



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**АНТИТУМОРСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ И
УТИЦАЈ НА МИТОХОНДРИЈСКУ
РЕСПИРАЦИЈУ Л-КАРНОЗИНА И
ЊЕГОВИХ ФОРМУЛАЦИЈА
ПРИМЕЊЕНИХ НА
КОНТИНУИРАНИМ ЂЕЛИЈСКИМ
ЛИНИЈАМА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

Проф. др Иван Чапо
Проф. др Марко Љубковић

Кандидат:

др Александра Поповић

Нови Сад, 2022. године

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Александра Поповић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Иван Чапо, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду Проф. др Марко Љубковић, редовни професор, Медицински факултет, Свеучилиште у Сплиту
Наслов рада:	Антитуморски потенцијал и утицај на митохондријску респирацију Л-карнозина и његових формулација примењених на континуираним ћелијским линијама
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница: 250 Поглавља: 7 Референци: 406 Табела: 4 Слика: 52 Графикона: 48 Прилога: 0
Научна област:	Физиологија, Хистологија и ембриологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Физиологија, Хистологија и ембриологија
Кључне речи / предметна одредница:	глиобластом; неоплазме дојке; ћелијске линије; карнозин; антинеопластички агенси; ћелијска пролиферација; миграција ћелија; виментин; супероксид дизмутаза; митохондрије; ћелијска респирација
Резиме на језику рада:	Увод: Процес карциногенезе може се јавити у свакој ћелији, ткиву или органу што последично узрокује низ патолошких промена које резултују настанком великог броја карцинома. Запажање да митохондријска дисфункција или настали дефекти могу бити потенцијални узрок настанка туморских промена подстакло је бројне истраживаче да поље свог интересовања усмерене на испитивање патогенезе и улоге митохондрија у настанку различитих тумора. Карнозин (β -аланил-л-хистидин) је природни дипептид присутан у многим ткивима попут мишићног, плућног, ткива ока, затим у мозгу, бубрезима и јетри. Поред познатих бројних улога које испољава ова супстанца наводе се и

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

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

5г – Изјава о коришћењу.

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

антиоксидативна као и антитуморска способност које се огледају на више нивоа деловања. Ове функције Л-карнозина су испитиване на многобројним континуираним ћелијским линијама као и животињским моделима.

Циљ: Докторска дисертација је конципирана са циљем да се утврди антитуморски потенцијал чисте супстанце Л-карнозина као и препарата Карнозин EXTRA® и Now® Л-карнозин у *in vitro* условима на континуираним туморским линијама хуманог аденокарцинома дојке (MCF-7) и хуманог глиобластома (U87) анализирајући утицај на морфолошке карактеристике, пролиферативну способност, експримираност протеина виментина (ВИМ) и супероксид-дизмутаза (СОД2), миграторну способност, као и утицај на биоенергетски профил. Како би се сагледали могући ефекти ових препарата на организам човека читав концепт студије спроведен је и на здравој ћелијској линији бубрега хрчка (ВНК-21/С-13) као и на ћелијама хуманих феталних фибробласта плућа (MRC-5).

Материјал и методе: Испитивање антитуморског потенцијала спроведено је путем опсежног сагледавања бројних могућих нивоа на којима карнозин испољава своје деловање. Испитивање морфолошких карактеристика вршено је након стандардног бојења туморских и здравих ћелија хематоксилином и еозином као и употребом фазног контраста. Утицај на пролиферативну способност анализиран је употребом МТТ теста. Применом „спратцх“ есеја праћена је миграторна способност третираних ћелија. Након имунофлуоресцентног бојења применом анти-ВИМ и анти-СОД2 антитела квантификовани су резултати укупног интензитета флуоресценције. И у последњем делу експерименталне студије вршено је одређивање параметара митохондријске респирације “интактних ћелија”, одређивање концентрације дигитонина потребне за пермеабилитет ћелијске мембране и на крају одређивање параметара митохондријске респирације ћелија након пермеабилитет ћелијске мембране.

Резултати: Примена чисте супстанце Л-карнозина као и препарата Карнозин EXTRA® и Now® Л-карнозин условила је измене морфолошких својстава у погледу облика и величине, инхибицију пролиферативне способности туморских ћелија као и инхибицију миграције ћелија које ову способност поседују (U87). Утицај на експримираност протеина виментина у цитоплазми U87 ћелија након третмана препаратом Карнозин EXTRA® била је евидентна ($p < 0,0001$), док примена чисте супстанце као и препарата Now® Л-карнозин нису имали ефекта. Анализом утицаја испитиваних препарата на ниво експресије оксидативног (СОД2) маркера утврђено је да спроведени третмани узрокују смањење нивоа експримираности у митохондријама MCF-7 ћелија ($p < 0,0001$) док на U87 ћелијама не испољавају значајније промене. Такође, установљено је да су спроведени третмани код ћелија обе туморске линије довели до инхибиције продукције енергије путем деловања на компоненте респираторног ланца митохондрија ($p < 0,0001$). У погледу деловања на здравим ћелијама спроведени третман чистом супстанцом Л-карнозин као и препаратом Now® Л-карнозин није условио измене морфолошких својстава и пролиферативне способности, док је препарат Карнозин EXTRA® изазвао супротне ефекте када је у питању ћелијска линија MRC-5 ($p < 0,0001$). Препарат Карнозин EXTRA® доводи до повећања експримираности протеина ВИМ у свим концентрацијама као и пораста експресије СОД2 маркера при концентрацијама карнозина од 5 и 10 mM код обе здраве ћелијске линије ($p < 0,0001$). Третман препаратом

	<p>Now® Л-карнозин код ВНК-21/С-13 условљио је смањење док код МРЦ-5 ћелија пораст СОД2 маркера (p<0,0001). Спроведени третмани при концентрацији од 2 и 5 мМ карнозина условили су повећање продукције енергије путем стимулације активности комплекса респираторног ланца митохондрија као и максималног капацитета електрон транспортног система код ВНК-21/С-13 ћелија (p<0,0001), док је концентрација од 10 мМ карнозина испољила инхибиторне ефекте (p<0,0001). Инкубација МРЦ-5 ћелија са чистом супстанцом Л-карнозин као и препаратом Now® Л-карнозин при свим испитиваним концентрацијама довела је до инхибиције активности комплекса и респираторног ланца митохондрија уз последично смањење вредности максималног капацитета електрон транспортног система, док је примена препарата Карнозин EXTRA® узроковала инхибицију продукције енергије делујући на свим нивоима респираторног ланца митохондрија.</p> <p>Закључак: Антитуморски потенцијал и цитотоксични ефекти испитиваних препарата на континуираним туморским линијама доказани су путем деловања карнозина на више ћелијских нивоа. Међутим, тачан молекуларни механизам још увек је непознаница. Резултати изнети у овој докторској дисертацији на туморским али и здравим ћелијским линијама говоре о потреби за даљим ин виво али и клиничким истраживањима а све у сврху далекосежног циља будуће примене ових препарата како у превентивне а тако и у терапијске сврхе обољења која погађају хуману популацију.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	23.03.2021. године
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OR CENTER**

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Aleksandra Popović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. dr Ivan Čapo, associate professor, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad Prof. dr Marko Ljubković, associate professor, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Split School of Medicine
Thesis title:	Antitumour potential and effects of L-carnosine and its formulations on mitochondrial respiration after treatment of continuous cell lines
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages: 250 Chapters: 7 References: 406 Tables: 4 Illustrations: 52 Graphs: 48 Appendices: 0
Scientific field:	Physiology, Histology and embryology
Scientific subfield (scientific discipline):	Physiology, Histology and embryology
Subject, Key words:	Glioblastoma; Breast Neoplasms; Cell Line; Carnosine; Antineoplastic Agents; Cell Proliferation; Cell Movement; Vimentin; Superoxide Dismutase; Mitochondria; Cell Respiration
Abstract in English language:	Introduction: The process of carcinogenesis may be developed in any cell, tissue or organ, which consequently causes a series of pathological changes resulting in different cancers. Mitochondrial dysfunction or defects could be a potential cause of tumour changes, which has encouraged numerous researchers to focus their field of interest on examining the pathogenesis and role of mitochondria in the development of various tumours. Carnosine (β -alanyl-l-histidine) is a natural dipeptide present in many tissues such as muscles, lungs, eyes, brain, kidneys and liver. In addition to the well-known numerous roles, there are also an antioxidant and antitumour potential of L-

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

5Ā – Statement on the authority,

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

5r – Statement on copyright licenses.

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

carnosine, which are reflected on several levels of action. These functions of L-carnosine have been investigated on numerous continuous cell lines as well as on animal models.

The aim: This thesis was designed to determine the antitumour potential of the pure substance L-carnosine as well as the supplements Karnozin EXTRA® and Now® L-carnosine *in vitro* on continuous tumour cell lines of human breast adenocarcinoma (MCF-7), and human glioblastoma (U87), analyzing the effects on morphological features, proliferative capacity, vimentin (VIM), and superoxide dismutase (SOD2) protein expression, migratory ability, as well as the effect on their bioenergetic profile. To understand the possible effects of these formulations, the entire concept of the study were carried out on the healthy hamster kidney cell line (BHK-21/C-13), and on human fetal lung fibroblast cells (MRC-5).

Material and methods: The evaluation of antitumour potential was conducted by analyzing a number of possible levels on which carnosine exerts its action. Morphological changes were analyzed after standard staining of tumor and healthy cells with hematoxylin and eosin, and by using phase contrast. The proliferative capacity was analyzed using the MTT test. The migratory ability of the treated cells was monitored by "scratch" assay. Using immunofluorescent staining of cells with anti-VIM and anti-SOD2 antibodies, the total fluorescence intensity was determined. In the last part of the experimental study we analyzed the "intact cells" respiration, digitonin concentration required for cell membrane permeabilization, and activities of mitochondrial respiratory complexes.

Results: Application of the pure substance of L-carnosine, and the Karnozin EXTRA® and Now® L-carnosine resulted in changes in morphological characteristics in terms of shape and size. Inhibition of the proliferative capacity of both tumour cell lines and migration of U87 cells were also presented. The effect on the VIM expression in the cytoplasm of U87 cells after treatment with the Karnozin EXTRA® was evident ($p < 0.0001$), while the application of the pure substance and the Now® L-carnosine had no effect. Analysis of the oxidative (SOD2) marker level revealed that the treatments caused a decrease in the MCF-7 cells ($p < 0.0001$), while no significant changes were observed in U87 cells. Also, it was established that the treatments of both tumour lines led to the inhibition of energy production by acting on the components of the mitochondrial respiratory chain. Regarding the effect on healthy cells, the treatment with the pure substance of L-carnosine, and Now® L-carnosine did not change the morphology and proliferative capacity, while the Karnozin EXTRA® caused the opposite effects on the MRC-5 cell line. Treatment with Karnozin EXTRA® led to an increase in the expression of VIM at all concentrations ($p < 0.0001$), as well as an increase in the SOD2 expression at the carnosine concentrations of 5 and 10 mM in both healthy cell lines ($p < 0.0001$). Treatment with Now® L-carnosine in BHK-21/C-13 cells decreased, while in MRC-5 cells increased SOD2 expressions ($p < 0.001$). Treatments carried out at concentrations of 2

	<p>and 5 mM of carnosine led to an increase in energy production by stimulating the activity of the mitochondrial respiratory chain complex as well as the maximum capacity of the electron transport system in BHK-21/C-13 cells ($p < 0.0001$), while the concentration of 10 mM carnosine exhibited inhibitory effects ($p < 0.0001$). Incubation of MRC-5 cells with the pure substance L-carnosine as well as the preparation Now[®] L-carnosine at all tested concentrations led to the inhibition of the activity of complex I of the mitochondrial respiratory chain with a consequent decrease in the value of the maximum capacity of the electron transport system, while the application of the preparation Karnozin EXTRA[®] caused the inhibition of energy production by acting on all levels of the mitochondrial respiratory chain ($p < 0.001$).</p> <p>Conclusion: The antitumour potential and cytotoxic effects of the tested L-carnosine formulations on continuous tumour cell lines were proven through the its action on several cellular levels. However, the exact molecular mechanism is still unraveled. The results presented in this thesis on tumour and healthy cell lines indicate for further <i>in vivo</i> and clinical studies, all for the far-reaching goal of the future application of these formulations for both preventive and supportive treatment of diseases that affect the human population.</p>
Accepted on Scientific Board on:	23.03.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

ZAHVALNICA

Hvala cenjenim mentorima Prof. dr Ivanu Čapi i Prof. dr Marku Ljubkoviću koji su nesebično podelili svoje znanje, vreme, trud i rad i time omogućili da ova doktorska disertacija ugleda svetlost dana.

Zahvaljujem se svim kolegama, rodbini i prijateljima koji su mi bili velika podrška.

*Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojim dragim roditeljima, suprugu Milanu i ćerki Lari.
Zajedno smo se borili i zajedno postigli cilj!*

Aleksandra Popović

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Odlike malignih tumora	1
1.2. Karakteristike energetskeg metabolizma zdravih i tumorskih ćelija	4
1.2.1. Energetski metabolizam zdravih ćelija	4
1.2.1.1. <i>Krebsov ciklus</i>	4
1.2.1.2. <i>Kompleksi respiratornog lanca mitohondrija</i>	7
1.2.1.3. <i>Inhibitori kompleksa respiratornog lanca mitohondrija</i>	14
1.2.2. Energetski metabolizam tumorskih ćelija	16
1.3. Karcinom dojke	17
1.3.1. Epidemiologija karcinoma dojke	17
1.3.2. Etiologija karcinoma dojke	17
1.3.3. Dijagnoza karcinoma dojke	19
1.3.4. Klasifikacija karcinoma dojke	21
1.3.5. Terapija karcinoma dojke	24
1.4. Glioblastom	27
1.4.1. Epidemiologija glioblastoma	27
1.4.2. Etiologija glioblastoma	28
1.4.3. Klinički znaci oboljenja	29
1.4.4. Dijagnostičke metode	29
1.4.5. Morfološke karakteristike glioblastoma	30
1.4.6. Terapija oboljenja	33
1.5. Karnozin	36
1.5.1. Karnozin i njegovi prirodni derivati	36
1.5.2. Distribucija karnozina i njegovih prirodnih derivata u tkivima	37
1.5.3. Uloge karnozina	39
1.5.3.1. <i>Antioksidativna aktivnost karnozina</i>	39
1.5.3.2. <i>Fiziološke uloge karnozina u skeletnoj mišićavosti</i>	41
1.5.3.3. <i>Pozitivni efekti karnozina pri suplementacionoj primeni kod raznih oboljenja</i>	42
1.5.3.4. <i>Antitumorski potencijal karnozina</i>	43
2. CILJEVI I HIPOTEZE	45

3. MATERIJAL I METODE	47
3.1. Materijal	47
3.1.1. Hemikalije, reagensi i rastvori	47
3.1.2. Priprema L-karnozin supstance	50
3.1.3. Ispitivane ćelijske linije	51
3.1.4. Kultivacija i subkultivacija kontinuiranih ćelijskih linija u jednom sloju	51
3.1.4.1. Kultivacija ćelija u pločama sa otvorima za potrebe bojenja	52
3.1.4.2. Kultivacija ćelija u flasku T75 cm ² za potrebe merenja parametara mitohondrijske respiracije	52
3.1.5. Test odbacivanja boje	53
3.1.6. Eksperimentalni dizajn istraživanja	53
3.2. Metode	55
3.2.1. Određivanje morfoloških karakteristika ispitivanih ćelijskih linija	55
3.2.1.1. Ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija bojenih hematoksilinom i eozinom (H&E bojenje)	55
3.2.1.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika nativnih ćelija	56
3.2.2. Test vijabiliteta ispitivanih ćelijskih linija nakon tretmana	56
3.2.3. Ispitivanje migratorne sposobnosti kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija nakon tretmana – in vitro "scratch" esej	57
3.2.4. Imunofluorescentno bojenje kontinuiranih ćelijskih linija	58
3.2.5. Ispitivanje parametara mitohondrijske respiracije kontinuiranih ćelijskih linija	59
3.2.5.1. Određivanje parametara mitohondrijske respiracije "intaktnih ćelija"	59
3.2.5.2. Određivanje koncentracije digitonina potrebne za permeabilizaciju ćelijske membrane ispitivanih kontinuiranih ćelijskih linija	60
3.2.5.3. Određivanje parametara mitohondrijske respiracije ćelija nakon permeabilizacije ćelijske membrane	61
3.2.6. Statistička obrada i analiza dobijenih rezultata	61
4. REZULTATI	62
4.1. Analiza morfoloških karakteristika ćelijskih linija nakon tretmana	62
4.1.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)	62
4.1.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija	63
4.1.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija	64
4.1.1.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija	65

4.1.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)	65
4.1.2.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju MRC-5 ćelija</i>	66
4.1.2.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju MRC-5 ćelija</i>	67
4.1.2.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju MRC-5 ćelija</i>	68
4.1.3. Ćelije adenocarcinoma dojke (MCF-7)	68
4.1.3.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju MCF-7 ćelija</i>	69
4.1.3.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju MCF-7 ćelija</i>	70
4.1.3.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju MCF-7 ćelija</i>	71
4.1.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	72
4.1.4.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju U87 ćelija</i>	72
4.1.4.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju U87 ćelija</i>	73
4.1.4.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju U87 ćelija</i>	74
4.2. Antiproliferativna aktivnost različitih preparata karnozina na ispitivanim ćelijskim linijama	75
4.2.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)	75
4.2.1.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	75
4.2.1.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	75
4.2.1.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	75
4.2.1.4. <i>Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	76
4.2.1.5. <i>Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	76
4.2.1.6. <i>Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija</i>	76
4.2.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)	77
4.2.2.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	77
4.2.2.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	77
4.2.2.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	78
4.2.2.4. <i>Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	79
4.2.2.5. <i>Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	79
4.2.2.6. <i>Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija</i>	79
4.2.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)	80
4.2.3.1. <i>Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet MCF-7 ćelija</i>	80
4.2.3.2. <i>Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na vijabilitet MCF-7 ćelija</i>	81
4.2.3.3. <i>Uticaj preparata Now® L-karnozin na vijabilitet MCF-7 ćelija</i>	81

4.2.3.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija	82
4.2.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija	82
4.2.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija	82
4.2.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	83
4.2.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet U87 ćelija	83
4.2.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na vijabilitet U87 ćelija	83
4.2.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na vijabilitet U87 ćelija	84
4.2.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija	85
4.2.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija	85
4.2.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija	85
4.3. Inhibitorni potencijal ispitivanih preparata na migratornu sposobnost tumorskih ćelija – in vitro "scratch"esej	87
4.3.1. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)	87
4.3.2. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	88
4.3.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na migratornu sposobnost U87 ćelija	88
4.3.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na migratornu sposobnost U87 ćelija	89
4.3.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na migratornu sposobnost U87 ćelija	90
4.3.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija	91
4.3.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija	91
4.3.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija	92
4.4. Efekti ispitivanih preparata na ekspresiju vimentina nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija	93
4.4.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)	93
4.4.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	93

4.4.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	95
4.4.1.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	96
4.4.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	98
4.4.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	98
4.4.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija	99
4.4.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)	100
4.4.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije vimentina kod MRC-5 ćelija	100
4.4.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina kod MRC-5 ćelija	101
4.4.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina kod MRC-5 ćelija	103
4.4.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija	104
4.4.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija	105
4.4.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija	105
4.4.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)	106
4.4.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	107
4.4.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	107
4.4.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	108
4.4.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	110
4.4.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	111
4.4.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	111
4.4.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija	112

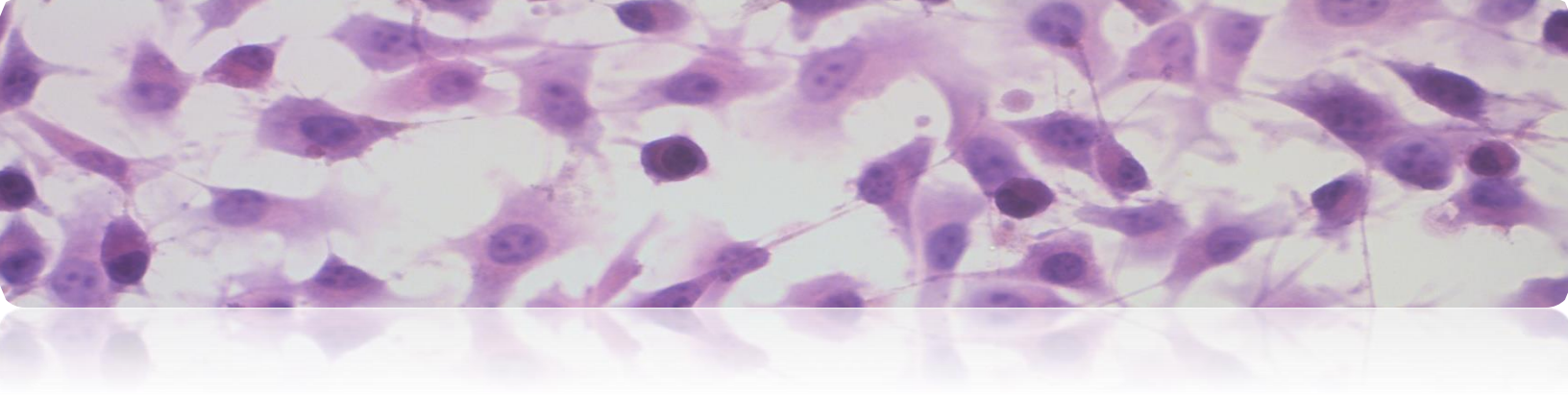
4.5. Efekti ispitivanih preparata na ekspresiju SOD2 nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija	113
4.5.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)	113
4.5.1.1. <i>Uticao čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	113
4.5.1.2. <i>Uticao preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	114
4.5.1.3. <i>Uticao preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	115
4.5.1.4. <i>Uticao koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	117
4.5.1.5. <i>Uticao koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	117
4.5.1.6. <i>Uticao koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija</i>	118
4.5.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)	119
4.5.2.1. <i>Uticao čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MRC-5 ćelija</i>	119
4.5.2.2. <i>Uticao preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MRC-5 ćelija.....</i>	120
4.5.2.3. <i>Uticao preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MRC-5 ćelija</i>	122
4.5.2.4. <i>Uticao koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija</i>	123
4.5.2.5. <i>Uticao koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija</i>	123
4.5.2.6. <i>Uticao koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija</i>	124
4.5.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)	125
4.5.3.1. <i>Uticao čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MCF-7 ćelija.....</i>	125
4.5.3.2. <i>Uticao preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MCF-7 ćelija.</i>	126
4.5.3.3. <i>Uticao preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 kod MCF-7 ćelija</i>	127
4.5.3.4. <i>Uticao koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija</i>	128

4.5.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija	128
4.5.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija	129
4.5.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	130
4.5.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije SOD2 kod U87 ćelija ..	130
4.5.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 kod U87 ćelija ..	131
4.5.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 kod U87 ćelija ..	132
4.5.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija	133
4.5.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija	133
4.5.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija	133

4.6. Efekti ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija

4.6.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)	135
4.6.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	135
4.6.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	138
4.6.1.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	140
4.6.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	142
4.6.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	144
4.6.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija	146
4.6.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)	148
4.6.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	148
4.6.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	150
4.6.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	152

4.6.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	154
4.6.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	157
4.6.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija	159
4.6.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)	161
4.6.3.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	161
4.6.3.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	164
4.6.3.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	166
4.6.3.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	168
4.6.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	170
4.6.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija	172
4.6.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)	174
4.6.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija.....	174
4.6.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija.	177
4.6.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija.	180
4.6.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija	182
4.6.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija	184
4.6.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija	186
5. DISKUSIJA	188
6. ZAKLJUČCI	209
7. LITERATURA	213

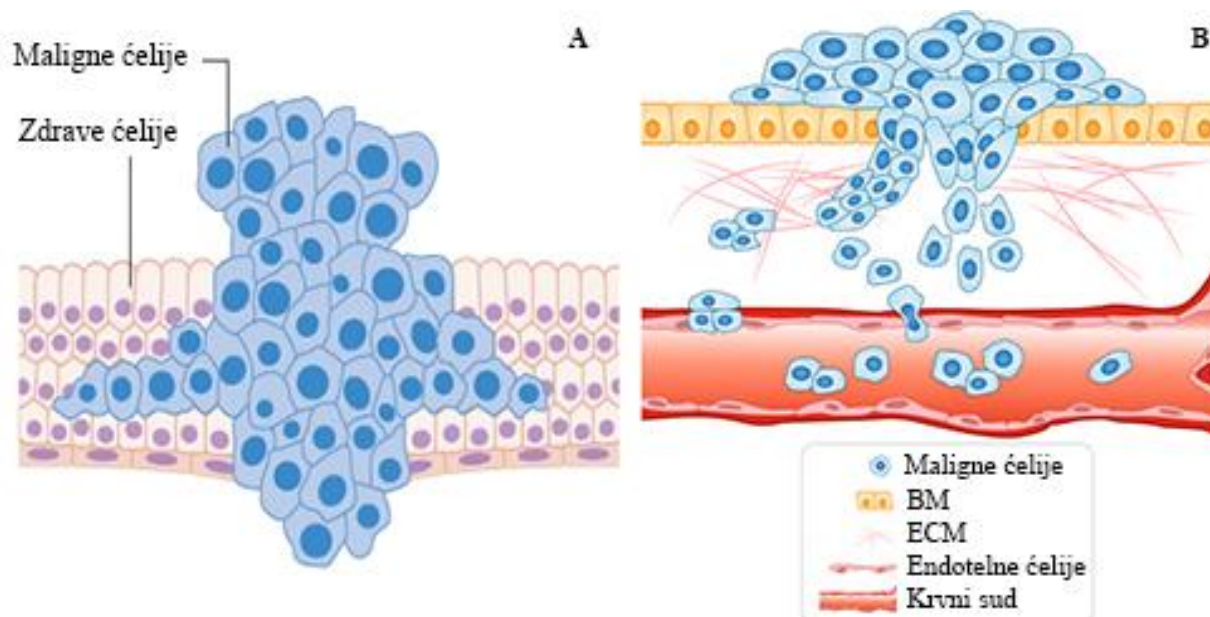


1. UVOD

1.1. Odlike malignih tumora

Proces karcinogeneze može se javiti u svakoj ćeliji, tkivu ili organu što uzrokuje patološke promene koje rezultuju nastankom velikog broja karcinoma. U osnovi patogeneze je multifaktorski proces koji je prvenstveno stimulisan genetskim predispozicijama ali i faktorima životne sredine. Broj smrtnih slučajeva pacijenata obolelih od karcinoma se zabrinjavajuće povećava svake godine što ovo oboljenje svrstava u jedan od glavnih uzroka smrti širom sveta (1, 2). Iako značajan broj karcinoma ne mora uvek dovesti do smrtnog ishoda, jedno je sigurno imaju veliki uticaj na smanjenje kvaliteta života.

Disregulacija ćelijske proliferacije kao i metastatski potencijal ćelija karcinoma, koje potiču iz primarnog tumora, da invadiraju okolna ili udaljena tkiva predstavljaju glavne mehanizme koji omogućavaju progresiju ovog oboljenja (**Slika 1.1.1**) (3). Abnormalna ćelijska proliferacija nastaje usled disregulacije ćelijskog ciklusa (posebno se naglašava prelazna faza G1/S), izazvane promenama u ekspresiji onkogeni kao i tumor supresor gena koji su ključni u kontroli ćelijskog ciklusa (4).



Slika 1.1.1. Šematski prikaz **A)** ćelijske proliferacije i **B)** migracije malignih ćelija. BM - bazalna membrana, ECM – ekstrascelularni matriks. *Preuzeto i modificirano iz rada: Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. Br J Cancer. 2021;24(1):102-14. i sa sajta: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancers-grow>*

Brojna istraživanja su posvećena proučavanju mehanizama koji su ključni i doprinose sposobnosti malignih ćelija da migriraju kroz ekstrascelularni matriks (ECM) čime se ujedno uspostavlja nastanak sekundarnih metastatskih promena (**Slika 1.1.1B**) (5-7). Među najznačajnijim mehanizmima ubrajaju se: gubitak ključnih epitelnih markera poput E-kadherina i posledično raskidanje međućelijskih veza kao rezultat ili smanjenja ili inaktivacije ekspresije gena za ovaj protein; izmenjena ekspresija proteina integrina koja destabilizuje interakcije ćelija-ćelijijski matriks; stimulirana proizvodnja enzima koji imaju ulogu u razgradnji ECM, poput metaloproteaza koje olakšavaju ameboidnu migraciju malignih ćelija kroz ECM kao i disregulacija dinamike polimerizacije i kontraktilnosti aktina (8-10) što doprinosi promeni oblika ćelija, uključujući formiranje izbočina i produžetaka a sve u svrhu olakšanog kretanja (11).

Pored navedenih odlika posebno treba naglasiti prekomernu angiogenezu koja je ujedno i ključni tumorogeni fenomen (12). Angiogeneza predstavlja proces formiranja i razvoja

novih krvnih sudova iz već postojeće vaskulature (13) i uljučuje niz koraka počevši od perivaskularnog odvajanja, vaskularne dilatacije, angiogenog klijanja, formiranje novih krvnih sudova i krajnje regrutovanje perivaskularnih ćelija za stabilizaciju novoformiranih krvnih sudova (14). Naime, proces angiogeneze je u korelaciji sa inicijacijom tumora, malignom progresijom kao i lošijom prognozom (15). Hipoksično stanje unutar tumorskog središta pokreće i uslovljava signalne događje koji dovode do stimulisanja procesa angiogeneze što rezultira migracijom i proliferacijom endotelnih ćelija a sve u cilju bolje vaskularizacije (16, 17). Signalni događaji povezani sa hipoksičnim tumorskim središtem pokreću se stabilizacijom faktora indukovano hipoksijom (HIFa), koji kao ključni faktor transkripcije dovodi do indukcije i sekrecije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) (18). Aktivacijom receptora VEGFR 1 i VEGFR2 na endotelnim ćelijama iniciraju se signalni putevi koji uključuju ERK, p38 MAPK i p125FAK (19) što na kraju uslovljava i stimuliše endotelne ćelije da proizvode i luče faktore poput matriks metaloproteinaza koji pomažu u prliferaciji i hemotaksičnoj migraciji ovih ćelija (20).

1.2. Karakteristike energetskeg metabolizma zdravih i tumorskih ćelija

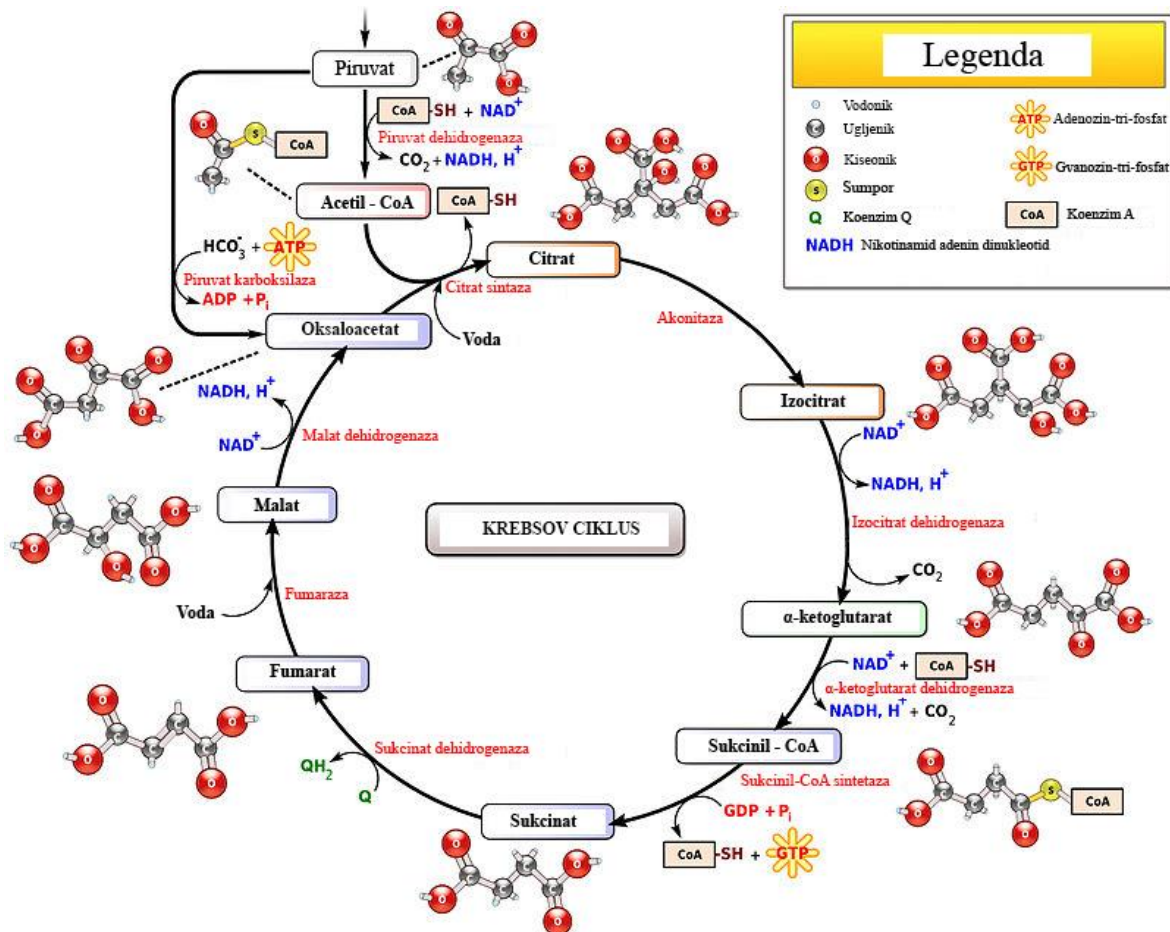
1.2.1. Energetski metabolizam zdravih ćelija

1.2.1.1. *Krebsov ciklus*

Svi aerobni organizmi se prvenstveno oslanjaju na Krebsov ciklus, koji je još poznat i pod nazivom ciklus limunske kiseline ili ciklus trikarboksilne kiseline (TCA). Krebsov ciklus se sastoji od niza biohemijskih reakcija koje se odvijaju u matriksu mitohondrija pri čemu se vrši oksidacija biohemijskih jedinjenja i na taj način se aerobni organizmi snabdevaju energijom (21). To je poslednji ili završni metabolički put za lipide, ugljene hidrate i aminokiseline i ujedno može se reći da povezuje sve druge pojedinačne metaboličke puteve (22).

