutarćelijskog odgovora na tretman AE-om bio je ispitivanje promena u ekspresiji ERK1/2 molekula kod dve različite linije melanoma. B16 i A375 ćelije su inkubirane 30 minuta, 2 h, 4 h i 24 h u prisustvu 40  $\mu$ M AE-a nakon čega se pristupilo Western blot analizi. Aktivacija ERK1/2 proteina je određivana kao odnos aktivirane, fosforilisane forme, prema ukupnoj količini relevantnog proteina (graf. 9). Rezultati su pokazali da kod B16 ćelija tretiranih AE-om dolazi do kontinuiranog povećanja aktivnosti ERK1/2, vidljivog već posle 30 minuta tretmana. S druge strane, kod A375 ćelija, AE negativno reguliše aktivaciju ovog proteina, te ona kontinuirano opada od 30-og minuta tretmana AE-om. Kako je u literaturi opisano da je indukcija permanentne aktivacije ERK1/2 vezana za diferencijaciju (von Kriegsheim i sar., 2009), rezultati dobijeni na B16 ćelijama koreliraju sa pokazanom diferencijacijom kod ovih ćelija indukovanom AE-om. S druge strane, kod humanog melanoma se prekomerna aktivnost ERK1/2 dovodi u vezu sa proliferacijom, preživljavanjem ćelija i rastom tumora (Gray-Schopfer i sar., 2007), pa bi pokazani pad aktivnosti ERK1/2 indukovani AE-om mogao biti uzrok ili posledica započete apoptoze.

Dobijeni rezultati pokazuju da je tretman AE-om kod dve analizirane linije melanoma različito regulisao ekspresiju ERK1/2 signalnog molekula.





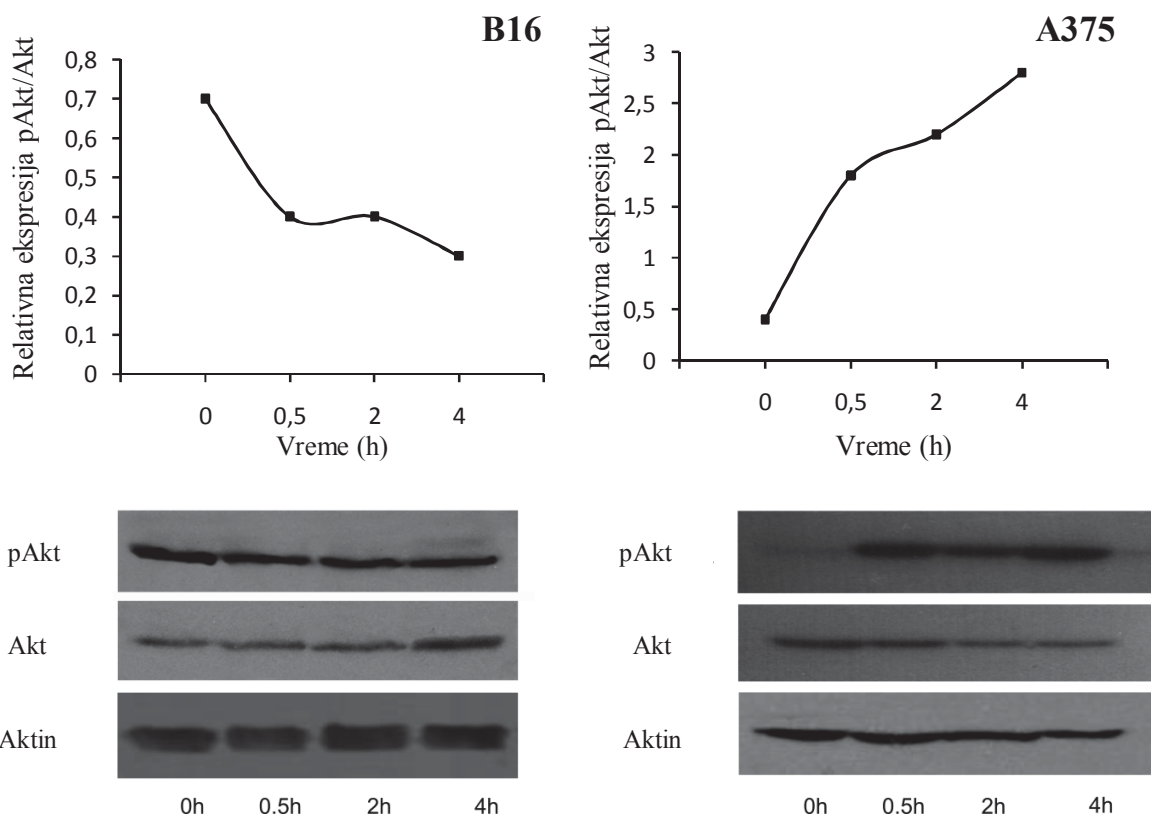
**Grafik 9. AE različito reguliše ERK1/2 ekspresiju kod dve linije melanoma**

B16 i A375 ćelije su inkubirane 24 sata u prisustvu ili odsustvu (kontrola) AE-a ( $40\mu\text{M}$ ) nakon čega je ekspresija ERK1/2 analizirana Western blot metodom.

#### 4.1.7.2. Aloe emodin deluje na PI3K signalni put

Prisustvo funkcionalnog PTEN proteina kod ćelija mišjeg melanoma, odnosno njegovo odsustvo kod ćelija humanog melanoma (Melnikova i sar., 2004), ukazuje na mogući značaj PI3K signalnog puta u različitom odgovoru ove dve linije na tretman AE-om. Tako je nametnuta potreba da se analizira uticaj AE-a na ekspresiju Akt-a, ključnog molekula PI3K puta, kod obe ispitivane linije melanoma. Nakon 30 minuta, 2 h, 4 h i 24 h inkubacije B16 i A375 ćelija u prisustvu  $40\mu\text{M}$  AE-a, pristupilo se Western blot analizi. Aktivacija

Akt-a je određivana kao odnos aktiviranog, fosforilisanog oblika proteina na poziciji Ser473, prema ukupnoj količini relevantnog proteina.



**Grafik 10. AE različito reguliše ekspresiju Akt kod B16 i A375 ćelija**

B16 i A375 ćelije su inkubirane u definisanom vremenu u prisustvu ili odsustvu (kontrole) AE-a (40 $\mu$ M) nakon čega je ekspresija p-Akt-a analizirana Western blot metodom.

Rezultati su pokazali da kod B16 ćelija tretiranih AE-om dolazi do kontinuiranog smanjenja aktivacije Akt-a, dok kod A375 ćelija, već 30 minuta nakon aplikacije, AE dovodi do kontinuirane aktivacije Akt-a (graf. 10). Iz literature je poznato da je aktivacija Akt-a vezana za prekomernu proliferaciju tumora te je rezultat dobijen na B16 ćelijama u skladu sa pokazanim zaustavljanjem proliferacije ovih ćelija, indukovanim AE-om. Dalje,

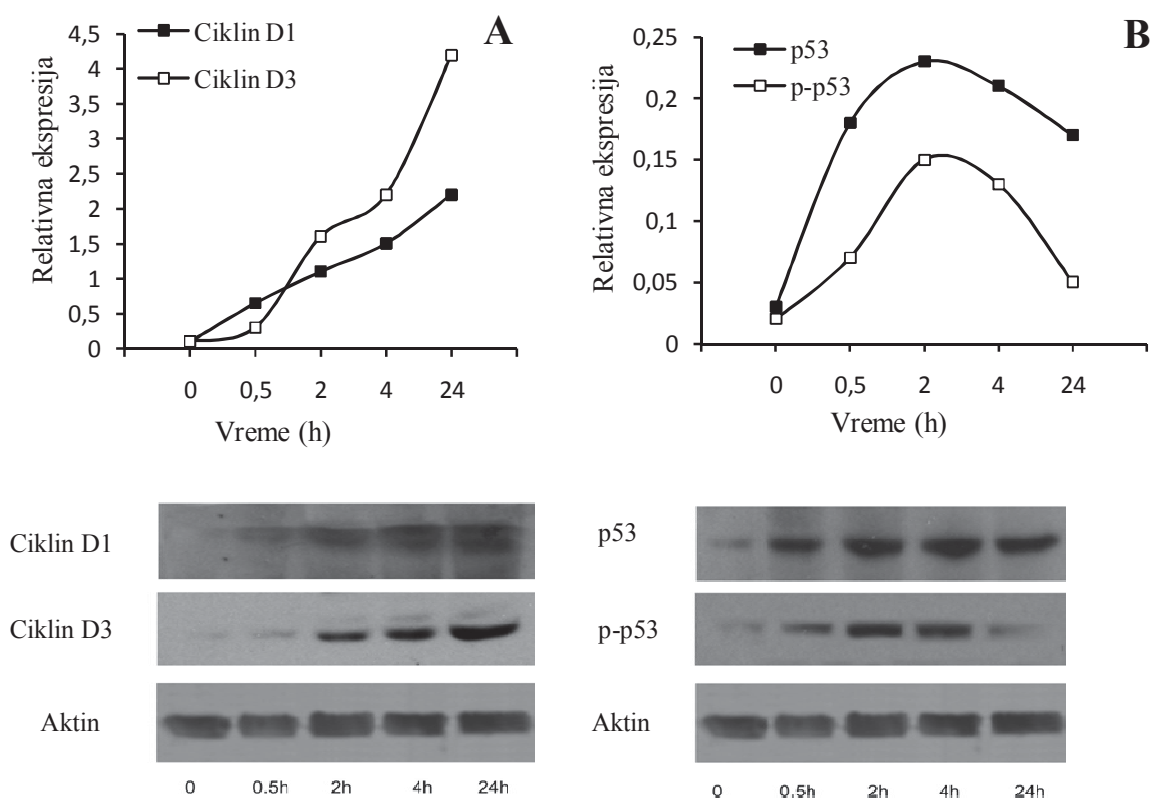
kako je aktivirani Akt opisan kao molekul koji inhibira apoptozu (Kim i sar., 2006.), njegova aktivacija 24-og sata, uslovljena AE-om kod A375 ćelija, mogla bi predstavljati pokušaj ćelije da se spase. Rezultati ovog, kao i prethodnog eksperimenta pokazuju da AE različito reguliše aktivaciju Akt signalnog molekula kod dve linije melanoma, ali i da je Akt/ ERK1/2 aktivacija recipročno regulisana kod ispitivanih linija.

#### 4.1.7.3. Aloe emodin pozitivno reguliše ekspresiju molekula relevantnih za proces diferencijacije B16 ćelija

Pošto je pokazano da AE dovodi do zastoja u ćelijskom ciklusu praćenog diferencijacijom B16 ćelija, sledeći korak u analizi efekata AE-a na unutarćelijske događaje kod mišjeg melanoma, bio je analiza molekula koji su u literaturi opisani kao učesnici u diferencijaciji: ciklina D1 i ciklina D3. Poznato je da porast u ekspresiji D1 ciklina negativno reguliše ulazak ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa (Alao, 2007), što ostavlja ćeliji vreme potrebno za eventualnu reparaciju DNK molekula, neophodnu za preživljavanje i/ili diferencijaciju ćelije. Takođe, sugerisana je uloga D3 ciklina u diferencijaciji HL-60 ćelija, kao i u promovisanju, a verovatno i održavanju terminalne diferencijacije kod brojnih mišjih i humanih ćelija (Bartkova i sar., 1998.; Beumer i sar., 2000.; Despouy i sar., 2003). B16 ćelije su inkubirane 30 minuta, 2 h, 4 h i 24 h u prisustvu 40  $\mu$ M AE-a nakon čega je analizirana ekspresija D1 i D3 ciklina. Rezultati Western blot analize su pokazali da kod B16 ćelija tretiranih AE-om, već posle 30 minuta dolazi do kontinuiranog povećanja u ekspresiji D1 i D3 ciklina, što sugerise njihovu moguću ulogu u diferencijaciji ćelija mišjeg melanoma (graf. 11A).

Dalje, kako je opisana uloga tumor supresor proteina, p53, u procesu diferencijacije (Poluha i sar., 1997, Eizenberg i sar., 1996, Murray- Zmijewski i sar., 2006), pristupilo se analizi nivoa p53 proteina kod B16 ćelija tretiranih AE-om (40  $\mu$ M) u trajanju od 30 minuta, 2h, 4h i 24h. Budući da je fosforilacija p53 na serinu na poziciji 20 mehanizam kojim ćelija stabilizuje prisutan p53 protein, čime omogućava njegovu brzu akumulaciju, analiziran je nivo ukupnog p53, ali i p53 proteina fosforilisanog na Ser20. Western blot

analiza je pokazala da je već nakon 30 minuta po tretmanu AE-om došlo do porasta u koncentraciji ovih proteina, što je rezultat koji ukazuje da tretman AE-om usporava degradaciju Ser20p-p53 u vremenski definisanom okviru (nakon 2h nivo ispitivanih proteina opada) što se odražava i na prolazni porast u koncentraciji ukupnog p53 (graf. 11B).

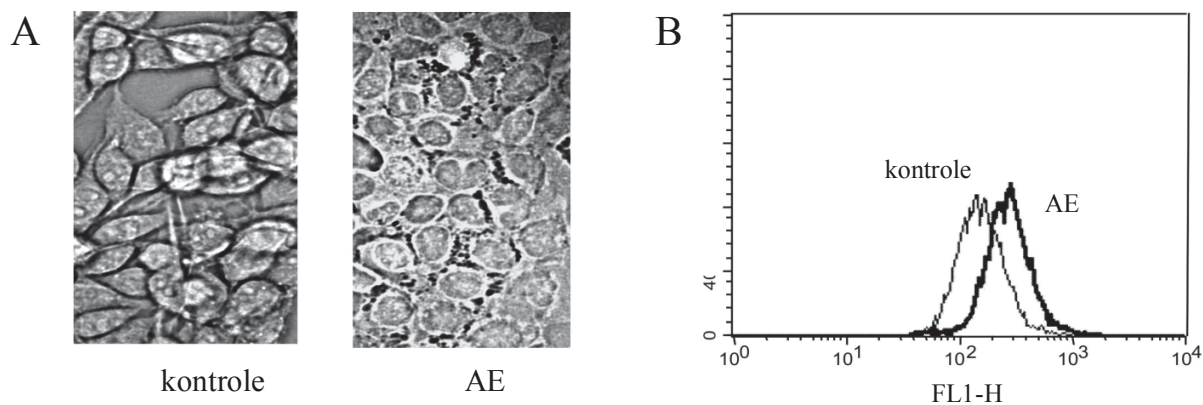


**Grafik 11. Efekat AE-a na molekule relevantne za proces diferencijacije**

B16 ćelije su inkubirane u definisanom vremenu u prisustvu ili odsustvu (kontrola) AE-a (40 $\mu$ M) nakon čega je ekspresija ciklina D1, ciklina D3 (A), p53 i p-p53 (B) analizirana Western blot metodom.