Energija koja je potrebna za život kao i reprodukciju ćelija obezbeđuje se iz dva izvora. Prvi proces se odvija u citoplazmatskom regionu i naziva se glikolizom, dok se drugi proces odnosi na TCA i on se kod eukariotskih ćelija odvija u mitohondrijama, a kod prokariotskih u citosolu. U glikolitičkom putu putem niza biohemijskih reakcija odvija se konverzija glukoze ili glikogena u piruvat pri čemu se iz svakog molekula glukoze proizvedu dva molekula adenzin-trifosfata (ATP). Glikoliza se smatra ključnim putem za produkciju energije u različitim ćelijama, kao što su anoksične, embrionalne ili ćelije koje se intezivno razmnožavaju, kao i u ćelijama CNS koje svoje energetske potrebe obezbeđuju isključivo ovim putem i zavisne su od dostupnosti glukoze. U TCA ciklusu koristi se piruvat nastao u procesima glikolize i ovim putem se proizvede 36-38 molekula ATP-a iz svakog molekula glukoze (23). Dva atoma ugljenika se oksiduju u ugljen-dioksid, pri čemu je ova energija oksidacije spojena sa sintezom gvanozin-trifosfata (GTP) ili ATP-a, čijom naknadnom disocijacijom se vrši prenos energije na druge metaboličke puteve koji to zahtevaju (**Slika 1.2.1**) (23).

Podela TCA ciklusa može se izvršiti na dve faze: 1) dekarboksilaciju u kojoj se citrat (jedinjenje sa 6 atoma ugljenika) pretvara u sukcinil-CoA (jedinjenje sa četiri atoma ugljenika) pri čemu se odlobađaju dva atoma ugljenika i 2) redukciju koju čine uzastopne reakcije oksidacije sukcinata u fumarat, fumarata u malat i malata u oksaloacetat (24).



Slika 1.2.1. Šematski prikaz biohemijskih reakcija koje se odvijaju unutar Krebsovog ciklusa. Preuzeto i modifikovano sa sajta: <https://hr.weblogographic.com/why-is-citric-acid-cycle-called-cycle>

Naime, oksidacioni putevi masnih kiselina, glukoze, aminokiselina i ketonskih tela stvaraju jedinjenje poznato pod nazivom acetil-koenzima A (acetil-CoA). Sa druge strane, oksaloacetat predstavlja jedinjenje koje nastaje na kraju svakog TCA ciklusa i time se ujedno kruženje ciklusa nastavlja, a može poticati i iz piruvata koji ulazi u mitohondrije nakon procesa glikolize ili može nastati procesom oksidacije masnih kiselina tokom β -oksidacije. Reakcijom kondenzacije ova dva jedinjenja acetil-CoA sa oksaloacetatom u svrhu formiranja citrata posredstvom enzima citrat sintaze počinje TCA ciklus. Nastali citrat se može eksportovati u citoplazmu i služiti kao prekursor za sintezu lipida ili ostati u mitohondrijama gde se posredstvom

enzima akonitaze pretvara u izocitrat (25). Konverzija izocitrata u α -ketoglutarat predstavlja prvu reakciju oksidativne dekarboksilacije TCA ciklusa. Ovu reakciju katalizuje enzim izocitrat dehidrogenaza. Kompleks α -ketoglutarat dehidrogenaze katalizuje konverziju α -ketoglutarata u sukcinil-CoA i CO_2 (26). Potom, enzim sukcinil CoA sintetaza omogućuje prevođenje sukcinil-CoA u sukcinat pri čemu nastaje i GTP ili ATP. Sukcinat se dalje oksiduje u fumarat pomoću sukcinat dehidrogenaze. Treba napomenuti da sukcinat dehidrogenaza predstavlja kako deo TCA ciklusa tako i deo respiratornog lanca mitohondrija u kom je poznata pod nazivom kompleks II (27). Zatim sledi reakcija u kojoj enzim fumarat hidrataza učestvuje u procesu katalizovanja fumarata u malat. "Poslednja" reakcija TCA ciklusa vrši prevođenje malate u oksaloacetat. Ova reakcija je posredovana enzimom malat dehidrogenaze i spaja oksidaciju malata sa redukcijom nikotin amin adenine dinukleotida (NAD^+) (28).

Tokom Krebsovog ciklusa odvija se sinteza redukovanih formi flavin adenin dinukleotida (FADH_2) kao i NADH iz jedinjenja acetil-CoA koje je proizvod dekarboksilacije piruvata (29). NADH generiše veliki redukcionni potencijal koji je potreban za stvaranje ATP-a putem respiratornog lanca mitohondrija ili kako se drugačije naziva elektron transportnog sistema (ETS) tokom procesa oksidativne fosforilacije (30).

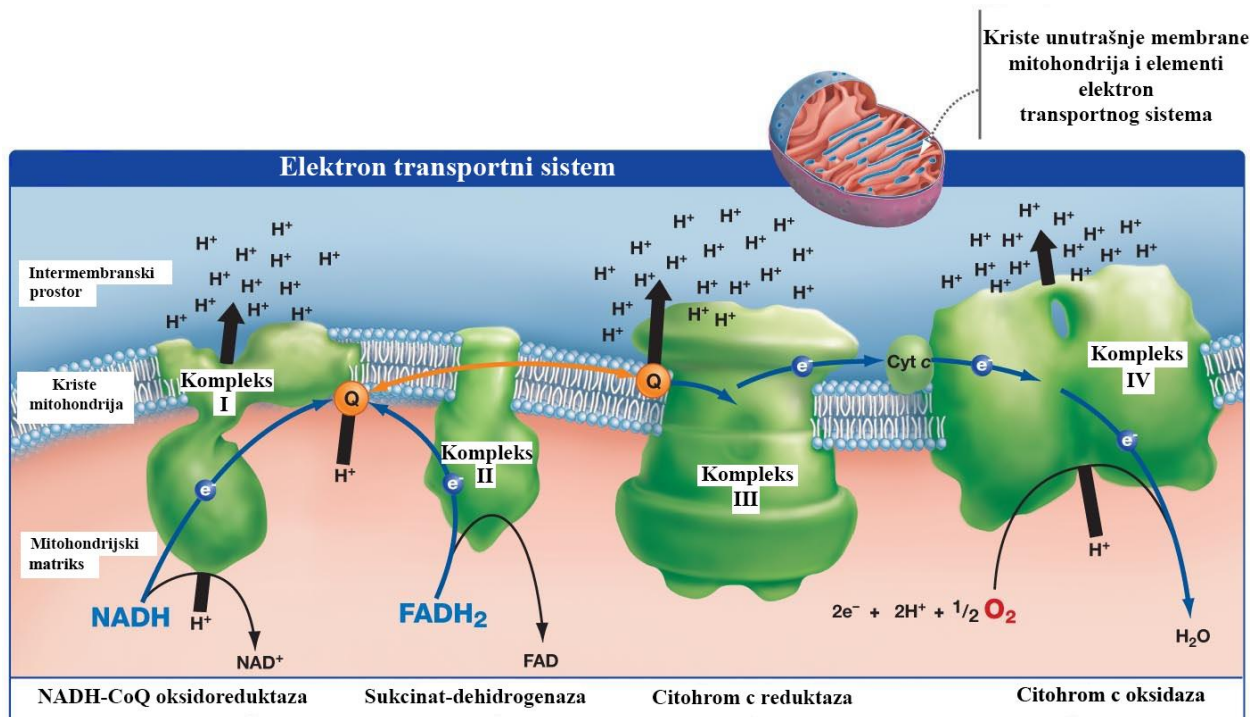
1.2.1.2. Kompleksi respiratornog lanca mitohondrija

Mitohondrije predstavljaju centralne organele bitne za procese integracije energije u eukariotskim ćelijama (31). Proizvodnja ATP-a, ključnog izvora energije ćelija kroz aerobnu oksidaciju supstrata (OKSFOS) jeste upravo glavna funkcija mitohondrijskog metabolizma. Ovim putem se obezbeđuje energija potrebna za preživljavanje, rast, reprodukciju ali i korekciju potencijalno nastalih defekata (32).

Naime, kasnih 50-ih godina je definisano nekoliko redoks enzima i proteolitičkih grupa odgovornih za prenos elektrona duž respiratornog lanca mitohondrija (33). Ukupna aktivnost mitohondrijskog respiratornog lanca kod sisara predstavljena je kao sekvencijalni transfer elektrona između četiri glavna multi-enzimska kompleksa kao i dva mobilna nosača dispergovanih na unutrašnjoj membrani mitohondrija.

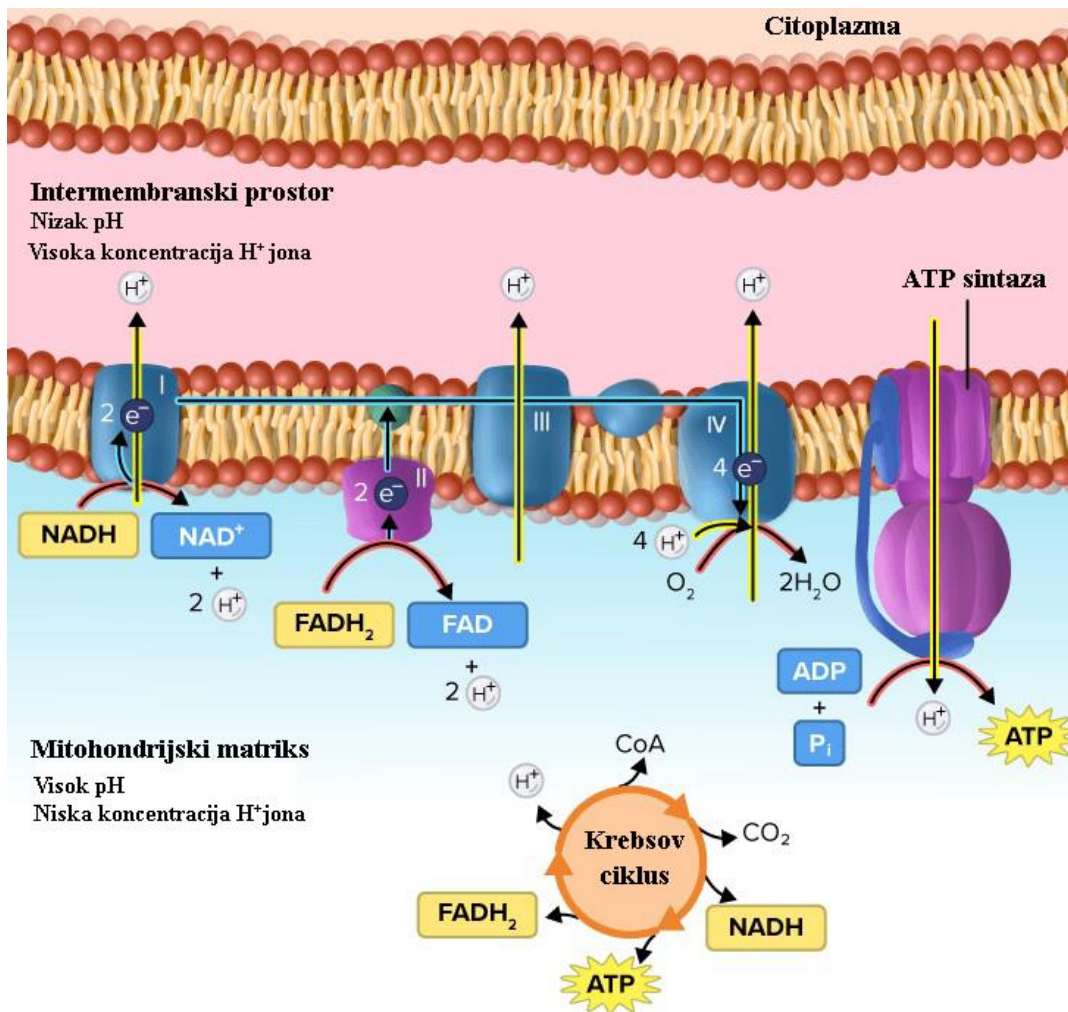
Među komplekse respiratornog lanca mitohondrija odnosno ETS ubrajaju se: kompleks I (C I) poznat pod nazivom NADH-CoQ oksidoreduktaza, kompleks II (C II) ili sukcinat-dehidrogenaza, kompleks III (C III) drugačije nazivan kompleks citohrom c reduktaza i kompleks IV (C IV) nazivan citohrom c oksidaza (**Slika 1.2.2**) (34-36). Navedeni kompleksi olakšavaju prenos elektrona sa redukovanih ekvivalenata na molekularni kiseonik u sprezi sa stvaranjem protonskog gradijenta preko unutrašnje membrane mitohondrija (37).

Pored navedenog, prenos elektrona je obezbeđen difuzijom dve mobilne komponente koje deluju kao kosupstrati a to su: lipofilni ubikvinon poznat kao koenzim Q (CoQ) ugrađen u lipidni membranski dvosloj i hidrofilni hem proteina citohroma c (cyt c) lokalizovan na spoljašnjoj površini unutrašnje mitohondrijske membrane (**Slika 1.2.2**) (38, 39). Posebno treba naglasiti činjenicu da usled potencijalnog narušavanja integriteta spoljašnje membrane mitohondrija dolazi do posledičnog oslobađanja cyt c u citosol ćelija. Ukoliko dođe do ovog procesa beleži se drastično smanjenje u brzini transporta elektrona duž ETS kao i aktivacija kaspaze i degradativnih enzima u citosolu što ujedno sve deluje kao okidač za nastanak apoptoze (40).



Slika 1.2.2. Prikaz kompleksa i mobilnih nosača elektron transportnog sistema lokalizovanih na unutrašnjoj membrani mitohondrija ćelija. *Preuzeto i modifikovano sa sajta: <https://orbitbiotech.com/electron-transport-chain-q-cycle-complex-i-complex-i-iron-sulfur-proteins-coenzyme-q/>*

Na **Slici 1.2.3** predstavljen je šematski prikaz sistema oksidativne fosforilacije na unutrašnjoj membrani mitohondrija u ćelijama sisara. Kompleksi I i II povezuju metaboličku oksidaciju u mitohondrijskom matriksu (TCA ciklus i β -oksidaciju) sa redukcijom CoQ. Redukovani CoQ reoksiduje C III koji prenosi elektrone preko cyt c do C IV (terminalne oksidaze). Prenos elektrona sa donora sa niskim redoks potencijalom na akceptor sa višim redoks potencijalom kod sva tri kompleksa povezan je sa kretanjem protona iz mitohondrijskog matriksa u intermembranski prostor čiji sastav je u homeostazi sa citosolom ćelije. Naime, ova tri kompleksa (C I, III i IV) nazivaju se i „mestima spajanja“ respiratornog lanca (41). Nastanak protonskog gradijenta sa dve strane mitohondrijske membrane bitan je za adekvatno funkcionisanje kompleksa C V koji je predstavljen kao ATP sintaza na čijem nivou se vrši proizvodnja energije (42).



Slika 1.2.3. Šematski prikaz elektron transportnog sistema (ETS) na unutrašnjoj membrani mitohondrija u ćelijama sisara – četiri enzimska kompleksa (C I-IV), dva posredna supstrata - koenzim Q i citohrom c i ATP sintaza koja je zadužena za generisanje ATP-a.

Preuzeto i modifikovano sajta: <https://flexbooks.ck12.org/cbook/ck-12-biology-flexbook-2.0/section/2.28/primary/lesson/electron-transport-bio/>

U stabilnom stanju, mitohondrije koje vrše proces respiracije održavaju transmembranski elektrohemijski gradijent od oko 220 mV. Pokretna sila protona može se izaziti kao: $\Delta p = \Delta \psi - (2.3RT/F)\Delta pH$, pri čemu je $\Delta \psi$ membranski potencijal, a Δp je razlika u pH vrednosti sa dve strane membrane, sa predznakama minus kao vrednosti koje vladaju u citoplazmatskom matriksu mitohondrija, R je gasna komponenta, F je Faradejeva konstanta. Membranski

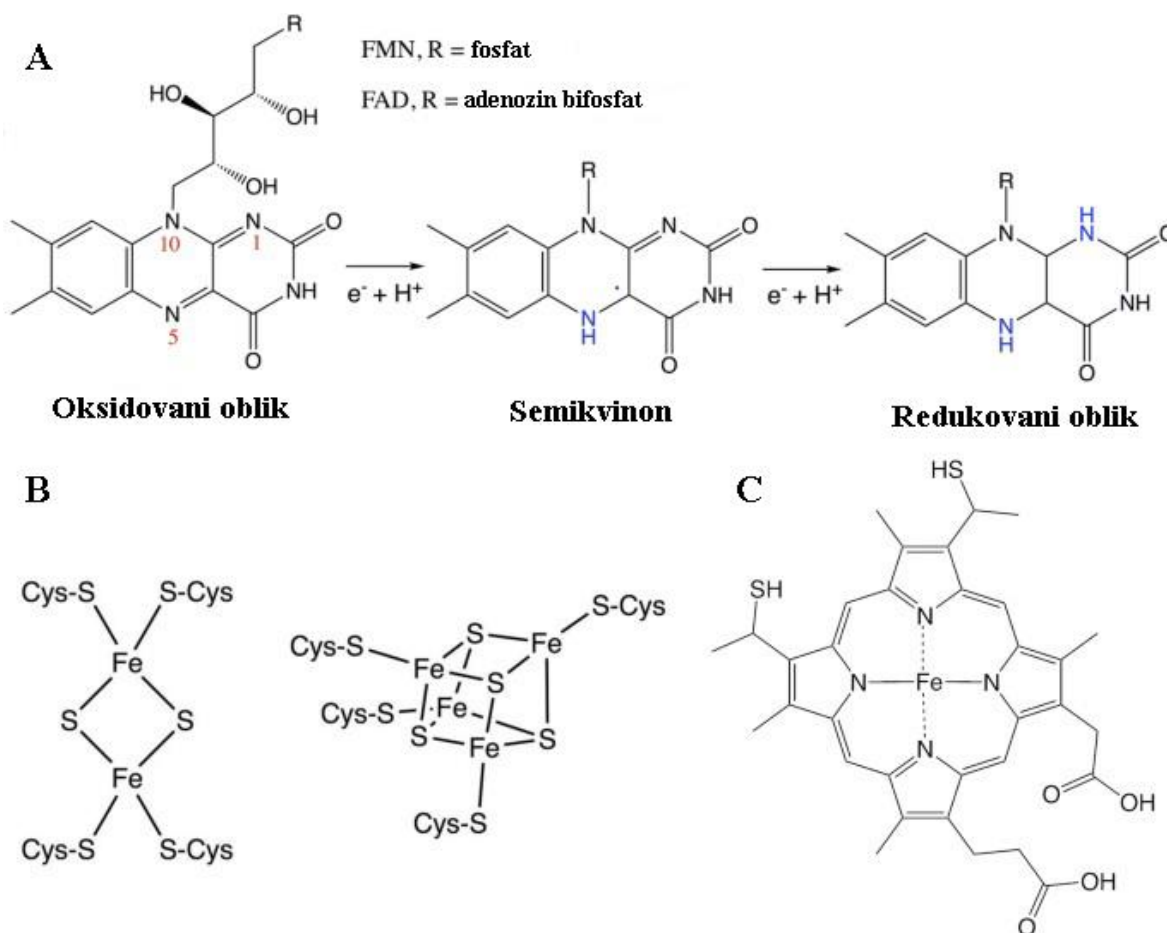
potencijal je pozitivan spolja dok je pH vrednost niža spolja nego u mitohondrijskom matriksu (43).

Redoks kofaktori su smešteni unutar proteina koji ujedno obezbeđuju izolaciju od okolnog vodenog okruženja, kao i mesta vezivanja za hemikalije potrebne za doniranje i prihvatanje elektrona. ETS sadrži flavine, klaster gvožđe-sumpor, nekoliko tipova hema i u terminalnoj oksidazi bakar. Familije redoks nosača imaju različita svojstva koja zavise od varijanti strukture kofaktora i specifičnog proteinskog okruženja (43).

Flavin mononukleotid (FMN) i FAD izvedeni su od vitamina riboflavina kod ljudi i mogu se redukovati za jedan elektron u flavosemikvinon ili za dva elektrona u flavohidrokinon (**Slika 1.2.4**). Svi oblici mogu biti protonirani ili ne u zavisnosti od potreba sredine (44). U ETS, C I sadrži FMN, dok je FAD kofaktor u enzimima ne protonske pumpe C II u TCA ciklusu i ujedno flavoprotein koji prenosi elektrone u procesima oksidacije masnih kiselina. Uloga flavina u kompleksima C I i C II ogleda se prenosu dva elektrona pri ulasku iz NADH ili sukcinata i time se omogućuje i nastavlja dalji put niz seriju klastera gvožđe-sumpor koje ovi kompleksi sadrže. Naime, mitohondrijski respiratorni lanac sadrži klaster sa dva, tri ili četiri atoma gvožđa povezana sa atomima sumpora. Klasteri Fe_2S_2 i Fe_4S_4 prikazani su na **Slici 1.2.4**. Svaki klaster se razlikuje za samo jedan elektron, te je naelektrisanje neravnomerno raspoređeno po atomima metala (mešovito valentno stanje). Redukovane forme se mogu detektovati elektronskom paramagnetnom rezonancom što je ujedno i korisno sredstvo za određivanje redukcije mitohondrijske membrane još od 1960. godine (45), a takođe je u upotrebi i za ispitivanje različitih proporcija oksidisanih i redukovanih nosača u složenim sistemima (46).

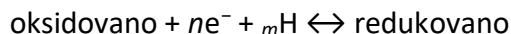
Citohromi sadrže hem grupe, odnosno gvožđe okruženo porfirinskim prstenom koji obezbeđuje četiri koordinaciona mesta, pri čemu se za peto i šesto mesto vezuju bočni lanci aminokiselina, obično histidina ili metionina. Različite vrste hema karakterišu spicifične vidljive spektralne promene pri redukciji. Grupe citohroma imaju ulogu u prenosu elektrona iz mobilnog CoQ do kiseonika. Hem c-tipa nalazi se u cyt c, mobilnom nosaču elektrona između C III i C IV (**Slika 1.2.4**). Naime, da bi se olakšao prenos elektrona duž respiratornog lanca mitohondrija, mali

visoko konzervirani protein cyt c se vezuje za kompleks I da bi prihvatio elektron a sa druge strane za kompleksa II kako bi se izvršilo doniranje elektrona putem elektrostatičkog vezivanja (43). Hem grupe nose samo po jedan elektron ali su zapravo potrebna četiri elektrona kako bi došlo do redukcije kiseonika u vodu što se odvija na samom kraju respiratornog lanca mitohondrija. Završni proces redukcije kiseonika u vodu postiže se u kompleksu IV upotrebom kombinacije hema i centara bakra koji sadrži dva bakra sa histidinom i metioninom kao i karbonil glavnog lanca. Međutim, iako sadrži dva bakra ovaj centar je u mogućnosti da prihvati samo jedan elektron koji biva delokalizovan preko oba bakra (43).



Slika 1.2.4. A) Strukture redoks faktora. FMN - u oksidovanom obliku i Semikvinon – jednim elektronom redukovani oblik, **B)** klasteri gvožđe-sumpor Fe_2S_2 i Fe_4S_4 , **C)** Hem. *Preuzeto i modificovano iz rada: Ramsay RR. Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. ChemTexts. 2019;5(2):1-4.*

Nosioci elektrona se redukuju prema generalizovanoj reakciji:



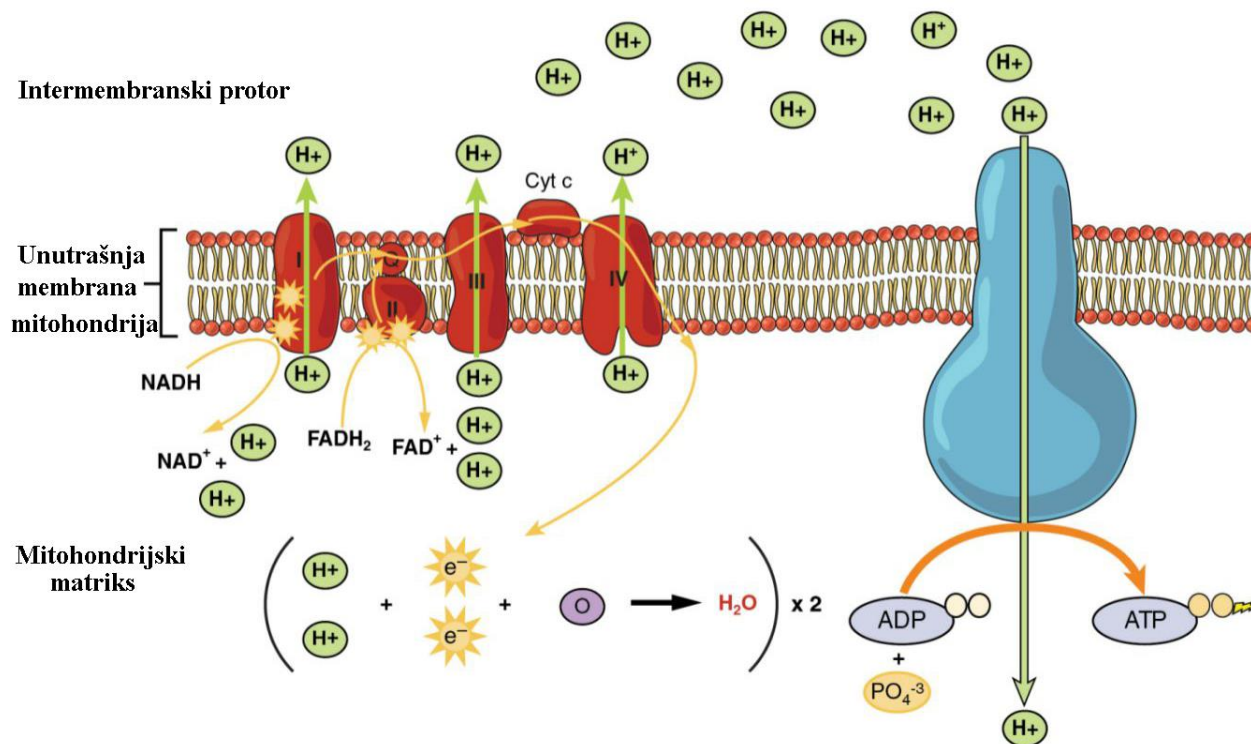
pri čemu se oznaka **n** odnosi na broj uključenih elektrona, dok slovo **m** predstavlja broj vodonika (H). Za potencijal srednje tačke kaže se da predstavlja onu vrednost potencijala pri kom je polovina oksidovana a polovina redukovana. Odnos između Gibsove slobodne energije (ΔG) za prenos elektrona između dva redoks para pri pH 7 izračunava se iz razlike redoks potencijala za njihovu oksidaciju/redukciju (43).

$$E_h = E^0 + \frac{2.3RT}{nF} \log \frac{\text{oksidacija}}{\text{redukcija}} + \frac{2.3RT}{nF} \log [\text{H}^+]$$

Pri čemu **n** predstavlja broj prenetih elektrona, **R** je gasna komponenta, **F** je Faradejeva konstanta, dok se oznaka **E_h** odnosi na srednji redoks potencijal polureakcije. Međutim, tamo gde su protoni uključeni u reakciju, pH menja redoks potencijal polureakcije zavistan od koncentracije. Uzimajući u obzir ceo lanac za transport elektrona, prenos elektrona sa NADH ($E_h = -320$ mV) na kvinon ($E_h = +4$ mV) pod standardnim vrednostima pH bi bio povezan sa Gibsovom slobodnom energijom ($\Delta G = -2(0.0965 \text{ kJ mol}^{-1}\text{mV}^{-1})(4 - (-320) \text{ mV}) = -62.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) što je energetski vrlo povoljno i odvija se stalnim snabdevanjem NADH iz ćelijskog metabolizma putem ciklusa limunske kiseline. Važno je napomenuti da u fiziološkim uslovima odnosi oksidovanih i redukovanih komponenti variraju u zavisnosti od metaboličkih uslova i dostupnosti kiseonika, pa se upravo iz ovog razloga vrednosti ΔG moraju izračunavati iz potencijala zavisnih od koncentracije (43). Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da se obrnuti transport elektrona od CoQ do NADH može odvijati kada je koncentracija sukcinata visoka, a dioksigena niska. Pored navedenih promena u koncentraciji reduktanata, razlika redoks potencijala je modulirana i ako su parovi donora i akceptora na suprotnim stranama membrane gde postoji transmembranski potencijal. Naime, tri kompleksa uključena u prenos elektrona koji pokreću kretanje protona kroz membranu imaju značajnu potencijalnu razliku između donora i akceptora

(Slika 1.2.5). Dok, nasuprot navedenog Eh za sukcinat ka ubikvinonu je blizu nule tako da se ovim putem ne može odviti nikakav rad te posledično nema ni prenosa protona preko C II (43).

Naime, steheometrija protona translociranih u elektrone ($nH^+/2e^-$) koji prolaze niz respiratorni lanac mitohondrija bila je tema brojnih studija (47-49). Za pojedine komplekse, $nH^+/2e^-$ steheometrija se može meriti upotrebom veštačkih akceptora elektrona kao i korišćenjem jona kalijuma u prisustvu jonofora valimicina a sve u cilju kvantifikacije kretanja naelektrisanja. Svaki od tri kompleksa na putu od NADH do dioksigena ima drugačiji mehanizam za pretvaranje energije iz prenosa elektrona u gradijent vodonikovih jona kroz unutrašnju membranu mitohondrija (Slika 1.2.5). Naime, C I ima četiri kanala slična antiporteru koja se otvaraju konformacionom promenom povezanom sa prenosom elektrona redoks stanjem CoQ (50-52). Steheometrijska vrednost protona za C I iznosi $4H^+/2e^-$ što je nedavno i potvrđeno (53). Kompleks III oslobađa $4H^+$ iz $2QH_2$, pri čemu $2e^-$ odmah prelaze na citohrom c. Dok se druga dva elektrona prosleđuju ka hemima u svrhu redukcije Q na mestu stabilizacije semikvinona, pri čemu se $2H^+$ jona uzimaju iz mitohondrijskog matriksa (54). I na kraju C IV ima protonske relejne kanale obložene aminokiselinama (55), pri čemu zahteva dva protona za svaku formiranu vodu ali u istom mahu dolazi i do pumpanja $2H^+/2e^-$. Za kompletan niz ETS, steheometrija od $10H^+/2e^-$ krećući se od NADH ka dioksigenu ili od $6H^+/2e^-$ počevši od sukcinata ka dioksigenu je opšte poznata (56).

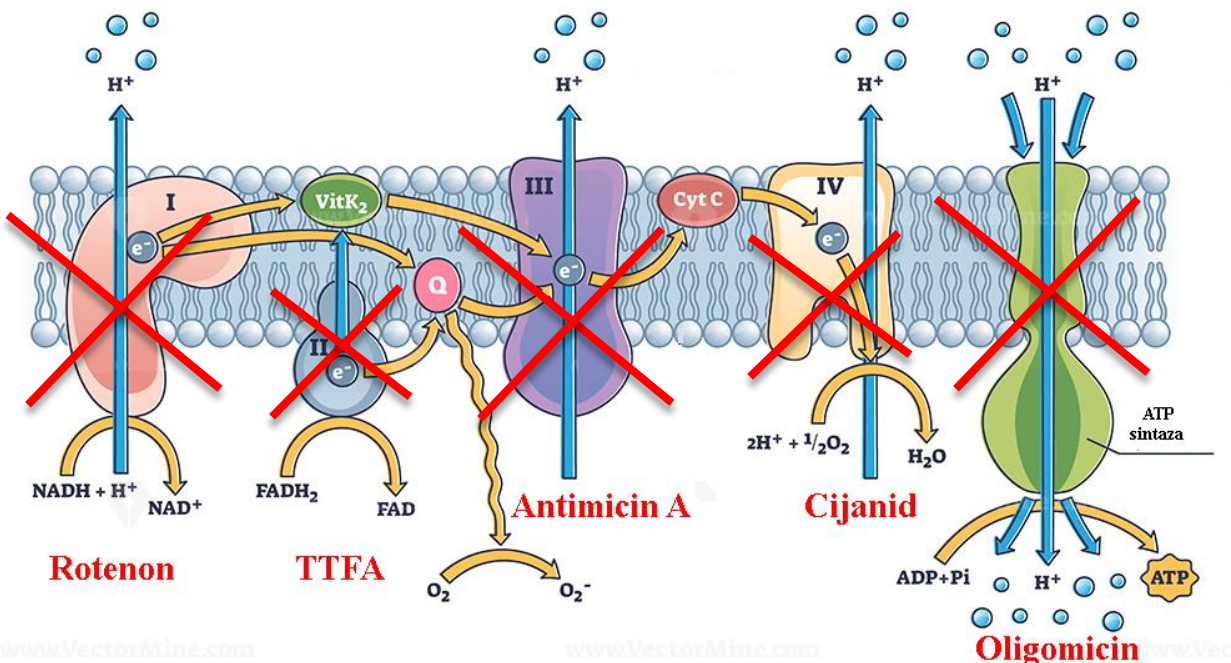


Slika 1.2.5. Steheometrija protona translociranih u elektrone koji se prenose duž respiratornog lanca mitohondrija. *Preuzeto i modifikovano sa sajta: <https://www.thoughtco.com/electron-transport-chain-and-energy-production-4136143>*

1.2.1.3. Inhibitori kompleksa respiratornog lanca mitohondrija

Davne 1981. godine Ernster L i saradnici (57) sprovodili su istraživanja na mitohondrijama goveđeg srca. Izolacija kompleksa respiratornog lanca mitohondrija kao i karakterizacija kofaktora bili su polje od interesa brojnih naučnika (37, 58, 59). Primena inhibitora sa selektivnim dejstvom za svaki kompleks bila je ključna te se ove hemikalije i danas koriste u brojnim eksperimentima koji se sprovode na mitohondrijama. Naime, pokazalo se da je selektivni inhibitor kompleksa I rotenon ili piericidin, za kompleks II tenoiltrifluoroaceton (TTFA) ili karboksini, antimicin A ili miksotiazol za C III, dok se specifična inhibicija C IV postiže aplikacijom cijanida ili ugljen-monoksida (60-63). I na kraju u svrhu selektivne blokade posledenjeg

kompleksa V respiratornog lanca mitohondrija primenjuje se oligomicin (**Slika 1.2.6**). Nakon primene specifičnih inhibitora ustanovljeno je da se usled aplikacije rotenona produkcija ATP-a i potrošnja kiseonika smanjuje za svega 30% što ukazuje da C I ima najmanje rezervnog kapaciteta. Nasuprot navedenog, inhibicija produkcije ATP-a primenom antimicin A iznosi čak 80% dok se aplikacijom cijanida aktivnost kompleksa IV kao i potrošnja kiseonika redukuje za 75% (43).



Slika 1.2.6. Elektron transportni sistem mitohondrija sa kompleksima koji učesvuju u prenosu elektrona kao i njihovim specifičnim inhibitorima. Q se odnosi na ubikvinon; TFEA – tenoiltrifluoroacetan. Preuzeto i modifikovano sa sajta: <https://vectormine.com/item/electron-transport-chain-as-respiratory-embedded-transporters-outline-diagram/>.

1.2.2. Energetski metabolizam tumorskih ćelija

Pre više od 70 godina, Otto Warburg navodi da mitohondrijska disfunkcija ili nastali defekti mogu biti potencijalni uzrok nastanka tumorskih procesa (21, 64). Ovo zapažanje je podstaklo brojne istraživače da polje svog interesovanja usmerene na ispitivanje patogeneze i uloge mitohondrija u nastanku različitih tumora (65-67). Izmene na nivou genetskog sadržaja mitohondrija, kopija mitohondrijske DNK (mtDNK) ili oksidativno oštećenje mtDNK uočeno je da su povezani sa progresijom različitih karcinoma (68-70). Uloga mitohondrija u nastanku tumorskih procesa može biti i rezultat mutacije na nivou enzima TCA ciklusa kao što su izocitrat dehidrogenaza, sukcinat dehidrogenaza ili fumarat dehidrogenaza (71, 72). Naime, mutacije gena koje kodiraju ove enzime dovode do abnormalne akumulacije onkometabolita TCA ciklusa, što učestvuje u nastanku i progresiji tumorskih procesa (72, 73). U krajnjem mitohondrijske abnormalnosti indukuju metaboličko reprogramiranje u ćelijama i stimulišu proces glikolize što omogućuje opstanak i dalje proliferisanje ćelija kao i procese transformacije ka nastanku tumora (74, 75). Zapravo maligne ćelije za svoje potrebe koriste mnogo manje količine kiseonika te se metabolički procesi uglavnom odvijaju u anaerobnim uslovima što u krajem dovodi do produkcije mlečne kiseline. Proizvedeći veoma kiselu i toksičnu sredinu u njihovom okruženju ostavljaju posledice i na zdrave ćelije čime se ujedno pospešuju procesi invazije i metastaziranja (76).

1.3. Karcinom dojke

1.3.1. Epidemiologija karcinoma dojke

Karcinom dojke predstavlja heterogenu grupu bolesti sa visokom stopom incidencije širom sveta, sa 2,3 miliona procenjenih novih slučajeva i 0,68 miliona smrtnih slučajeva u 2020. godini, predominantno ženskog pola (1). Evidentan je porast incidencije i stope smrtnosti od ovog maligniteta u poslednje tri decenije. Između 1990. i 2016. godine incidencija se više nego udvostručila u 60/102 zemlje, dok su se smrtni slučajevi udvostručili u 43/102 zemlje (77). U 2020. godini odnos mortaliteta i incidencije od karcinoma dojke kao reprezentativni pokazatelj stope preživljavanja bio je 0,30 na globalnom nivou (78). Trenutne projekcije ukazuju da će do 2030. godine broj novootkrivenih slučajeva širom sveta dostići čak 2,7 miliona godišnje, dok će broj umrlih biti 0,87 miliona (78). Preventivni pregledi kao i programirani skrining ključni su u pogledu moguće minimalizacije stope incidencije ovog maligniteta i uz sprovođenje ranog lečenja (79).

1.3.2. Etiologija karcinoma dojke

Faktori rizika za pojavu karcinoma dojke su mnogobrojni i uključuju faktore na koje se ne može uticati i faktore koji se mogu modifikovati. U sklopu faktora na koje se ne može uticati ubrajaju se pol, starosna dob, porodična istorija bolesti, genetske mutacije kao i etnička pripadnost.

Ženski pol predstavlja jedan od glavnih faktora povezanih sa povećanim rizikom od karcinoma dojke prvenstveno zbog pojačane hormonske stimulacije. Za razliku od muškaraca koji imaju neznatan nivo estrogena, a takođe i tkivo dojke kod žena građeno je iz ćelija koje su veoma osetljive na hormone (estrogen i progesteron) kao i na poremećaje u njihovoj koncentracijskoj ravnoteži (80, 81). Trudnoća, dojenje, pojava prve menstruacije i menopauza ključni su u smislu potencijalne indukcije kancerogenih događaja u mikrookruženju tkiva dojke (82, 83). Sa druge strane, manje od 1% svih karcinoma dojke javlja se kod muškog pola.

Trenutno oko 80% pacijenata obolelih od karcinoma dojke su osobe starije od 50 godina, dok je istovremeno više od 40% slučajeva starije od 65 godina (84, 85). Interesantno je da je primećena veza između određenog molekularnog podtipa karcinoma dojke i starosti pacijenata – agresivni trostruko negativan podtip najčešće se dijagnostikuje u grupama ispod 40 godina dok se kod pacijenata preko 70 godina najčešće sreće luminalni A podtip (85).

Porodična istorija bolesti predstavlja glavni faktor koji je značajno povezan sa povećanim rizikom od karcinoma dojke. Stopa incidencije je značajno viša kod svih pacijenata sa porodičnom istorijom bolesti uprkos godinama starosti. Čak oko 20% slučajeva sa dijagnozom karcinoma dojke imaju rođake u prvom stepenu srodstva obolele od ovog maligniteta (86). Ova povezanost je uzrokovana epigenetskim promenama kao i faktorima sredine koji takođe deluju kao potencijalni okidači (87).

Dokazano je da se nekoliko genetskih mutacija dovodi u vezu sa povećanim rizikom od karcinoma dojke. Dva glavna gena koja se karakterišu veoma velikom penetracijom jesu BRCA 1 (lokalizovan na hromozomu 17) i BRCA2 (lokalizovan na hromozomu 13) (88). Mutacije na nivou ovih gena se nasleđuju autozomno-dominantno, međutim beleže se i slučajevi sporadičnih mutacija koje su veoma česte. Pored navedenih u visoko penetrantne gene za karcinom dojke ubrajaju se i TP53, CDH1, PTEN i STK11 (89-92).

Rasa i etnička pripadnost se takođe ubrajaju u potencijalne uzročnike, međutim mehanizmi povezanosti sa pojavom karcinoma dojke još uvek nisu utvrđeni. Generalno, stopa incidencije ovog maligniteta najviša se među ženama bele puti koje nisu latinoameričke nacionalnosti (93). Nasuprot navedenog, stopa mortaliteta je značajno veća među ženama crne puti (94).

U sklopu faktora koji se mogu modifikovati navode se upotreba medikamenata, fizička aktivnost, telesna masa i upotreba duvana.

Naime, podaci sprovedenih istraživanja ukazuju da uzimanje diethylstilbestrola tokom trudnoće može biti povezano sa većim rizikom od karcinoma dojke majke ali i dece (95). Takođe, primećeno je da rizik od pojave ovog vida maligniteta raste sa većim dozama ovog medikamenta

(96). Pacijentkinje koje koriste hormonsku supstitucionu terapiju posebno duže od 5 godina, su pod povećanim rizikom od nastanka karcinoma dojke (97). Primećeno je da i uzimanje pojedinih antidepresivnih medikamenta kao što su paroksetin, triciklični antidepresivi kao i selektivni inhibitori ponovnog preuzimanja serotonina može biti povežano sa većim rizikom (98).

Redovna fizička aktivnost smatra se zaštitnim faktorom u incidenciji karcinoma dojke (99). Naime, postoji nekoliko hipoteza koje za cilj imaju da objasne zaštitnu ulogu fizičke aktivnosti, upravo smanjenjem izloženosti endogenim polnim hormonima, promenom odgovora imunog sistema ili nivoa faktora rasta-1 sličnog insulin (100).

Prema epidemiološkim podacima, gojaznost je povezana sa većom incidencijom obolevanja a posebno se naglašava period postmenopauze kada pacijentkinje imaju tendenciju ka razvijanju karcinoma dojke pozitivnog na estrogenske receptore (101). Pored navedenog veći BMI je povezan sa agresivnijim biloškim karakteristikama tumora uključujući veći procenat metastaza u limfne čvorove, a takođe veća je i verovatnoća nastanka relapsa bolesti i stopa mortaliteta (102).

Kancerogeni koji se nalaze u duvanu konzumacijom se transportuju do tkiva dojke povećavajući nastanak mutacija unutar onkogeni i tumor supresorskih gena (posebno p53). Pored aktivnog i pasivno izlaganje duvanskom dimu navodi se da ima značajan doprinos u indukciji prokancerogenih događaja (103).

1.3.3. Dijagnoza karcinoma dojke

U većini zemalja Evropske Unije (tačnije u 25 od 28 zemalja) sprovodi se (regionalni ili nacionalni) organizovani skrining program ranog otkrivanja karcinoma dojke pomoću imidžing metode mamografije (104). Inicijativa Evropske komisije za karcinom dojke (*ECIBC - European Commission Initiative on Breast Cancer*) je izdala preporuke za skrining mamografiju i one pokazuju sledeće smernice:

- Redovna (godišnja ili svake 2 godine) mamografija preporučuje se ženama starosti 50–69 godina.

- Redovna godišnja mamografija se takođe može uraditi za žene starosti 40–49 i 70–74 godine.
- Kod žena sa jakom porodičnom istorijom karcinoma dojke, sa ili bez dokazanih BRCA mutacija, preporučuje se godišnja magnetna rezonanca (MRI) i mamografija (propratna ili naizmenična) (105).

Prema aktuelno važećim *ESMO* preporukama (*European society for medical oncology - ESMO*) dijagnoza karcinoma dojke danas se zasniva na kliničkom pregledu koji je dopunjen dijagnostičkim imidžingom, a postojanje eventualne lezije potvrđuje se patohistološkom analizom (**Tabela 1.3.1**) (106).

Tabela 1.3.1. Tabelarni prikaz dijagnostičkog algoritma koji se primenjuje kod karcinoma dojke

Procena opšteg zdravstvenog statusa
Istorija Status menopauze Medicinski pregled Kompletna krvna slika Pregled jetre, bubrega i srca (kod pacijenata koji su planirani za lečenje antraciklinom i/ili trastuzumabom) funkcionalni testovi, alkalna fosfataza i kalcijum
Procena primarnog tumora
Medicinski pregled Mamografija Ultrazvuk dojke (UZ) MRI dojke u odabranim slučajevima Biopsija lezije sa patohistološkom potvrdom i određivanjem ER, PgR, HER2 i Ki67 statusa
Procena regionalnih limfnih čvorova
Medicinski pregled Ultrazvuk (UZ) Biopsija pod kontrolom ultrazvuka ukoliko su limfni čvorovi izmenjenog izgleda
Procena postojanja metastatske bolesti
Medicinski pregled Drugi testovi se ne preporučuju rutinski, osim ako je veliko tumorsko opterećenje, agresivna biologija ili kada su simptomi koji ukazuju na metastaze

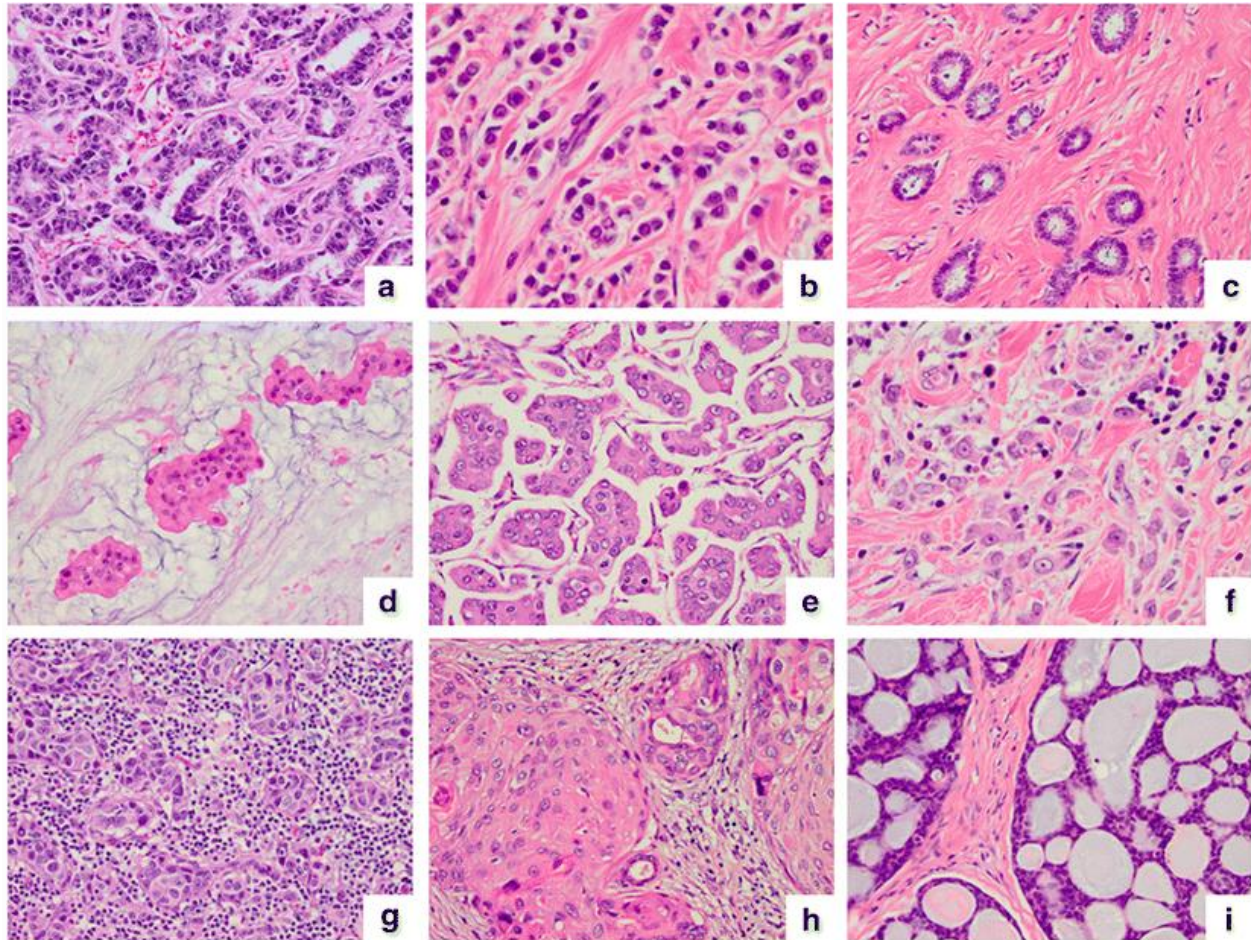
Klinički pregled obuhvata bimanualnu palpaciju dojki i regionalnih limfnih čvorova aksile. Imidžing metode podrazumevaju bilateralnu mamografiju i UZ dojki kao i regionalnih limfnih čvorova. Upotreba MRI dojki ne preporučuje se rutinski, ali primenu ove dijagnostičke metode treba razmotriti u slučajevima kao što su porodični karcinom dojke povezan sa BRCA mutacijama, lobularni karcinomi, kod pacijentkinja sa denznim dojčkama i kod sumnji na multifokalnost/multicentričnost lezije kao i u slučajevima velikih neslaganja između konvencionalnog snimanja i kliničkog pregleda (105, 107).

Pored navedenih dijagnostičkih metoda potrebno je posebno naglasiti da sve radiološki suspektne lezije bi trebalo biopsirati, a potom se definitivna patohistološka dijagnoza postavlja prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (SZO) (108).

1.3.4. Klasifikacija karcinoma dojke

Invazivni karcinom dojke obuhvata tumore koji pokazuju varijacije u pogledu njihove kliničke prezentacije, ponašanja i morfologije. Naime, SZO razlikuje najmanje 21 različitih histoloških tipova karcinoma dojke (109).

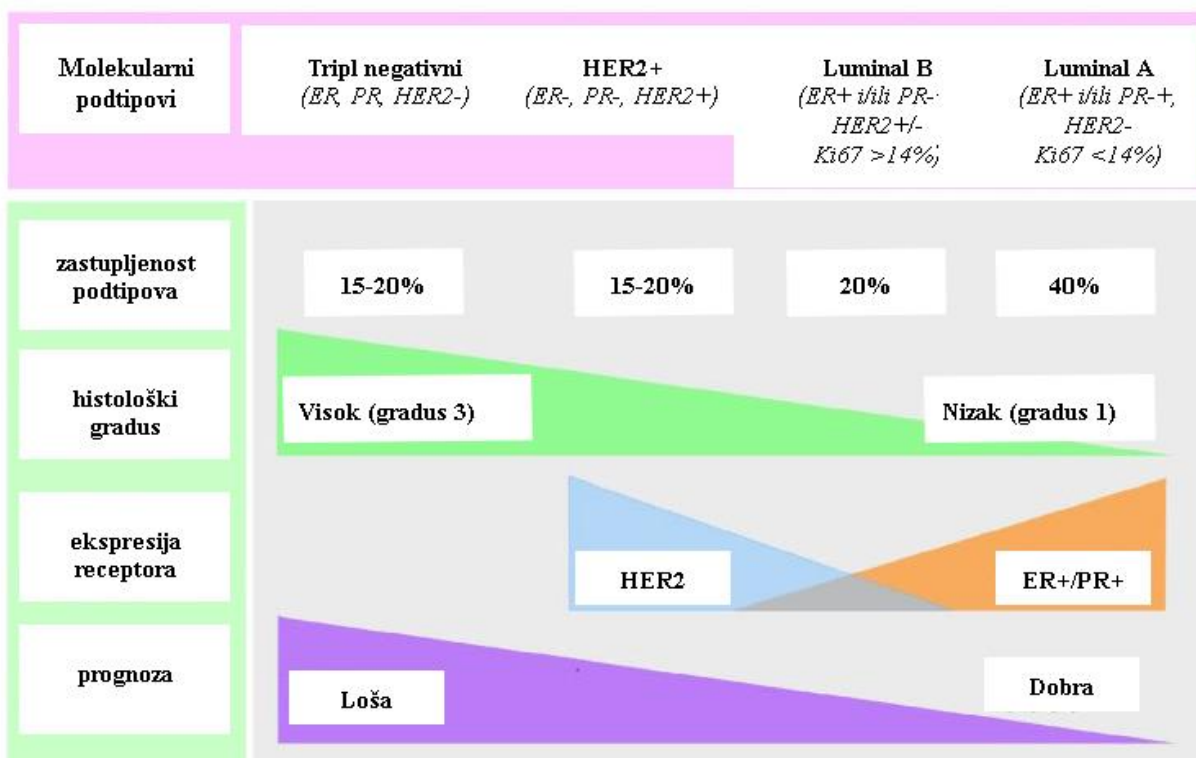
Invazivni karcinom dojke bez posebnog tipa (*no special type-NST*), ranije klasifikovan kao duktalni karcinom je najčešće zastupljena podgrupa (40-80%) (110) (**Slika 1.3.1A**). Preostali procenat invazivnih karcinoma dojke ima karakteristične obrasce rasta i citološke karakteristike pa se klasifikuju kao specifični podtipovi u koje se ubrajaju: invazivni lobularni karcinom, tubularni, mucinozni, neuroendokrini karcinom i dr. (**Slika 1.3.1**) (108, 111).



Slika 1.3.1. Reprezentativne mikrofotografije različitih histoloških tipova invazivnog karcinoma dojke: **A)** invazivni karcinom (*NST*), **B)** lobularni karcinom, **C)** tubularni karcinom, **D)** mucinozni karcinom, **E)** invazivni mikropapilarni karcinom, **F)** pleomorfni lobularni karcinom, **G)** medularni karcinom, **H)** metaplastični karcinom, **I)** adenoid cistični karcinom. *Preuzeto i modificovano iz rada: Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. Virchows Archiv. 2014;465(1):1-4.*

Prema molekularnoj klasifikaciji, nezavisno od histoloških tipova, karcinom dojke deli se na podtipove na osnovu nivoa ekspresije gena mRNK. Identifikovana su četiri glavna podtipa i to na osnovu prisustva/odsustva ekspresije imunohistohemijskih markera koji uključuju receptore estrogena (ER), receptore za progesteron (PR) i HER2, kao i proliferativni indeks tumorskih ćelija (procenata Ki67 pozitivnih). Ovi molekularni podtipovi uključuju podelu karcinoma dojke na luminal A, luminal B, HER2 pozitivan i trostruko negativan karcinom dojke (*triple negative breast cancer* - TNBC) (112). Imunohistohemijske karakteristike karcinoma dojke prikazane su u **Tabeli 1.3.2** (113).

Tabela 1.3.2. Molekularni podtipovi invazivnog karcinoma dojke. *Preuzeto i modifikovano iz rada: Saha T, Lukong KE. Breast cancer stem-like cells in drug resistance: A review of mechanisms and novel therapeutic strategies to overcome drug resistance. Front Oncol. 2022; 12:856974.*



1.3.5. Terapija karcinoma dojke

Upravo, postavljanjem molekularne dijagnoze jednog od navedenih podtipova zavisi primena terapijskih smernica (114). Dostupni terapijski pristupi baziraju se na hiruškom uklanjanju dijagnostikovanog karcinoma dojke, primeni radioterapije, hemoterapije, endokrine i anti HER-2 terapije kao i njihove kombinacije (115).

Trenutne nacionalne preporuke za hirušku disekciju pri lečenju karcinoma dojke uključuju izbegavanje aksilarne limfne disekcije kod pacijenata sa mikrometastazama ili makrometastazama u jedan ili dva sentinel čvora (116-118), ponovne ekscizije za bliske ali negativne hiruške ivice nakon delimične mastektomije (119), kontralateralnu profilaktičku mastektomiju kod pacijentkinja sa jednostranim karcinomom dojke povećanog rizika kao i biopsiju sentinel limfnog čvora kod pacijentkinja starijih od 70 godina života sa ranim stadijumom karcinoma pozitivnog na hormonske receptore (120). Noviji podaci govore u prilog sprovođenja biopsije sentinel limfnih čvorova sa ili bez ciljane aksilarne disekcije nakon sprovedene neoadjuvantne terapije kao i potpuno izostavljanje operativnog zahvata kod pacijentkinja sa potpunim kliničkim odgovorom na hemoterapiju (121).

Radioterapija (RT) predstavlja deo standardnog terapijskog protokola nakon dijagnostifikovanja ranog stadijuma karcinoma dojke i preporučuje se čak kod 83% svih pacijenata (122). Sprovođenje RT vrši se nakon operativnog zahvata i uklanjanja tumorskog tkiva ili nakon sprovedene mastektomije u cilju eliminacije rezidualnih tumorskih ćelija. Dokazano je da primena RT značajno smanjuje stopu relapsa oboljenja u poređenju sa samo sprovedenom hiruškom intervencijom. Čak štaviše, navodi se da kombinacija RT sa adjuvantnom hemoterapijom povećava stopu preživljavanja bez oboljenja kod pacijenata sa visokorizičnim karcinomom dojke (123-125). Ipak recidiv maligniteta je veliki klinički izazov koji se javlja kod oko 4,3-7,3% pacijenata sa karcinomom dojke koji primaju RT nakon operacije očuvanja tkiva dojke (126). Mnogi faktori, kao što su primenjena ukupna doza, frakcionisanje, vreme udvostručenja tumorske mase, hipoksični uslovi unutar tumorskog tkiva kao i intrizična radiosenzitivnost mogu doprineti odgovoru tumora na zračenje (127). Takođe, hetegrogenost samog karcinoma dojke

jeste upravo potencijalno objašnjenje različite osetljivosti i nejednakog odgovora tumorskih ćelija na RT (128).

Hemoterapija jeste upravo jedna od glavnih strategija pri lečenju karcinoma dojke. Ciljni efekat primene jeste ubijanje tumorskih ćelija primenom hemijskih ili prirodnih jedinjenja. Međutim, usled sistemskog delovanja na organizam nakon sprovođenja ovog vida lečenja beleži se širok spektar neželjenih efekata (129). Pored uništenja tumorskih ćelija ovaj vid terapije uslovljava i uništenje zdravih ćelija koje imaju veliku moć deobe kao što su ćelije u folikulima dlake, noktima, ustima, digestivnom traktu kao i ćelije u koštanoj srži uključene u proces proizvodnje ćelija krvi. Neželjeni efekti i toksičnost povezana sa primenom hemoterapeutika mogu usloviti smanjenu otpornost na infekcije, slabost organizma, gubitak kose, pojavu mučnine i povraćanja (130, 131). Upravo iz ovih razloga današnja istraživanja su usmerena na razvijanje drugačijih navika u ishrani sa istim terapijskim svojstvima koje ispoljavaju referentni hemoterapeutici a sve u cilju sprečavanja i ograničenja maligne transformacije tumorskih ćelija čime se ujedno poboljšava kvalitet života obolelih pacijenata (132, 133, 134).

Hormon receptor pozitivni (HR+) karcinom dojke kategoriše se kao karcinom sa najpovoljnijom prognozom u poređenju sa ostalim podtipovima, međutim postoji rizik od produžene pojave recidiva (135). Kod pacijenata u postmenopauzi primena endokrine terapije uz dve najvažnije kategorije lekova kao što su tamoksifen i inhibitori aromataze predstavljaju terapiju izbora (136). Karcinom dojke koji pokazuje HER2 pozitivnost čini oko 15% svih slučajeva (137) i lečenje ovih pacijenata zahteva primenu anti-HER2 monoklonskih antitela, trastuzumab ponekad u kombinaciji sa pertuzumabom, kao pomoćne ili neoadjuvantne terapije. Međutim, u novije vreme, lapatinib (dvostruki EGFR/HER2 reverzibilni inhibitor tirozin kinaze) uveden je kao potencijalna opcija za pomoćnu terapiju. Kombinacija hemoterapije i trastuzumaba kao i dvostruko ciljane terapije sa trastuzumabom i lapatinibom kod pacijenata sa lokalno uznapredovalim HER2-pozitivnim karcinomom dojke pokazuju poboljšan čak i potpuni patološki odgovor (138). Podtip TNBC karcinoma dojke sreće se kod 15-20% slučajeva i povezan je sa lošijom prognozom jer ciljani tretman nije dostupan a primena hemoterapije predstavlja jedinu

opciju izbora (139). U fazi kliničkih ispitivanja nalaze se inhibitori poli-ADP-riboza polimeraze (PARP) koji će predstavljati najpoznatije ciljane tretmane za BRCA1 i BRCA2 gene u kombinaciji sa hemoterapijom (115, 140).

Posebno je potrebno naglasiti da je primena dostupnih terapijskih protokola vrlo često praćena pojavom neželjenih nusfekata (141). Upravo iz ovog razloga istraživanje novih terapijskih mogućnosti u budućnosti je ključno.

1.4. Glioblastom

1.4.1. Epidemiologija glioblastoma

Većinu tumora centralnog nervnog sistema (CNS-a), oko 70% slučajeva, čine benigni tumori od čega polovinu čine meningeomi. Međutim, u preostalih 30% slučajeva tumori CNS-a su maligni pri čemu se u više od 80% svih malignih tumora ljudskog mozga izdvaja glioblastom (GBM) kao tumor koji pored toga što je najučestaliji ujedno je i najdestruktivniji među svim tumorima mozga (142, 143).

Navodi se da čak 90% multiformnih slučajeva GBM se razvija *de novo* (primarni glioblastom) iz zdravih glijalnih ćelija putem procesa tumorigeneze kroz više koraka, dok se preostalih 10% glioma razvija progresijom iz tumora niskog gradusa difuznog ili anaplastičnog astrocitoma i predstavljaju sekundarne neoplazme (144). Kada je reč o sekundarnom gliomu uglavnom se dijagnostikuje kod osoba srednje starosne dobi oko 39 godine, sporije progredira i ima bolju prognozu. Sa druge strane, GBM koji se razvija *de novo* raste velikom brzinom progresije (145). Iako su genetska osnova kao i molekularni putevi u osnovi razvoja primarnih i sekundarnih glioma različiti (146), ipak razlike u morfološkim karakteristikama nisu evidentirane (147). Iako SZO klasifikuje glioblastom kao gradus IV astrocitoma, prepostavlja se da GBM predstavlja kombinaciju neuralne matične ćelije (NMC) u subventrikularnoj zoni i oligodendrocitne progenitorske ćelije (OPĆ) (148, 149). Potencijalne fenotipske nejasnoće mogu se javiti kada ekspresija onkogeno može prouzrokovati nastanak predominantno astrocitnog ili oligodendroglijalnog izgleda (150).

GBM je najčešći maligni podtip glioma, koji se dijagnostikuje kod odraslih osoba sa godišnjom učestalošću od oko 1:33000 ljudi (151). Medijalna stopa preživljavanja pacijenata obolelih od ovog maligniteta je u proseku 12-15 meseci a petogodišnje preživljavanje navodi se da je svega kod 5% slučajeva (152).