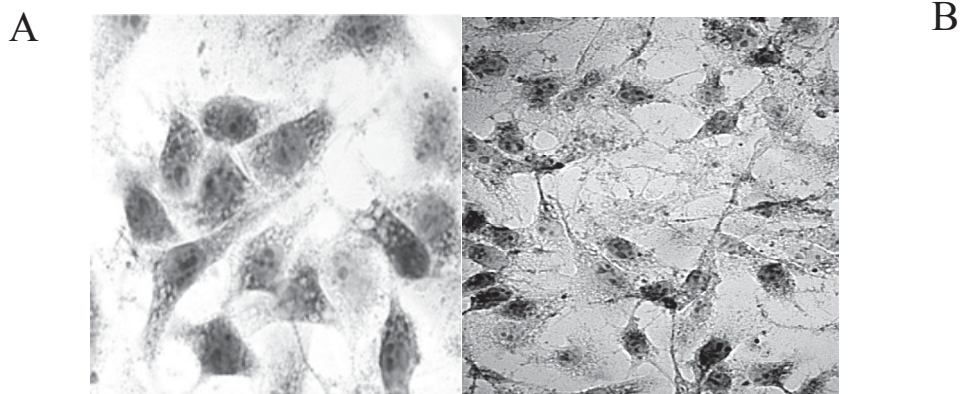
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je molekul sa potvrđenom ulogom u diferencijaciji različitih ćelija (Xiao i sar., 2009.; Steinbeck i sar, 1998.; Kang i sar., 2003.). Kako je poznato da AE indukuje oksidativni stres (Lu i sar., 2007), cilj narednih eksperimenata je bio utvrđivanje uticaja AE-a na

produkciju  $H_2O_2$ . B16 ćelije su tretirane  $40 \mu M$  AE-om i odmah potom je u kulturu dodat DAB, molekul koji u prisustvu  $H_2O_2$  oksiduje dajući tamno braon precipitate (Wilhelm i sar., 2009). Analiza svetlosnim mikroskopom, ovako pripremljenih kultura, je već nakon 5 minuta po tretmanu, pokazala prisustvo tamnih precipitata što je ukazalo na brzu produkciju  $H_2O_2$  kod B16 ćelija po dodavanju AE-a (slika 7A). Kako bi se odredio nivo proizvedenog  $H_2O_2$ , B16 ćelije su obojene CM- $H_2$ DCFDA i tretirane u određenim vremenskim intervalima AE-om ( $40 \mu M$ ). Deacetilovana forma CM- $H_2$ DCFDA ostaje zarobljena u ćeliji i biva oksidovana sa  $H_2O_2$  u fluorescentan DCFDA (Lu i sar., 2007) koji se detektuje protočnim citofluorimetrom. Rezultati koreliraju sa prethodnim, naime, već 5 minuta po aplikaciji AE-a, došlo je do povećanja produkcije  $H_2O_2$  za 50% (slika 7B). Kako bi se ispitao značaj pokazane produkcije  $H_2O_2$  u diferencijaciji B16 ćelija, kulture su tretirane ovim molekulom ( $0,5 \mu M$ ) u trajanju od 24 h i analizirane svetlosnom mikroskopijom. Analiza je pokazala da je  $H_2O_2$  doveo do promena u morfologiji ovih ćelija, na sličan način kao i AE (slika 8). Na osnovu dobijenih podataka, veruje se da je diferencijacija B16 ćelija indukovana AE-om posledica prekomerne produkcije  $H_2O_2$  molekula.



**Slika 7. AE indukuje prekomernu produkciju  $H_2O_2$  molekula kod B16 ćelija**

B16 ćelije su obojene DAB i  $H_2$ DCFDA i tretirane AE-om ( $40 \mu M$ ) u trajanju od 15 min. (A) Prisustvo tamnih precipitata u citoplazmi DAB obojenih ćelija, analizirano svetlosnim mikroskopom, (B) Produkcija  $H_2O_2$  kod  $H_2$ DCFDA obojenih ćelija, merena protočnom citofluorimetrijom.

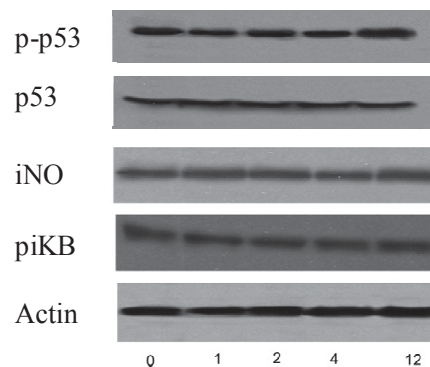
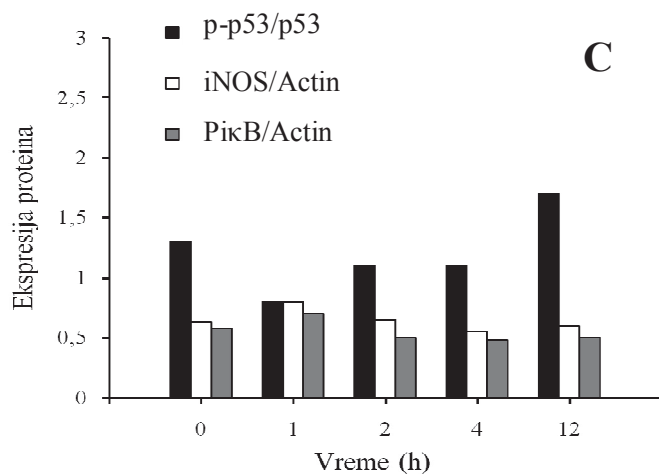
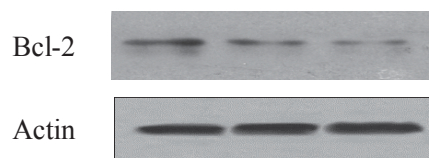
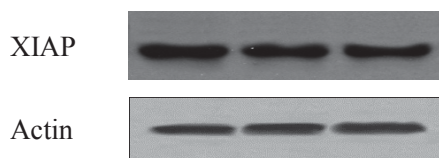
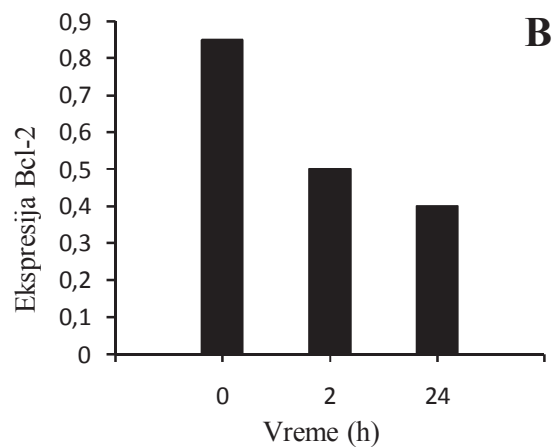
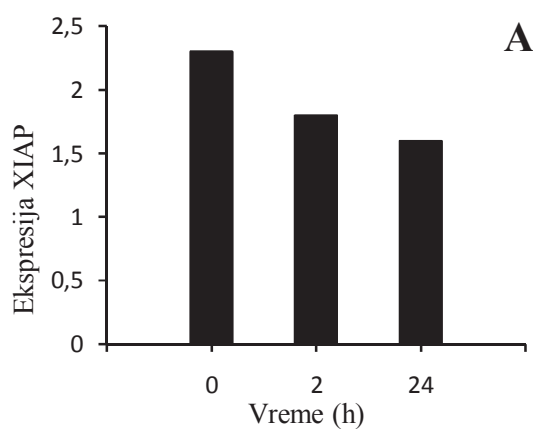


**Slika 8. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukuje promene u morfologiji B16 ćelija na sličan način kao i AE**

Nakon 24 sata inkubacije u prisustvu AE-a (40μM) (A) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5μM) (B) analizirana je morfologija B16 ćelija

#### 4.1.7.4. Aloe emodin utiče na ekspresiju molekula relevantnih za indukciju apoptoze A375 ćelija

Poznato je da endogeni NO, kod tumora neosetljivih na ovaj molekul, učestvuje u promovisanju rasta tumora mehanizmom koji uključuje inhibiciju apoptoze (Mijatović i sar., 2004), kao i to da je ekspresija iNOS-a kod iNOS pozitivnog melanoma asocirana sa pojačanom otpornošću na terapiju i lošijom prognozom bolesti nego u slučaju iNOS negativnog melanoma (Ekmekcioglu i sar., 2000). Kako je tretman AE-om, kod iNOS pozitivnih, A375 ćelije pokrenuo apoptozu, bilo je zanimljivo utvrditi da li je ovakav njegov efekat vezan za smanjenje ekspresije iNOS-a. Ćelije humanog melanoma su tretirane AE-om (40μM) u trajanju od 1h, 2h, 4h, 12h i 24h nakon čega je urađena Western blot analiza kako bi se detektovao nivo iNOS-a, ali i nivo pIκB, inhibitorne subjediniце NFκB, molekula koji reguliše transkripciju iNOS gena. Rezultati su pokazali da nema promene u koncentraciji ispitivanih proteina ni u jednom analiziranom terminu kod ćelija humanog melanoma tretiranih AE-om, što sugerije da smanjenje produkcije NO-a nije uzrok apoptoze indukovane AE-om kod A375 ćelija (graf. 12C).



**Grafik 12. Uticaj AE-a na molekule relevantne za indukciju apoptoze**

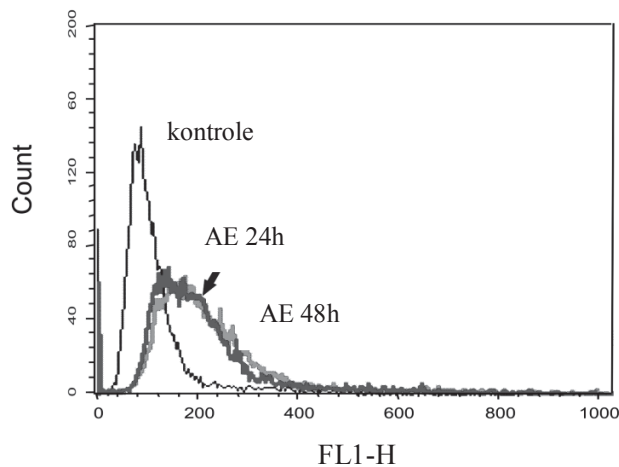
A375 ćelije su inkubirane u definisanom vremenu u prisustvu ili odsustvu (kontrola) AE-a (40 $\mu$ M) nakon čega je ekspresija XIAP (A), Bcl-2 (B), p53, p-p53, iNOS i PikB (C) i analizirana Western blot metodom.

Sledeći korak u analizi unutarćelijskih promena kod A375 ćelija tretiranih AE-om bio je Western blot analiza nivoa antiapoptotskih, protektivnih ćelijskih proteina. X-vezani inhibitor apoptoze ( engl. *X-linked inhibitor of apoptosis* - XIAP) je potentan inhibitor apoptoze koji je prekomerno eksprimiran kod malignih melanoma čime se delom objašnjava izrazita rezistencija ovih tumora na hemioterapiju (Kluger i sar., 2006), stoga je cilj narednih eksperimenata bio da se analizira ekspresija ovog molekula nakon tretmana A375 ćelija AE-om. Ćelije su izložene AE-u (40  $\mu$ M) u trajanju od 2 h, 4 h i 24 h nakon čega je urađena Western blot analiza.

Rezultati su pokazali da je tretman AE-om već od drugog sata tretmana, doveo do umerenog smanjenja nivoa XIAP-a kod A375 ćelija (graf. 12A). Paralelno, u istim uzorcima, praćena je promena nivoa još jednog antiapoptotskog molekula- Bcl-2. Western blot analizom je nakon 2 h detektovan skoro dvostruki pad u koncentraciji ovog proteina, kao i kontinuirano smanjenje njegove ekspresije prema kraju tretmana kod ćelija humanog melanoma tretiranih AE-om (graf. 12B). Kako je transkripcija Bcl-2 molekula regulisana p53 proteinom, bilo je interesantno ispitati eventualne promene u nivou p53 proteina. A375 ćelije su tretirane AE-om (40  $\mu$ M) u trajanju od 2 h, 4 h i 24 h nakon čega je urađena Western blot analiza. Pokazano je da kod A375 ćelija ne dolazi do promene u ekspresiji p53 ukupnog, kao ni p53 proteina fosforilisanog na serinu na poziciji 20 pod dejstvom AE-a, što ukazuje da je indukovana apoptoza kod ovih ćelija, nezavisna od p53 molekula (graf. 12C).

U pokušaju da se otkrije da li je detektovana apoptoza A375 ćelija zavisna od aktivacije kaspaza, A375 ćelije su inkubirane u prisustvu AE-a (40  $\mu$ M), nakon čega su obojene apostat bojom i uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru. Rezultati su pokazali da tretman AE-om dovodi do aktivacije kaspaza, što ukazuje da je apoptoza A375 ćelija, indukovana AE-om, posredovana aktivacijom kaspaza (graf. 13).





**Grafik 13. AE indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza kod A375 ćelija**

A375 ćelije su inkubirane 24 i 48 sati u prisustvu AE-a (40 $\mu$ M) ili u njegovom odsustvu (kontrola) nakon čega je protočnom citofluorimetrijom ispitivana aktivnost kaspaza.