1.4.2. Etiologija glioblastoma

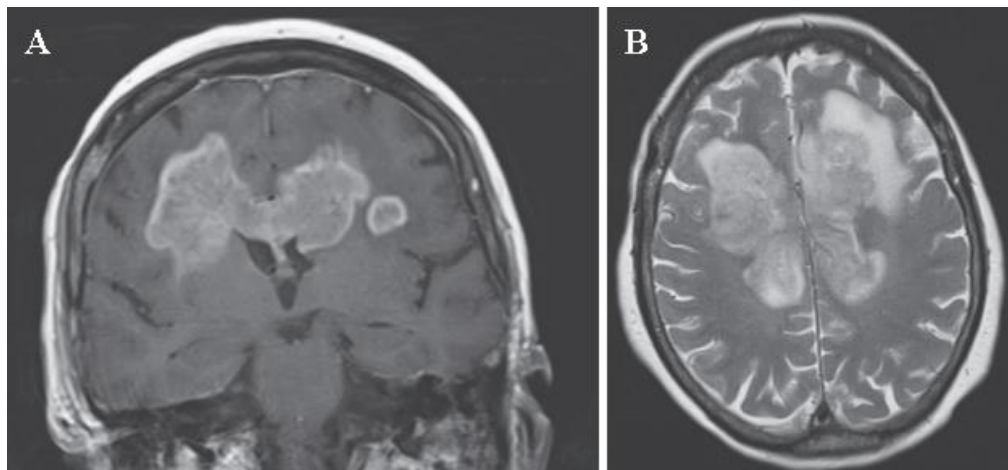
Etiologija nastanka ovog maligniteta još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Veruje se da je u pitanju tumor sa spontanom nastankom jer svega 1% slučajeva ima porodični oblik ovog tumora (153). Literaturni podaci govore o mogućoj povezanosti sa pojedinim genetskim oboljenjima kao što su tuberozna skleroza (154), Turkot sindrom (155), multipla endokrina neoplazija tipa IIA (156) kao i neurofibromatoza tip I (157). Pored navedenog kontuzija mozga koja nastaje kao posledica povreda glave može predisponirati nastanak GBM (158). Na molekularnom nivou primećeno je da je pojava GBM u potencijalnoj vezi sa deregulacijom G1/S faze ćelijskog ciklusa (159) kao i pojavom brojnih genetskih abnormalnosti (gubitak genetskog materijala na nivou hromozoma 10q, amplifikacija gena *EGFR*, *FGFR2*, *IRS2* and *AKT3*, kao i mutacije na nivou *PTEN*, *TP16*, *TP53*, *PARK2*, *PTPRD* i *NF1* gena) (160). Povećan rizik od nastanka GBM beleži se kod žena u postmenopauzi, pa je razvijena hipoteza o učešću polnih hormona u etiologiji (161). Takođe, primećeno je da je incidencija ovog tumora povezana sa visinom i BMI – visoke vrednosti ovih karakteristika povećavaju rizik od nastanka (162). Humani citomegalovirus smatra se još jednim potencijalnim etiološkim agensom za razvoj ovog maligniteta. Kod imunokompromitovanih osoba izaziva promene na više organa a navodi se da uzrokuje i kongenitalni encefalitis. Ono što je od posebnog interesa jeste da ovaj virus pokazuje tropizam prema glijalnim ćelijama i kodira proteine kao što su *IE1*, *US28*, *GB* koji dalje aktiviraju intracelularne signalne puteve uljučene u procese mitogeneze, mutagenze, apoptoze, inflamacije i angiogeneze. Posledično dolazi do disregulacije ključnih signalnih putava *PDGFR*, *Akt*, *STAT3* ali i nastanka poremećaja u funkciji monocita i samih glijalnih ćelija (163). Visok nivo ekspresije faktora stimulacije granulocita utvrđen je kod GBM različitog stepena maligniteta i smatra se da je uključen u nastanak ovog tumora (164). Jonizujuće zračenje predstavlja jedan od fizičkih faktora koji povećavaju verovatnoću razvoja GBM. Primećeno je da su osobe koje su zaposlene u gumarskoj i petrohemijskoj industriji u većem riziku od incidencije GBM. Takođe, pojedine hemikalije smatraju se potencijalno opasnim kao što su pesticidi, policiklična aromatična jedinjenja i rastvarači (165).

1.4.3. Klinički znaci oboljenja

U zavisnosti od lokalizacije i povećanja intrakranijalnog pritiska kao posledica kliničkog stadijuma bolesti, najčešći znaci GBM su glavobolja, ataksija, vrtoglavica, poremećaji vida (zamagljen vid, diplopija), kao i česta sinkopa (166, 167). Zbog ovih nespecifičnih simptoma, GBM se često pogrešno dijagnostikuje kao infekcije, inflamatorni procesi ili cirkularna oboljenja CNS-a (168). Pored navedenih simptoma pojava bola u leđima, nogama i pojava išijasa mogu ukazati na lumbalnu herniju (169). Kod pacijenata kod kojih ranije nije dijagnostikovana epilepsija takođe može biti jedna od indikacija za neuroimidžing usled sumnje na GBM (170).

1.4.4. Dijagnostičke metode

Magnetna rezonanca (MR) predstavlja primarnu dijagnostičku metodu za postavljanje dijagnoze GBM. Navodi se da je prečnik tumora u trenutku postavljanja dijagnoze približno oko 4 cm (171). Specifičnost koja se može uočiti na MR snimku jeste tumor koji zahvata *corpus callosum* i raste bulateralno u okcipitalne i temporalne režnjeve “leptir glioblastom” (Slika 1.4.1)(172).



Slika 1.4.1. Prikaz “leptir glioblastoma” na magnetnoj rezonanci u: **A)** frontalnoj i **B)** horizontalnoj ravani. Preuzeto i modifikovano iz rada: Juveria S, Anant SK. Butterfly glioma. *N Engl J Med.* 2018; 378(3):281.

Definitivna dijagnoza zasniva se na histopatološkom pregledu intraoperativno uklonjenog tumora ili njegovih segmenata kao i primenom tradicionalnih histoloških, citoloških i histochemijskih metoda (173). Kod pacijenata kod kojih nije moguće sprovesti neurohirušku resekciju tumora radi se biopsija tankom iglom (174).

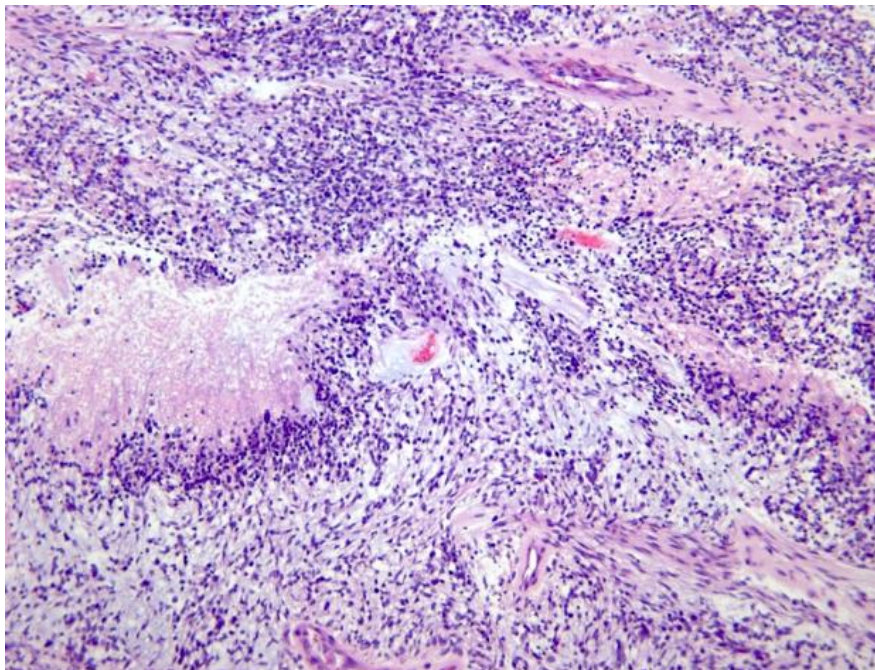
Morfološka dijagnoza bazira se na kriterijumima koji su definisani od strane SZO. Gradiranje tumora CNS-a obuhvata procenu njihovih morfoloških karakteristika, stepena maligniteta (I-IV), proliferativnog indeksa, odgovora na sprovedenu terapiju kao i vremena preživljavanja. I stepen obuhvata benigne tumore CNS-a, II stepen se koristi za relativno nemaligne tumore, III stepen uključuje tumore niskog stepena maligniteta, dok IV stepen označava najmalignije tumore sa medijalnom stopom preživljavanja od 6-12 meseci. GBM je klasifikovan kao IV stepen (175).

Verifikacija primarne dijagnoze vrši se primenom imunohistochemijskih bojenja uzorkovanog tumorskog tkiva na prisustvo glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) (176). Ovaj protein je najspecifičniji marker astrocita kako u zdravom tkivu tako i u patološki izmenjenom jer ima ulogu u sazrevanju astrocita. Gubitak ekspresije GFAP proteina dovodi se u vezu sa porastom stepena malignosti tumora astrocitnog porekla. Kod GBM ćelije pokazuju negativnost na GFAP i bržu proliferaciju u odnosu na pozitivno obojene ćelije (177). Pored navedenog specifičnog proteina i kiseli protein S100 može biti prisutan u glijalnim ćelijama i predstavlja specifičan marker za tumore CNS-a, ali je ustanovljeno da stepen ekspresiranosti ovog proteina ne može biti osnovni kriterijum u diferencijalnoj dijagnozi (178).

1.4.5. Morfološke karakteristike glioblastoma

Morfološki GBM karakterišu ćelije malih dimenzija sa prisutnim odlikama polimorfizma, anaplazije i anizokarioze. Multiformne ćelije GBM su poligonalne ili vretenaste sa acidofilnom citoplazmom i nejasnim ćelijskim granicama (**Slika 1.4.2**). Prisutan je nuklearni pleomorfizam. Naime, jedra su ovalna ili izdužena sa grupo zgrudvanim hiperhromatskim hromatinom uz centralnu ili pericentralnu lokalizaciju unutar ćelija. Kod pojedinih ćelija uočava se prisustvo

intranuklearnih inkluzija. Takođe, mogu biti prisutne i binuklearne i multinuklearne ćelije poput limfocita, neutrofila, makrofaga ali i nekrotične ćelije (174).



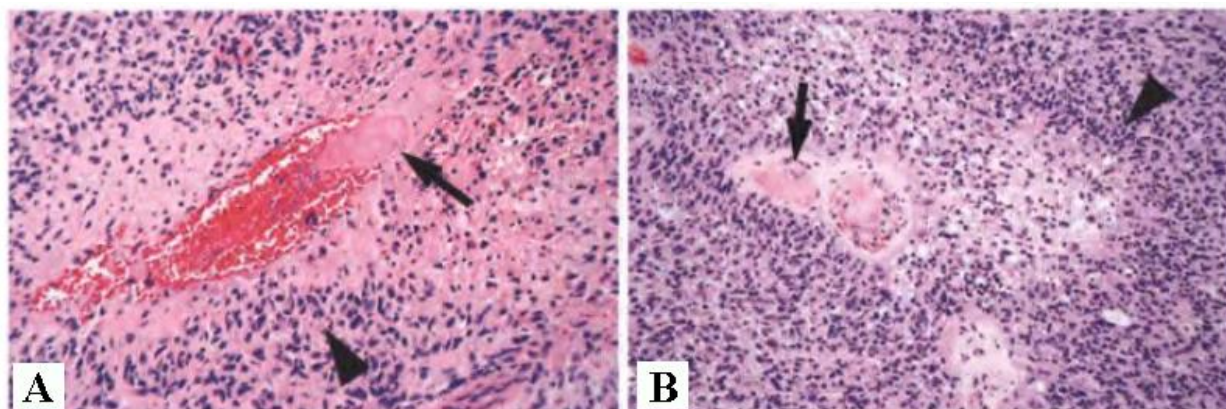
Slika 1.4.2. Histološki prikaz arhitekstonske građe glioblastoma sa oblastima visoke celularnosti koje sadrže ćelije malih dimenzija oskudne citoplazme i manje ćelijske oblasti sa ćelijama izduženih jedara. *Preuzeto i modifikovano sa sajta:*

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/cnstumorglioblastomaidhmutant.html>

Ćelije slične adipocitima koje odlikuje prisustvo lipomatoznih vakuola mogu činiti oko 5-10% svih tumorskih ćelija ali kod pojedinih slučajeva ova procentualna zastupljenost može preći i 80%. Ovaj vid GBM uprkos razlikama u morfologiji pokazuje molekularne karakteristike slične primarnom gliomu pa se opisuje kao gliom “bogat mastima” (179).

GBM pripada grupi tumora sa bogatom vaskularizacijom (180). Naime, novorazvijeni krvni sudovi imaju slične morfološke osobine kao i krvni sudovi bubrežnih glomerula ali se njihove endotelne ćelije fenotipski razlikuju od zdravih endotelinih ćelija. Prisutno je fokalno preklapanje, hiperplazija kao i heterogenost u pogledu veličine i oblika. Karakteristično je da se višestruka

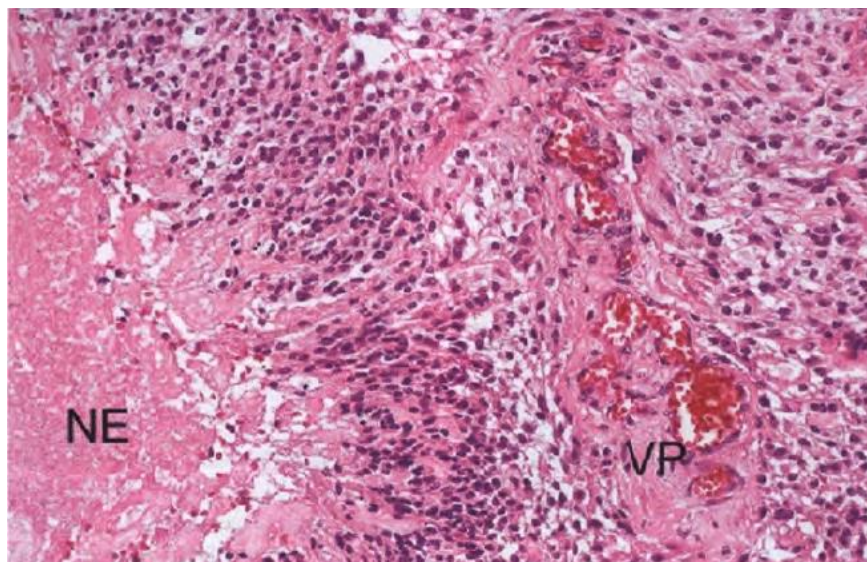
Veibel-Palade tela, koja su normalno odsutna u endotelnim ćelijama mozga, uočavaju u ćelijama novoformiranih krvnih sudova GBM. Još jedna od odlika jeste da je površina krvnih sudova prekrivena diskontinualnim slojem pericita bez kontakta sa astrocitima (181). Unutar krvnih sudova uočava se prisustvo vaskularnih trombova koji dovode do oštećenja ali i proliferacije endotelnih ćelija (**Slika 1.4.3**) (182). Kao posledica nastanka vaskularnog oštećenja dolazi do ekstravazacije crvenih krvnih zrnaca (183).



Slika 1.4.3. Mikroskopski prikaz intravaskularne tromboze kod glioblastoma. **A)** Centralni krvni sud je okludiran intravaskularnim trombom (označeno crnim strelicama), **B)** Palisadna grupacija tumorskih ćelija oko tromboziranog krvnog suda (označeno crnim strelicama) uz prisutnu perivaskularnu nekrozu. *Preuzeto i modifikovano iz: Louis DN, editor. WHO classification of tumours of the central nervous system. WHO; 2007.*

Nekrotična zarišta jedna su od značajnih karakteristika GBM. Histološki, uobičajeno susreću se dva tipa nekroze u zavisnosti od lokalizacije i veličine nekrotičnog područja. Odlike prvog tipa nekroze jesu velike površine nekrotičnih područja unutar centralnog dela tumora koje nastaju kao posledica neadekvatnog snabdevanja krvlju kod svih primarnih GBM. Drugi tip nekroze sadrži mala nekrotična žarišta nepravilnog oblika okružena pseudopalisadnim oblastima koje stvaraju radijalno orjentisane glijane ćelije prisutne i kod primarnih ali i kod sekundarnih GBM (**Slika 1.4.4**) (184). Populacija pseudopalisadnih ćelija navodi se da predstavlja brzo proliferišuće neoplastične ćelije koje imaju povećane potrebe za snabdevanje krvlju i podvrgnute

su centralnoj nekrozi. Naime, to je grupacija ćelija otporna na apoptozu koja se formirala usled povećanog preživljavanja ćelija, mešovita populacija tumorskih i inflamatornih ćelija u blizini nekroze ili populacija ćelija koja ima sposobnost migriranja ka ili iz centralnog fokusa (185). Pseudopalisadne oblasti karakterišu se i prisustvom višestrukih apoptotičnih ćelija (186). Povećanje stepena atipije, nuklearne hiperhromatoze, povećan mitotički indeks, prisutvo velikih površina nekrotičnih područja kao i krvni sudovi atipičnih karakteristika ukazuju na očekivanje lošeg terapijskog odgovora i brzu progresiju oboljenja (187).



Slika 1.4.4. Histološke karakteristike glioblastoma. Polje ishemične nekroze (NE) je okruženo palisadno raspoređenim tumorskim ćelijama uz prisutnu vaskularnu proliferaciju (VP). *Preuzeto i modificovano iz: Louis DN, editor. WHO classification of tumours of the central nervous system. WHO; 2007.*

1.4.6. Terapija oboljenja

GBM se odlikuje visokom proliferativnom aktivnošću (188). Hiruška resekcija u meri u kojoj je to moguće uz primenu hemoterapije i radioterapije predstavljaju glavnu osnovu terapijskih protokola pri lečenju obolelih od ovog maligniteta (189).

Međutim, usled infiltracije okolnog tkiva malignim ćelijama, prisustva kompleksne vaskularizacije, lokalizacije tumorske mase potpuna resekcija GBM je gotovo nemoguća. Pri operativnom zahvatu pristupa se maksimalnoj radikalnoj resekciji u cilju smanjenja tumorske mase kao i povećanju efikasnosti adjuvantne terapije što u krajem dovodi do povećanja stope preživljanja kod pojedinih slučajeva (190). Spoznaja da GBM pokazuje veliku intra- kao i inter-tumorsku heterogenost objašnjava terapijsku rezistenciju kao i nastanak recidiva ove bolesti u čak 90% slučajeva nakon sprovedenog operativnog zahvata (191, 192).

Radioterapija se još uvek nije pokazala efikasnom upravo iz razloga što se maligne ćelije koje su lokalizovane u područjima hipoksije otporne na ovaj vid terapije (193). Krvno-moždana barijera takođe otežava lečenje jer brojni medikamenti ne prolaze do struktura CNS-a (194). Cilj terapijskih strategija u borbi protiv GBM jeste postizanje regresije tumora kao i obezbeđenje što je moguće dužeg preživljanja obolelih (195).

Poređenjem rezultata primene hemoterapeutika pri lečenju GBM dokazano je da je primena temozolomida dovela do najveće medijane preživljavanja obolelih (196). Takođe, kombinovana primena temozolomida uz radioterapiju pokazala je bolje rezultate u odnosu na samostalnu primenu radioterapijskih tretmana (197). Trenutna standardna terapija pri tretmanu GBM je Stupp-ov režim, koji obuhvata radioterapiju (2 Gy dnevno, 5 dana u nedelji, do ukupno 60 Gy) uz kombinovanu i istovremenu primenu temozolomida (TMZ) (198, 199). Usled blokade sinteze NHERF-1 u ćelijama glioma nakon radioterapije povećava se osetljivost ovih ćelija na citotoksično dejstvo temozolomida kao i indukciju apoptoze u ćelijama GBM (196).

Spoznaja da je GBM visoko vaskularizovan karcinom jeste razlog za razvoj i istraživanje anti-angiogene genske terapije sa krajnjim ciljem blokade VEGF-zavisnog puta (200). Joše jedan medikament bevacizumab (humanizovano IgG1 monoklonsko antitelo) se pokazao delotvornim u poboljšanju ishoda oboljenja kod rekurentnih formi GBM (201). Postoji nekoliko mehanizama delovanja bevacizumaba. Selektivno se vezuje sa visokim afinitetom za humani VEGF i time neutralize njegovu bilošku aktivnost, uzrokuje direktnu inhibiciju angiogeneze povezane sa tumorom kao i poremećaj mikrovaskularnog okruženja matičnih ćelija glioma (202).

Međutim, uprkos ogromnim pokušajima i uloženom trudu u svrhu razvoja novih terapijskih mogućnosti, GBM je i dalje nedostižna meta za brojne medikamente (203). Upravo iz ovog razloga reč je o neistraženom polju u koje se ulaže svakodnevni napor kako bi se proširio terapijski izbor i produžila stopa preživljavanja a ujedno i pacijentima obezbedio kvalitetniji život nakon dijagnostikovanja (189). Ovaj uloženi trud bi omogućio otkrivanje novih medikamenata koji bi zapravo bili potencijalno moćno sredstvo u lečenju ove veoma agresivne maligne bolesti (204, 205).

1.5. Karnozin

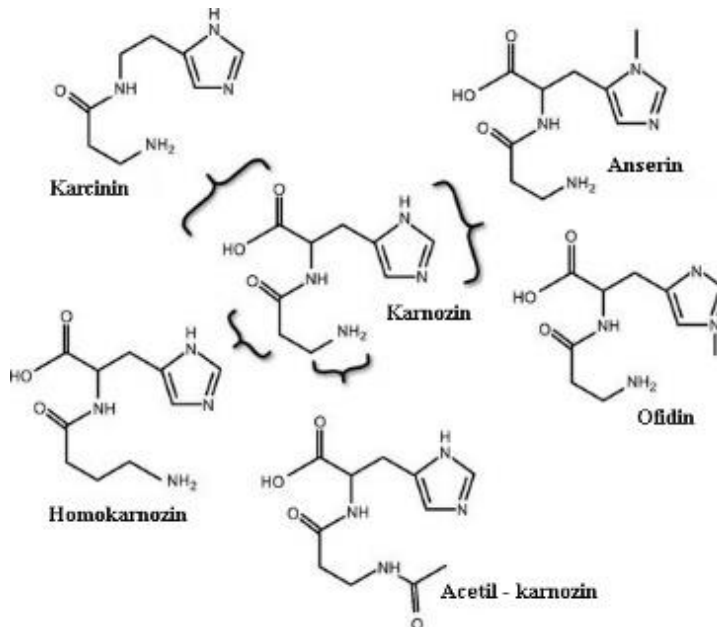
Karnozin (β -alanil-L-histidin) je prirodni dipeptid prisutan u mnogim tkivima poput mišićnog, plućnog, tkiva oka, zatim u mozgu, bubrezima i jetri. Maksimalna koncentracija koja je zabeležena u mišićnom tkivu iznosi $\sim 2,5$ mM (206). Sinteza ovog dipeptida se odvija iz prekursora β -alanila i histidina učešćem enzima karnozin sintaze, dok je sa druge strane enzim poznat kao karnozinaza odgovoran za katabolizam (207).

1.5.1. Karnozin i njegovi prirodni derivati

Najčešće varijante derivata karnozina su metilovani analozi anserin i ofidin u kojima je imidazolski prsten L-histidina metilovan na atomu azota najbližem bočnom lancu i udaljenom od bočnog lanca. Homokarnozin predstavlja analog karnozinu u kom je β -alanil zamenjen GABA. Druga srodna jedinjenja uključuju acetilovani oblik (acetilkarnozin), u kom je β -alanil acetiliran i karcinin u kom je L-histidinski ostatak karnozina zamenjen histaminom (**Slika 1.5.1**) (206). Često se u literaturi sreće skraćénica HCD koja ujedno označava dipeptide koji sarže histidin (karnozin, anserine i ofidin).

Karnozin je prvi put otkriven 1900. godine od strane ruskog hemičara V.S. Guleviča tokom istraživanja na neidentifikovanim jedinjenjima koja ne sadrže azot u Liebigovom mesnom ekstraktu (208). Nakon otkrića karnozina primećeno je da većina mišića ptica ne sardži karnozin (209). Umesto toga, novo jedinjenje anserin je identifikovano u mišićima guske (210) i piletine (211). Još jedan analog metilovanog karnozina pronađen je u mišićima zmije i kitova i nazvan je ofidin. Distribucija HCD u različitim životinjskim vrstama bila je predmet proučavanja skoro 100 godina. Skoro sve studije su sprovedene na tkivu skeletnih mišića raznih životinjskih vrta.

Navodi se da skoro svi sisari u svom organizmu imaju karnozin zajednosa jednim od analoga metilovanog karnozina, anserin ili ofidin. Jedina vrsta sisara za koju se zna da nema nijedan od dva analoga metilovanog karnozina je zapravo *Homo sapiens*. Još jedan izuzetak koji se navodi jeste da neke životinje poput svinje i bivola imaju sva tri HCD ali se metilovani oblici u daleko manjem procentu zastupljeni u odnosu na karnozin (212).



Slika 1.5.1. Hemijska struktura karnozina i njegovih prirodnih derivata. *Preuzeto i modifikovano iz rada: Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiol Rev. 2013; 93(4):1803-45.*

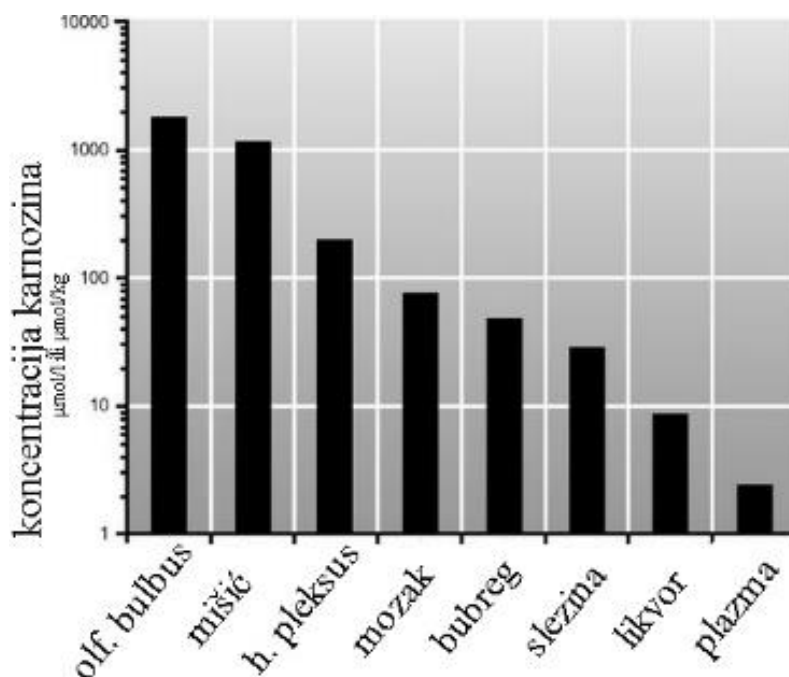
1.5.2. Distribucija karnozina i njegovih prirodnih derivata u tkivima

Prema literaturnim navodima, kod sisara samo dva tkiva se navode da poseduju koncentraciju karnozina koja je u milimolarnom opsegu a to su skeletni mišić i olfaktorni bulbus (**Slika 1.5.2**) (212). Naime, kako skeletni mišić predstavlja značajan procenat telesne mase može se reći da preko 99% prisutnog karnozina u organizmu se nalazi u skeletnom mišićnom tkivu (213).

O prisustvu karnozina u drugim tkivima u organizmu sisara literaturni podaci su kontradiktorni. U istraživanju sprovedenom davne 1960. godine (214) navodi se odsustvo HCD jedinjenja u tkivu jetre zeca, dok sa druge strane prema navodima studije iz 2005. godine (215) utvrđena je veoma visoka koncentracija karnozina u tkivu jetre govečeta. Relativno visoke koncentracije HCD dokazane su i u koži gmizavaca i žaba (216). Sa druge strane, u goveđem sočivu evidentirano je prisustvo karnozina u tragovima (217). Deo kontradiktornosti u literaturnim navodima proizilazi nesumnjivo iz činjenice da su koncentracije karnozina u različitim tkivima na

granici detekcije, da postoje značajne razlike među životinjskim vrstama kao i da postoji velika razlika u tačnosti HCD kvantifikacije između različitih analitičkih metodologija.

Profilisanje HCD u tkivima pacova metodom visoke preciznosti upotrebom tečne hromatografije sa elektroesej jonizacijom dalo je podatke da se karnozin može detektovati u milimolarnom opsegu u skeletnim mišićima (2-6 mmol/kg vlažnog tkiva), u mikromolarnom opsegu u tkivu mozga, malog mozga i miokardu (25-70 mmol/kg vlažnog tkiva), međutim detekcija nije izvršena u bubrezima, jetri, plućima i plazmi. Slično profilisanje sadržaja karnozina u humanom tkivu trenutno nedostaje u literaturi. Jedina često merena koncentracija karnozina u ljudskom tkivu jeste u skeletnim mišićima, zbog prisutne visoke koncentracije kao i relativne lakoće uzorkovanja mišićnog tkiva invazivnom metodom (biopsija) ili neinvazivno (spektroskopija magnetne rezonance) (218, 219).



Slika 1.5.2. Koncentracije karnozina u endogenom tkivu i telesnim tečnostima kod miša. *Preuzeto i modifikovano iz rada: Kamal MA, Jiang H, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009;296(4):R986-91.*

1.5.3. Uloge karnozina

Poznate su brojne funkcije koje ispoljava karnozin kao što su antioksidativna, uloga u helaciji jona Cu^{2+} i Zn^{2+} i puferovanju H^+ jona, uloga u oslobađanju Ca^{2+} jona iz sarkoplazmatskog retikuluma pri mišićnoj kontrakciji, kao i ispoljavanje antiproliferativnog potencijala (220, 221). Pored navedenih brojne studije govore o pozitivnim efektima pri primeni ove supstance kao suplementacione terapije raznih oboljenja poput Alchajmerove bolesti, Parkinsonizma, šizofrenije, autizma kod dece, dijabetesa i oboljenja oka (katarakta) (222,223, 224, 225).

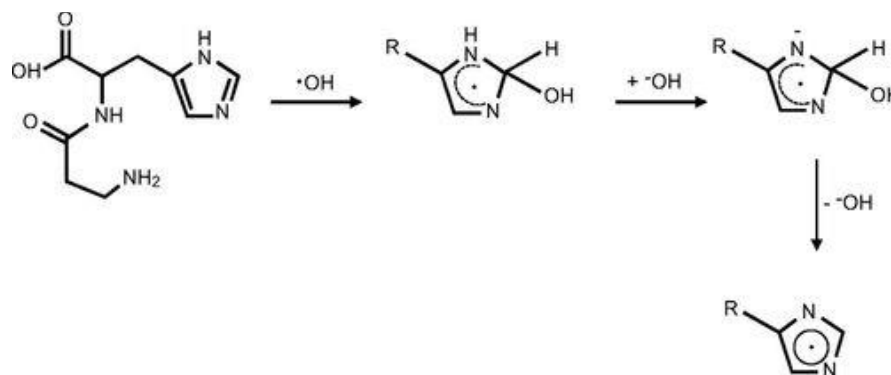
1.5.3.1. Antioksidativna aktivnost karnozina

Antioksidativnu aktivnost karnozina proučavali su Bolirev i saradnici 80-ih godina (226, 227). Kasnije brojna istraživanja govore o direktnoj i indirektnoj aktivnosti ovog jedinjenja u pogledu antioksidativne uloge (228, 229). Naime, antioksidativna aktivnost karnozina je posredovana različitim mehanizmima uključujući helaciju metalnih jona kao i uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i peroksil radikala.

Većina istraživanja o karnozinu kao helatoru Cu^{2+} i Zn^{2+} sprovedena je u *in vitro* uslovima koji su ipak drugačiji od onih koji se odigravaju u fiziološkim uslovima u organizmu (229-231). Upravo iz ovog razloga potreban je značajan broj novih istraživanja koja bi se bazirala na boljem razmevanju uloge karnozina kao fiziološkog helatora metalnih jona a ujedno i razjasnila uloga tih mehanizama.

Mehanizam interakcije karnozina sa superoksidnim radikalima proučavali su Pavlov i saradnici (232) u vodenim rastvorima i ustanovili su da u osnovi svega leži sposobnost karnozina da formira kompleks za prenos naelektrisanja sa superoksidnim radikalom ($\text{O}_2^{\cdot-}$) koji menja reaktivnost. Takođe, metodom pulsne radiolize dobijeni rezultati ukazali su da karnozin ima sposobnost reagovanja i sa hidroksilnim radikalom ($\cdot\text{OH}$) pri čemu nastaje stabilan intermedijer koji je manje reaktivan prema drugim molekulima (**Slika 1.5.3**) (233).

Antioksidativnu aktivnost karnozina proučavali su i Decker i saradnici 2000. godine (228) upotrebom prečišćene supstance L-karnozina. U svom istraživanju navode da karnozin i l-histidin imaju ulogu u uklanjanju peroksilnih radikala u rasponu milimolarnih koncentracija, dok se β -alanil pokazao kao neefikasan.



Slika 1.5.3. Hemijska reakcija karnozina i hidrosilnog radikala. *Preuzeto i modifikovano iz rada: Tamba M, Torreggiani A. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. Int J Radiat Biol. 1998;74:333–40.*

In vivo antioksidativna aktivnost karnozina proučavana je na životinjskim modelima u fiziološkim uslovima kao i uslovima izazvanog oksidativnog stresa primenom ksenobiotika koji deluje kao induktori radikala kao što su etanol, tioacetamid i agensi protiv karcinoma (228).

U fiziološkim uslovima utvrđeno je da karnozin smanjuje oksidativna oštećenja kao i poboljšanje enzimske i neenzimske antioksidativne aktivnosti. Naime, tretman karnozinom u trajanju od mesec dana primenom dnevne doze karnozina od 250 mg/kg pokazao se efikasnim kod starijih pacova u smanjenju nekih markera oksidacije lipida kao i podizanju nivoa glutationa u krvi (GSH) i bazalne aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su superoksid dizmutaza (SOD) i glutation peroksidaza (GP) (234). U saglasnosti sa navedenim su i rezultati istraživanja koje su sprovedli Kim i saradnici (235) koji su u period od 6 nedelja primenjivali karnozin u dozi od 0,5% u ishrani pacova i primetili povećanje aktivnosti enzimskih antioksidanasa kao što su SOD i GP.

Istraživanja sprovedena na životinjskim modelima usled indukcije oksidativnog stresa primenom ksenobiotika potvrđuju antioksidativnu aktivnost karnozina. Utvrđeno je da karnozin kao i l-histidin u zavisnosti od primenjene doze inhibiraju oksidativna oštećenja izazvana primenom etanola, povećanjem ekspresije katalaze i nivoa GSH i aktivnosti GP (236). Antioksidativnu aktivnost karnozina u jetri kao i smanjenje aktivnosti plazma transferaza primenom karnozina kod pacova tretiranih etanolom primetila je još jedna grupa istraživača (237).

1.5.3.2. Fiziološke uloge karnozina u skeletnoj muskulaturi

Literaturni navodi potvrđuju ulogu karnozina u kontraktilnoj funkciji skeletnih mišića. Naime, nakon niza ritmičnih kontakcija skeletnih mišića žabe u preparatima usled primene 10 mM karnozina u medijumu, nastanak zamora je izostao u poređenju sa netretiranom grupom. Ovaj efekat karnozina protiv nastanka zamora prihvaćen je kao "Severinov fenomen" (238).

Uloga karnozina kao pH pufera u skeletnim mišićima prvi put je utvđena 1938. godine (239). Tokom mišićnih kontrakcija velikog intenziteta, anaerobna glikoliza dovodi do povećanja proizvodnje mlečne kiseline koja se odmah disocira na H^+ jone i laktatne jone pri fiziološkim vrednostima pH. Nastala acidoza može dostići pH vrednosti i niže od 6,5 i često je povezana sa posledičnom pojavom kontraktilnog umora mišića. Suplementacija karnozinom kod ljudi doprinela je smanjenju stepena acidoze u krvi usled treninga velikog intenziteta (240). Na osnovu svega navedenog zaključeno je da je uloga karnozina u smanjenju razvoja acidoze upravo u njegovoj sposobnosti da helira jone H^+ (241). Pored navedenog, uloga karnozina u adekvatnom funkcionisanju i kontakciji skeletne muskulature ogleda se i u zaštiti od proizvodnje ROS-a kao i helaciji Cu^{2+} jona (242, 243).

Dobro je poznato da je process ekscitacije-kontrakcije u ćelijama skeletne muskulature složeno regulisan lanac događaja pri kojima se kalcijum oslobađa iz sarkoplazmatskog retikuluma. Upravo brojne studije govore o stimulativnom efektu karnozina na oslobađanje jona Ca^{2+} (244,

245). Takođe, primenećeno je i ispoljavanje delovanja karnozina na spregu ekscitacije-kontrakcije u smislu povećanja osetljivosti kontraktilnog aparata na oslobođen kalcijum (246, 247).

1.5.3.3. Pozitivni efekti karnozina pri suplementacionoj primeni kod raznih oboljenja

Potencijalni zaštitni efekti karnozina primećeni su kod Alchajmerove bolesti prvi put su evidentirani kasnih 90tih kada su *in vitro* studije dokazale da sposobnost ovog dipeptida pri inhibiciji formiranja β -amiloidne polimerizacije kao i posledičnu toksičnost na ćelije (248). Takođe, Perston i saradnici (249) dokazali su da karnozin pruža zaštitu od dejstva neurotoksina β -amiloidnog peptide na vaskularne endotelne ćelije mozga pacova. Pored *in vitro*, sprovedene su i brojne *in vivo* studije koje su dokazale da karnozin ima snažan efekat u obnavljanju i funkcionisanju mitohondrija kao i suzbijanju agregacije β -amiloidne supstance kao i da je pokazao trend ka poboljšanju kognitivnih deficita (250). Naime, predložene su hipoteze o ovim efektima karnozina, koje govore o mogućem uticaju u regulaciji oslobađanja glutamata kao i prometa NMDA receptora (251). Takođe, potencijalna interakcija između karnozina i naelektrisanih grupa koje okružuju hidrofobni klaster β -amiloidna čime se inhibira povećanje koncentracije istog navodi se kao jedna od potencijalnih mogućnosti ispoljavanja delovanja (252). Ne treba zanemariti i aktivnost karnozina u heliranju metalnih jona (Zn^{2+} i Cu^{2+}) i čime se pospešuje neuroprotektivna uloga što je i dokazano u *in vitro* uslovima ali i na *in vivo* modelima (250, 253).

Pozitivni efekti usled suplementacione primene karnozina primećeni su i kod Parkinsonove bolesti. Naime, dokazano je da tretman karnozinom (1,5 g/dan) u kombinaciji sa l-DOPA kod pacijenata sa ovim oboljenjem značajno poboljšava brojen neurološke simptome poput smanjenja rigidnosti šaka i nogu. Na biohemijskom nivou mehanizam delovanja mogao bi se objasniti kroz smanjenje proteinskih karbonila u krvnoj plazmi kao i povećanjem SOD aktivnosti (254).

Takođe, utvrđeno je da karnozin poboljšava kognitivne testove kao što je test detekcije strateškog cilja kod odraslih osoba sa hroničnom šizofrenijom nakon primene 2 g dnevno karnozina tokom 3 meseca u randomiziranoj, dvostruko slepoj, placebo kontrolisanoj studiji

(255). U cilju uvođenja karnozina u terapijske svrhe ovog oboljenja još uvek se sprovode brojna istraživanja (256-258).

Primena karnozina u kontrolisanoj studiji (800 mg dnevno tokom 8 nedelja) kod dece sa poremećajima autističnog spektra uslovlila je statistički značajno poboljšanje na Giliam skali za procenu autizma i testu receptivnog rečnika (259). Te su pozitivni efekti karnozina i pri tretmanu ovog stanja i dan danas meta brojnih istraživanja.

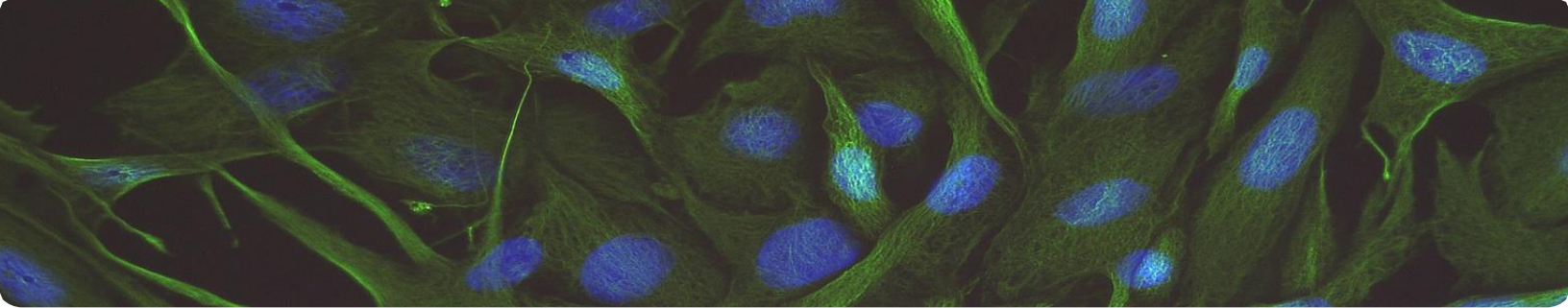
Sve je veći broj istraživanja koja ukazuju na zaštitnu ulogu usled primene karnozina kod pacijenata obolelih od dijabetesa. Posebno se ističe sposobnost ove supstance u kontroli glikemijskog statusa kao i sprečavanje ili ublažavanje dijabetičkih komplikacija poput nefropatije i oštećenja oka (260, 261). O zaštitnim efektima karnozina prvi put se spominje u istraživanju sprovedenom od strane Lee i saradnika (262) kada je primećeno da je oralna suplementacija miševa karnozinom u periodu od 4 nedelje značajno smanjila nivo glukoze i fibronektina u plazmi, a sa druge strane povećala nivo insulina. Kasnije je utvrđeno da je potencijalni mehanizam uslovljavanja hipoglikemijskog efekta uslovljen sposobnošću karnozina da reguliše autonomni nervni sistem preko H3 receptora, kao i mogućnosti snižavanja neuronske aktivnosti simpatičkih nerava uzrokujući time povećanje lučenja insulina i supresiju lučenja glukagona iz pankreasa (263).

Sposobnost karnozina da spreči nastanak i razvoj katarakte ispitivana je na brojnim životinjskim modelima (zec, pacov...) (264, 265). Naime, govori se o sposobnosti karnozina da inhibira agregaciju α -kristalina izazvanu metilglioksalom kao i mogućnosti dezagregacije već glikovanog α -kristalina (266).

1.5.3.4. Antitumorski potencijal karnozina

Posebno interesovanje je izazvao antitumorski potencijal karnozina (267-271). Prvi izveštaj o antiproliferativnom dejstvu karnozina opisala je grupa istraživača davne 1986. godine (263) uočivši da je tretman karnozinom od 50 mg/kg na dan inhibirao rast tumora i smanjio smrtnost kod miševa. Deset godina kasnije dokazano je da tretman karnozinom nije ispoljio

inhibitorni uticaj na rast humanih fibroblasta dok je jasna selektivna inhibicija bila ispoljena na rast neoplastičnih ćelijskih linija (272). Ubrzo nakon ovih saznanja proistekla je i prva hipoteza o potencijalnom mehanizmu delovanja, koja se zasnivala na sposobnosti karnozina da inhibira intermedijere glikolize (gliceraldehid fosfat i dihidroksiaceton fosfat) i time posledično smanjenje stvaranje ATP-a. Navedeni mehanizam ujedno je objašnjavao i specifičnost delovanja karnozina na tumorskim ćelijama usled metaboličkih različitosti između tumorskih i ćelija zdravog tkiva. Pored dokaza da karnozin poseduje sposobnost inhibicije tumorskog rasta delujući na glikolitičke procese, takođe se navodi i uticaj na inhibiciju mitohondrijske ROS generacije koju indukuje KRAS onkogen a koja ima veliki uticaj na proliferaciju ćelija (269). Iovine B i saradnici navode kao još jednu od uloga i mogućih mehanizama delovanja udeo u procesu ćelijske apoptoze (269). Međutim, tačan mehanizam delovanja karnozina pri ispoljavanju antitumorskog potencijala još uvek je sfera brojnih istraživača pri čemu se sprovode brojna *in vitro* ali i *in vivo* istraživanja (269, 273-275).



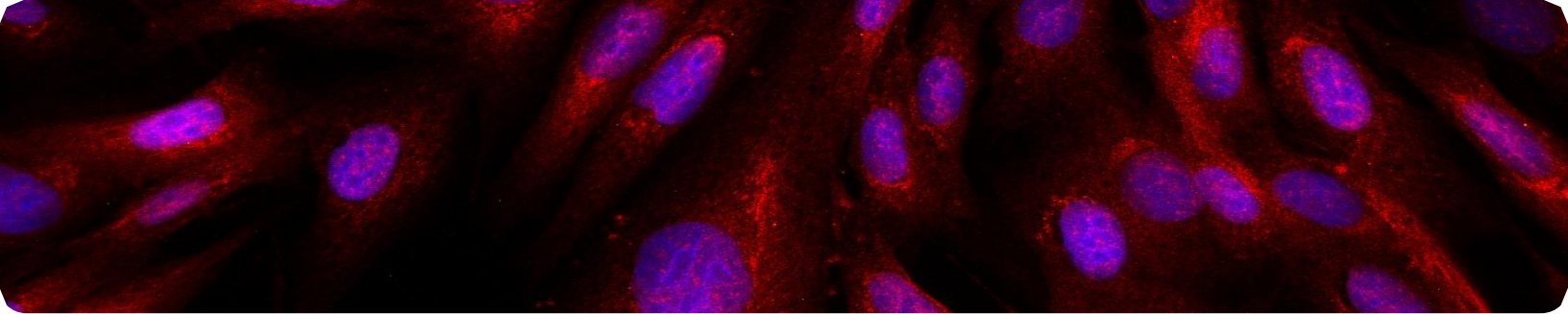
2. CILJEVI I HIPOTEZE

Ciljevi sprovedenog istraživanja bili su:

- Ispitati uticaj različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na morfološke karakteristike kontinuiranih ćelijskih linija - BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87.
- Ispitati upotrebom MTT metode uticaj različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na proliferativnu aktivnost kontinuiranih ćelijskih linija - BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87.
- Ispitati upotrebom "scratch eseja" uticaj različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozina na progres migracije ćelija kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija - MCF-7 i U87.
- Ispitati karakteristike imunofluorescentne pozitivnosti strukturnog (vimentin) markera nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija - BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87 različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin.
- Ispitati uticaj različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozina na imunofluorescentnu pozitivnost oksidativnog (SOD2) markera kontinuiranih ćelijskih linija - BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87.
- Ispitati uticaj različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na mitohondrijsku respiraciju „intaktnih ćelija“ i aktivnost kompleksa respiratornog lanca mitohondrija, kontinuiranih ćelijskih linija - BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87.

Hipoteze sprovedenog istraživanja bile su:

- Primena čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin uzrokuju značajne promene morfoloških karakteristika kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija, dok na zdravim kontinuiranim ćelijskim linijama morfološka svojstva ostaju neizmenjena.
- Čista supstanca L-karnozin, preparati Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin nakon sprovedenih tretmana kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija pokazuju antiproliferativnu aktivnost, ali ispoljavanje citotoksičnog efekta na zdravim ćelijama izostaje.
- Čista supstanca L-karnozin, preparati Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin će dovesti do statistički značajnog smanjenja migratorne sposobnosti ćelija kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija.
- Tretmani čistom supstancom L-karnozin, preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin uslovili su promenu intenziteta fluorescencije intermedijernog filameta vimentina u citoplazmi kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija, dok se isti efekat na zdravim ćelijama ne beleži.
- Primenom čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na kontinuiranim ćelijskim linijama - MCF-7, U87, BHK-21/C13 i MRC-5 očekuje se imunohistohemijska potvrda antioksidativnog efekta (SOD2).
- Čista supstanca L-karnozin, preparati Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin će dovesti do statistički značajne redukcije stepena respiracije „intaktnih ćelija“ ispitivanih kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija. Isti tretmani uslovljavaju stimulaciju stepena potrošnje kiseonika na BHK-21/C13 i MRC-5 ćelijama.
- Čista supstanca L-karnozin, preparati Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin će dovesti do statistički značajnog smanjenja aktivnosti kompleksa respiratornog lanca mitohondrija kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija, dok je sa druge strane kod zdravih ćelijskih linija zabeležen trend povećanja aktivnosti ispitivanih kompleksa.



3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Ogledi u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su u Laboratoriji za ćelijsku fiziologiju Zavoda za Fiziologiju, Laboratoriji za ćelijsku kulturu Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, kao i u Laboratorijama Centra za medicinsko-farmaceutska istraživanja i kontrolu kvaliteta (CMFIK) Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

3.1.1. Hemikalije, reagensi i rastvori

U **Tabeli 3.1.1** prikazan je spisak reagenasa i rastvora korišćenih za izvođenje oglada i metoda u sklopu ovog istraživanja.

Tabela 3.1.1. Spisak korišćenih hemikalija, reagenasa i rastvora

Hemikalije/Reagensi/ Rastvori	Proizvođač, zemlja porekla
Etilen glikol – bis (2-aminoetiletar) - <i>N,N,N',N'</i> -tetra sirćetna kiselina	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
K-laktobionat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Taurin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etansumporna kiselina (HEPES)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
D-Saharoza	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Goveđi serum albumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države

Tabela 3.1.1. Spisak korišćenih hemikalija, reagenasa i rastvora

Hemikalije/Reagensi/ Rastvori	Proizvođač, zemlja porekla
Kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Magnezijum hlorid heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Natrijum piruvat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Adenozine 5'-difosfat (ADP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Izopropanol	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države
N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamin dihidrohlorid (TMPD)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
(+)-Natrijum L-askorbat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Antimicin A iz <i>Streptomyces</i> sp.	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Rotenon	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Citohrom c	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Digitonin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Dimetil sulfoksid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Kalijum hlorid (KCl)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid (MTT)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Antibiotici (streptamicin i penicilin)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Izopropanol	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Sjedinjene Američke Države

Tabela 3.1.1. Spisak korišćenih hemikalija, reagenasa i rastvora

Hemikalije/Reagensi/ Rastvori	Proizvođač, zemlja porekla
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medijum</i> (DMEM) bez fenol crvene	<i>Capricorn</i> , Nemačka
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i> (DMEM/Ham's F-12) medijum sa L-glutaminom	<i>Capricorn</i> , Nemačka
<i>Minimum Essential</i> medijum (MEM-A)	<i>Capricorn</i> , Nemačka
L-glutamin	<i>Capricorn</i> , Nemačka
Fluorescentna boja za jedra, DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol)	<i>Abcam</i> , Sjedinjene Američke Države
<i>DPX (Tissue-Tek® Coverslipping Systems)</i>	Sakura, Engleska
Hlorovodonična kiselina (HCl)	Zorka, Srbija
Fosfatni pufer (PBS)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Triton X-100 (t-oksildenokspolietoksietanol)	<i>Alfa Aesar</i> , A 16046, Nemačka
Natrijum ditionat	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
L-Glutaminska kiselina	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Neesencijalne aminokiseline	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Tripsin sa Etilendiantetrasirćetnom kiselinom (Tripsin-EDTA)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Paraformaldehid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Zečje antitelo na vimentin	<i>Abcam</i> , ab92547, Engleska
Zečje antitelo na SOD2	<i>Flarebio</i> , P04179, Sjedinjene Američke Države
Sekundarno antitelo Alexa Fluor® 555	<i>Abcam</i> , ab150078, United Kingdom

Tabela 3.1.1. Spisak korišćenih hemikalija, reagenasa i rastvora

Hemikalije/Reagensi/ Rastvori	Proizvođač, zemlja porekla
Sekundarno antitelo Alexa Fluor[®] 488	Abcam, ab 150077, United Kingdom
Fetalni goveđi serum (FCS)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
L(-)-Malatna kiselina	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države
Kalijum hidroksid (KOH)	<i>Sigma-Aldrich</i>, Sjedinjene Američke Države
Karbonilcijanid-p-trifluorometoksi-fenilhidrazon (FCCP)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Sjedinjene Američke Države

3.1.2. Priprema L-karnozin supstance

U cilju utvrđivanja antitumorskog potencijala L-karnozina u okviru ove doktorske disertacije ispitivani su efekti različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin kao i različitih koncentracija karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L-karnozin. Čista supstanca L-karnozin proizvod je kompanije *Sigma-Aldrich* (Sjedinjene Američke Države). Karnozin EXTRA[®] kapsula je komercijalno dostupna formulacija L-karnozina (125 mg), obogaćena vitaminom E (20 mg), koenzimom Q10 (20 mg), L-karnitinom (20 mg), ekstraktom severne borovnice (20 mg) i ekstraktima semena grožđa (20 mg) (*CarnoMed*, LLC, Novi Sad, Srbija). Kapsula Now[®] L-karnozin je takođe komercijalno dostupan dijetetski suplement L-karnozina i proizvod je kompanije *Now Foods* (Amerika).

Priprema sterilnih rastvora čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L-karnozin vršila se neposredno pre tretmana eksperimentalnih grupa. Čista supstanca L-karnozin merena je na analitičkoj vagi (*AS 120.R2 Plus Radwag, USA*) u gramaži proporcijalnoj da bi se u odgovarajućoj zapremini fosfatnog pufera (PBS-a) postigle potrebne koncentracije. Sadržaj kapsule preparata Karnozin EXTRA[®] (500 mg) je rastvaran u 1500 µl PBS-a u tubi od 15 ml i mešan pomoću vodenog ultrazvučnog kulatora (*CliftonTM SW30H, Fisher Scientific, England*) u trajanju od

16 minuta a potom se pristupalo centrifugiranju na 3000 rpm u trajanju od 5 minuta na temperaturi 22 °C. Supernatant svetlo smeđe boje je aspiriran automatskom pipetom od 1000 µl. Kapsula Now® L-karnozin (500 mg) je rastvarana u zapremini od 22,1 ml PBS-a. Ovako pripremljeni rastvori su profiltrirani kroz bakteriološki filter dimenzija 0,22 µm kako bi se postigla sterilnost rastvora koji je bio u upotrebi za tretman ćelija.

3.1.3. Ispitivane ćelijske linije

Antitumorski potencijal L-karnozin supstance ispitivan je na četiri kontinuirane ćelijske linije različitog porekla. Dve linije su poreklom od zdravog tkiva (ćelije bubrega hrčka i humani fetalni fibroblasti pluća), a dve potiču od različitih solidnih tumora (humani adenokarcinom dojke i humani glioblastom). Sve ćelijske linije na kojima se vršilo ispitivanje su adherentnog tipa, tj. rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija („*monolayer*”). Ćelijske linije ispitivane u ovom radu su:

1. **BHK-21/C-13** – ćelijska linija poreklom iz bubrega hrčka starosti jedan dan,
2. **MRC-5** - ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća,
3. **MCF-7** - ćelijska linija estrogen receptor pozitivnog (ER+) humanog adenokarcinoma dojke i
4. **U87** - ćelijska linija humanog glioblastoma.

MCF-7 i BHK-21/C-13 ćelijske linije su donacija Zavoda za antirabičnu zaštitu - Pasterov zavod u Novom Sadu. MRC-5 ćelijska linija je nabavljena od Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, dok je U87 ćelijska linija donacija Instituta za biohemiju Univerziteta u Beogradu. Sve ćelijske linije su nabavljene iz „banke ćelija” *American Type Culture Collection*, ATCC.

3.1.4. Kultivacija i subkultivacija kontinuiranih ćelijskih linija u jednom sloju

BHK-21/C-13 i MCF-7 ćelijske linije gajene su u DMEM medijumu sa natrijum piruvatom i L-glutaminom uz dodatak 10% FBS-a, u prisustvu 1% penicilina i streptomocina. MRC-5 ćelijska linija gajena je u DMEM/Ham's F-12 medijumu sa L-glutaminom uz dodatak 10% FBS-a, u

prisustvu 1% penicilina i streptomocina. U87 ćelijska linija gajena je u MEM-A medijumu uz dodatak 1% L-glutamina, 10% FBS-a, 1% neesencijalnih aminokiselina i 1% penicilina i streptomocina.

Ćelijske linije su održavane u inkubatoru (*NUAIRE DH AUTOFLOW, CO₂ air-jacketed incubator, USA*) na 37 °C, u atmosferi sa >95% vlažnosti i 5% CO₂. Po dostizanju 60-70% konfluentnosti nakon perioda od 48 h vršilo se ispiranje ćelija PBS-om. U flask T 75 cm² (*Grainer Bio-One, Austria*) aplikovao se 0,25% Tripsin/EDTA u zapremini od 4 ml u cilju raskidanja veza između ćelija i zidova flaska kao i formiranih veza među samim ćelijama. Inkubacija primenjenog Tripsin/EDTA trajala je tokom 5 minuta na 37 °C. Zatim se pristupalo inaktivaciji Tripsin/EDTA dodatkom 5 ml medijuma.

3.1.4.1. Kultivacija ćelija u pločama sa otvorima za potrebe bojenja

Za potrebe standardnog histološkog bojenja hematoksinom i eozinom (H&E) i imunofluorescentnog bojenja, uzorci ćelijskih linija zasejavani su u ploče sa 24 bunarića, sa pokrovnicom prečnika 12 mm (*Marienfeld, Germany*), u koncentraciji od 5x10⁴ ćelija/bunariću u 0,55 ml odgovarajućeg medijuma u zavisnosti od potreba ćelijske linije. Ispitivane kontinuirane ćelijske linije su kultivisane u skladu sa prethodno opisanim uslovima.

3.1.4.2. Kultivacija ćelija u flasku T 75 cm² za potrebe merenja parametara mitohondrijske respiracije

U cilju određivanja parametara mitohondrijske respiracije, ćelije su uzgajane u flaskovima T 75 cm², u koncentraciji od 6x10⁵ ćelija u 12 ml odgovarajućeg medijuma u zavisnosti od potreba ćelijske linije. U logaritamskoj fazi rasta ćelije u flaskovima su tretirane određenim koncentracijama čiste supstance L-karnozin kao i različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin.

3.1.5. Test odbacivanja boje

Za potrebe održavanja ćelijskih linija, broj ćelija i njihova vijabilnost ispitivani su pomoću testa odbacivanja boje sa 0,4% rastvorom boje tripan plavo (eng. *DET - trypan blue Dye Exclusion Test*). Metoda se zasniva na principu da vijabilne ćelije imaju intaktnu ćelijsku membranu koja onemogućuje prodor boje u citoplazmu, dok se sa druge strane citoplazma ćelija narušenog integriteta ćelijske membrane i nevijabilnih ćelija boji plavo (276).

Suspenzija ćelija zapremine 50 µl razblažena je sa 50 µl rastvora boje 0,4% tripan plavo. Nakon inkubacije od 2 minuta na sobnoj temperaturi, 20 µl rastvora ćelija sa bojom aplikovalo se u hemocitometar (Neubauer-ova komora). Brojanje vijabilnih i nevijabilnih ćelija vršeno je na invertnom mikroskopu (*Leica, DMIL, Germany*). Broj vijabilnih ćelija u 1 ml suspenzije računat je prema sledećoj formuli:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 2$$

gde je **N** = ukupan broj živih ćelija u 1 ml suspenzije; **N₀** = broj živih ćelija izbrojan po kvadrantu komore hemocitometra; 2 = faktor razblaženja; 10⁴ = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u ml).

Uzorak ćelija korišćenih u eksperimentima je bio iz grupe pasažiranih ćelija čija je vijabilnost bila veća od 90%.

3.1.6. Eksperimentalni dizajn istraživanja

U cilju ispitivanja efekta različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin kao i različitih koncentracija karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin tretman kontinuiranih ćelijskih linija je podeljen u 10 grupa:

1. Grupa **Kontrola** – kontrolna grupa kontinuiranih ćelija tretiranih PBS-om,
2. Grupa **2 mM L-karnozin** – grupa kontinuiranih ćelija tretiranih čistom supstancom L-karnozina u koncentraciji od 2 mM,
3. Grupa **5 mM L-karnozin** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih čistom supstancom L-

- karnozina u koncentraciji od 5 mM,
4. Grupa **10 mM L-karnozin** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih čistom supstancom L-karnozina u koncentraciji od 10 mM,
 5. Grupa **2 mM Karnozin EXTRA[®]** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA[®] u koncentraciji ekvivalentnoj 2 mM koncentraciji čiste supstance L-karnozina iz kapsule,
 6. Grupa **5 mM Karnozin EXTRA[®]** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA[®] u koncentraciji ekvivalentnoj 5 mM koncentraciji čiste supstance L-karnozina iz kapsule,
 7. Grupa **10 mM Karnozin EXTRA[®]** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA[®] u koncentraciji ekvivalentnoj 10 mM koncentraciji čiste supstance L-karnozina iz kapsule,
 8. Grupa **2 mM Now[®] L-karnozin** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih 2 mM L-karnozinom iz preparata Now[®] L-karnozin,
 9. Grupa **5 mM Now[®] L-karnozin** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih 5 mM L-karnozinom iz preparata Now[®] L-karnozin,
 10. Grupa **10 mM Now[®] L-karnozin** - grupa kontinuiranih ćelija tretiranih 10 mM L-karnozinom iz preparata Now[®] L-karnozin.

Tretiranje ploča sa 24 bunarića finalnih zapremina 550 μ l, ploča sa 6 bunarića finalnih zapremina 2 ml i flaskova T 75 cm² finalnih zapremina 12,120 ml vršeno je prema šemi prikazanoj u Tabeli 3.1.6.

Tabela 3.1.6. Finalne koncentracije čiste sipstance L-karnozin, karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L- karnozin u hranljivoj podlozi za rast kultura ćelija

Koncentracije	Posude	L-karnozin i Now [®] L- karnozin (mg)	Karnozin EXTRA [®] (μ l)
	Ploča sa 24 bunarića	0,25	2,99
2 mM	Ploča sa 6 bunarića	0,91	10,87
	Flask T 75 cm ²	5,48	65,8
	Ploča sa 24 bunarića	0,62	7,47
5 mM	Ploča sa 6 bunarića	2,25	27,16
	Flask T 75 cm ²	13,71	164,5
	Ploča sa 24 bunarića	1,24	14,93
10 mM	Ploča sa 6 bunarića	4,51	54,4
	Flask T 75 cm ²	27,42	329

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje morfoloških karakteristika ispitivanih ćelijskih linija

3.2.1.1. Ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija bojenih hematoksilinom i eozinom (H&E bojenje)

U cilju ispitivanja morfoloških karakteristika ćelijskih linija uključenih u ogled, ćelije su tripsinizirane i zasejavane u ploče sa 24 bunarića (5×10^4 ćelija/bunariću) koja su sadržala sterilna

pokrovna stakla za rast ćelija. Zasejane ćelije su inkubirane na 37 °C tokom 24 h perioda kako bi se dostigla pokrivenost pokrovnih stakala od 60-80% kada je vršen tretman različitim preparatima karnozina u različitim koncentracijama kao što je navedeno ranije. Nakon 24 h inkubacije tako tretiranih ćelija pristupalo se standardnom H&E bojenju. Zalepljene ćelije na pokrovnim staklima su ispirane PBS-om, a zatim fiksirane sa 4% paraformaldehidom tokom 20 minuta. Posle fiksacije ćelije su ispirane ponovo PBS-om i potom inkubirane u hematoksilinu tokom 7 minuta. Po isteku perioda bojenja hematoksilinom vršeno je ispiranje ćelija mlakom česmenskom vodom, a zatim je sledilo bojenje eozinom. Nakon toga ćelije su ispirane više puta prvo 96% alkoholom a onda i 100% alkoholom. Lepljenje tako obojenih ćelija na predmetna stakla vršeno je pomoću DPX. Mikrografije ćelija nakon H&E bojenja uslikane su kamerom Leica MC 190 postavljenom na svetlosni mikroskop Leica DMLB 100T, pri uveličanju 400x. Morfološke karakteristike i promene su analizirane na najmanje 1000 ćelija za svaku eksperimentalnu grupu.

3.2.1.2. Ispitivanje morfoloških karakteristika nativnih ćelija

Ispitivane ćelijske linije su zasejavane u ploče sa 24 bunarića (5×10^4 ćelija/bunariću) i inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Nakon tretmana native ćelije u kulturi su uslikane kamerom Leica MC 190 postavljenom na invertni mikroskop (*Leica DMIL, Germany*) sa faznim kontrastom pri uveličanju 200x. Morfološka svojstva ćelija su analizirana na najmanje 1000 ćelija u svim grupama.

3.2.2. Test vijabiliteta ispitivanih ćelijskih linija nakon tretmana

U cilju ispitivanja uticaja čiste supstance, L-karnozina kao i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na vijabilitet, ćelije su zasejavane pri gustini od 10×10^4 ćelija po bunariću u ploče sa 96 bunarića. Nakon adheriranja ćelija za podlogu preko noći tretirane su različitim koncentracijama karnozina (2, 5 i 10 mM) i inkubirane u trajanju od 24 h. Kontrolu su činile ćelije inkubirane samo sa PBS-om. Efekat ispitivanih preparata na proliferaciju ćelija određen je primenom MTT testa sa izvesnim modifikacijama (277). MTT test se bazira na redukciji tetrazolijumske soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) koja je žute boje,

do kristala formazana (ljubičaste boje) nerastvorljivih u vodi. Navedeni proces se dešava u metabolički aktivnim ćelijama. Nakon sprovedenog tretmana, sav medijum je aspiriran automatskom pipetom i ćelije su isprane rastvorom PBS-a. U svaki bunarić je dodat MTT rastvor (0,5 mg/ml) i ploče su inkubirane na 37 °C tokom 3 h. Potom je u cilju rastvaranja formazan kristala u sve bunariće dodata kiselina-izopropanol i temeljno pomešana, jer se upravo količina rastvorenog formazana smatra direktno proporcionalna broju vijabilnih odnosno metabolički aktivnih ćelija. Spektrofotometrijsko merenje redukcije MTT-a, odnosno intenziteta ljubičaste boje, vršeno je na talasnoj dužini od 540/690 nm na čitaču Multiscan MCC340, Labsystems. Rezultati su predstavljeni kao stepen proliferacije odnosno procenat živih ćelija koje su tretirane u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije, čiji je vijabilitet arbitrarno postavljen na 100%. Pri izmerenim vrednosti vijabiliteta $\geq 90\%$ sprovedeni tretman ćelija se smatrao netoksičnim (278). Dva nezavisna eksperimenta su izvedena u kvadriplikatu za svaki ispitivani preparat.