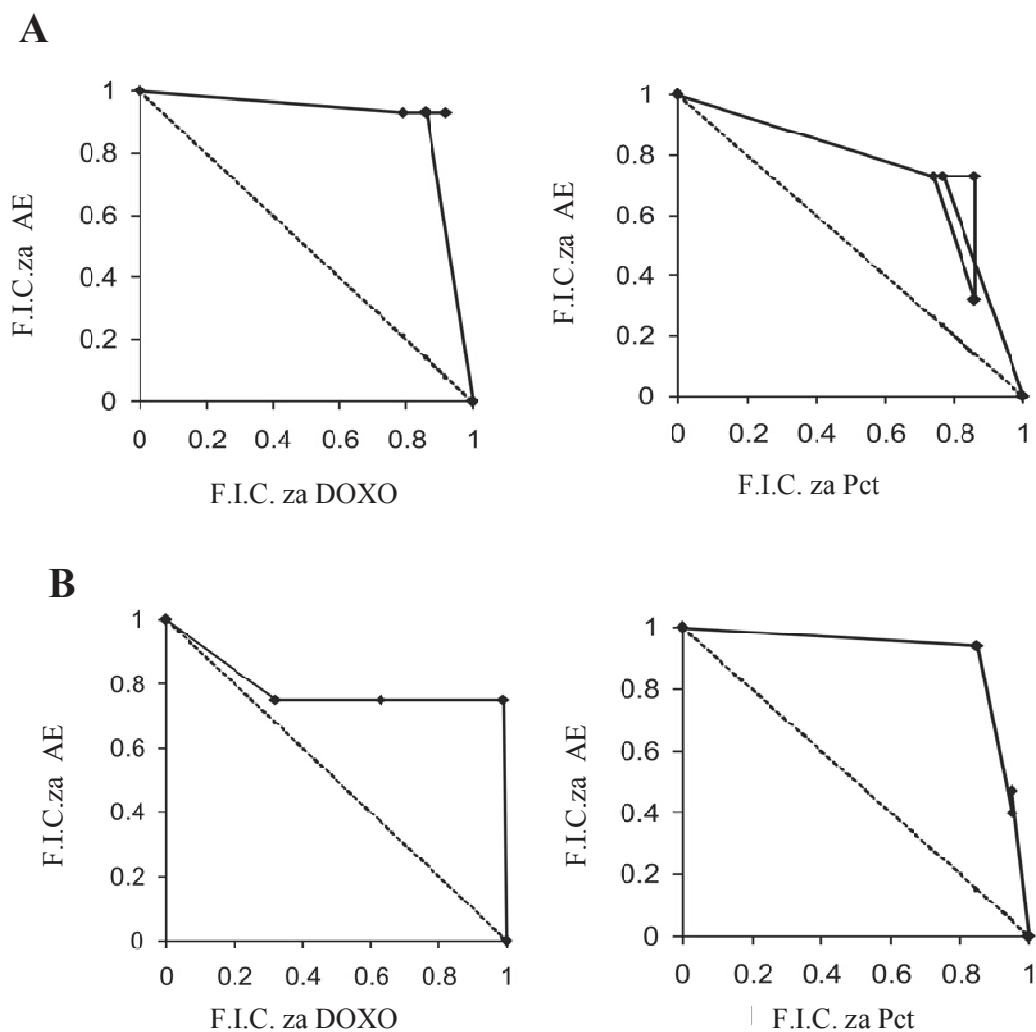
## 4.2. Indirektni efekti AE na B16 i A375 ćelije

### 4.2.1. Aloe emodin neutrališe aktivnost citostatika

U pokušaju da se zaustavi ili suprimira rast kancera često se pribegava suplementaciji hemioterapije različitim preparatima biljnog porekla. Kako se AE pojavljuje kao komponenta brojnih preparata prisutnih na tržištu, bilo je interesantno ispitati efekat kombinovane primene AE-a i nekih od konvencionalnih hemioterapeutika na ćelije melanoma.

U tu svrhu, B16 i A375 ćelije su tretirane širokim rasponom doza poznatih citostatika, doksorubicina i paklitaksela, u prisustvu ili odsustvu AE-a. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h, meren je ćelijski vijabilitet, a interakcije primenjenih agenasa su utvrđene izobologram analizom. Oblik krive izobolograma pokazuje šta je u osnovi interakcije dva ispitivana agensa. Odnosi koncentracije pri kojima agensi pokazuju antagonizam,

odnosno sinergizam, daju krive koje su konveksne, odnosno konkavne u odnosu na krivu aditivnosti (isprekidana linija). Rezultati izobologram analize su nedvosmisleno pokazali antagonizam između AE-a i primenjenih citostatika u obe linije melanoma (graf. 14).



**Grafik 14. AE antagonizuje delovanje hemioterapije**

B16 (A) i A375 (B) ( $10^4$  po bunariću) ćelije su tretirane sa 10, 20 i 40  $\mu$ M koncentracijom AE-a paralelno sa doksorubicinom ili paklitakselom. Nakon 24 sata kultivacije, relativan broj živih ćelija određivan je MTT testom. Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna testa su predstavljani krivom izoblograma. (FCI > 1 se smatra antagonizmom).

#### 4.2.2. Aloe emodin utiče na imunski odgovor na melanom

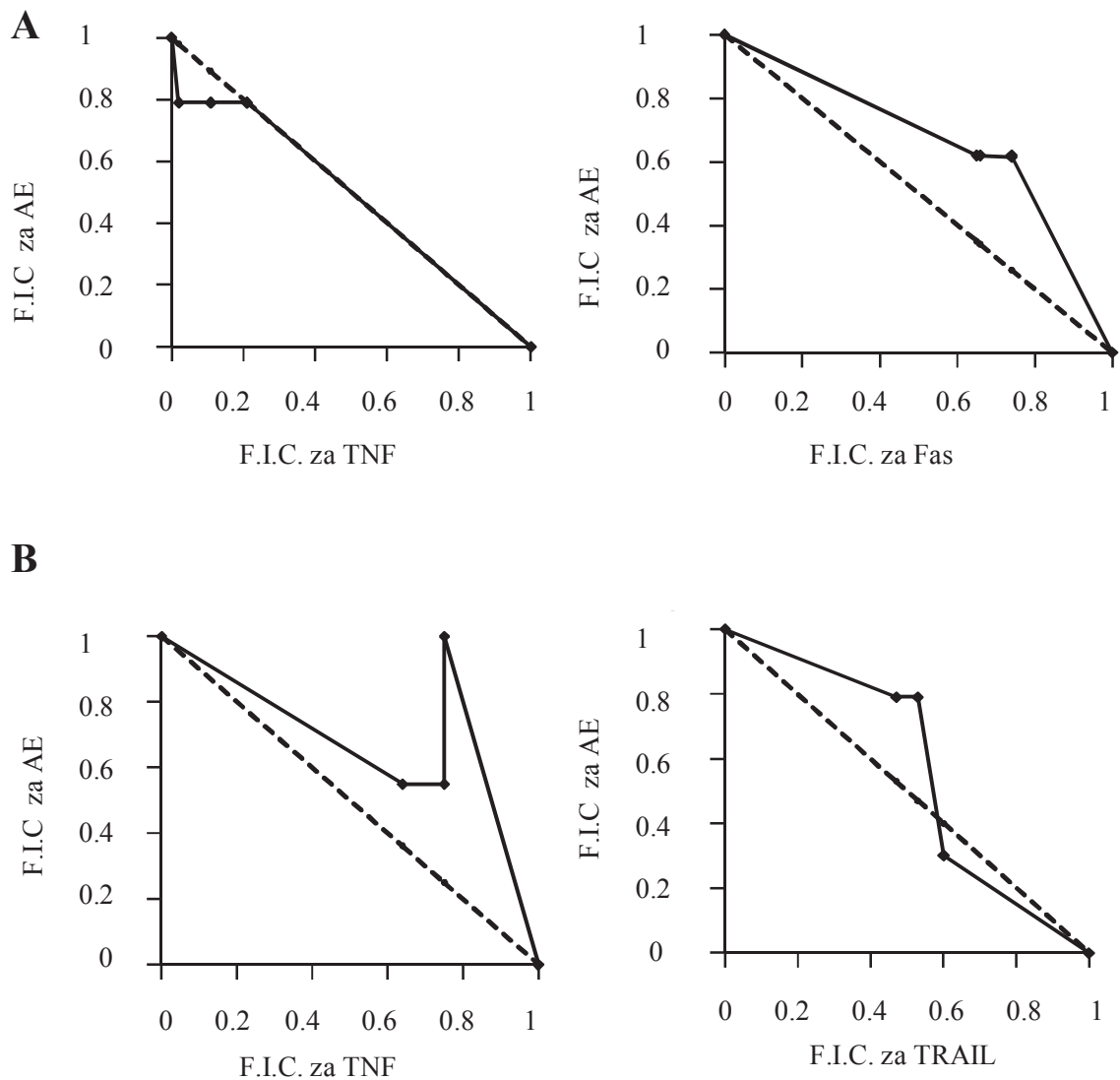
U pokušaju da se odgovori na pitanje da li AE utiče na imunski odgovor organizma na melanom, ispitivani su efekti paralelne primene AE-a i određenih medijatora TNF familije sa direktnim citotoksičnim delovanjem.

B16 ćelije su tretirane različitim dozama TNF $\alpha$  i Fas molekula u prisustvu ili odsustvu AE-a, dok su A375 ćelije podvrgnute tretmanu različitim koncentracija TNF $\alpha$  i TRAIL-a (engl. *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* -TRAIL), opet u prisustvu ili odsustvu AE-a tokom 24 h. Po isteku perioda inkubacije, određivan je vijabilitet ćelija, a efekti kombinovanog tretmana su procenjivani izobologram analizom.

Izobologram analiza paralelne aplikacije AE-a i Fas na B16 ćelijama, pokazala je antagonizam ova dva molekula, što ukazuje na to da AE ublažava efekat Fas na B16 ćelije (graf. 15A).

Rezultati analize efekta TNF $\alpha$  na B16 ćelije su pokazali da su ove ćelije neosetljive na pomenuti citokin (graf. 15A). Pokazana neosetljivost ćelija mišjeg melanoma na TNF $\alpha$  nije promenjena u prisustvu AE-a. S druge strane, izobologram analiza je pokazala antagonizam u slučaju kombinovanog tretmana A375 ćelija AE-om i TNF $\alpha$ (graf. 15B), što sugerše iskompromitovanu osetljivost ćelija humanog melanoma na pomenuti citokin u prisustvu AE-a. Dalje, izobologram konstruisan na osnovu paralelanog tretmana A375 ćelija AE-om i TRAIL-om pokazao je nešto drugačiju sliku: pri istovremenoj upotrebi niskih doza pomenutih supstanci, kao ishod pojavljuje se konveksna kriva koja sugerše neutrališući efekat AE-a na osetljivost A375 ćelija na TRAIL, dok se kao rezultat kombinacije visokih doza na izobologramu uočava konkavna kriva ukazujući na sinergizam AE i TRAIL molekula (graf. 15B).

Rezultati opisanih eksperimenata pokazuju da ne postoji uniformno delovanje AE-a kada je u pitanju imunski odgovor na melanom posredovan pomenutim citotoksičnim molekulima.



**Grafik 15. AE ne deluje uniformno na imunski odgovor na melanom**

B16 ( $10^4$  po bunariću) ćelije su tretirane sa 10, 20 i  $40\mu\text{M}$  koncentracijom AE-a paralelno sa opsegom doza TNF $\alpha$  ili Fas. Nakon 24 sata kultivacije, relativan broj živih ćelija određivan je MTT testom(A). A375 ( $10^4$  po bunariću) ćelije su tretirane sa 10, 20 i  $40\mu\text{M}$  koncentracijom AE-a paralelno sa opsegom doza TNF ili TRAIL. Nakon 24 sata kultivacije, relativan broj živih ćelija određivan je MTT testom (B). Rezultati reprezentativnog od tri nezavisna testa su pretstavljani krivom izobolograma. (FCI > 1 se smatra antagonizmom).

## *5. DISKUSIJA*

Danas se maligne bolesti, kao uzročnici smrtnosti, nalaze na nezavidnom drugom mestu odmah iza kardio- i cerebrovaskularnih poremećaja (Schuster i sar., 2006). Iako je u prethodne dve decenije bilo brojnih dostignuća u razumevanju patogeneze kancera, koja su kao rezultat dovela do razvoja novih, obećavajućih antitumorskih tretmana i dalje, na žalost, ne postoji uspešna terapija protiv ove bolesti. Činjenica da su sličnosti između transformisane i normalne ćelije ipak mnogo veće nego njihove međusobne razlike objašnjava brojne sistemske efekte pretežno negativnog karaktera na organizam (Galanski i sar., 2003; Monsuez i sar., 2010). U osnovi koncipiranja novih terapijskih pristupa je pokušaj da se identifikuje supstanca sa selektivnim delovanjem na tumorsko tkivo, kao i da se pronađu načini za kontrolu invanzivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija (Rang, 2005). Postojanje CIC ćelija, ćelija otpornih na primenjenu terapiju (Mc Cubrey i sar., 2011), ukazuje na potrebu za suštinskom promenom u načinu na koji se posmatra kancer i predstavlja pokušaje lečenja još većim izazovom.

Aloe emodin je molekul antraciklinskog tipa koji je u prethodne dve decenije opisivao kao supstanca sa laksativnim, diuretskim, imunosupresivnim, antiinflamatornim, vazorelaksirajućim, antibakterijskim, viricidnim i fungicidnim dejstvom (Anderson i sar., 1991; Huang i sar., 1991; Barnard i sar., 1992; Huang i sar., 1992; Krumbiegel i sar., 1993; Yagi i sar., 1997; Kumar i sar., 1998; Arosio i sar., 2000; Lee i sar., 2001; Kim i sar., 2004; Basu i sar., 2005; Chiu i sar., 2009). Poslednjih godina, intenzivno se ispituje njegova antitumorska aktivnost. Do danas je pokazana sposobnost AE-a da suprimira rast velikog broja različitih tumorskih linija, iako posebnu osetljivost na pomenutu supstancu pokazuju tumori neuroektodermalnog porekla (Pecere i sar., 2000). U osnovi antitumorskih svojstava AE-a stoji njegova sposobnost da indukuje ćelijsku smrt, diferencijaciju maligne ćelije ka zrelijem fenotipu, inhibiciju angiogeneze i metastaziranja, ali i povećanje osetljivosti tumorske ćelije na hemioterapiju (Kanzawa i sar., 2004; Mijatović i sar., 2005; Cardenas i sar., 2006; Lin i sar., 2006; Chen i sar., 2010).