3.2.3. Ispitivanje migratorne sposobnosti kontinuiranih tumorskih ćelijskih linija nakon tretmana – *in vitro* „scratch”esej

Eksponencijalno rastuće ćelije humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) i humanog glioblastoma (U87) zasejavane su u ploče sa 6 bunarića u koncentraciji od 2×10^5 ćelija/bunariću sa odgovarajućim medijumom za rast. Tokom naredna 24 h ćelije su formirale konfluentni monosloj. Zatim je izvršen tretman eksperimentalnih grupa i ćelije su inkubirane u vremenskom periodu od 24 h. Ispitivanje sposobnosti ćelija da migriraju vršeno je pomoću „scratch”eseja (279). Nakon uklanjanja hranljivog medijuma sterilnim, žutim nastavkom za automatsku pipetu od 200 μ l, formirana je linija u centralnom delu monosloja u svakom bunariću, jednake širine celom dužinom. Ćelije su zatim blago isprane PBS-om, čime su uklonjene odlepljene plutajuće ćelije. Potom je u bunarić aplikovan odgovarajući hranljivi medijum bez FBS-a.

Pomoću kamere, marke Leica MC 190 HD (Germany) native ćelije u kulturi su slikane neposredno nakon formiranja centralne linije (praznog prostora) i nakon 24 h. Fotografisane su reprezentativne tačke u gornjem, srednjem i donjem delu praznog prostora. U programu ImageJ

vršena je analiza fotografija korišćenjem dodatka *MRI Wound Healing Tool* pomoću kog se računala površina postojećeg praznog prostora između ćelija. Srednja vrednost rastojanja neposredno po formiranju centrale linije (0 h) smatrana je kontrolnom (100%), a srednje vrednosti rastojanja nakon 24 h inkubacije tretiranih ćelija preračunata su kao % vrednost u odnosu na kontrolno rastojanje. Sva eksperimentalna merenja ponavljana su u triplikatu.

3.2.4. Imunofluorescentno bojenje kontinuiranih ćelijskih linija

Nakon isteka perioda inkubacije od 24 h, kontrolnih i tretiranih eksperimentalnih grupa, pristupalo se bojenju zalepljenih ćelija na pokrovnica iz ploča sa 24 bunarića. Pomoću automatske pipete od 1000 μ l, aspiriran je sav medijum za rast ćelija. U sledećem koraku zalepljene ćelije za pokrovnice ispirane su tri puta PBS-om. Potom je u trajanju od 10 minuta vršeno fiksiranje zalepljenih ćelija pomoću 4% paraformaldehida (rastvoreng u PBS-u). Nakon fiksiranja vršeno je ponovno ispiranje ćelija PBS-om. Primenom 0,3% Triton X-100 u trajanju od 5 minuta vršena je permeabilizacija ćelijskih membrana. Dalji postupak pripreme ćelija za bojenje izvodio se u vlažnoj komori. Pokrovnice prebačene u vlažnu komoru tretirane su 10% normalnim kozjim serumom radi blokiranja nespecifičnog bojenja, u trajanju od 30 minuta na 25 °C.

Imunofluorescentno bojenje odvijalo se prema sledećem protokolu:

Na staklene pokrovnice sa predhodno fiksiranim ćelijama aplikovala su se primarna antitela:

1. Vimentin u razblaženju 1:500 i
2. SOD2 u razblaženju 1:50.

Primarna antitela su zatim inkubirana na temperaturi od 25 °C u periodu od 60 minuta. Sekundarna antitela Alexa Fluor® 555 i Alexa Fluor® 488, aplikovana su na staklene pokrovnice sa fiksiranim ćelijama, u vlažnoj i mračnoj komori, u vremenskom periodu od 30 minuta, pri temperaturi od 25 °C. Pokrovnice sa ćelijama su potom montirane na predmetno staklo pomoću DAPI medijuma u mračnoj prostoriji.

Obojene ćelije analizirane su na mikroskopu marke *Leica DMLB 100T, Germany* i fotografisane kamerom marke *Leica MC 190 HD, Germany* pri uveličanju od 400x. Merenje intenziteta imunofluorescencije vršeno je na deset nasumičnih vidnih polja pri uveličanju od 400x pomoću *ImageJ 1.45* softvera (SAD). Oko svih ćelija vizualizovanih na staklenim pokrovnica nacrtao je obris. Izmerena je ukupna površina obojenih ćelija i srednja vrednost intenziteta fluorescencije (integrisana gustina) zajedno sa nekoliko merenja intenziteta pozadine oko samih ćelija. Ukupan intenzitet ćelijske fluorescencije (*total corrected cellular fluorescence - TCCF*) izračunat je prema formuli:

$$\text{TCCF} = \text{integrisana gustina} - (\text{oblast izabranih ćelija} \times \text{intenzitet pozadine}) \quad (280).$$

3.2.5. Ispitivanje parametara mitohondrijske respiracije kontinuiranih ćelijskih linija

3.2.5.1. Određivanje parametara mitohondrijske respiracije "intaktnih ćelija"

Kalibracija aparata *Oxygraph plus (Hancatach Instruments, England)* vršena je pre svakog eksperimenta prema uputstvima proizvođača. Pomoću automatske pipete od 1000 µl u komoru reakcionog suda aplikovao se volumen od 2 ml MiR05 rastvora (110 mM sukroza, 60 mM K-laktobionat, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20 mM Taurin, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES i 0,1% BSA, pH 7,1 na 37 °C). U cilju postizanja ekvibracije temperature od 37 °C MiR05 rastvora, u komori reakcionog suda, isti je mešan malim magnetom u vremenskom periodu od 10 minuta.

Nakon izvršene tripsinizacije ćelija i po uzimanju određenog volumena medijuma sa 2x10⁶ vijabilnih ćelija vršeno je centrifugiranje tokom 5 minuta na 300 g. Potom su ćelije bile resuspendovane u PBS-u i izvršeno je ponovno centrifugiranje, u vremenskom periodu od 5 minuta na 300 g, u cilju ispiranja ćelija od hranljivog medijuma u kom su kultivisane. Zatim je tako dobijen pelet ćelija resuspendovan u tubici sa 0,5 ml MiR05 rastvora, predhodno temperiranog u komori reakcionog suda aparata *Oxygraph plus*, i potom dodate u komoru istog. Ovim postupkom ćelije su pripremljene za merenje mitohondrijske respiracije.

Koncentracija kiseonika u komori reakcionog suda merena je pomoću Klarkove elektrode (*Hancatach Instruments, England*), prema uputstvima proizvođača. Sam aparat povezan je sa

kompjuterskim programom *O₂ view* pomoću kog je vršeno tumačenje rezultata. Stepenn potrošnje kiseonika izražen je u nmol O₂/min/2x10⁶ ćelija.

3.2.5.2. Određivanje koncentracije digitonina potrebne za permeabilizaciju ćelijske membrane ispitivanih kontinuiranih ćelijskih linija

Koncentraciju digitonina koja je potrebna za permeabilizaciju ćelijske membrane, a da se tom prilikom ne naruši integritet membrane mitohondrija, bilo je potrebno optimizovati za svaku ispitivanu ćelijsku liniju.

Priprema ćelija za određivanje koncentracije digitonina vršila se prema protokolu za određivanje parametara mitohondrijske respiracije intaktnih ćelija. Nakon dodavanja 0,5 ml MiR05 rastvora sa 2x10⁶ vijabilnih ćelija merena je vrednost parametara mitohondrijske respiracije intaktnih ćelija. Zatim su u komoru reakcionog suda, pomoću preciznih Hamilton staklenih špriceva (Sjedinjene Američke Države), bili aplikovani supstrati prema sledećem protokolu:

1. sukcinat (10 mM),
2. ADP (5 mM),
3. rotenon - inhibitor kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija (0,1 μM).

Vremenski period u toku kog su praćeni parametri mitohondrijske respiracije, nakon dodavanja svakog pojedinačnog supstrata, kretao se u intervalu od 5 do 10 minuta u zavisnosti od postizanja stabilnog signala.

Nakon dodavanja rotenona vršena je titracija digitoninom. Početna koncentracija digitonina koja je dodata u komoru reakcionog suda iznosila je 5 μg/ml i postepeno je naknadnom titracijom povećavana do vrednosti od 50 μg/ml. Citohrom c (10 μM) korišćen je kako bi se kontrolisao stepen očuvanosti integriteta spoljašnje membrane mitohondrija. Naime, ukoliko je narušen integritet spoljašnje membrane na snimku se mogao uočiti porast parametara mitohondrijske respiracije nakon dodavanja citohroma c u komoru reakcionog suda.

3.2.5.3. Određivanje parametara mitohondrijske respiracije ćelija nakon permeabilizacije ćelijske membrane

Nakon permeabilizacije ćelijske membrane, pomoću odgovarajuće koncentracije digitonina, pristupalo se merenju parametara mitohondrijske respiracije. Koristeći Hamilton staklene špriceve, u komoru reakcionog suda aplikovana je odgovarajuća koncentracija supstrata kao i inhibitora određenih kompleksa. Aktivnost kompleksa respiratornog lanca mitohondrija merena je prema sledećem protokolu:

1. piruvat (10 mM),
2. malat (2 mM),
3. ADP (2,5 mM),
4. glutamat (10 mM),
5. rotenon (0,5 μ M),
6. sukcinat (15 mM),
7. antimicin A (2,5 μ M) i
8. TMPD + askorbat (0,5 mM + 2 mM) (281).

3.2.6. Statistička obrada i analiza dobijenih rezultata

Analizirani rezultati su predstavljeni na mikrofotografijama i grafički. U sklopu deskriptivne statistike numeričke varijable su izražene koristeći srednju vrednost \pm standardna devijacija (SD). Testiranje razlika između nezavisnih varijabli vršeno je parametarskom statističkom analizom varijanse – ANOVA pri čemu je korišćen *Games Howell post hoc* test za nejednake varijanse. Sve analize su izvedene upotrebom softvera *IBM SPSS Statistics 23* (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Na nivou statističke značajnosti ($p < 0,05$, odnosno $p < 0,0001$) hipoteze su bile testirane. Za grafički prikaz rezultata korišćen je softverski paket *Graphpad Prism software* (version 7.05, San Diego, CA, USA).



4. REZULTATI

4.1. Analiza morfoloških karakteristika ćelijskih linija nakon tretmana

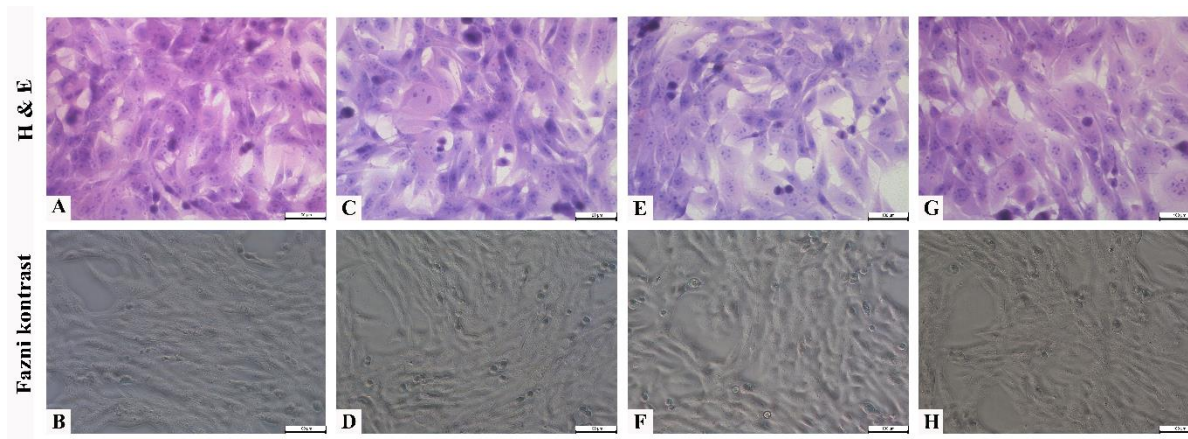
U cilju analize efekata čiste supstance L-karnozina, i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na ćelijsku morfologiju BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87 ćelijskih linija, ćelije su tretirane različitim koncentracijama karnozina (2, 5 i 10 mM) tokom 24 h. Nakon izvršenog tretmana prisustvo morfoloških promena je ispitivano na mikrofotografijama ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem kao i vizuelnom opservacijom nativnih ćelija pomoću invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom.

4.1.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)

BHK-21/C-13 ćelije poseduju karakteristike fibroblasta. Ćelije kontrolne grupe su prilično krupne i vretenastog oblika. Veliko euhromatično jedro ispunjava gotovo čitavu ćeliju, a uočeno je i prisustvo velikog broja jedaraca. Specifičan rast u mono-sloju u vidu grupacija ćelija sa paralelnom orijentacijom odlika su ove ćelijske linije. Morfološke karakteristike BHK-21/C-13 ćelija, nakon tretmana različitim preparatima karnozina predstavljene su na **Slikama 4.1.1, 4.1.2 i 4.1.3.**

4.1.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija

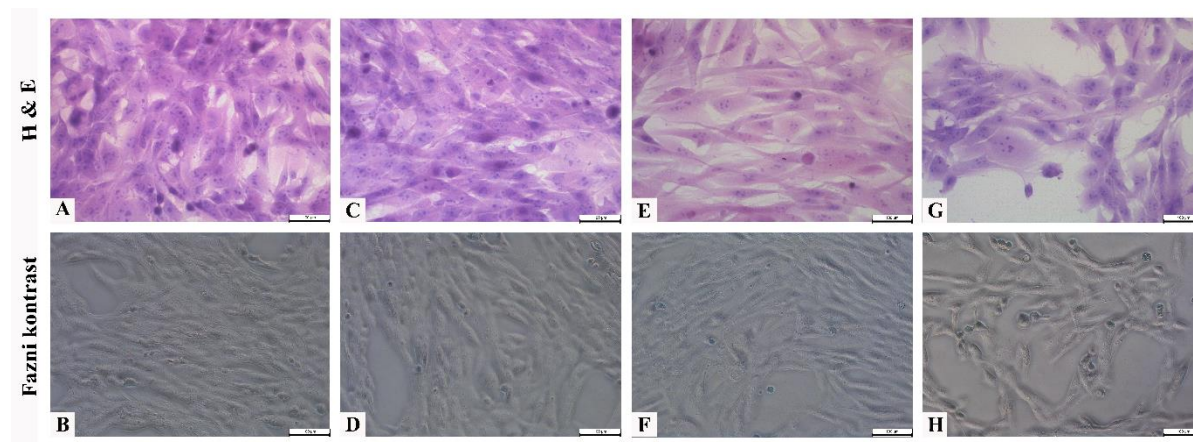
Analizom morfoloških karakteristika BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama L-karnozina zapaženo je da se ćelije eksperimentalnih grupa odlikuju istim morfološkim svojstvima koje poseduju ćelije kontrolne grupe (**Slika 4.1.1**).



Slika 4.1.1. Morfološke karakteristike BHK-21/C-13 ćelija nakon 24 h tretmana L-karnozinom. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM L-karnozin, **E) i F)** 5 mM L-karnozin, **G) i H)** 10 mM L-karnozin.

4.1.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija

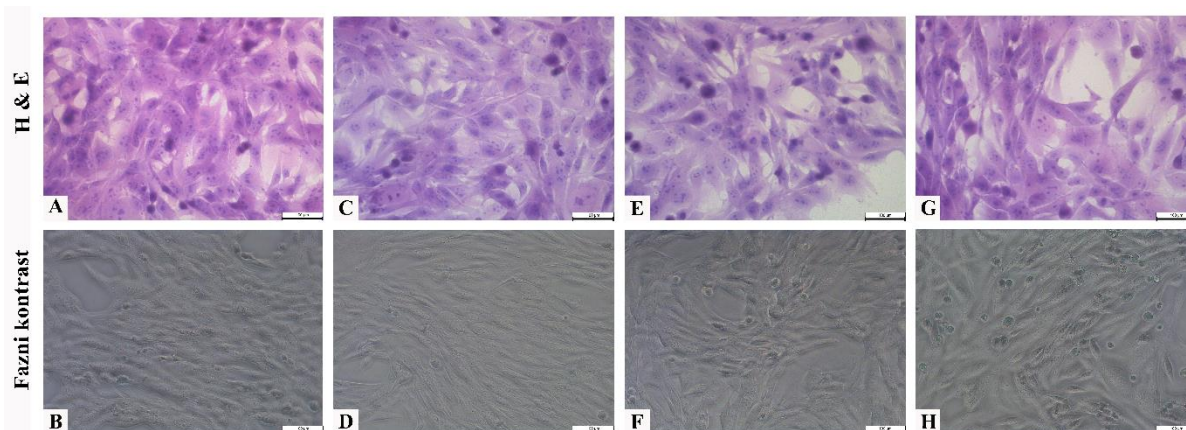
Na **Slici 4.1.2** predstavljene su kontrolna i eksperimentalne grupe ćelija BHK-21/C-13 tretirane različitim koncentracijama ispitivanog preparata. BHK-21/C-13 ćelije u grupama 2 i 5 mM Karnozin EXTRA® zadržale su karakteristična morfološka svojstva koja poseduju netretirane ćelije. Sa druge strane, primena preparata Karnozin EXTRA® u grupi 10 mM uslovlila je nastanak značajnih varijacija u ćelijskoj morfologiji. Ćelije su vizuelno manjih dimenzija i izmenjenog oblika koji više nije vretenast već poligonalni, a vidljive su i promene u građi jedra sa prisutnim znacima fragmentacije i degradacije istog. Takođe, uočava se i porast broja okruglih ćelija koje gube svoja adhezionna svojstva.



Slika 4.1.2. Morfološke karakteristike BHK-21/C-13 ćelija nakon 24 h tretmana Karnozinom EXTRA®. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Karnozin EXTRA®, **E) i F)** 5 mM Karnozin EXTRA®, **G) i H)** 10 mM Karnozin EXTRA®.

4.1.1.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju BHK-21/C-13 ćelija

Morfološke karakteristike BHK-21/C-13 ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama ispitivanog preparata predstavljene su na **Slici 4.1.3**. Vretenast oblik ćelija i prisustvo krupnog euhromatičnog jedra odlika su ćelija kontrolne ali i eksperimentalnih grupa.



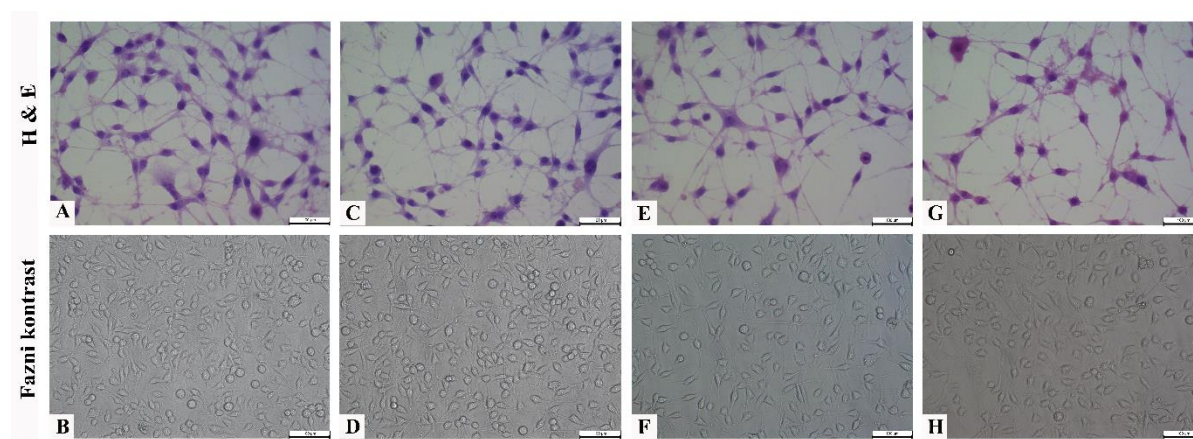
Slika 4.1.3. Morfološke karakteristike BHK-21/C-13 ćelija nakon 24 h tretmana Now® L-karnozinom. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Now® L-karnozin, **E) i F)** 5 mM Now® L-karnozin, **G) i H)** 10 mM Now® L-karnozin.

4.1.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)

MRC-5 ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta pluća se odlikuje rastom u monosloju uz izraženu kontaktnu inhibiciju. Ćelije kontrolne grupe poseduju morfološke karakteristike samih fibroblasta. Imaju vretenasto-poligonalan oblik, a unutar centralnog dela ćelije nalazi se heterohromatično jedro. Ćelije međusobno komuniciraju pomoću mnogobrojnih citoplazmatskih produžetaka koji se prižaju sa tela samih ćelija. U sprovedenoj studiji analizirali smo efekte različitih preparata karnozina na morfologiju ne-tumorskih ćelija, MRC-5 ćelijske linije, što je i predstavljeno na **Slikama 4.1.4, 4.1.5 i 4.1.6**.

4.1.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju MRC-5 ćelija

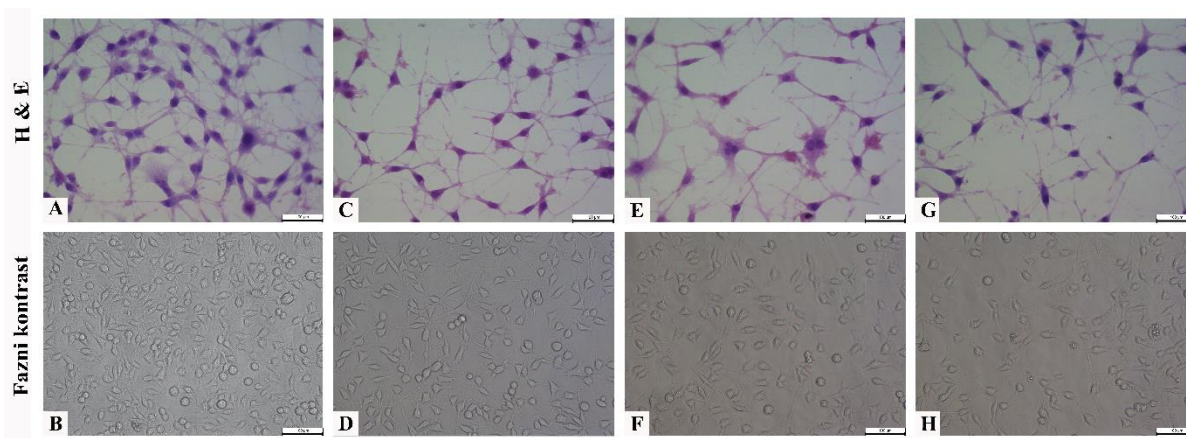
Aplikacija različitih koncentracija čiste supstance, L-karnozina, nije usloвила nastanak promena morfoloških svojstava MRC-5 ćelija (**Slika 4.1.4**). U sve tri eksperimentalne grupe uočava se prisustvo ćelija u fazi deobe. Ćelije su vretenasto-poligonalnog oblika sa centralno postavljenim heterohromatskim jedrom. Takođe, prisustvo mnogobrojnih citoplazmatskih produžetaka ukazuje na to da su ćelije eksperimentalnih grupa zadržale morfološke karakteristike netretiranih ćelija.



Slika 4.1.4. Morfološke karakteristike MRC-5 ćelija nakon 24 h tretmana L-karnozinom. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM L-karnozin, **E) i F)** 5 mM L-karnozin, **G) i H)** 10 mM L-karnozin.

4.1.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju MRC-5 ćelija

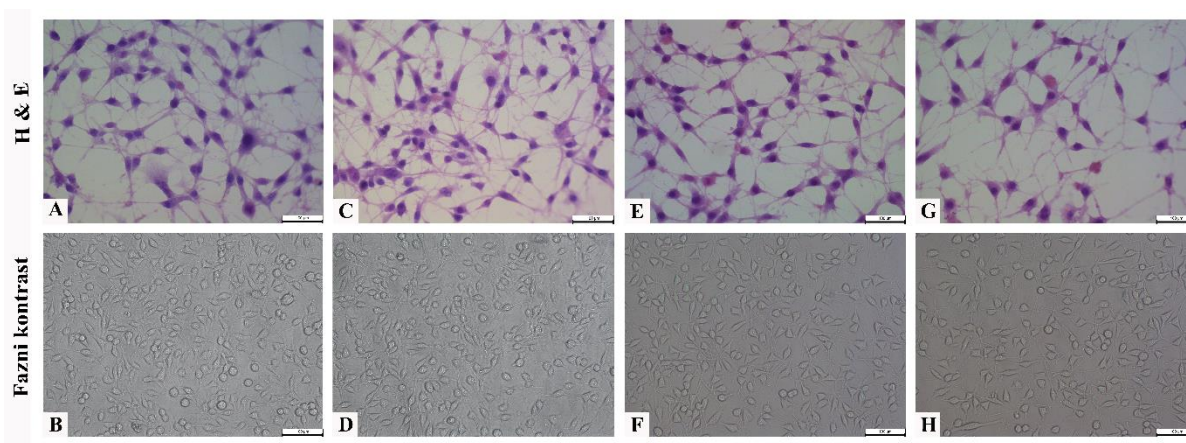
Tretman preparatom Karnozin EXTRA® uzrokovao je nastanak značajnih varijacija u morfološkim karakteristikama ćelija sve tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom (Slika 4.1.5). Početak promene morfoloških svojstava evidentiran je već u grupi 2 mM Karnozin EXTRA®. Uočava se prisustvo ćelija manjih dimenzija sa dugim i istanjenim citoplazmatskim produžecima i velikim krupnim jedrom koje potiskuje citoplazmu ka periferiji. Međutim, najizraženiji efekat preparata na promenu morfoloških svojstava MRC-5 ćelija evidentiran je u grupama 5 i 10 mM Karnozin EXTRA®. Ćelije su izdužene, istanjene i imaju vretenast izgled. Morfološki izgled ćelija ovih eksperimentalnih grupa karakteriše se i drastičnim smanjenjem broja citoplazmatskih produžetaka koji polaze sa tela samih ćelija. Oko vijabilnih ćelija zalepljenih za podlogu uočava se ćelijski debris.



Slika 4.1.5. Morfološke karakteristike MRC-5 ćelija nakon 24 h tretmana Karnozinom EXTRA®. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Karnozin EXTRA®, **E) i F)** 5 mM Karnozin EXTRA®, **G) i H)** 10 mM Karnozin EXTRA®.

4.1.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju MRC-5 ćelija

Analizirajući efekte preparata Now® L-karnozin na morfološka svojstva humanih fetalnih fibroblasta pluća nisu uočena znatnija odstupanja istih u poređenju sa izgledom ćelija kontrolne grupe (**Slika 4.1.6**). Ćelije su poligonalnog oblika sa mnogobrojnim citoplazmatskim produžecima. Heterohromatično jedro zauzima centralni deo ćelije. U sve tri eksperimentalne grupe evidentira se prisustvo ćelija u različitim fazama deobe.



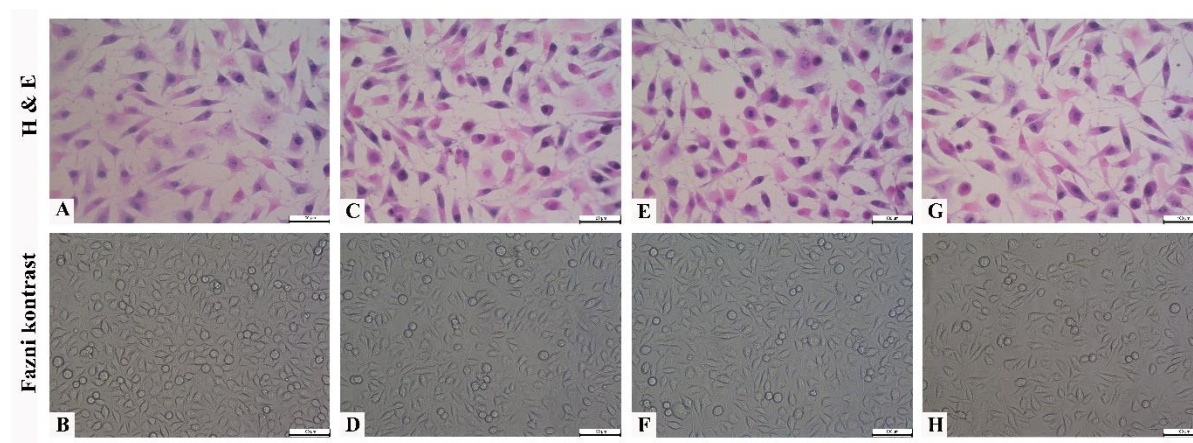
Slika 4.1.6. Morfološke karakteristike MRC-5 ćelija nakon 24 h tretmana preparatom Now® L-karnozin. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μ m), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μ m). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Now® L-karnozin, **E) i F)** 5 mM Now® L-karnozin, **G) i H)** 10 mM Now® L-karnozin.

4.1.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

Promene morfoloških karakteristika MCF-7 ćelijske linije nakon tretmana različitim preparatima karnozina predstavljene su na **Slikama 4.1.7, 4.1.8 i 4.1.9**. Na standardnom H&E bojenju i faznom kontrastu MCF-7 ćelije kontrolne grupe odlikuju se tipičnim karakteristikama epitelijalne prirode kao i rastom ćelija u monosloju. Ćelije su poligonalnog oblika sa velikim centralno postavljenim euhromatičnim jedrom unutar kog se vizualizuje jedno do dva jedarca.

4.1.3.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju MCF-7 ćelija

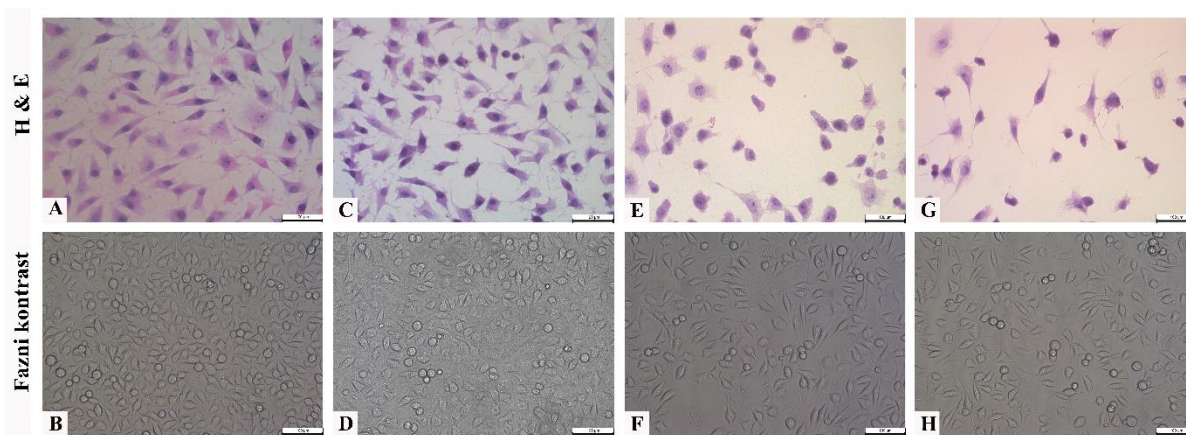
Nakon 24 h tretmana MCF-7 ćelijske linije čistom supstancom, L-karnozinom, identifikovana je serija promena morfoloških svojstava u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 4.1.7). Naime, u sve tri eksperimentalne grupe zapaža se prisustvo pojedinačnih džinovskih ćelija sa povećanjem broja istih usled porasta koncentracije ispitivane supstance. Karakteristična svojstva tretiranih ćelija se pripisuju apoptozi i predstavljena su u vidu vakuolizacije citoplazme kao i narušavanja integriteta ćelijske membrane, a prisutna je i posledična dezintegracija samih ćelija. Najizraženiji efekti L-karnozina na promenu morfoloških osobina MCF7 ćelija uočavaju se u grupi 10 mM L-karnozin.



Slika 4.1.7. Morfološke karakteristike MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana L-karnozinom. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM L-karnozin, **E) i F)** 5 mM L-karnozin, **G) i H)** 10 mM L-karnozin.