U ovoj studiji je u nekoliko koraka ispitivano delovanje AE-a na melanom, najsmrtonosniji oblik raka kože. Dobijeni podaci o efektima AE-a na izolovane ćelije tumora, a onda i rezultati vezani za uticaj AE-a na imunski odgovor na melanom kao i oni koji govore o

posledicama kombinovane aplikacije AE-a sa konvencionalnim terapeutima, doprineli su formiranju jasnije slike o kompleksnosti eventualne primene AE-a u terapiji melanoma.

Na osnovu ovde prikazanih rezultata AE je, nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana, snažno inhibirao rast kako mišjeg, tako i humanog melanoma. Opaženi pad vijabiliteta tumorskih ćelija mogao je biti uzrokovan sposobnošću primenjene supstance da zaustavi proliferaciju ćelija melanoma ili da indukuje neki od tipova ćelijske smrti. Kako najveći broj podataka iz literature pripisuje antitumorski efekat AE-a njegovoj sposobnosti da indukuje apoptozu (Lin i sar., 2006; Lin i sar., 2010; Chiu i sar., 2009), donekle iznenađujući bio je podatak da ni kod jedne ispitivane linije nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana AE-om, bojenjem aneksin-propidijum jodidom, nije pokazana apoptoza. Daljom analizom, A375 ćelija koje su provele 48 h pod delovanjem AE-a, uočeno je prisustvo ćelija kod kojih je došlo do izvrtnja molekula fosfatidil serina u spoljašnji sloj membrane, što je događaj karakterističan za ranu apoptozu. Takođe, otkriveno je postojanje i populacije ćelija kod kojih je, pored izvrtnja molekula fosfatidil serina, narušen integritet ćelijske membrane, što su promene koje se mogu videti kod kasno apoptotskih, sekundarno nekrotičnih, ali i primarno nekrotičnih ćelija. Dalje, činjenica da su se, 48 h po primeni AE-a, na A375 ćelijama obojenim propidijum jodidom, mogle uočiti tipične morfološke karakteristike apoptoze, navodi na zaključak da je kod ćelija humanog melanoma upravo apoptoza krajnji ishod delovanja AE-a. S druge strane, nijednom primenjenom metodom za detekciju apoptoze nije pokazano prisustvo ovog tipa ćelijske smrti nakon tretmana AE-om kod B16 ćelija.

Antitumorski efekat najvećeg broja agenasa opisanih kroz literaturu uslovljen je upravo njihovim citocidnim potencijalom (Lowe i sar., 2000; Kanzawa i sar., 2004; Gozuacik i sar., 2004; Giannopoulou i sar., 2009). Činjenica da apoptoza nije bila uzrok pada vijabiliteta 24 h po delovanju AE-a ni kod jedne linije melanoma, kao i postojanje A375 ćelija koje su, nakon 48 h pod AE-om, pretrpele promene koje bi se mogle objasniti eventualnom indukcijom nekroze, nameće ideju o nekom drugom obliku ćelijske smrti, kao mehanizmu antimelanoma delovanja AE-a. Kako je glavna odlika nekroze izlivanje ćelijskog sadržaja u međućelijski prostor praćeno inflamacijom koja dodatno promoviše

rast tumora (Grivennikov i sar., 2010), ovakav tip umiranja nije poželjan kod potencijalnih hemioterapeutika (Alberts i sar., 2002). U tom kontekstu, činjenica da je LDH testom otklonjena sumnja da ćelije melanoma tretirane AE-om umiru nekrozom, ide u prilog pomenutoj supstanci. Dalje, iako je autofagija prvobitno opisana kao evolutivno konzerviran fiziološki proces koji predstavlja odgovor ćelije na stresne uslove i omogućava degradaciju proteina i oštećenih organela (Okada i sar., 2004) danas se zna da agensi kakvi su temozolomid, arsenik trioksid, paklitaksel, tamoksifen ili epirubicin dovode do smrti tumorske ćelije autofagijom (Kanzawa i sar., 2003; Gorka i sar., 2005; Kanzawa i sar., 2004). Sa druge strane, postojanje autofagije objašnjava rezistentnost određenih tumora na radio- i hemioterapiju. Naime, pokazano je da je upravo autofagija odgovorna za eliminaciju oštećenja indukovanih niskim dozama zračenja, čime spašava ćeliju od apoptoze (Paglin i sar., 2001). Obzirom da je na linijama humanog i pacovskog glioma pokazano da AE indukuje autofagiju (Mijatović i sar., 2005), sledeći logičan korak bio je da se ispita eventualno prisustvo, a zatim i značaj autofagije u kulturama B16 i A375 ćelija tretiranih AE-om. Analiza prisustva autofagozoma nije ukazala na razliku između ćelija melanoma kultivisanih sa ili bez AE-a upućujući na to da je proces autofagije irelevantan za citotoksičnu aktivnost testiranog agensa.

Kako nakon dvadesetčetvoročasovnog tretmana AE-om nije detektovana smrt ćelija melanoma, kao razlog uočenog smanjenog rasta u ovom terminu, nameće se eventualni citostatski efekat analizirane supstance. Zaista, analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa protočnim citofluorimetrom, pokazala je akumulaciju ćelija melanoma tretiranih 24 h AE-om u G2/M fazi, kao i odsustvo hipodiploidnih ćelija, odnosno ćelija sa fragmentisanim DNK materijalom. Karakteristična fragmentacija DNK molekula je odlika krajnjeg stadijuma apoptotskog procesa (Okada i Mak, 2004), te izostanak ćelija u subG fazi korelira sa pokazanim odsustvom apoptoze u posmatranom terminu. Dalje, veza između zastoja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi i apoptoze, pokazana je na brojnim tumorskim linijama (Lin i sar., 2006; Jin i sar., 2006; Selvendiran i sar., 2007; Yan i sar., 2010), što navodi na zaključak da je kod A375 ćelija AE indukovao G2/M blok što je za posledicu imalo pokretanje apoptoze. S druge strane, pokazano zaustavljanje B16 ćelija u



G2/M fazi ćelijskog ciklusa, sugerisalo je sposobnost AE-a da svoju antitumorsku aktivnost na liniji mišjeg melanoma realizuje inhibicijom proliferacije ćelija tumora. Zaista, CFSE testom je otkriven snažan blok u proliferaciji B16 ćelija, čime je potvrđeno da je za smanjenje rasta ćelija u kulturi mišjeg melanoma, odgovoran antiproliferativni efekat ispitivane supstance.

Takođe, B16 ćelije su, za razliku od A375 ćelija, nakon tretmana AE-om pretrpele značajnu morfološku promenu. Podaci u literaturi ukazuju na sposobnost određenih agenasa da dovedu do ponovne diferencijacije ćelija melanoma u melanocite. Tako je pokazano da ligandi benzodiazepanskih receptora, kakvi su dijazepan i klonazepan, indukuju promene u fenotipu B16 ćelija koje se vezuju za gubitak malignih svojstava. Ćelije se morfološki transformišu, pojačava se sinteza melanina i smanjuje aktivnost  $\gamma$ - glutamil transpeptidaze - enzima čija se prekomerna ekspresija dovodi u vezu sa metastatskim potencijalom ovih ćelija (Obrador i sar., 2002). Opisanim promenama prethodila je akumulacija ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Landau i sar., 1998). Takođe, u literaturi je opisana sposobnost i samog AE-a da indukuje G2/M blok i posledičnu diferencijaciju kod humanog oralnog kancera (Xiao i sar., 2007) i humanog cervikalnog karcinoma (Guo i sar., 2007). Morfološka transformacija, uočena kod B16 ćelija tretiranih AE-om, odlikovala se zadobijanjem asimetričnog oblika ćelija sa povećanim volumenom citoplazme, prisustvom velikog broja granula u citoplazmi što je ukazivalo na intenziviranu sintetsku i sekretornu aktivnost, kao i velikim brojem izduženih membranskih nastavaka nalik na dendrite. Kako je poznato da je diferencijacija melanocita praćena pojavom dendritičnih membranskih izraštaja čija je svrha brža distribucija melanina kroz kožu (Kuwajima i sar., 2009), opisane promene sugerisale su prelazak ovih ćelija na viši stepen zrelosti. Još jedan događaj karakterističan za diferencijaciju melanocita je intenzivirana produkcija melanina uzrokovana povećanjem aktivnosti tirozinaze (Ogiwara i sar., 2009), enzima koji katalizuje hidrosilaciju L-tirozina u 3, 4-dihidroksifenilalanin (L-dopa) i dalju oksidaciju L-dopa u dopahinon, te ima ključnu ulogu u sintezi pomenutog pigmenta. Kod melanocita i melanoma, produkciju melanina je moguće pokrenuti stimulusima kakvi su  $\alpha$ -stimulišući hormon melanocita, ultravioletno A i B zračenje, ali i farmakološkim agensima kao što su

forskolin, kolera toksin, izobutilmetilksantin, retinoična kiselina (Busca i sar., 1998; Zhao i sar., 1999; Ohguchi i sar., 2004). AE je kod B16 ćelija indukovao povećanje aktivnosti tirozinaze i posledičnu produkciju melanina, što je pokazalo da je morfološka transformacija ovih ćelija praćena i biohemijskim promenama, te i potvrdilo da AE pokreće diferencijaciju B16 ćelija ka njihovom izvornom fenotipu- melanocitima. Dalje, pretretman AE-om ćelija mišjeg melanoma, 24 h pre inokulacije u C57BL/6 miševе, dramatično je smanjio sposobnost ovih ćelija da generišu tumore, što se manifestovalo njihovom odloženom pojavom, kao i značajno manjim volumenom tumora nego kod kontrolne grupe. Ovakav rezultat navodi na zaključak da su promene indukovane AE-om ireverzibilnog karaktera, kao i to da testirana supstanca bitno smanjuje maligni potencijal B16 ćelija.

Jasno je da svi pomenuti procesi koreliraju sa promenama na unutarćelijskom nivou čijom indukcijom AE ispoljava svoju antitumorsku aktivnost, bilo da ona rezultira apoptozom, kao kod humanog, ili diferencijacijom, kao što je to slučaj kod mišjeg melanoma. Ciklini, molekuli koji aktivacijom i inaktivacijom ciklin zavisnih kinaza regulišu progresiju ćelijskog ciklusa, u poslednje vreme se sve češće dovode u vezu sa diferencijacijom različitih tipova ćelija. Tako je opisano da tokom diferencijacije ćelija humane mijeloidne leukemije indukovane različitim agensima (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , tetraforbol acetatom i butiričnom kiselinom) dolazi do prekomerne ekspresije ciklina D1 (Ullmannova i sar., 2003). Takođe, pokazano je da, kod fibroblasta, prekomerna ekspresija ciklina D1 sprečava ulazak ćelije u S fazu. Naime, ciklin D1 se vezuje za nuklearni antigen proliferišućih ćelija (engl. *proliferating cell nuclear antigen*, PCNA), subjedinicu DNK polimeraze, što direktno inhibira DNK sintezu (Alao, 2007). Ovakav scenario ostavlja ćeliji vreme potrebno za eventualnu reparaciju DNK molekula, neophodnu za preživljavanje i/ili diferencijaciju ćelije. Dalje, u diferencijaciji ćelija humane promijelocitne leukemije, HL-60 ćelija, uočena je uloga ciklina D3 (Despouy i sar., 2003). Osim toga, prekomerna ekspresija ciklina D3, ali i p53 proteina, pokazana je kod sazrevanja multipotentnih stem ćelija ka oligodendrocitima, kada se stem ćelije stimulišu tiroidnim hormonom (Tokumoto i sar., 1999). Štaviše, ciklin D3 se smatra ključnim molekulom u diferencijaciji oligodendrocita (Bartkova i sar., 1998.; Billon i sar., 2002). Pokazani porast ekspresije ciklina D1 i D3 kod

B16 ćelija, indukovan AE-om, u skladu sa navedenim podacima, sugerije njihovu ulogu u diferencijaciji ćelija mišjeg melanoma.

Uloga tumor supresor proteina, p53, u diferencijaciji ćelija centralnog nervnog sistema, opisana je u više navrata (Poluha i sar., 1997; Eizenberg i sar., 1996; Murray- Zmijewski i sar., 2006). Billon i sar. (2002) sugeriju da p53 reguliše transkripciju gena uključenih u zaustavljanje ćelijskog ciklusa i diferencijaciju prekursorskih ćelija oligodendrocita (engl. *oligodendrocyte precursor cells*, OPC). Poznato je da p53 indukuje sintezu p21/Cip1 proteina. Prekomerna ekspresija ovog molekula inhibira progresiju ćelijskog ciklusa i to na dva načina: inhibicijom različitih ciklin – kinaza zavisnih od ciklina (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK) kompleksa, dovodi do G1/S ili do G2/M zastoja, dok interakcijom sa PCNA, p21 inhibira DNK sintezu i indukuje G2/M zastoju ćelijskom ciklusu (Barnouin i sar., 2002). Kod B16 ćelija, već nakon 30 minuta, AE je doveo do porasta u koncentraciji kako ukupnog p53 proteina, tako i njegove fosforilisane forme. Kako je ovo vreme nedovoljno za *de novo* sintezu pomenutog proteina moguće je zaključiti da je testirana supstanca usporila degradaciju fosforilisane forme p53 proteina u vremenski definisanom okviru što se odrazilo i na porast u koncentraciji ukupnog p53. Ishod delovanja AE-a na B16 ćelije bi se u tom smislu mogao objasniti opisanom akumulacijom p53, što se odrazilo na pokazani G2/M blok i posledičnu diferencijaciju ovih ćelija.