4.1.3.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju MCF-7 ćelija

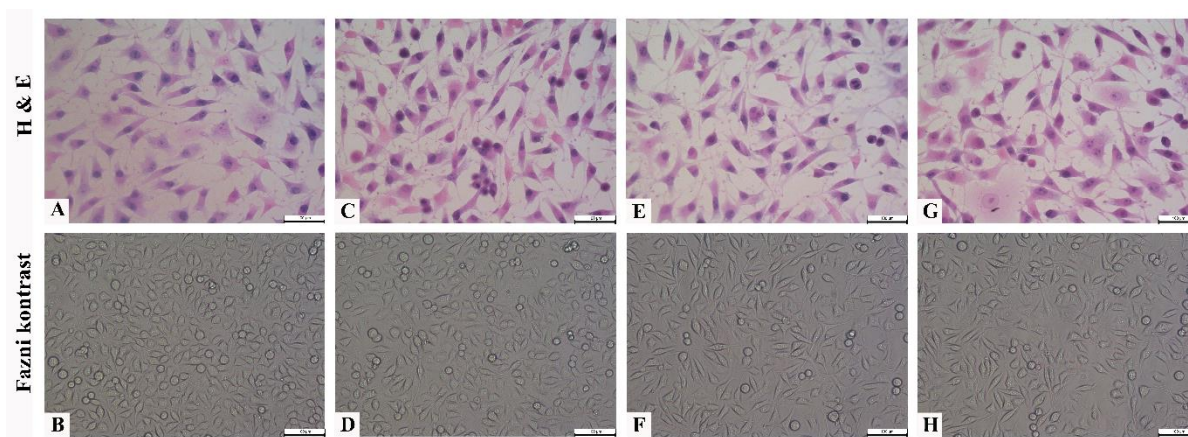
Kao što je predstvaljeno na **Slici 4.1.8**, Karnozin EXTRA® dovodi do drastičnih promena morfoloških karakteristika koje su dozno zavisne. U grupi 2 mM Karnozin EXTRA® beleži se prisustvo pojedinačnih okruglih ćelija, manjih dimenzija od netretiranih ćelija. Kondenzacija citoplazme, narušen integritet ćelijske membrane, smanjena ćelijska adhezivnost za zidove flaska kao i porast broja plutajućih ćelija u medijumu uočavaju se u grupama 5 i 10 mM Karnozin EXTRA®. U grupi 10 mM Karnozin EXTRA® dominira i prisustvo okruglih ćelija znatno manjih dimenzija sa vidljivom kondenzacijom i fragmentacijom nukleusa.



Slika 4.1.8. Morfološke karakteristike MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana Karnozinom EXTRA®. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Karnozin EXTRA®, **E) i F)** 5 mM Karnozin EXTRA®, **G) i H)** 10 mM Karnozin EXTRA®.

4.1.3.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju MCF-7 ćelija

MCF-7 ćelije tretirane preparatom Now® L-karnozin su morfološki izmenjene u poređenju sa kontrolnom grupom (**Slika 4.1.9**). Grupisane okrugle ćelije manjih dimenzija sa velikim okruglim jedrom uočavaju se u svim eksperimentalnim grupama. Međutim, u grupama 5 i 10 mM Now® L-karnozin zapažaju se i pojedinačne džinovske ćelije nepravilnog ili poligonalnog oblika sa centralno postavljenim jedrom. Prisustvo ćelijskog debrisa („ćelijske prašine“) u eksperimentalnim grupama se intenzivira sa porastom koncentracije ispitivanog preparata.



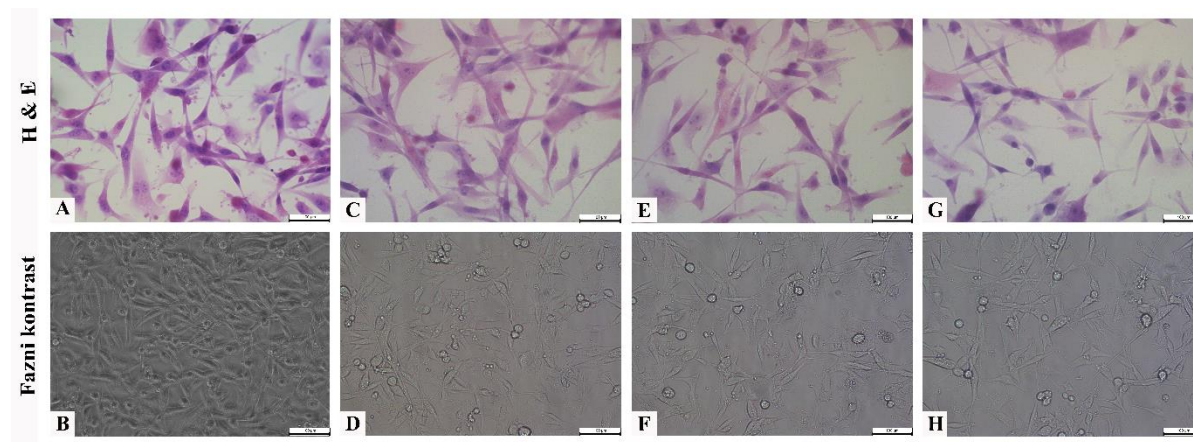
Slika 4.1.9. Morfološke karakteristike MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana preparatom Now® L-karnozin. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Now® L-karnozin, **E) i F)** 5 mM Now® L-karnozin, **G) i H)** 10 mM Now® L-karnozin.

4.1.4. Čelije humanog glioblastoma (U87)

Kao što je predstavljeno na **Slikama 4.1.10, 4.1.11 i 4.1.12**, tretman ćelija humanog glioblastoma različitim supstancama karnozina uzrokovao je drastične morfološke promene koje su dozno-zavisne. Netretirane ćelije pokazuju karakteristična morfološka svojstva ove ćelijske linije. Naime U87 ćelije humanog glioblastoma karakterišu se epitelijalnom morfologijom. Rast u monosloju, prisutvo krupnih heterohromatskih jedara sa 2 do 5 centralno postavljenih jedaraca kao i bočni razgranati produžetci odlike su ove ćelijske linije.

4.1.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na morfologiju U87 ćelija

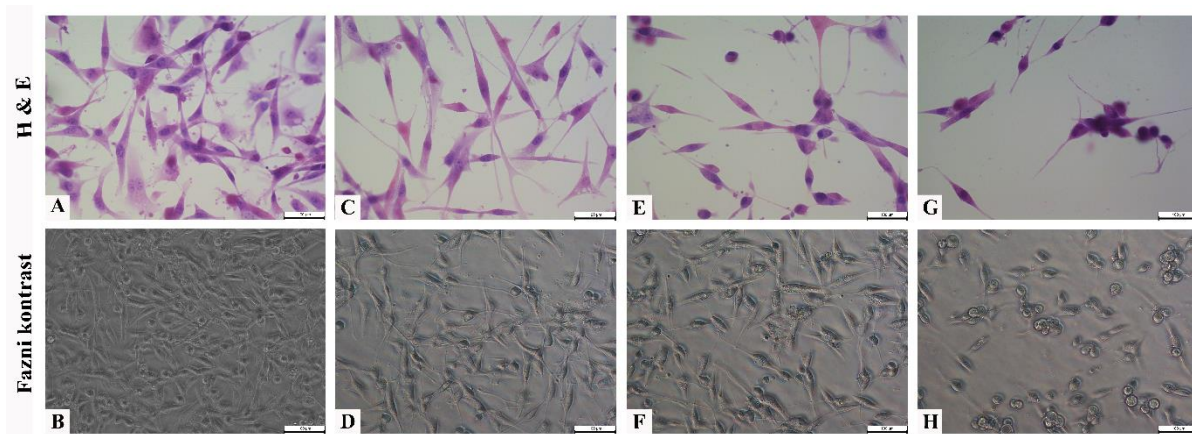
Primena čiste supstance karnozina, L-karnozin, uslovlila je značajne promene morfoloških svojstava ćelija humanog glioblastoma koje su dozno-zavisne (**Slika 4.1.10**). Veće dimenzije, nepravilan oblik kao i prisutvo dugih produžetaka odlika su ćelija grupe 2 mM L-karnozin. U grupama 5 mM i 10 mM L-karnozin ćelije se karakterišu prisustvom mnogobrojnih prozirnih vakuola u citoplazmi koje uzrokuju deformaciju ćelijske membrane. Pojava ćelija sfernog oblika sa tamnije obojenim piknotičnim jedrom prisutna je u grupi 10 mM L-karnozin.



Slika 4.1.10. Morfološke karakteristike U87 ćelija nakon 24 h tretmana L-karnozinom. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM L-karnozin, **E) i F)** 5 mM L-karnozin, **G) i H)** 10 mM L-karnozin.

4.1.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na morfologiju U87 ćelija

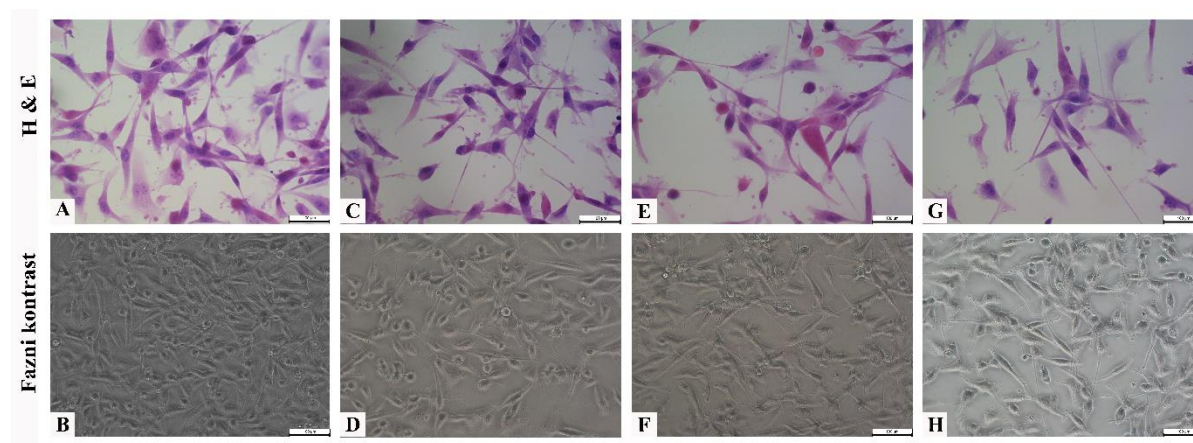
Tretman preparatom Karnozin EXTRA® doveo je do različitosti u ćelijskoj morfologiji U87 ćelija u sve tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom (**Slika 4.1.11**). Naime, u grupi 2 mM Karnozin EXTRA® prisutna je izražena promena u obliku ćelija. Ćelije su izdužene i istanjene, a evidentno je i odustvo bočnih produžetaka. Deformacija ćelijske membrane je izražena usled prisustva mnogobrojnih vakuola u samoj citoplazmi. Ćelije u grupi 5 mM Karnozin EXTRA® karakterišu se izraženom promenom oblika ali i veličine u poređenju sa kontrolnom. Ćelije su znatno manjih dimenzija, više nisu toliko izdužene kao u grupi 2 mM Karnozin EXTRA®, a uočava se i prisustvo ćelija sfernog oblika. Porast broja plutajućih ćelija u medijumu za rast ukazuje na gubitak adherentne moći ćelija. Morfološke promene U87 ćelija u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® ukazuju na znake ćelijske smrti, uključujući zaokruživanje ćelija, formiranje apoptotskih telašaca sa kondenzovanim hromatinom kao i gubitak adherentne moći ćelija za zidove flaska. Evidentno je da porast koncentracije karnozina dovodi do smanjenja vitalnosti ćelija i povećanja broja plutajućih U87 ćelija u medijumu sa najizraženijim efektom u grupi 10 mM Karnozin EXTRA®.



Slika 4.1.11. Morfološke karakteristike U87 ćelija nakon 24 h tretmana Karnozinom EXTRA®. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μ m), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μ m). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Karnozin EXTRA®, **E) i F)** 5 mM Karnozin EXTRA®, **G) i H)** 10 mM Karnozin EXTRA®.

4.1.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na morfologiju U87 ćelija

Nakon sprovedenog tretmana preparatom Now® L-karnozin na ćelijskoj liniji humanog glioblastoma došlo je do gubitka tipične ćelijske morfologije eksperimentalnih grupa u poređenju sa kontrolnom (**Slika 4.1.12**). U sve tri eksperimentalne grupe beleži se prisutvo mnogobrojnih vakula u citoplazmi. Naime u poređenju sa kontrolnom grupom, ćelije tretirane preparatom Now® L-karnozin su izgubile tipičan oblik. Manji i kraći bočni produžetci kao i gubitak vretenastog oblika uočava se u grupama 2 i 5 mM Now® L-karnozin. Karakteristika ćelija humanog glioblastoma u grupi 10 mM Now® L-karnozin jeste gotovo potpuno odustvo produžetaka, takođe stiče se i utisak voluminoznosti samih ćelija a uočava se i deformacija ćelijske membrane.



Slika 4.1.12. Morfološke karakteristike U87 ćelija nakon 24 h tretmana preparatom Now® L-karnozin. Preparati ćelija obojenih standardnim H&E bojenjem su fotografisani na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 50 μm), dok su mikrofotografije živih nativnih ćelija u kulturi fotografisane na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (200x uveličanje, skala 100 μm). **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Now® L-karnozin, **E) i F)** 5 Now® L-karnozin, **G) i H)** 10 mM Now® L-karnozin.

4.2. Antiproliferativna aktivnost različitih preparata karnozina na ispitivanim ćelijskim linijama

Rezultati MTT testa nakon 24 h tretmana BHK-21/C-13, MRC-5, MCF-7 i U87 ćelijskih linija različitim koncentracijama karnozina (2, 5 i 10 mM) čiste supstance kao i ispitivanih preparata Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L-karnozin prikazani su grafički. Svi rezultati predstavljeni su kao procenat vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu.

4.2.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)

4.2.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

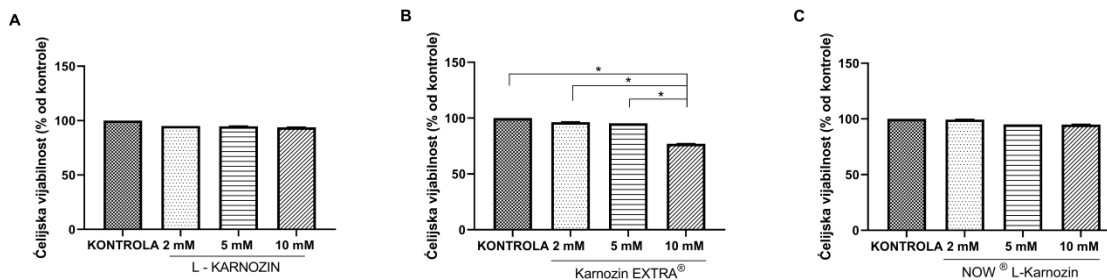
Efekti čiste supstance L-karnozina na vijabilnost BHK-21/C-13 ćelija nakon 24 h tretmana predstavljeni su na **Grafikonu 4.2.1A**. Uočava se izuzetno visok stepen vijabilnosti u svim eksperimentalnim grupama >90% u poređenju sa kontrolnom, te se primena čiste supstance smatra netoksičnom na ovoj ćelijskoj liniji.

4.2.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA[®] na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

Nakon sprovedenog 24 h tretmana BHK-21/C-13 ćelija različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®] sprovedena je analiza vijabilnosti ove ćelijske linije (**Grafikon 4.2.1B**). U grupi 2 mM Karnozin EXTRA[®] i grupi 5 mM Karnozin EXTRA[®] primenjeni tretman nije ispoljio citotoksični efekat. Sa druge strane u poređenju sa kontrolnom grupom kao i preostalim eksperimentalnim grupama vrednost vijabilnosti nakon tretmana u grupi 10 mM Karnozin EXTRA[®] statistički se značajno razlikuje ($F=3247,67$; $p<0,05$). Naime, u ovoj eksperimentalnoj grupi došlo je do značajnijeg pada vijabiliteta.

4.2.1.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

Analizirajući rezultate MTT testa sprovedenog nakon 24 h tretmana BHK-21/C-13 ćelija različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin evidentiran je visok stepen vijabiliteta >90% što je i predstavljeno na **Grafikonu 4.2.1C**. Sprovedeni tretman preparatom Now[®] L-karnozinom se smatra netoksičnim za BHK-21/C-13 kontinuiranu ćelijsku liniju pošto je vijabilitet ćelija u svim eksperimentalnim grupama iznosio >90%.



Grafikon 4.2.1. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na vijabilnost ćelija bubrega hrčka. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p < 0,05$

4.2.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

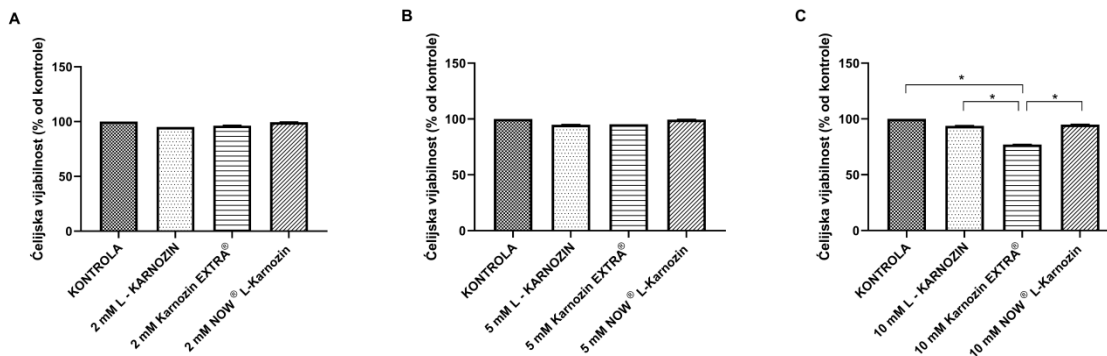
BHK-21/C-13 ćelije tretirane različitim preparatima karnozina u koncentraciji od 2 mM pokazale su izuzetno visok stepen vijabiliteta u odnosu na kontrolnu grupu u sve tri eksperimentalne grupe (**Grafikon 4.2.2A**). Naime vrednost vijabilnih ćelija 2 mM Now® L-karnozin je bila gotovo ista kao u kontrolnoj.

4.2.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

Sprovedeni tretman u koncentraciji od 5 mM karnozina ispitivanih preparata nije ispoljio citotoksičan efekat na ćelijama bubrega hrčka što je i predstavljeno na **Grafikonu 4.2.2B**.

4.2.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet BHK-21/C-13 ćelija

Na **Grafikonu 4.2.2C** predstavljen je efekat ispitivanih preparata u koncentraciji od 10 mM karnozina na vijabilitet kontinuirane ćelijske linije BHK-21/C-13. U grupama 10 mM Now® L-karnozin i 10 mM L-karnozin sprovedeni tretman nije uzrokovao nastanak citotoksičnog efekta. Sa druge strane, statistički značajno smanjenje vijabilnih ćelija evidentirano je u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na kontrolnu i eksperimentalne grupe ($F=3247,67$; $p < 0,05$).



Grafikon 4.2.2. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na vijabilnost ćelija bubrega hrčka nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A**) 2 mM, **B**) 5 mM i **C**) 10 mM karnozina. Ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije.

* $p < 0,05$

4.2.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)

4.2.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet MRC-5 ćelija

Vijabilnost ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća kontinuirane ćelijske linije MRC-5 nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance, L-karnozina prikazana je na **Grafikonu 4.2.3A**. U evim eksperimentalnim grupama izmerena vrednost vijabilnih ćelija je $\geq 90\%$ te se primena čiste supstance L-karnozina može smatrati netoksičnom na MRC-5 ćelijama.

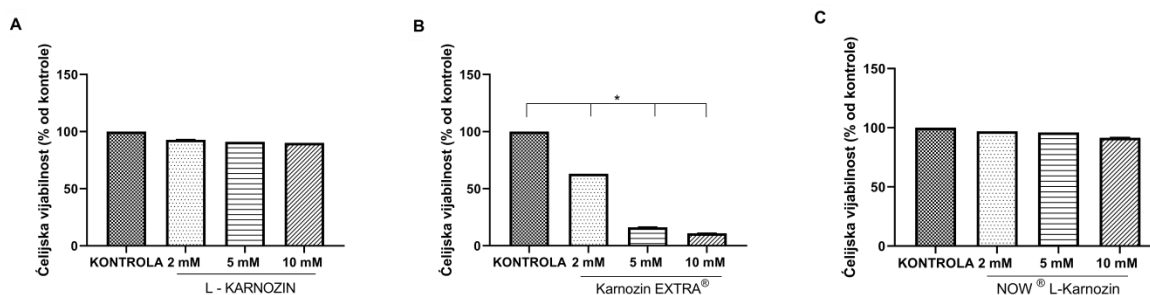
4.2.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na vijabilitet MRC-5 ćelija

Inkubacijom ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća tokom 24 h perioda nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® evidentirano je dozno-zavisno smanjenje vijabiliteta u poređenju sa kontrolnom grupom ($F=32269052$; $p < 0,05$) (**Grafikon 4.2.3B**). Statistički značajna razlika u procentualnoj vrednosti vijabilnih ćelija takođe je uočena i poređenjem svih eksperimentalnih grupa međusobno ($F=32269052$; $p < 0,05$). U grupi 2

mM Karnozin EXTRA[®] ta vrednost je iznosila 63,11±0,008%, dok je drastično smanjenje broja kao i izraženiji citotoksični efekat primećen u grupama 5 mM Karnozin EXTRA[®] i 10 mM Karnozin EXTRA[®].

4.2.2.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na vijabilitet MRC-5 ćelija

Na **Grafikonu 4.2.3C** predstavljen je uticaj različitih koncentracija preparata Now[®] L-karnozin na vijabilnost MRC-5 kontinuirane ćelijske linije. Naime, vijabilnost ćelija unutar svih eksperimentalnih grupa je iznosila >90%. U grupama 2 mM Now[®] L-karnozin i 5 mM Now[®] L-karnozin procentualna vrednost vijabilnih ćelija je bila veoma slična. Statistički značajno smanjenje vijabiliteta je zabeleženo u grupi 10 mM Now[®] L-karnozin u odnosu na kontrolnu i preostale eksperimentalne grupe (F=32269052; p<0,05). Međutim, kako je izmerena procentualna vrednost vijabilnih ćelija i ove grupe >90%, tretman koncentracijom od 10 mM Now[®] L-karnozina može se takođe smatrati netoksičnim prema ćelijama humanih fetalnih fibroblasta pluća.



Grafikon 4.2.3. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA[®] i **C)** preparata Now[®] L-karnozin na vijabilnost ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * p<0,05

4.2.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija

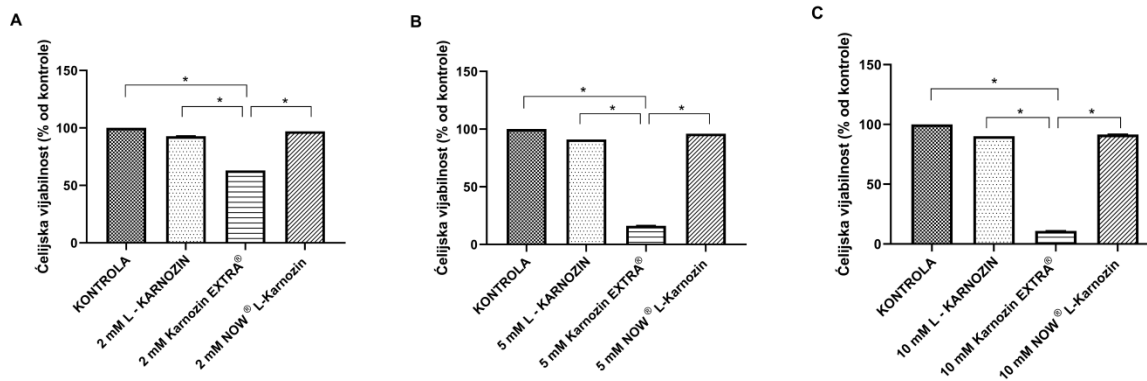
Vijabilnost kontinuirane ćelijske linije MRC-5 ćelija inkubiranih koncentracijom od 2 mM karnozina ispitivanih preparata u odnosu na kontrolnu grupu prikazana je na **Grafikonu 4.2.4A**. U grupi 2 mM Karnozin EXTRA[®] utvrđeno je statistički značajno smanjenje proliferacije tretiranih ćelija u poređenju sa kontrolnom ali i ostalim eksperimentalnim grupama ($F=32269052$; $p<0,05$). Procentualna vrednost vijabilnih ćelija u grupama 2 mM L-karnozin i 2 mM Now[®] L-karnozin bila je $>90\%$ te se primena ovih preparata smatrala netoksičnom za ćelije humanih fetalnih fibroblasta pluća.

4.2.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija

Na **Grafikon 4.2.4B** prikazani su rezultati MTT testa u kulturi MRC-5 ćelija inkubiranih tokom 24 h perioda koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata u odnosu na kontrolnu grupu. Citotoksični efekat u grupama 5 mM L-karnozin i 5 mM Now[®] L-karnozin nije evidentiran, pošto je vijabilnost ćelija u ovim eksperimentalnim iznosila $\geq 90\%$. Nasuprot navedenog, efekat karnozina u grupi 5 mM Karnozin EXTRA[®] na proliferaciju MRC-5 ćelija pokazao je drastičano smanjenje broja vijabilnih ćelija koje je statistički značajano kako u odnosu na vrednosti kontrolne tako i u odnosu na izmerene vrednosti preostale dve eksperimentalne grupe ($F=32269052$; $p<0,05$).

4.2.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MRC-5 ćelija

Rezultati sprovedenog MTT testa u svrhu merenja vijabiliteta MRC-5 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata predstavljeni su na **Grafikonu 4.2.4C**. U grupi 10 mM Karnozin EXTRA[®] nakon 24 h tretmana evidentirano je statistički značajno izrazito smanjenje broja vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolnu i eksperimentalne grupe ($F=32269052$; $p<0,05$). Nasuprot navedenog, tretman MRC-5 ćelijske linije čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Now[®] L-karnozin u ovoj koncentraciji nije rezultovao nastankom citotoksičnog efekta.



Grafikon 4.2.4. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na vijabilnost ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p < 0,05$

4.2.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

4.2.3.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet MCF-7 ćelija

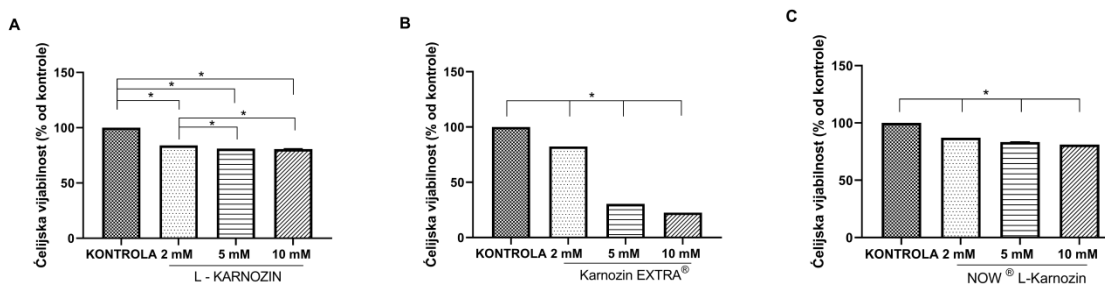
Na osnovu rezultata prikazanih na **Grafikonu 4.2.5A** vidi se da 24 h tretman različitim koncentracijama L-karnozina ispoljava antiproliferativnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma dojke. Statistički značajno smanjenje vrednosti vijabilnih ćelija je evidentirano u svim eksperimentalnim grupama nakon poređenja sa kontrolnom ($F=4627146,1$; $p < 0,05$). Takođe, značajna razlika postoji u vrednostima vijabilnih ćelija grupe 2 mM L-karnozin u odnosu na grupe 5 mM L-karnozin i 10 mM L-karnozin. Usled 24 h tretmana ćelija adenokarcinoma dojke sa koncentracijom od 5 mM i 10 mM L-karnozina nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u vijabilitetu između ove dve grupe ($p > 0,05$).

4.2.3.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA[®] na vijabilitet MCF-7 ćelija

Ćelijska linija adenokarcinoma dojke se pokazala kao izuzetno osetljivom na sprovedeni tretman preparatom Karnozin EXTRA[®] (**Grafikonu 4.2.5B**). Nakon inkubacionog perioda od 24 h, poređenjem vrednosti eksperimentalnih sa kontrolnom grupom, uočen je statistički značajan pad vijabiliteta ćelija koji je dozno-zavistan ($F=4627146,1$; $p<0,05$). Smanjenje broja vijabilnih adherentnih ćelija uočeno je već pri koncentraciji od 2 mM Karnozin EXTRA[®]. Međutim, treba naglasiti da je najizraženiji citotoksični efekat evidentiran u grupama 5 i 10 mM Karnozin EXTRA[®]. Vrednost vijabilnih ćelija u ovim grupama bila je izuzetno niska.

4.2.3.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na vijabilitet MCF-7 ćelija

Tretman ćelija adenokarcinoma dojke različitim koncentracijama preparata Now[®] L-karnozin rezultovao je statistički značajnim smanjenjem vijabiliteta u odnosu na kontrolnu grupu ($F=4627146,1$; $p<0,05$; $p<0,05$) (**Grafikon 4.2.5C**). Takođe, statistički značajna razlika u vijabilitetu uočena je i poređenjem vrednosti između eksperimentalnih grupa ($F=4627146,1$; $p<0,05$).



Grafikon 4.2.5. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA[®] i **C)** preparata Now[®] L-karnozin na vijabilnost ćelija adenokarcinoma dojke. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p<0,05$

4.2.3.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija

U poređenju sa netretiranim ćelijama tretman L-karnozinom kao i preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentraciji od 2 mM karnozina uzrokovao je statistički značajan pad vijabiliteta MCF-7 ćelija ($F=4627146,1$; $p<0,05$) (**Grafikon 4.2.6A**). Takođe, statistički značajna razlika antiproliferativnog efekta evidentirana je i pri poređenju vrednosti među eksperimentalnim grupama ($F=4627146,1$; $p<0,05$). Najizraženije smanjenje vijabiliteta evidentirano je u grupi 2 mM Karnozin EXTRA®.

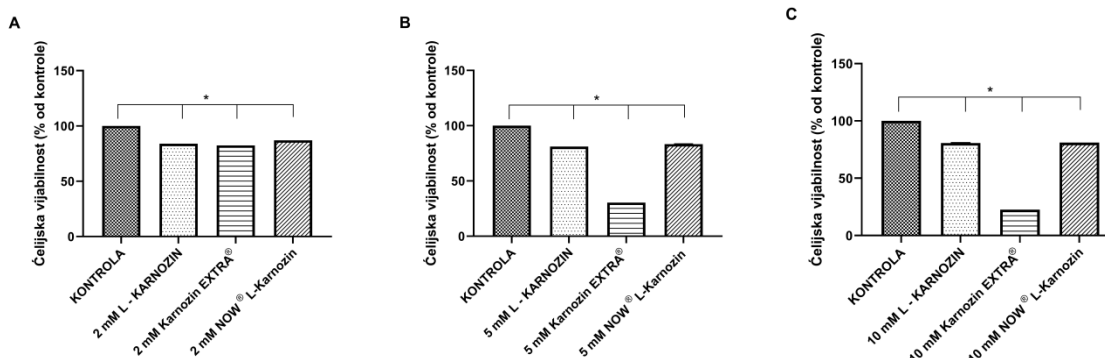
4.2.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija

Nakon 24 h tretmana ćelija adenokarcinoma dojke čistom supstancom, L-karnozin kao i preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentraciji od 5 mM karnozina pomoću MTT testa meren je uticaj na vijabilitet ćelija (**Grafikonu 4.2.6B**). Statistički značajna razlika je zabeležena poređenjem vrednosti vijabilnih ćelija eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu ($F=4627146,1$; $p<0,05$). Takođe, % vrednosti vijabilnih ćelija statistički se značajno razlikuju i među eksperimentalnim grupama ispitivanih preparata ($F=4627146,1$; $p<0,05$). Najizraženiji citotoksični efekat je postignut nakon tretmana preparatom Karnozin EXTRA®, dok su % vrednosti vijabilnih ćelija adenokarcinoma dojke u grupi L-karnozin kao i grupi Now® L-karnozin bile znatno više.

4.2.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet MCF-7 ćelija

Na **Grafikonu 4.2.6C** predstavljen je efekat ispitivanih preparata u koncentraciji od 10 mM karnozina tokom 24 h tretmana na vijabilnost ćelija adenokarcinoma dojke. Postojanje statistički značajne razlike utvrđeno je poređenjem vrednosti između kontrolne i svih eksperimentalnih grupa, kao i međusobnim poređenjem vrednosti nakon sprovedenog tretmana ($F=4627146,1$;

$p < 0,05$). Tretman preparatom Karnozin EXTRA[®] uzrokovao je nastanak drastičnog pada vijabilnosti MCF-7 ćelija u odnosu na ostale grupe.