Još jedan molekul koji bi mogao biti odgovoran za pokazanu diferencijaciju B16 ćelija nakon tretmana AE-om, a do čije je snažne produkcije ispitivana supstanca dovela kod ovih ćelija, je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vodonik peroksid je molekul koji je i u normalnim fiziološkim uslovima prisutan u životu melanocita (Jimenes-Cervantes i sar., 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se pojavljuje kao uobičajeni sporedni proizvod u melanogenezi (Nappi i Vass, 1996), kao sekundarni glasnik u propagaciji signala pokrenutih citokinima TNF $\alpha$  i TGF $\beta$  (Hennet i sar., 1993; Thannickal i Fanburg, 1995), ali i kao jedan od ROS koji se generiše u odgovoru na UV zračenje (Peus i sar., 1999). Dalje, poznato je da izvestan nivo oksidativnog stresa u ćelijama kancera promoviše preživljavanje i proliferaciju ovih ćelija (Toyokuni i sar., 1995). Ipak, nivo ROS produkcije koji doseže određeni prag, indukuje ireverzibilno oštećenje DNK molekula, uvodi ćelije kancera u stanje mirovanja ili apoptozu (Lu i sar., 2007). Kod melanoma je

nešto drugačija situacija. Peinado i sar. (1992) su pokazali da ćelije melanoma odgovaraju na oksidativni izazov povećanjem unutarćelijske koncentracije glutationa, kao i to da slabo podležu lizi nakon oksidativnog šoka. Opisana neosetljivost ćelija melanoma na oksidativno oštećenje korelira sa prethodno pomenutom ulogom  $H_2O_2$  u metabolizmu melanocita i ujedno, objašnjava činjenicu da snažna produkcija  $H_2O_2$  indukovana AE-om, kod ćelija mišjeg melanoma, nije dovela do ćelijske smrti. Dalje, prekomerna produkcija  $H_2O_2$  koja je prethodila diferencijaciji B16 ćelija, pokrenutoj AE-om, korelira sa podacima iz literature o sposobnosti  $H_2O_2$  da indukuje diferencijaciju različitih ćelijskih tipova. Tako je opisana uloga  $H_2O_2$  u diferencijaciji embrionalnih stem ćelija (ES) u vaskularne glatke mišićne ćelije (engl. *smooth muscle cells*, SMC) (Xiao i sar., 2009). Naime, izoforma NADPH oksidaze, Nox4, u ES ćelijama dovodi do produkcije  $H_2O_2$  koji inicira translokaciju SRF (engl. *serum response factor*), ključnog regulatora diferencijacije SMC ćelija, u nukleus (Xiao i sar., 2009). Takođe, pokazano je da je produkcija  $H_2O_2$  važan lokalni factor u diferencijaciji prekursorske linije osteoklasta, HD-11 EM, u ćelije nalik na osteoklaste, što sugerise ulogu ovog molekula u prirodnoj diferencijaciji osteoklasta (Steinbeck i sar., 1998). Dalje, Kang i sar. (2003) su pokazali da L-askorbinska kiselina dovodi do diferencijacije HL-60 ćelija u granulocite, upravo posredstvom produkcije  $H_2O_2$ . Konačno, kako je efekat AE-a na ćelijama mišjeg melanoma uspešno simuliran tretmanom sa  $H_2O_2$ , može se pretpostaviti da je diferencijacija B16 ćelija indukovana AE-om posledica prekomerne produkcije  $H_2O_2$  molekula.

Razlika u redoks status dve ispitivane linije melanoma mogla bi biti jedan od razloga njihovog različitog odgovora na tretman AE-om. Za razliku od A375 ćelija koje konstitutivno eksprimiraju iNOS i imaju visok intracelularni nivo ROS, te ih karakteriše manja osetljivost na oksidativni stres pa i na agense čiji je mehanizam delovanja vezan za indukciju ROS i RNS, B16 ćelije su opisane kao ćelije sa niskom produkcijom ROS (Demary i sar., 2001). Tako, dok su se A375 ćelije pokazale rezistentnim na tretman retinoičnom kiselinom (engl. *retinoic acid*, RA) kod ćelija mišjeg melanoma RA je indukovala diferencijaciju ka zrelijem fenotipu, praćenu visokom produkcijom  $H_2O_2$ ,

povećanjem ekspresije  $\alpha$ PKC i stimulacijom aktivnosti MAPK, kakva je ERK, kao i AP1 transkripcionog faktora (Huang i sar., 2003).

Kako je, s druge strane, AE kod A375, ćelija koje konstantno eksprimiraju iNOS, pokrenuo apoptozu, eventualna promena produkcije endogenog NO-a mogla bi da objasni pokazani efekat kod ove ćelijske linije. Produkcija NO-a, oksidacijom L-arginina u citrulin posredovana iNOS-om, smatra se bitnim antitumorskim mehanizmom urođenog imuniteta (Cifone i sar., 1995). Oslobođeni NO, od strane makrofaga i NK ćelija, dovodi do apoptoze tumorskih ćelija, mehanizmom koji uključuje akumulaciju p53 molekula, oštećenje mitohondrijalne funkcije, promene u ekspresiji antiapoptotskih molekula, aktivaciju kaspaza i DNK fragmentaciju (Umansky i sar., 2001). Takođe, pokazano je i da NO, proizveden od strane samog tumora deluje kao autokrini faktor u zaustavljanju njegove progresije (Hu i sar., 2004). S druge strane, ambivalentna uloga ovog molekula opisana je kod tumora neosetljivih na njegovo dejstvo. Kod pomenutih tumora endogeni NO promoviše rast i metastaziranje, delujući na angiogenezu, vazodilataciju, ali i inhibirajući proapoptotske stimulse (Grimm i sar., 2008), te bi smanjenje u produkciji NO-a kod ovakvih tumora, negativno regulisalo njihov rast. Dalje, upravo kod melanoma je pokazano da je ekspresija iNOS-a kod iNOS pozitivnog tumora, asocirana sa pojačanom otpornošću na terapiju i lošijom prognozom bolesti nego u slučaju iNOS negativnog melanoma (Tang i sar., 2004). Autori objašnjavaju ovaj podatak time da NO inhibira apoptozu pokrenutu cisplatinom tako što inicira aktivaciju p53 proteina koja dovodi do pojačane transkripcije p21 što rezultira zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, popravkom DNK oštećenja i preživljavanjem ćelije. Izgleda da NO inhibira Mdm-2 posredovani eksport p53 iz nukleusa čime se sprečava ubikvitin zavisna proteoliza ovog molekula i dolazi do njegove akumulacije neophodne za opisanu biološku aktivnost (Tang i Grimm, 2004).

Iako je opisano da AE deluje na nivo endogenog NO-a, kod ćelija mišjeg fibrosarkoma i pacovskog glioma, inhibicijom ekspresije iNOS gena (Mijatović i sar., 2004), sličan efekat na ekspresiju iNOS-a kod A375 ćelija je izostao: testirana supstanca nije dovela do promene u koncentraciji ovog molekula. Ovakav scenario ukazuje da je apoptoza ćelija humanog melanoma, indukovana AE-om, nezavisna od NO produkcije.

Poznato je da stres u ćeliji dovodi do aktivacije tumor supresor proteina, p53, što ishoduje, zaustavljanjem ćelijskog ciklusa, popravkom DNK oštećenja, prethodno opisanom diferencijacijom ili indukcijom apoptoze (Oren, 2003). Apoptoza posredovana p53 proteinom podrazumeva transkripcionu aktivaciju proapoptotskih gena, kakvi su geni koji kodiraju receptore smrti, Fas ili DR5, kao i onih koji kodiraju mitohondrijalne proteine, Bax, Noxa, Puma, transkripcionu represiju antiapoptotskih gena, Bcl-2 i Bcl-X, ali i aktivnosti p53 proteina koje su nezavisne od njegove transkripcione funkcije kakve su: translokacija Fas receptora u plazma membranu, Bax molekula u mitohondrije sa posledičnim oslobađanjem citohroma C kao i aktivacija kaspaze 8 (Oren, 2003). Ipak, AE nije doveo do promene u nivou p53 proteina kod A375 ćelija što navodi na zaključak da je indukcija apoptoze kod linije humanog melanoma, nezavisna od aktivnosti navedenog tumor supresor proteina.

Izrazita hemiorezistencija melanoma se u poslednje vreme dovodi u vezu sa prekomernom produkcijom XIAP proteina (Kluger i sar., 2006). Pokazano je da se ovaj antiapoptotski molekul, kod melanoma, vezuje za kaspazu-3, čime onemogućava aktivaciju efektorske kaspaze u daljoj promociji započete apoptoze (Hörnle i sar., 2011). Senzitivizacija ćelija melanoma na antitumorske agense se, takođe, dovodi u vezu sa ekspresijom XIAP (Hörnle i sar., 2011). Isti autori opisuju da subletalna doza UVB povećava osetljivost ćelija melanoma na ligand koji indukuje apoptozu vezan za TNF (engl. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) tako što dovodi do povećanja propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane i otpuštanja Smac proteina, koji oslobađa kaspazu-3 od inhibitornog dejstva XIAP-a. U pozitivnoj povratnoj sprezi aktivirana kaspaza-3 iseca XIAP čime inicira njegovu proteozomalnu degradaciju. Kako je nakon tretmana AE-om došlo do smanjenja nivoa XIAP proteina kod A375 ćelija, pretpostavljamo da je za pokretanje apoptoze kod ovih ćelija, barem delom, odgovorna sposobnost testirane supstance da indukuje degradaciju XIAP-a. Osim toga, nakon tretmana AE-om, pokazano je i smanjenje nivoa Bcl-2, antiapoptotskog molekula koji stabilizuje spoljašnju mitohondrijalnu membranu čime blokira oslobađanje citohroma C i drugih apoptotskih proteina u citosol. Ovakav rezultat korelira sa brojnim podacima iz literature koji opisuju

sposobnost AE-a da, inhibicijom ekspresije ili aktivnosti Bcl-2, indukuje programiranu ćelijsku smrt tipa I (Chiu i sar., 2009; Yeh i sar., 2003), što dodatno sugerise da se apoptotska aktivnost AE-a, na ćelijama humanog melanoma, zasniva na sposobnosti pomenute supstance da “isključiti” antiapoptotski program ćelije.

Unutrašnji i spoljašnji put aktivacije efektorskih kaspaza je najbrži i najefikasniji mehanizam programirane ćelijske smrti. Ipak, ukoliko je ćelija u nevolji, usled razloga kakvi su genetske manipulacije ili postojanje inhibitora, rezistentna na apoptozu posredovanu kaspazama, postoje alternativni putevi indukcije ovog ili nekog drugog tipa ćelijske smrti. Aktivacija različitih proteaza, kakve su lizozomske i proteozomske proteaze, granzim B ili metaloproteinaze matriksa, kao i aktivacija endonukleaza nezavisnih od kaspaza (AIF, Topoizomeraza II, EndoG i Dnaza), dovodi do oštećenja osnovnih ćelijskih struktura, što finalno uvodi ćeliju u smrt koju karakterišu jedna ili čak, nekoliko odlika apoptoze (Lockshin i Zakeri, 2004). Dalje, Mijatović i sar. su pokazali da je kod TA3Ha, mišjeg tumora mlečne žlezde, ćelijska smrt nalik na apoptozu, a nezavisna od aktivnosti kaspaza, spregnuta sa značajno smanjenom ekspresijom antiapoptotskog Bcl-2 molekula (Mijatović i sar., 2010). Ipak, kod A375 ćelija, nakon smanjenja nivoa Bcl-2 proteina, nastupila je aktivacija kaspaza, što je ujedno i potvrdilo da je ćelijska smrt indukovana AE-om kod linije humanog melanoma, tipična apoptoza zavisna od aktivacije kaspaza.

Poznato je da je kod humanog melanoma, kao posledica mutacija koje pogađaju učesnike MAPK signalnog puta, prisutna prekomerna aktivacija ERK1/2 molekula (Cohen i sar., 2002), što se dovodi u vezu sa proliferacijom, preživljavanjem ćelija i rastom tumora (Gray-Schopfer i sar., 2007). Sherwin i sar. (1979) navode da bi snažna aktivnost ERK1/2 kod A375 ćelija mogla biti rezultat visoke ekspresije PTK receptora kakav je receptor za faktore rasta neurona (engl. *nerve growth factor receptor-NGF*). Sa druge strane, u literaturi je opisana veza između inhibicije MEK/ERK signalnog puta i apoptoze (Nishioka i sar., 2010; Konopleva i sar., 2011; Alaoui i sar., 2007). Noviji podaci govore o apoptozi kod A375 ćelija uslovljenoj upravo inaktivacijom ERK1/2 molekula i posledičnom inhibicijom *inhibitora vezivanja za DNK-1* (Id-1), molekula koji reguliše ekspresiju antiapoptotskih proteina kakav je Bcl-2 (Tada i sar., 2011). Dalje, pokazano je da kod ćelija

pacovskog glioma AE realizuje svoj antitumorski potencijal inhibicijom aktivnosti ERK1/2 (Mijatović i sar., 2004), što je sugerisalo ulogu ovog molekula i u apoptozi A375 ćelija indukovanoj AE-om. Zaista, tretman ispitivanom supstancom je kod ćelija humanog melanoma značajno redukovao aktivnost ERK1/2, što je događaj koji je prethodio apoptozi i koji bi mogao biti uzrok smrti kod A375 ćelija.

Sa druge strane, ćelije mišjeg melanoma odlikuje niska aktivnost ERK1/2. Donekle iznenađujuća bila je činjenica da je očekivani pad u aktivnosti pomenutog proteina po tretmanu AE-om na B16 ćelijama izostao. Štaviše, AE je kod ovih ćelija ispoljio suprotan efekat i indukovao snažnu aktivaciju ERK1/2. Von Kriegsheim i sar. (2009) su pokazali da je diferencijacija PC12 ćelija uslovljena upravo permanentnom aktivacijom ERK1/2. Slično tome, opisana je aktivacija pomenutog proteina i tokom diferencijacije B16 ćelija indukovane retinoičnom kiselinom (Huang i sar., 2003), što navodi na zaključak da je povećanje aktivnosti ERK1/2 barem delom odgovorno za diferencijaciju ćelija mišjeg melanoma nakon tretmana AE-om.

Poznato je da je PI3K signalni put prekomerno aktiviran kod velikog broja tumor, kao i to da su brojni molekuli, učesnici ovog signalnog puta, uključeni u inicijaciju i progresiju melanoma (Gray-Schopfer i sar., 2007). Akt, ili protein kinaza B, ključni molekul PI3K signalnog puta, je u literaturi opisan kao molekul čija je prekomerna aktivacija vezana za intenzivnu proliferaciju tumora (Pitt i sar., 2009). Činjenica da je AE doveo do smanjenja aktivnosti Akt-a kod ćelija mišjeg melanoma mogla bi da objasni pokazani zastoj proliferacije B16 ćelija indukovan pomenutom supstancom. S druge strane, AE je kod humanog melanoma doveo do aktivacije Akt-a. Iako se ovakav događaj kroz literaturu uglavnom vezuje za inhibiciju apoptoze (Wang i sar., 2011; Kim i sar., 2006), postoje podaci koji opisuju povećanje aktivnosti Akt-a kod ćelijskih linija koje podležu apoptozi (Meng i sar., 2011; Mijatović i sar., 2011). U slučaju apoptoze ćelija karcinoma bubrega indukovanoj indometacinom, Ou i sar. (2007) sugerišu međusobnu aktivaciju Akt-a i molekula MAPK puta koja rezultira citotoksičnošću. Takođe, povećanje aktivnosti Akt-a moglo bi nastupiti kao rezultat oslobađanja mTORC2 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2*) od supresije S6 kinazom što ukazuje na mogućnost



delovanja AE-a na nishodni, pre nego ushodni, deo PI3K puta (Fenton i sar., 2011). Ova pretpostavka je zasnovana na činjenici da su procesi kao što su zaustavljanje ćelijskog ciklusa, smanjena ekspresija citoprotektivnih molekula kao i kasna degradacija aktina, kod A375 ćelija, upravo pod kontrolom S6 kinaze (Delgoffeisar., 2011). Kako je već 4 h po primeni AE-a kod A375 ćelija došlo do aktivacije Akt-a, ovaj događaj bi mogao imati izvesnu ulogu u nastupajućoj apoptozi.

Interesantna je činjenica da su kod obe ispitivane linije melanoma, ERK1/2 i Akt bili recipročno regulisani. Ovakav trend je opisan i u slučaju A375 ćelija tretiranih inhibitorom HIV proteaze, sakvinavirom, kao i njegovom formom modifikovanom vezivanjem NO-a (Mijatović i sar., 2011). Recipročna aktivacija pomenutih proteina bi se mogla objasniti činjenicom da je aktivacija S6 kinaze zavisna od aktivnosti ERK1/2, koji fosforilacijom serinskih i treoninskih ostataka omogućava kinazi zavisnoj od fosfoinozitida (engl. *phosphoinositide dependent kinase, PDK-1*) fosforilaciju aktivacione T petlje (Fentona i sar., 2011). Tako bi u sistemu gde dolazi do povećanja aktivnosti ERK1/2, bila aktivirana i S6 kinaza što bi inhibiralo mTORC2-Akt aktivaciju, i obrnuto, smanjena aktivnost ERK1/2 umnogome bi umanjila aktivaciju S6 kinaze, te bi se neometano odvijala aktivacija Akt-a od strane mTORC2.

Do sada opisani efekti AE-a na ćelije melanoma odnosili su se uglavnom na izolovani, *in vitro* sistem. Kako bi se dobila potpunija slika o delovanju AE-a, bilo je neophodno da se aktivnost ove supstance postavi u kontekst mikrosredine melanoma. U organizmu je sudbina maligne ćelije određena složenim interakcijama između tumorske ćelije, ekstraćelijskog matriksa, okolnog tkiva i imunskog odgovora, gde je sposobnost tumorske ćelije da izbegne imunski odgovor, prednost koja joj omogućava opstanak. Kako je poznato da je melanom razvio brojne mehanizme koji ga čine otpornim na delovanje kako specifičnog, tako i nespecifičnog imunskog odgovora, bilo je interesantno ispitati da li AE može da pojača njegovu osetljivost na aktivnost imunskog sistema. TNF $\alpha$ , plejotropni citokin koga proizvode aktivisani makrofagi, ali i limfociti, fibroblasti i hepatociti (Vassalli, 1992), je molekul sa toksičnim dejstvom na tumorske ćelije, što ga čini kandidatom u tretmanu kancera (Nakamoto i sar., 2000). Ipak, kako je do sada pokazano da su mnogi

tumori rezistentni na smrt posredovanu TNF-om (Janji i sar., 2010; Kim i sar., 2009), nije iznenadio podatak da su se i ćelije mišjeg melanoma pokazale neosetljivim na njegovo delovanje. Primena AE-a na B16 ćelije istovremeno tretirane sa TNF $\alpha$ , nije promenila njihovu osetljivost na pomenuti citokin. S druge strane, AE je smanjio osetljivost A375 ćelija na TNF $\alpha$ . Harhaji i sar. (2007) su pokazali da AE blokira toksičnost TNF $\alpha$  na ćelijama mišjeg fibrosarkoma, delom putem inhibicije ERK1/2 molekula. Kako je ranije opisano, AE redukuje aktivnost ERK1/2 kod A375 ćelija, pa bi ovaj događaj mogao da rezultira neutralisanjem toksičnosti TNF $\alpha$ . Dalje, analiza paralelne primene AE-a i Fas molekula na B16 liniji pokazala je da testirana supstanca, nepoznatim mehanizmom, ublažava delovanje Fas-a na ćelije mišjeg melanoma. S druge strane, analiza istovremenog tretmana A375 ćelija AE-om i ligandom smrti TRAIL, pokazuje nešto drugačiju sliku: u niskim dozama, AE neutrališe delovanje TRAIL-a, dok se u visokim dozama javlja sinergističko dejstvo dva molekula. Ovakav rezultat bi se mogao objasniti pokazanom činjenicom da, nakon dostizanja određene koncentracije, AE dovodi do smanjenja količine XIAP-a, antiapoptotskog molekula koji blokira efekat TRAIL-a inhibicijom aktivnosti kaspaze-3 (Hörmle i sar., 2010).

Izrazita otpornost melanoma na citotoksične agense, opisana u brojnim studijama (Gray-Schopfer i sar., 2007; Soengas i sar., 2003; Kluger i sar., 2006), nametnula je potrebu za analizom eventualnog efekta AE-a na osetljivost ćelija melanoma na tretman konvencionalnim hemioterapeutcima. Noviji rezultati su pokazali da je ekstrakt suvog lista masline (engl. *Dry Olive Leaf Extract*, DOLE) značajno pojačao osetljivost B16 ćelija na cisplatinu i paklitaksel, dok je kombinovana primena DOLE sa doksorubicinom i temozolomidom redukovala efikasnost pomenutih citostatika (Mijatović i sar., 2011). S druge strane, AE je, mehanizmom koji uključuje inhibiciju aktivacije ERK1/2, zaštitio C6 i L929 ćelije od citotoksičnog dejstva cisplatine (Mijatović i sar., 2005). Slično tome, rezultati ove studije pokazuju da paralelan tretman AE-om neutrališe aktivnost doksorubicina i paklitaksela kod obe linije melanoma. Kako se AE pojavljuje kao komponenta brojnih preparata prisutnih na tržištu, očigledna je opasnost nasumičnog kombinovanja ovakvih suplemenata sa agensima koje koristi moderna medicina. Takođe,

jasno je da brojni faktori, kao što su mehanizam delovanja primenjenih supstanci, ali i specifičnost same tumorske ćelije, mogu da utiču na ishod istovremene primene. Otud se i nameće potreba za opsežnom naučnom analizom efekata kombinovane terapije, pre nego se, u bezizlaznoj situaciji koju ova bolest nameće, posegne za bilo čim.

Rezultati prezentovani u ovoj studiji opisuju veliki potencijal AE-a u tretmanu melanoma, ukazuju na interesantnu plastičnost u delovanju testirane supstance zavisno od tipa tumora, ali i sugerišu potrebu za ozbiljnijim pristupom nauke kada je u pitanju ishod kombinovane primene proizvoda moderne i tradicionalne medicine. Na osnovu navedenog, nameće se potreba za daljim istraživanjima u ovoj oblasti koja bi finalno omogućila eventualnu primenu AE-a u kliničkoj praksi.

## *6. ZAKLJUČCI*

Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. AE snažno inhibira rast kako mišjeg B16 tako i humanog A375 melanoma;
2. AE indukuje apoptozu kod A375 ćelija praćenu smanjenjem nivoa antiapoptotskih proteina XIAP i Bcl-2 i jakom aktivacijom kaspaza;
3. AE dovodi do permanentne diferencijacije B16 ćelija ka zrelijem fenotipu praćene povećanom produkcijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ekspresijom ciklina D tipa i vremenski ograničenom akumulacijom p53;
4. Tretman AE-om je obrnuto proporcionalno regulisao aktivnost ERK1/2 i Akt u obe ćelijske linije;
5. Različit ishod tretmana AE-om kod B16 i A375 ćelija korelira sa suprotnim odgovorom PI3K i MAPK signalnog puta;
6. Uticaj AE na osetljivost melanoma na imunski odgovor usmeren protiv maligno transformisane ćelije uslovljen je karakteristikama same ćelije, kao i tipom i koncentracijom medijatora antitumorskog odgovora u okruženju;
7. AE neutrališe aktivnost konvencionalnih citostatika - doksorubicina i paklitaksela kod obe linije melanoma.

Iako je potencijal AE-a nesumnjiv, njegova primena bi se morala razmatrati u kontekstu specifičnosti tumorske ćelije, kao i njenog neposrednog okruženja.

## *7. LITERATURA*

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cellular and molecular immunology, Seventh edition, 2012, W.B. Saunders Company, USA
2. Acevedo-Duncan M, Russell C, Patel S, Patel R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(14):1775-84.
3. Aguilera A, Gómez-González B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(3):204-17.
4. AillesLE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol.*2007; 18(5):460-6.
5. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer.* 2007; 2;6:24.
6. Alaoui A.,Hassan M., Nagano F., Miliauskaite A., Haikel Y., Selimovic D. NF-kappaB/ERK inhibition enhances Taxol- induced apoptosis in head/squamous cell carcinoma.
7. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth edition, 2002, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, NY, USA
8. Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK, North JA. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res.* 1991;16(2):185-96.
9. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, De Castri D, Moscheni C, Annoni G. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol.* 2000;87(5):229-33.
10. Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2005;6(3):185-93.
11. Barnard DL, Huffman JH, Morris JL, Wood SG, Hughes BG, Sidwell RW. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 1992;17:63-77
12. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de Mattos S, Glassford J, Medema RH, Mann DJ, Lam EW. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a transient multi-phase cell cycle arrest in

- mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem.* 2002; 277(16):13761-70.
13. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene.*1998; 17(8):1027-37.
  14. Basu S, Ghosh A, Hazra B. Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn. *Rubia cordifolia* Linn. And *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents. *Phytother Res.* 2005;19:888-94
  15. Bertolaccini, L., Olivero, G. Cancer immunotherapy. A future therapeutical choice? *Minerva Chir.* 2001, 56, 183–191
  16. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000; 21(6):167-223.
  17. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Kal HB, de Rooij DG. Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biol Reprod.* 2000;63(6):1893-8.
  18. Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene.*2005; 24(21):3459-71.
  19. Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
  20. Billon N, Jolicoeur C, Tokumoto Y, Vennström B, Raff M. Normal timing of oligodendrocyte development depends on thyroid hormone receptor alpha 1 (TRalpha1). *EMBO J.* 2002; 21(23):6452-60.
  21. Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21(5):525-33.
  22. Buscà R, Bertolotto C, Abbe P, Englaro W, Ishizaki T, Narumiya S, Boquet P, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol Biol Cell.* 1998; 9(6):1367-78.



23. Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA. Evaluation of the anti-angiogenic effect of aloe-emodin. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63(24):3083-9.
24. Chang HM, But PPH. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, 1986, World Scientific Publishing, Singapore, Vol 1,2
25. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2507-16.
26. Chen HC, Hsieh WT, Chang WC, Chung JG. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(8):1251-7.
27. Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45(11):2296-303.
28. Chen YY, Chiang SY, Lin JG, Ma YS, Liao CL, Weng SW, Lai TY, Chung JG. Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int J Oncol.* 2010; 36(5):1113-20.
29. Chiu TH, Lai WW, Hsia TC, Yang JS, Lai TY, Wu PP, Ma CY, Yeh CC, Ho CC, Lu HF, Wood WG, Chung JG. Aloe-emodin induces cell death through S-phase arrest and caspase-dependent pathways in human tongue squamous cancer SCC-4 cells. *Anticancer Res.* 2009; 29(11):4503-11.
30. Ciampricotti M, Vrijland K, Hau CS, Pemovska T, Doornebal CW, Speksnijder EN, Wartha K, Jonkers J, de Visser KE. Development of metastatic HER2(+) breast cancer is independent of the adaptive immune system. *J Pathol.* 2010.
31. Cifone MG, Cironi L, Meccia MA, Roncaioli P, Festuccia C, De Nuntiis G, D'Aló S, Santoni A. Role of nitric oxide in cell-mediated tumor cytotoxicity. *Adv Neuroimmunol.* 1995;5(4):443-61.

32. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66(19):9339-44.
33. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(12):3728-33.
34. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS.* (2006);(96):321-49.
35. Condeelis, J., Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, 2006, 124, 263-266.
36. Costello RT, Fauriat C, Olive D. Natural killer cells and immunity against cancer. *Discov Med.* 2004; 4(23):333-7.
37. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.* 2009; 109(7):3012-43
38. Cuendet M, Christov K, Lantvit DD, Deng Y, Hedayat S, Helson L, McChesney JD, Pezzuto JM. Multiple myeloma regression mediated by bruceantin. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(3):1170-9.
39. Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81(4):500-7.
40. Dancy JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5(9):1065-73.
41. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton

- MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949-54.
42. De Cremoux P. Hormone therapy and breast cancer. *Bull Cancer*. 2011; 98(11):1311-9.
43. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, Xiao B, Worley PF, Powell JD. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol*. 2011; 12(4):295-303.
44. Demary K, Wong L, Liou JS, Faller DV, Spanjaard RA. Redox control of retinoic acid receptor activity: a novel mechanism for retinoic acid resistance in melanoma cells. *Endocrinology* 2001;142:2600-5
45. Despouy G, Bastie JN, Deshaies S, Balitrand N, Mazharian A, Rochette-Egly C, Chomienne C, Delva L. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem*.2003; 278(8):6355-62.
46. Dev S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. *Environ Health Perspect*. 1999; 107(10):783-9
47. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008; 112(13):4793-807.
48. Dillman RO, Soori G, Wiemann MC, Schulof R, Dobbs TW, Ruben RH, DePriest CB, Church C. Phase II trial of subcutaneous interleukin-2, subcutaneous interferon-alpha, intravenous combination chemotherapy, and oral tamoxifen in the treatment of metastatic melanoma: final results of cancer biotherapy research group 94-11. *Cancer Biother Radiopharm*. 2000; 15(5):487-94.
49. Dissemond J, Götte P, Mörs J, Lindeke A, Goos M, Ferrone S, Wagner SN. Association of TAP1 downregulation in human primary melanoma lesions with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res*. 2003; 13(3):253-8.
50. Dispenzieri A, Gertz MA, Lacy MQ, Geyer SM, Fitch TR, Fenton RG, Fonseca R, Isham CR, Ziesmer SC, Erlichman C, Bible KC. Flavopiridol in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a phase 2 trial with clinical and pharmacodynamic end-points. *Haematologica*. 2006; 91(3):390-3.

51. Dumontet C. Antitubulin agents. *Bull Cancer*. 2011; 98(11):1275-85.
52. Eizenberg O, Faber-Elman A, Gottlieb E, Oren M, Rotter V, Schwartz M. p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(9):5178-85.
53. Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004; 40(12):1825-3
54. Eggermont AM, Robert C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur J Cancer*. 2011; 47(14):2150-7.
55. Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC, Grimm EA. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(12):4768-75.
56. Ellerhorst JA, Ekmekcioglu S, Johnson MK, Cooke CP, Johnson MM, Grimm EA. Regulation of iNOS by the p44/42 mitogen-activated protein kinase pathway in human melanoma. *Oncogene*. 2006; 25(28):3956-62.
57. Fenton TR, Ivan T. Functions and regulation of the 70 kDa ribosomal S6 kinases Goutb *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; 43(1): 47-59
58. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2009; 29, 789–791.
59. Ferrarini M, Imro MA, Sciorati C, Heltai S, Protti MP, Pellicciari C, Rovere P, Manfredi AA, Rugarli C. Blockade of the Fas-triggered intracellular signaling pathway in human melanomas is circumvented by cytotoxic lymphocytes. *Int J Cancer*. 1999; 81(4):573-9.
60. Flaherty KT. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(7 Pt 2):2366s-2370s.
61. Fujita Y. Interface between normal and transformed epithelial cells: a road to a novel type of cancer prevention and treatment. *Cancer Sci*. 2011; 102(10):1749-55.
62. G. M. Cragg and D. J. Newman. *PLANTS AS A SOURCE OF ANTI-CANCER AGENTS*, *Ethnopharmacology*, (2004/Rev.2006)
63. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des*. 2003;9(25):2078-89.

64. Galmozzi E, Facchetti F, La Porta CA. Cancer stem cells and therapeutic perspectives. *Curr Med Chem*. 2006;13(6):603-7.
65. Giannopoulou E, Antonacopoulou A, Matsouka P, Kalofonos HP. Autophagy: novel action of panitumumab in colon cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29(12):5077-82.
66. Giordano G, Hong S, Faustman EM, Costa LG. Measurements of cell death in neuronal and glial cells. *Methods Mol Biol*. 2011;758:171-8.
67. González Astorga B, Jiménez Rubiano B, Delgado Pérez JR, Valdivia Bautista J, Sánchez Toro C, González Flores E, Luque Caro R, Castellón Rubio V. Biochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma in selected patients. *Clin Transl Oncol*. 2009; 11(6):382-6.
68. Górka M, Daniewski WM, Gajkowska B, Lusakowska E, Godlewski MM, Motyl T. Autophagy is the dominant type of programmed cell death in breast cancer MCF-7 cells exposed to AGS 115 and EFDAC, new sesquiterpene analogs of paclitaxel. *Anticancer Drugs*. 2005; 16(7):777-88.
69. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004; 23(16):2891-906.
70. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007; 445(7130):851-7.
71. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, Marais R, Wynford-Thomas D, Bennett DC. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. 2006; 95(4):496-505.
72. Grimm EA, Ellerhorst J, Tang CH, Ekmekcioglu S. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide*. 2008; 19(2):133-7.
73. Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 2010; 140, 883–899.
74. Gueritte, F., Fahy, J. *The vinca alkaloids Anticancer Agents from Natural Products*. CRC Press: Boca Raton, 2005; pp., 123–135.

75. Guo JM, Xiao BX, Liu Q, Zhang S, Liu DH, Gong ZH. Anticancer effect of aloe-emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(12):1991-5.
76. Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; 86, 353–364.
77. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1):57-70.
78. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
79. Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol.* 2004; 35(3):309-18.
80. Harhaji L, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Popadic D, Isakovic A, Todorovic-Markovic B, Trajkovic V. Aloe emodin inhibits the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *Eur J Pharmacol.* 2007; 568(1-3):248-59.
81. Hartwell J L. (1982). *Plants Used Against Cancer.* 709 pp. Lawrence, Massachusetts: [This book lists plants reported to possess anti-cancer activity, covering up to 1971. It has been updated by Farnsworth et al. *J. Ethnopharmacology*, 2000; 73,347-377.
82. Heidemann A, Völkner W, Mengs U. Genotoxicity of aloe emodin in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 1996; 367(3):123-33.
83. Hennet T, Richter C, Peterhans E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem J.* 1993; 289 ( Pt 2):587-92.
84. Hofle G, Reichenbach H. Epothilone, a Myxobacterial Metabolite with Promising Antitumor Activity. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ., Eds Taylor and Francis: Boca raton, Fl, 2005 pp. 413-450.
85. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl JMed*, 2009; 361:1570–1583.
86. Hörnle M, Peters N, Thayaparasingham B, Vörsmann H, Kashkar H, Kulms D. Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene.* 2011; 30(5):575-87.

87. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68(23):3853-68.
88. Huang HC, Chang JH, Tung SF, Wu RT, Foegh ML, Chu SH. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *Eur J Pharmacol.* 1992;211:359-64
89. Huang HC, Lee CR, Chao PD, Chen CC, Chu SH. Vasorelaxant effect of emodin, an anthraquinone from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol* 1991;205:289-94
90. Huang Y, Boskovic G, Niles RM. Retinoic acid-induced AP-1 transcriptional activity regulates B16 mouse melanoma growth inhibition and differentiation. *J Cell Physiol.* 2003; 194(2):162-70.
91. Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt CA, Benbow U, Slingsluff CL Jr, Brinckerhoff CE. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem.* 2004; 279(32):33168-76.
92. Hurley, K.E., Chapman, P.B. Helping melanoma patients decide whether to choose adjuvant high-dose interferon-alpha2b. *Oncologist* 2005, 10, 739-742
93. Inman BA, Frigola X, Dong H, Kwon ED. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets.*2007; 7(1):15-30.
94. Janji B, Vallar L, Al Tanoury Z, Bernardin F, Vetter G, Schaffner-Reckinger E, Berchem G, Friederich E, Chouaib S. The actin filament cross-linker L-plastin confers resistance to TNF-alpha in MCF-7 breast cancer cells in a phosphorylation-dependent manner. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6A):1264-75.
95. Jiménez-Cervantes C, Martínez-Esparza M, Pérez C, Daum N, Solano F, García-Borrón JC. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 12):2335-44.
96. Jin CY, Choi YH, Moon DO, Park C, Park YM, Jeong SC, Heo MS, Lee TH, Lee JD, Kim GY. Induction of G2/M arrest and apoptosis in human gastric epithelial AGS cells by aqueous extract of *Agaricus blazei*. *Oncol Rep.* 2006; 16(6):1349-55.

97. Kang HK, Suh JH, Lee JJ, Yoon SH, Hyun JW, Choi SW, Choi JY, Ryu KH, Chung MH. Induction of the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells by L-ascorbic acid. *Free Radic Res.* 2003; 37(7):773-9.
98. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004; 11(4):448-57.
99. Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res.* 2003; 63(9):2103-8.
100. Kapoor LD, CRC Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants, CRC, Press, Boca Raton 1990.
101. Kelly GL, Strasser A. The essential role of evasion from cell death in cancer. *Adv Cancer Res.* 2011;111:39-96.
102. Kim TJ, Lee JW, Song SY, Choi JJ, Choi CH, Kim BG, Lee JH, Bae DS. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Br J Cancer.* 2006; 94(11):1678-82.
103. Kim MH, Minton AZ, Agrawal V. C/EBPbeta regulates metastatic gene expression and confers TNF-alpha resistance to prostate cancer cells. *Prostate.* 2009; 69(13):1435-47.
104. Kim YM, Lee CH, Kim HG, Lee HS. Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 2004;52:6096-100
105. Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*,2007;121, 1–14.
106. H. M. Kluger, M. McCarthy, A. Alvero, K. Divito, R. Camp, D. Rimm, G. Mor. XIAP is highly expressed in melanoma and is associated with chemotherapy resistance. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 8008.
107. Konopleva M, Milella M, Ruvolo P, Watts JC, Ricciardi MR, Korchin B, McQueen T, Bommann W, Tsao T, Bergamo P, Mak DH, Chen W, McCubrey J, Tafuri A, Andreeff M. MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis



- via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex. *Leukemia*. 2011. doi: 10.1038/leu.2011.287.
108. Krumbiegel G, Schulz HU. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man. *Pharmacology*. 1993; 47 Suppl 1:120-4.
109. Kumar A, Dhawan S, Aggarwal BB. Emodin (3-methyl-1, 6, 8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 1998;17:913-8
110. Kuo PL, Lin TC, Lin CC. The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sci*. 2002; 71(16):1879-92.
111. Kuwajima A, Sakai M, Iwashita J, Abe T. Differentiation of B16-BL6 melanoma cells into microtubule-associated protein 2- positive cells after treatment with the histone deacetylase inhibitors butyrate and trichostatin A. *Journal of health science*. 2009;55(1):138-142.
112. Lampronti I, Saab AM, Gambari R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol*. 2006; 29(4):989-95.
113. Landau M, Weizman A, Zoref-Shani E, Beery E, Wasseman L, Landau O, Gavish M, Brenner S, Nordenberg J. Antiproliferative and differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol*. 1998 Oct 15;56(8):1029-34
114. Lansiaux A. i Pourquier P. Molecular determinants of response to topoisomerase II inhibitors. *Bull Cancer*. 2011; 98(11):1299-1310.
115. Lansiaux A., Antimetabolites. *Bull Cancer*. 2011; 98(11):1263-74.
116. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367(6464):645-8.
117. Lawson DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2044-50.

118. Lee HZ, Hsu SL, Liu MC, Wu CH. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Eur J Pharmacol.* 2001; 431(3):287-95.
119. Lee HZ, Lin CJ, Yang WH, Leung WC, Chang SP. Aloe-emodin induced DNA damage through generation of reactive oxygen species in human lung carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006; 239(1):55-63.
120. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 318(3):1375-87.
121. Lin JG, Chen GW, Li TM, Chouh ST, Tan TW, Chung JG. Aloe-emodin induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells through the p53 dependent apoptotic pathway. *J Urol.* 2006; 175(1):343-7.
122. Lin ML, Lu YC, Chung JG, Li YC, Wang SG, N G SH, Wu CY, Su HL, Chen SS. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.* 2010; 291(1):46-58.
123. Li L, Borodyansky L, Yang Y. Genomic instability en route to and from cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2009; 8(7):1000-2.
124. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18 Suppl):5054s-5059s.
125. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(12):2405-19.
126. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene.* 2004; 23(16):2766-73.
127. Lode HN, Xiang R, Pertl U, Förster E, Schoenberger SP, Gillies SD, Reisfeld RA. Melanoma immunotherapy by targeted IL-2 depends on CD4(+) T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction. *J Clin Invest.* 2000 ;105(11):1623-30.
128. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):485-95.

129. Lu GD, Shen HM, Chung MC, Ong CN. Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 2007; 28(9):1937-45.
130. Lu GD, Shen HM, Ong CN, Chung MC. Anticancer effects of aloe-emodin on HepG2 cells: Cellular and proteomic studies. *Proteomics Clin Appl*. 2007; 1(4):410-9.
131. Marian CO, Shay JW. Prostate tumor-initiating cells: a new target for telomerase inhibition therapy? *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792(4):289-96.
132. McCubrey JA, Chappell WH, Abrams SL, Franklin RA, Long JM, Sattler JA, Kempf CR, Laidler P, Steelman LS. Targeting the cancer-initiating cell: the Achilles' heel of cancer. *Adv Enzyme Regul*. 2011;51(1):152-62.
133. Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem J*. 1989; 263(2):539-45.
134. Melnikova VO, Bolshakov SV, Walker C, Ananthaswamy HN. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene*, 2004;23:2347-2356.
135. Meng L, Tao H, Dong G, Yang T, Zhang W, Zhu W, Huang C. ERK1/2 and AKT pathway were activated during (3R,6R)-Bassiatin (1)-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Cell Biol Int*. 2012; 36(4):345-8
136. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Mojic M, Timotijevic G, Miljkovic D, Mangano K, Donia M, Di Cataldo A, Al-Abed Y, Cheng KF, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J Cell Physiol* 2011;226:1803-12.
137. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Kaludjerovic GN, Sabo TJ, Trajkovic V. Aloe emodin decreases the ERK-dependent anticancer activity of cisplatin. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(11):1275-82.

138. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic Dj, Harhaji Lj, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(5):589-98.
139. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Popadic D, Momcilovic M, Harhaji L, Miljkovic D, Trajkovic V. Aloe-emodin prevents cytokine-induced tumor cell death: the inhibition of auto-toxic nitric oxide release as a potential mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(14):1805-15.
140. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Timotijevic G, Miljkovic D, Donia M, Libra M, Coco M, McCubrey J, Al-Abed Y, Korac A, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Induction of caspase-independent apoptotic-like cell death of mouse mammary tumor TA3Ha cells in vitro and reduction of their lethality in vivo by the novel chemotherapeutic agent GIT-27NO. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(8):1090-9.
141. Mijatovic SA, Timotijevic GS, Miljkovic DM, Radovic JM, Maksimovic-Ivanic DD, Dekanski DP, Stosic-Grujicic SD. Multiple antimelanoma potential of dry olive leaf extract. *Int J Cancer.* 2011; 128(8):1955-65. doi: 10.1002/ijc.25526.
142. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006 Jul 6;355(1):51-65.
143. Mitra R, Singh S, Khar A. Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5(3):1-19.
144. Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N, Artigou JY. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol.* 2010; 144(1):3-15.
145. Mueller SO, Stopper H, Dekant W. Biotransformation of the anthraquinones emodin and chrysophanol by cytochrome P450 enzymes. Bioactivation to genotoxic metabolites. *Drug Metab Dispos.* 1998; 26(6):540-6.
146. Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. *Anticancer Drugs.* 2010; 21(3):215-27.
147. Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 2006; 13(6):962-72.

148. Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, Soma G. A new method of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors. *Anticancer Res.* 2000; 20(6A):4087-96.
149. Nappi AJ, Vass E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Melanoma Res.* 1996; 6(5):341-9.
150. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A. Inhibition of MEK/ERK signaling induces apoptosis of acute myelogenous leukemia cells via inhibition of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 and down-regulation of Mcl-1. *Apoptosis.* 2010; 15(7):795-804.
151. Obrador E, Carretero J, Ortega A, Medina I, Rodilla V, Pellicer JA, Estrela JM. gamma-Glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver. *Hepatology.* 2002; 35(1):74-81.
152. Ogiwara K, Hata K. Melanoma cell differentiation induced by lupeol separates into two stages: morphological and functional changes. *J Nat Med.* 2009; 63:323–326.
153. Ohguchi K, Banno Y, Akao Y, Nozawa Y. Involvement of phospholipase D1 in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *J Biol Chem.* 2004; 279(5):3408-12.
154. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(8):592-603.
155. Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.* 2003; 10(4):431-42.
156. Ou YC, Yang CR, Cheng CL, Raung SL, Hung YY, Chen CJ. Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT. *Eur J Pharmacol.* 2007; 563(1-3):49-60.
157. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res.* 2001; 61(2):439-44.
158. Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(4):828-32.

159. Patel PM, Suci S, Mortier L. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus decarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). *Eur J Cancer* 2011; 47(10):1476-83.
160. Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palù G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* 2000; 60(11):2800-4.
161. Peinado P, Martinez-Liarte JH, del Marmol V, Solano F, Lozano JA. Glutathione depletion in mouse melanoma cells increases their sensitivity to oxidative lysis. *Cancer J.* 1992;5:348-353
162. Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999; 112(5):751-6.
163. Pitt SC, Chen H, Kunnimalaiyaan M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling suppresses tumor cell proliferation and neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors. 2009; 16(10):2936-42.
164. Poluha W, Schonhoff CM, Harrington KS, Lachyankar MB, Crosbie NE, Bulseco DA, Ross AH. A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(38):24002-7.
165. Pourquier P. Alkylating agents. *Bull Cancer.* 2011; 98(11):1237-51.
166. H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P.K. Moore. *Pharmacology. Data status 2005*
167. Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(2):241-65.
168. Richtig E, Hofmann-Wellenhof R, Pehamberger H, Forstinger Ch, Wolff K, Mischer P, Raml J, Fritsch P, Zelger B, Ratzinger G, Koller J, Lang A, Konrad K, Kindermann-Glebowski E, Seeber A, Steiner A, Fialla R, Pachinger W, Kos C, Klein G, Kehrer H, Kerl H, Ulmer H, Smolle J. Temozolomide and interferon alpha 2b in metastatic melanoma stage IV. *Br J Dermatol.* 2004; 151(1):91-8.

- 169.Reynolds T. The compounds in aloe leaf exudates: a review. *Bot. J Linn.* 1985; Soc.90, 157-177
- 170.Robert A. Weinberg „, Cancer“. Data status 2008.
171. Satyamoorthy K, Li G, Gerrero MR, Brose MS, Volpe P, Weber BL, Van Belle P, Elder DE, Herlyn M. Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* 2003; 63(4):756-9.
- 172.Sauroja, I., Smeds, J., Vlaykova, T., Kumar, R., Talve, L., Hahka-Kemppinen, M., Punnonen, K., Jansen, C.T., Hemminki, K.,and Pyrhonen, S. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 28, 404-414.
- 173.Scheier B, Amaria R, Lewis K, Gonzalez R. Novel Therapies in Melanoma. *Immunotherapy.* 2011;3(12):1461-1469.
- 174.Schultes, Richard Evans; and Robert F. Raffauf (1990). *The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia.* Portland, Or.: Dioscorides Press. ISBN 0-931146-14-3.
- 175.Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J.*2006; 1(2):138-47.
- 176.Sell S. Cellular origin of cancer: differentiation or stem cell maturation arrest? *Environ Health Perspect*, 101:15-26,1993.
- 177.Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S, Bratasz A, Trigg NJ, Kutala VK, Hideg K, Kuppusamy P. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem.* 2007; 282(39):28609-18.
- 178.Shah MA, Kortmansky J, Motwani M, Drobnjak M, Gonen M, Yi S, Weyerbacher A, Cordon-Cardo C, Lefkowitz R, Brenner B, O'Reilly E, Saltz L, Tong W, Kelsen DP, Schwartz GK. A phase I clinical trial of the sequential combination of irinotecan followed by flavopiridol. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(10):3836-45.

179. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599E-B-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2412-21.
180. Sharp S, Workman P. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res.* 2006; 95:323-48.
181. Sherwin SA, Sliski AH, Todaro GJ. Human melanoma cells have both nerve growth factor and nerve growth factor-specific receptors on their cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1288-92
182. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004; 84(4):1155-228.
183. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003; 22(20):3138-51.
184. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5):1065-73.
185. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64(19):7002-10.
186. Steinbeck MJ, Kim JK, Trudeau MJ, Hauschka PV, Karnovsky MJ. Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of clonal HD-11EM cells into osteoclast-like cells. *J Cell Physiol.* 1998; 176(3):574-87.
187. Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliverio S, Carlomosti F, Beninati S. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sci.* 2010; 87(9-10):316-24.
188. Tada KI, Kawahara KI, Matsushita S, Hashiguchi T, Maruyama I, Kanekura T. MK615, a *Prunus mume* Steb. Et Zucc ('Ume') Extract, Attenuates the Growth of A375 Melanoma Cells by Inhibiting the ERK1/2-Id-1 Pathway. *Phytother Res.* 2011. doi: 10.1002/ptr.3645.
189. Talmadge, J. E., Donkor, M., Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, 26, 373-400.



190. Tang CH, Grimm EA. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 2004; 279(1):288-98.
191. Tarhini AA, Agarwala SS. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatol Ther.* 2006; 19(1):19-25.
192. Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J. Leukoc. Biol.* 2008; 84, 988–993.
193. Thannickal VJ, Hassoun PM, White AC, Fanburg BL. Enhanced rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from bovine pulmonary artery endothelial cells induced by TGF-beta 1. *Am J Physiol.* 1993; 265(6 Pt 1):L622-6.
194. Thannickal VJ, Fanburg BL. Activation of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating NADH oxidase in human lung fibroblasts by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem.* 1995; 270(51):30334-8.
195. Thompson J.F., Morton D.L., Kroon B.R., J.F. “Textbook of melanoma”. Data status 2004
196. Tokumoto YM, Durand B, Raff MC. An analysis of the early events when oligodendrocyte precursor cells are triggered to differentiate by thyroid hormone, retinoic acid, or PDGF withdrawal. *Dev Biol.* 1999; 213(2):327-39.
197. Töpfer K, Kempe S, Müller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, Schackert G, Temme A. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:918471.
198. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995; 358(1):1-3.
199. Trosko JE. Review paper: cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells. *Vet Pathol.* 2009; 46(2):176-93.
200. Tse T.W. Use of common Chinese herbs in the treatment of psoriasis. *Clin. And Exp. Derm.* 2003; 28:469-475

201. Ullmannová V, Stöckbauer P, Hradcová M, Soucek J, Haskovec C. Relationship between cyclin D1 and p21 (Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res.* 2003; 27(12):1115-23.
202. Umansky V, Schirmacher V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. *Adv Cancer Res.* 2001;82:107-31.
203. Varagić, V. M., Milošević, M. P. *Farmakologija, Elit – Medica, Beograd* 2004
204. Vassalli P., The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:411-52.
205. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 2000; 243, 167-190
206. Viac J, Vincent C, Palacio S, Schmitt D, Claudy A. Tumor necrosis factor (TNF) soluble receptors in malignant melanoma-correlation with soluble ICAM-1 levels. *Eur J Cancer.* 1996; 32A:447-9
207. von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, Sumpton D, Bienvenut W, Morrice N, Yamada K, Lamond A, Kalna G, Orton R, Gilbert D, Kolch W. Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(12):1458-64.
208. Wang JH, Zhou YJ, Bai X, He P. Jolkinolide B from *Euphorbia fischeriana* Steud induces apoptosis in human leukemic U937 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways. *Mol Cells.* 2011; 32(5):451-7.
209. Wang HH, Chung JG, Ho CC, Wu LT, Chang CH. Aloe emodin effects on arylamine N acetyltransferase activity in the bacterium *helicobacter pylori*. *Planta Med.* 1998; 64(2):176-8.
210. Wasserman L, Avigad S, Beery E, Nordenberg J, Fenig E. The effect of aloe emodin on the proliferation of a new merkelcarcinomacell line. *Am J Dermatopathol.* 2002; 24(1):17-22.
211. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989; 49(14):3713-21.

212. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol.* 2005; 170(5):703-8.
213. Wilhelm J, Vytašek R, Ošťadalova I. Evaluation of different methods detecting intracellular generation of free radicals. *Mol Cell Biochem.* 2009;328:167-176.
214. Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol.* 2005; 36(5):486-93.
215. White, E., and DiPaola, R.S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15, 5308–5316.
216. Xiao B, Guo J, Liu D, Zhang S. Aloe-emodin induces in vitro G2/M arrest and alkaline phosphatase activation in human oral cancer KB cells. *Oral Oncol.* 2007; 43(9):905-10.
217. Xiao Q, Luo Z, Pepe AE, Margariti A, Zeng L, Xu Q. Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009; 296(4):C711-23.
218. Yagi T, Yamauchi K, Kuwano S. The synergistic purgative action of aloe-emodin anthrone and rhein anthrone in mice: synergism in large intestinal propulsion and water secretion. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:22-5
219. Yan J, Katz AE. Prosta Caid induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human and mouse androgen-dependent and-independent prostate cancer cells. *Integr Cancer Ther.* 2010; 9(2):186-96.
220. Yang, J.C., Sherry, R.M., Steinberg, S.M., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J. et al. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 3127-3132.
221. Yang F, Zhang T, Tian G, Cao H, Liu Q, Ito Y. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones from *Rheum officinale* Baill by high-speed counter-current chromatography using pH-modulated stepwise elution. *J Chromatogr A.* 1999; 858(1):103-7.

222. Yeh FT, Wu CH, Lee HZ. Signaling pathway for aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell. *Int J Cancer*. 2003; 106(1):26-33.
223. Yi-Hsiung Lin, Sheng-Huei Yang, Ching-Ming Chien, Xiu-Wei Hu, Ying-Hui Huang, Chih-Ming Lu, Yeh-Long Chen, Shinne-Ren Lin. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel indoloquinoline derivative, IQDMA, in K562 cells. *Drug Dev. Res.* 2006; 67:743–751.
224. Yoshida Y, Nakajima J, Wada H, Kakimi K.  $\gamma\delta$  T-cell immunotherapy for lung cancer. *Surg Today*. 2011; 41(5):606-11.
225. Zhang HN, He JH, Yuan L, Lin ZB. In vitro and in vivo protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sci*. 2003;19;73(18):2307-19.
226. Zhao X, Wakamatsu Y, Shibahara M, Nomura N, Geltinger C, Nakahara T, Murata T, Yokoyama KK. Mannosylerythritol lipid is a potent inducer of apoptosis and differentiation of mouse melanoma cells in culture. *Cancer Res*. 1999; 59(2):482-6.
227. Zheng M, Ekmekcioglu S, Walch ET, Tang CH, Grimm EA. Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. *Melanoma Res*. 2004; 14(3):165-71.

## **BIOGRAFIJA**

Julijana Radović rođena je 22.06.1975. godine u Beogradu. Nakon završene I beogradske gimnazije, upisuje Biološki fakultet, smer "Molekularna biologija i fiziologija", na kome diplomira 2002. godine, sa prosečnom ocenom 8,83. Diplomski rad "Virusni vektori u genskoj terapiji raka" kod mentora prof. Dr. Tanje Jovanović, odbranila je 23. septembra, 2002. godine. Od 2003. godine, volontira u laboratoriji Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Doktorske studije, smer „Neuronauke“, odsek Neurologija sa neuroimunologijom, upisuje 2006. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Doktorsku disertaciju prijavljuje 2009. godine i stiče zvanje Istraživač saradnik. Do danas je objavila pet radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 8 kongresnih saopštenja naskupovima međunarodnog značaja i 2 naskupovima domaćeg značaja.

Julijana Radović je od 01.03.2005. godine zaposlena u DNK laboratoriji Bezbednosno Informativne Agencije sa zvanjem Samostalni istraživač.

Udata je i ima dvoje dece.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Јулијана Радовић

број уписа KB060183

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање утицаја алое емодина на ћелије меланома В16 и А375 и њихову осетљивост

на цитостатике и имунски одговор

- 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, 27-06-2012. год.

Јулијана Радовић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јулијана Радовић

Број уписа KB060183

Студијски програм Неуронауке

Наслов рада Испитивање утицаја алое емодина на ћелије меланома В16 и А375 и њихову осетљивост на цитостатике и имунски одговор

Ментор др Данијела Максимовић Иванић и др Милена Катарановски

Потписани

Д. Максимовић-Иванић  
М. Катарановски

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, 27.06.2012. год.

Јулијана Радовић

## Изјава о коришћењу

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

Испитивање утицаја алое емодина на ћелије меланома В16 и А375 и њихову осетљивост

---

на цитостатике и имунски одговор

---

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
3. 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, 27.06.2012. год.

*Јулијана Раговић*