Grafikon 4.2.6. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L-karnozin na vijabilnost ćelija adenokarcinoma dojke nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p < 0,05$

4.2.4. Ćelije humanog glioblastoma (U87)

4.2.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na vijabilitet U87 ćelija

U cilju utvrđivanja potencijalnog citotoksičnog dejstva čiste supstance, L-karnozina na ćelije humanog glioblastoma, vijabilitet U87 ćelija je procenjivan nakon 24 h tretmana pomoću MTT testa. Utvrđeno je da L-karnozin u koncentraciji od 2mM i većim dovodi do statistički značajnog dozno-zavisnog pada vijabiliteta u poređenju sa kontrolnom grupom ($F=706365,96$; $p < 0,05$) (**Grafikonu 4.2.7A**). Takođe, postojanje statistički značajne razlike uočeno je i poređenjem vrednosti između sve tri eksperimentalne grupe ($F=706365,96$; $p < 0,05$).

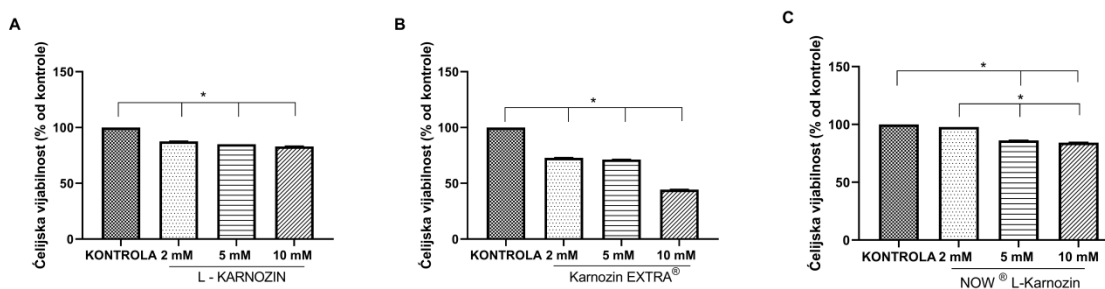
4.2.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA[®] na vijabilitet U87 ćelija

Nakon analize dobijenih rezultata sprovedenog MTT testa na ćelijskoj liniji humanog glioblastoma usled tretmana različitim koncentracijama preparata Karnozin EXTRA[®] u toku 24 h

evidentirano je postojanje statistički značajnog pada vijabiliteta ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom ($F=706365,96$; $p<0,05$) (**Grafikonu 4.2.7B**). Poredivši procentualne vrednosti vijabilnih ćelija između eksperimentalnih grupa, takođe je uočeno statistički značajno smanjenje ($F=706365,96$; $p<0,05$). Naime, vrednosti vijabiliteta u grupama 2 mM Karnozin EXTRA® i 5 mM Karnozin EXTRA® su pokazale postojanje citotoksičnog efekata. Međutim, treba naglasiti da je pri koncentraciji od 10 mM vijabilitet ovih ćelija bio drastično nizak u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama.

4.2.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na vijabilitet U87 ćelija

Na **Grafikonu 4.2.7C** predstavljeni su rezultati MTT testa sprovedenog nakon 24 h tretmana ćelija humanog glioblastoma različitim koncentracijama preparata Now® L-karnozin. U grupi 2 mM Now® L-karnozin evidentirana je visoka % vrednost vijabilnih ćelija, te se može smatrati da ova koncentracija ne ispoljava citotoksični efekat na ispitivanim ćelijama. Sa druge strane, poredivši vrednosti vijabiliteta ćelija u grupama 5 mM i 10 mM Now® L-karnozin statistički značajna razlika postoji pri međusobnom poređenju ali i u odnosu na kontrolnu grupu ($F=706365,96$; $p<0,05$). Takođe, značajna razlika u vijabilitetu ćelija je evidentirana i komparacijom vrednosti grupe 2 mM sa grupama 5 i 10 mM Now® L-karnozin.



Grafikon 4.2.7. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na vijabilnost ćelija humanog glioblastoma. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina u toku 24 h, a ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p<0,05$

4.2.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija

Nakon 24 h tretmana U87 ćelija čistom supstancom L-karnozinom, kao i ispitivanim preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentraciji od 2mM karnozina, procentualna vrednost vijabilnih ćelija je određena pomoću MTT testa (**Grafikon 4.2.8A**). U grupama 2 mM L-karnozin i 2 mM Karnozin EXTRA® uočava se antiproliferativni efekat i postojanje statistički značajne razlike u procentu vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu ($F=706365,96$; $p<0,05$). Sa druge strane, tretman preparatom Now® L-karnozin pri ovoj koncentraciji se smatra netoksičnim. Poređenjem procentualnih vrednosti vijabilnih ćelija među eksperimentalnim grupama uočeno je postojanje statistički značajne razlike. Najizraženiji efekat na smanjenje vijabiliteta ćelija humanog glioblastoma prisutan je u grupi 2 mM Karnozin EXTRA®.

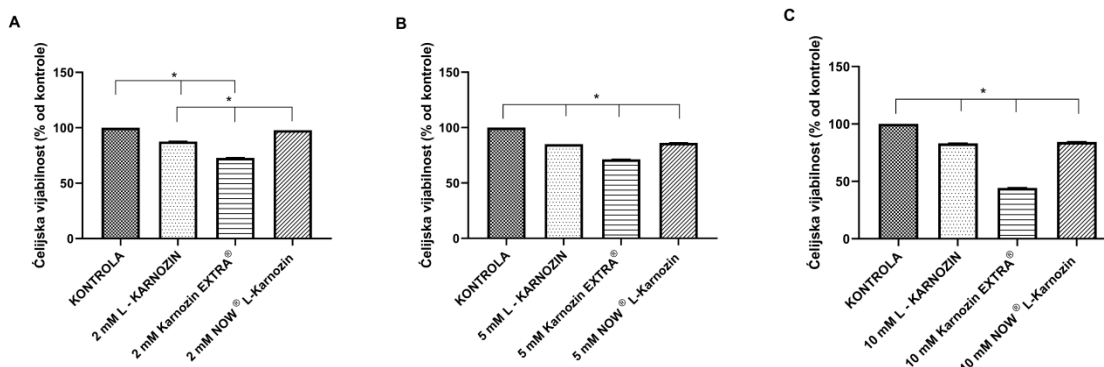
4.2.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija

Uticaj čiste supstance L-karnozina kao i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentraciji od 5 mM karnozina tokom 24 h perioda na vijabilnost ćelija humanog glioblastoma predstavljen je na **Grafikonu 4.2.8B**. Analizom procentualnih vrednosti vijabilnih ćelija u kontrolnoj grupi pri poređenju sa eksperimentalnim grupama, kao i međusobnim poređenjem eksperimentalnih grupa utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike ($F=706365,96$; $p<0,05$). Najniža vrednost vijabiliteta evidentirana je u grupi 5 mM Karnozin EXTRA®.

4.2.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na vijabilitet U87 ćelija

Primenom MTT testa u cilju ispitivanja citotoksičnog dejstva L-karnozina i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentraciji od 10 mM karnozina uočava se promena procentualnih vrednosti vijabilnih ćelija u sve tri eksperimentalne grupe u poređenju sa kontrolnom ($p<0,05$) (**Grafikon 4.2.8C**). Poredivši vrednosti procenata vijabilnih ćelija grupe 10 mM L-karnozin i 10 mM Now® L-karnozin sa grupom 10 mM Karnozin EXTRA® takođe je

evidentirano postojanje statistički značajne razlike. Naime, najizraženiji citotoksični efekat prisutan je u grupi 10 mM Karnozin EXTRA®.



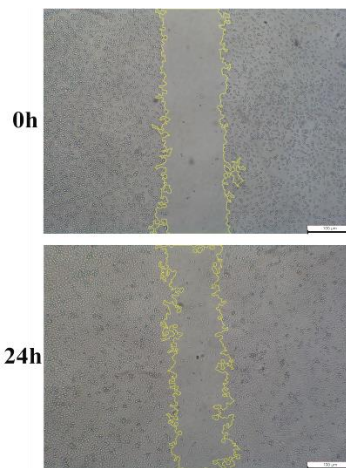
Grafikon 4.2.8. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na vijabilnost ćelija humanog glioblastoma nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Ćelijski vijabilitet procenjen je pomoću MTT testa. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±SD. Vijabilitet je izražen kao procenat u odnosu na netretirane ćelije. * $p < 0,05$

4.3. Inhibitorni potencijal ispitivanih preparata na migratornu sposobnost tumorskih ćelija – in vitro "scratch"esej

Primenom "scratch" eseja, obradom mikrofotografija i statističkom analizom ispitan je uticaj čiste supstance L-karnozin, preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u različitim koncentracijama na migratornu sposobnost ćelija adenokarcinoma dojke i humanog glioblastoma. Na mikrofotografijama uočava se žuto markirana linija koja odeljuje površinu praznog prostora i adheriranih ćelija u monosloju u 0 h i 24 h nakon sprovedenog tretmana.

4.3.1. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

Analizirajući migratornu sposobnost MCF-7 ćelija i poredivši vrednosti površine praznog prostora odmah nakon napravljenog defekta u monosloju (0 h - 100%) i 24 h sata posle (**Slika 4.3.1**), ustanovljena je slaba migratorna sposobnost ove ćelijske linije što je u skladu sa literaturnim navodima (282, 283, 284).



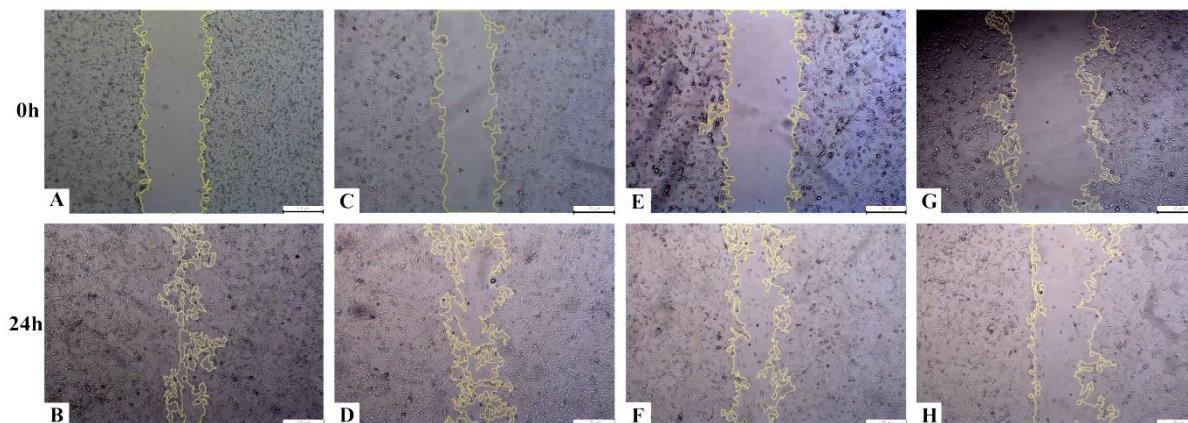
Slika 4.3.1. Migratorna sposobnost MCF-7 ćelija netretirane grupe u 0 h i nakon 24 h. Nativne ćelije adenokarcinoma dojke su fotografisane na svetlosnom mikroskopu (400x uveličanje, skala 100 μ m).

4.3.2. Čelije humanog glioblastoma (U87)

Rezultati uticaja ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija predstavljeni su i grafički (**Grafikon 4.3.1** i **Grafikon 4.3.2**). Evidentno je da su netretirane ćelije humanog glioblastoma nakon 24 h gotovo u potpunosti popunile izazvani defekt (25,84±0,240% početne vrednosti defekta). Dok sa druge strane, ćelije koje su tretirane ispitivanim preparatima pokazale dozno-zavisno smanjenje u sposobnosti da migriraju.

4.3.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na migratornu sposobnost U87 ćelija

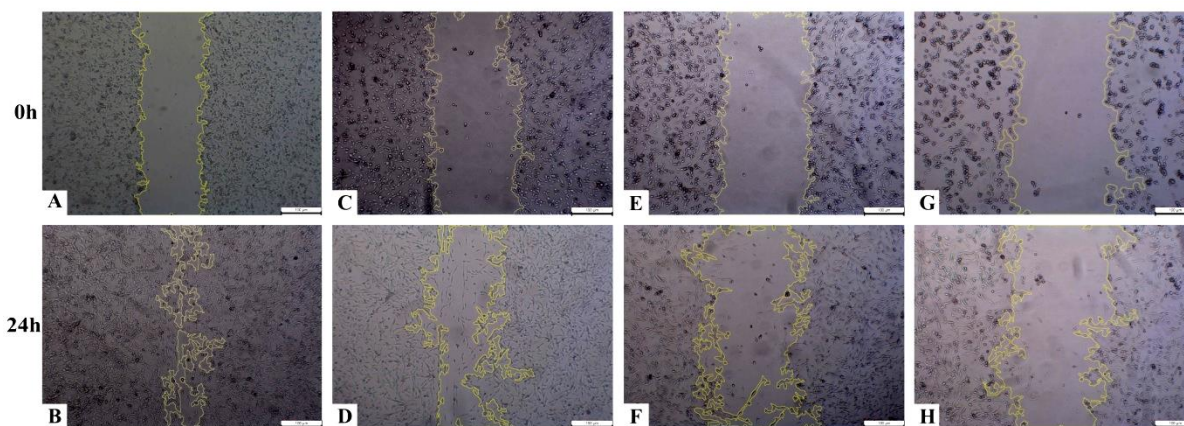
Nakon sprovedenog tretmana U87 ćelija različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina analizirana je sposobnost ovih ćelija da migriraju (**Slika 4.3.2**). Statistički značajno dozno-zavisno smanjenje migratorne sposobnosti tretiranih ćelija primećeno je pri poređenju eksperimentalnih grupa međusobno kao i u odnosu na kontrolnu grupu ($F=34191,257$; $p<0,05$) (**Grafikon 4.3.1A**). Najveće vrednosti površine praznog prostora zabeležene su u grupi 10 mM L-karnozin, dok su vrednosti u ostalim grupama bile nešto niže, i iznosile u grupi 5 mM L-karnozin 66,74±0,135% i u grupi 2 mM L-karnozin 60,45±0,110% u odnosu na vrednosti izmerine u 0 h.



Slika 4.3.2. Migratorna sposobnost U87 ćelija nakon 24 h tretmana L-karnozinom. Nativne ćelije humanog glioblastoma su fotografisane na svetlosnom mikroskopu (400x uvećanje, skala 100 μm) **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM L-karnozin, **E) i F)** 5 mM L-karnozin, **G) i H)** 10 mM L-karnozin.

4.3.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na migratornu sposobnost U87 ćelija

Na **Slici 4.3.3** predstavljena je migratorna sposobnost ćelija humanog glioblastoma nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Statistički značajno povećanje praznog prostora uočeno je u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu ($F=34191,257$; $p<0,05$) (**Grafikon 4.3.1B**). Takođe, dozno-zavisno povećanje površine praznog prostora koje je statistički značajno evidentirano je i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($F=34191,257$; $p<0,05$). Nakon tretmana U87 ćelija koncentracijom od 2 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® površina praznog prostora je bila $62,79\pm 0,124\%$ u odnosu na početnu u 0 h. U slučaju tretmana koncentracijom 5 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® površina praznog prostora iznosila je $81,72\pm 0,214\%$. Usled drastičnog smanjenja broja vijabilnih ćelija adheriranih za površinu flaska u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® procentualna vrednost površine praznog prostora je bila veća poredjenju sa kontrolnom ali i ostalim eksperimentalnim grupama i iznosila je $103\pm 0,111\%$.

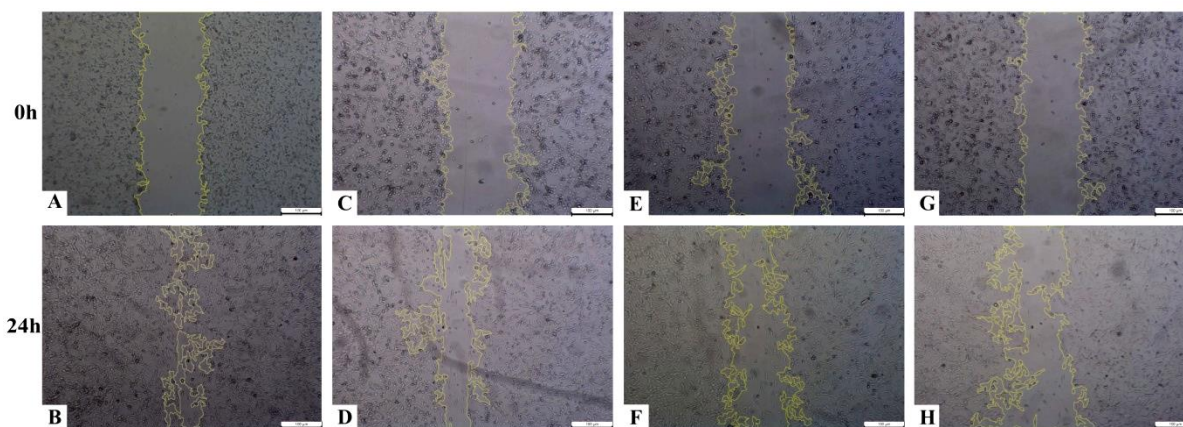


Slika 4.3.3. Migratorna sposobnost U87 ćelija nakon 24 h tretmana preparatom Karnozin EXTRA®. Nativne ćelije humanog glioblastoma su fotografisane na svetlosnom mikroskopu (400x

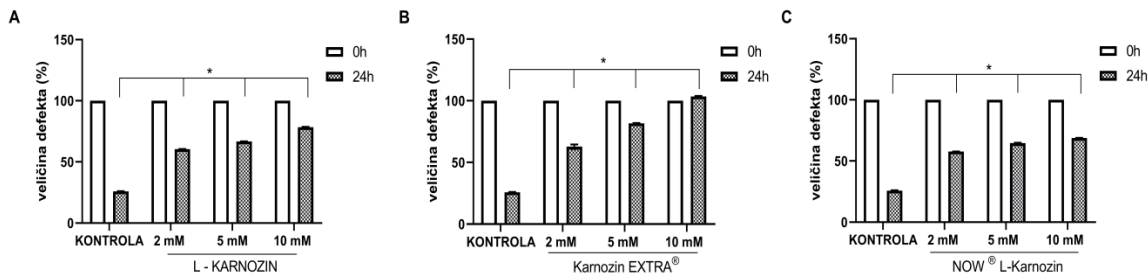
uveličanje, skala 100 μm) **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Karnozin EXTRA[®], **E) i F)** 5 mM Karnozin EXTRA[®], **G) i H)** 10 mM Karnozin EXTRA[®].

4.3.2.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na migratornu sposobnost U87 ćelija

Migratorna sposobnost ćelija humanog glioblastoma nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin predstavljena je na **Slici 4.3.4**. Poređivši izmerene vrednosti veličine praznog prostora (nastalog defekta) eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu zapaženo je dozno-zavisno povećanje istog koje je statistički značajno ($F=34191,257$; $p<0,05$) (**Grafikon 4.3.1C**). Takođe, postojanje statistički značajne razlike evidentirano je pri analizi vrednosti među eksperimentalnim grupama ($F=34191,257$; $p<0,05$). Najveća srednja vrednost praznog prostora uočava se u grupi 10 mM Now[®] L-karnozin i iznosi $68,77\pm 0,192\%$. Površina praznog prostora u grupi 5 mM Now[®] L-karnozin iznosila je $64,51\pm 0,393\%$, dok je u grupi 2 mM Now[®] L-karnozin ta vrednost bila $57,76\pm 0,081\%$.



Slika 4.3.4. Migratorna sposobnost U87 ćelija nakon 24 h tretmana preparatom Now[®] L-karnozin. Nativne ćelije humanog glioblastoma su fotografisane na svetlosnom mikroskopu (400 x uveličanje, skala 100 μm) **A) i B)** kontrolna grupa, **C) i D)** 2 mM Now[®] L-karnozin, **E) i F)** 5 mM Now[®] L-karnozin, **G) i H)** 10 mM Now[®] L-karnozin.



Grafikon 4.3.1. Kvantitativna analiza rezultata migratorne sposobnosti ćelija humanog glioblastoma nakon tretmana različitim koncentracijama **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin. Srednja vrednost širine formiranog defekta izražena je u procentima u odnosu na srednje vrednost širine u 0 h koja je smatrana kontrolnom i iznosi 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0,05$

4.3.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija

Na **Grafikonu 4.3.2A** prikazan je efekat ispitivanih preparata na migratornu sposobnost ćelija humanog glioblastoma nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina. Sva tri ispitivana preparata pokazala su inhibitorni efekat na migratornu sposobnost U87 ćelija. Statistički značajna razlika postoji pri poređenju eksperimentalnih grupa sa kontrolnom ($F=34191,257$; $p < 0,05$). Takođe, postojanje statistički značajne razlike evidentirano je i poredivši vrednosti površine nastalog defekta između grupe 2 mM L-karnozin i 2 mM Now® L-karnozin. Pri tretmanu preparatom Karnozin EXTRA® površina praznog prostora je bila najveća i iznosila je 62% u odnosu na početnu vrednost izmerenu u 0 h.

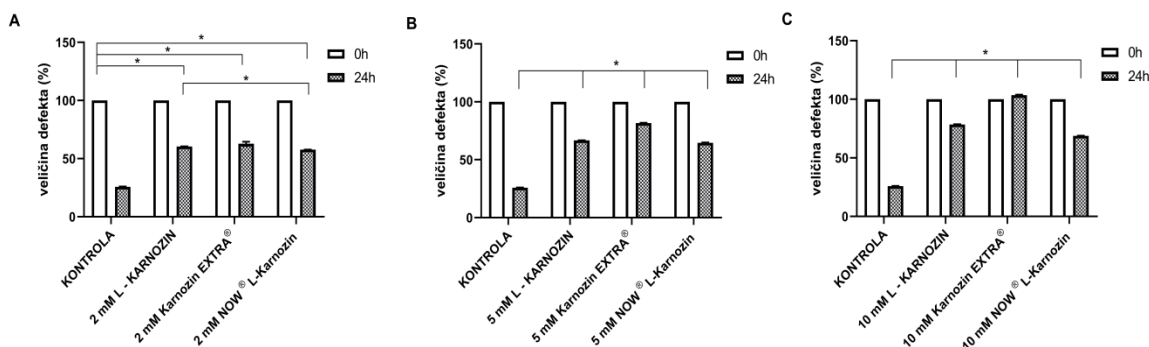
4.3.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija

Sprovedeni tretman na U87 ćeljskoj liniji koncentracijom od 5 mM karnozina ispitivanih preparata uzrokovao je inhibiciju procesa migracije ćelija što je i prikazano na **Grafikonu 4.3.2B**. Postojanje statistički značajne razlike evidentirano je kako pri poređenju eksperimentalnih grupa

sa kontrolnom tako i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($F=34191,257$; $p<0,05$). Na osnovu površine nastalog defekta uočava se da je efekat inhibicije na ćelijsku migraciju najizraženiji u grupi 5 mM Karnozin EXTRA® ($81,72\pm 0,214\%$)

4.3.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na migratornu sposobnost U87 ćelija

Čista supstanca L-karnozin, Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin primenjeni u koncentraciji od 10 mM karnozina pokazali su sposobnost da inhibiraju migraciju ćelija humanog glioblastoma (**Grafikonu 4.3.2C**). Izmerena vrednost rastojanja između ćelija, odnosno površina praznog prostora nakon sprovedenog tretmana statistički se značajno razlikuje u poređenju sa grupom netretiranih ćelija ($F=34191,257$; $p<0,05$). Poredivši vrednosti migratorne sposobnosti među ekperimentalnim grupama, takođe je uočeno postojanje značajne različitosti ($F=34191,257$; $p<0,05$). Naime, u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® sprovedeni tretman je uslovio drastično smanjenje vijabilnih ćelija adheriranih za površinu flaska pa sam tim i posledično izmerena vrednost inhibicije migratorne sposobnosti je najizraženija ($103,76\pm 0,111\%$).



Grafikonu 4.3.2. Kvantitativna analiza rezultata migratorne sposobnosti ćelija humanog glioblastoma nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin, kao i preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u koncentracijama od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Srednja vrednost širine formiranog defekta izražena u procentima u odnosu na srednje vrednost širine u 0 h koja je smatrana kontrolnom i iznosi 100%. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD. * $p<0,05$

4.4. Efekti ispitivanih preparata na ekspresiju vimentina nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija

U cilju analiziranja uticaja različitih koncentracija karnozina iz ispitivanih preparata na ekspresiju markera vimentina u kontrinuiranim ćelijskim linijama sprovedeno je imunofluorescentno bojenje. Naime, protein vimentin na reprezentativnim mikrofotografijama pokazuje zelenu fluorescenciju i lokalizovan je u citoplazmi ispitivanih ćelija, dok su jedra bojena DAPI bojom i pokazuju plavu fluorescenciju.

4.4.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)

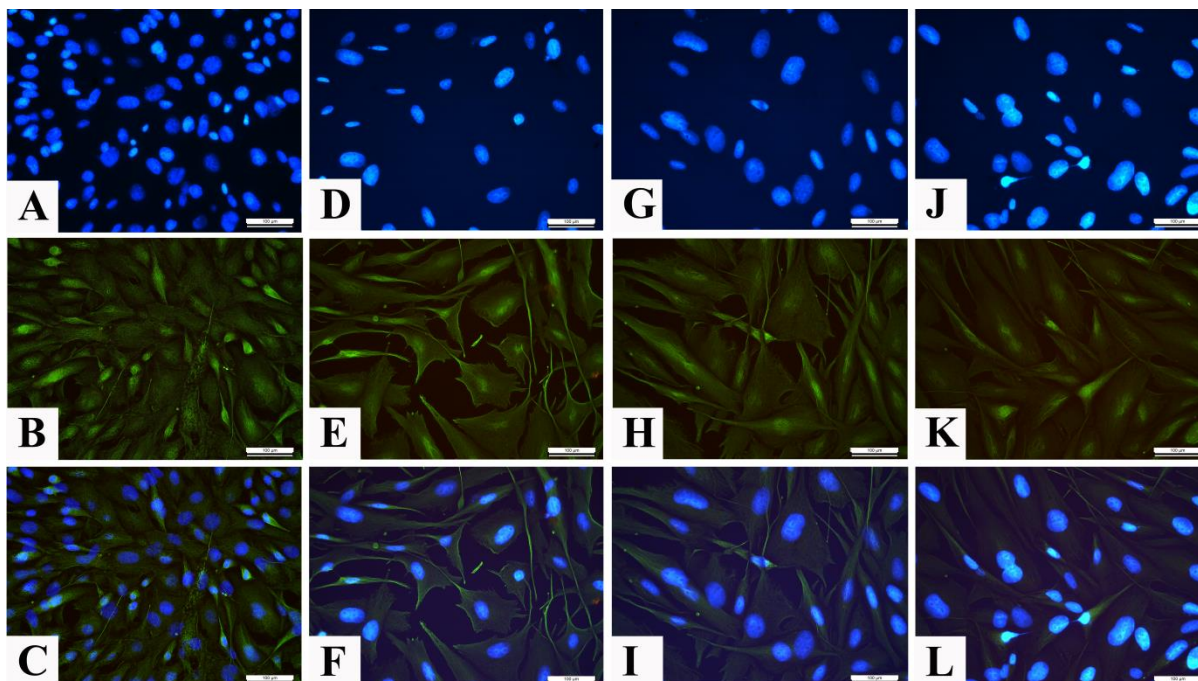
Nakon imunofluorescentnog bojenja zdravih BHK-21/C-13 ćelija kontrolne grupe uočava se ekspresija vimentina u citoplazmi ćelija. Analizirajući mikrofotografije primećeno je da filamentiraju gustu mrežu. Naime, u nekim regionima ćelija uočavaju se debela vlakna ili čak snopovi koji nastaju usled grupisanja velikog broja filamenata. Usled kvantifikacije rezultata i izračunavanja ukupnog intenziteta fluorescencije sekundarnog antitela vezanog za antigen vimentin u kontrolnoj grupi BHK-21/C-13 ćelija, došlo se do podatka da je vrednost TCCF $725639,2 \pm 161535,77$.

4.4.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Nakon sprovedenog 24 h tretmana BHK-21/C-13 ćelija različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina vršeno je imunofluorescentno bojenje u cilju utvrđivanja stepena ekspresije vimentina. Na **Slici 4.4.1** može se primetiti da signal fluorescencije opada sa povećanjem koncentracije ispitivane supstance. U svim eksperimentalnim grupama uočavaju se promene u rasporedu samih vlakana intermedijernih filamenata. U poređenju sa kontrolnom grupom mreža isprepletenih vlakana više nije tako gusta.

Kvantifikovani rezultati su predstavljeni grafički (**Grafikon 4.4.1A**) u cilju komparacije izmerenih vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije među grupama. Utvrđeno je postojanje

statistički značajnog dozno-zavisnog smanjenja ekspresije vimentina pri poređenju eksperimentalnih grupa sa kontrolnom ($F=54,201$; $p<0,0001$). Takođe, statistički značajna razlika u izmerenim vrednostima utvrđena je i pri međusobnom poređenju grupe 2 mM L-karnozin u odnosu na grupu 10 mM L-karnozin eksperimentalnih grupa ($p<0,0001$).

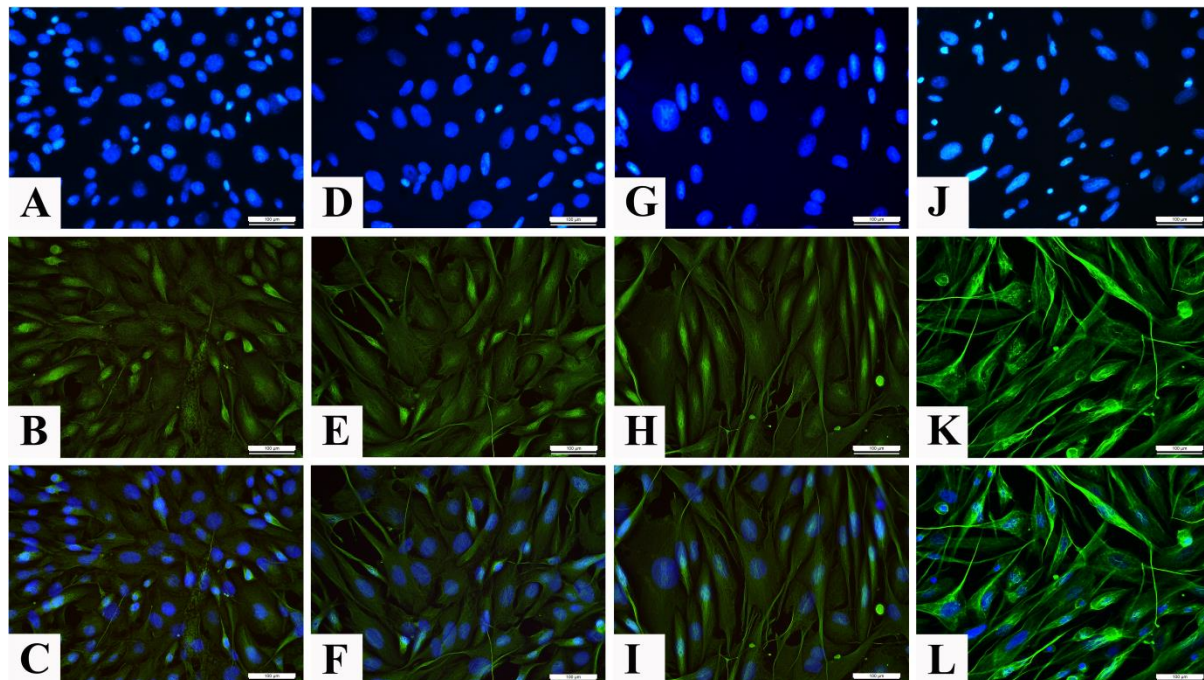


Slika 4.4.1. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.4.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Na **Slici 4.4.2** prikazano je imunofluorescentno bojenje vimentina kontrolne i eksperimentalnih grupa BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama ispitivanog preparata. Prisutno je povećanje intenziteta imunofluorescentnog signala koje je dozno-zavisno. Sa porastom koncentracije ispitivanog preparata u ćelijskom medijumu nakon sprovedenog tretmana dolazi i do promene oblika samih ćelija a posledično i do izmenjenih svojstava i građe intermedijernih filamenata. Grupisanje snopova vlakana odaje utisak prisutnosti pojedinačnih debelih vlakana te se izgled formirane mreže razlikuje u odnosu na grupu netretiranih ćelija. U grupi 10 mM Karnozin EXTRA® opisane promene su najizraženije.

Vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije (TCCF) predstavljene su i na **Grafikonu 4.4.1B**. Statističkom obradom podataka dokazano je postojanje značajnijeg porasta vrednosti TCCF sa porastom koncentracije ispitivanog preparata u odnosu na kontralnu grupu ($F=54,201$; $p<0,0001$). Razlika u vrednostima ekspresije vimentina evidentirana je pri međusobnom poređenju izmerenih vrednosti grupe 2 mM Karnozin EXTRA® sa grupom 10 mM Karnozin EXTRA® ($p<0,0001$).

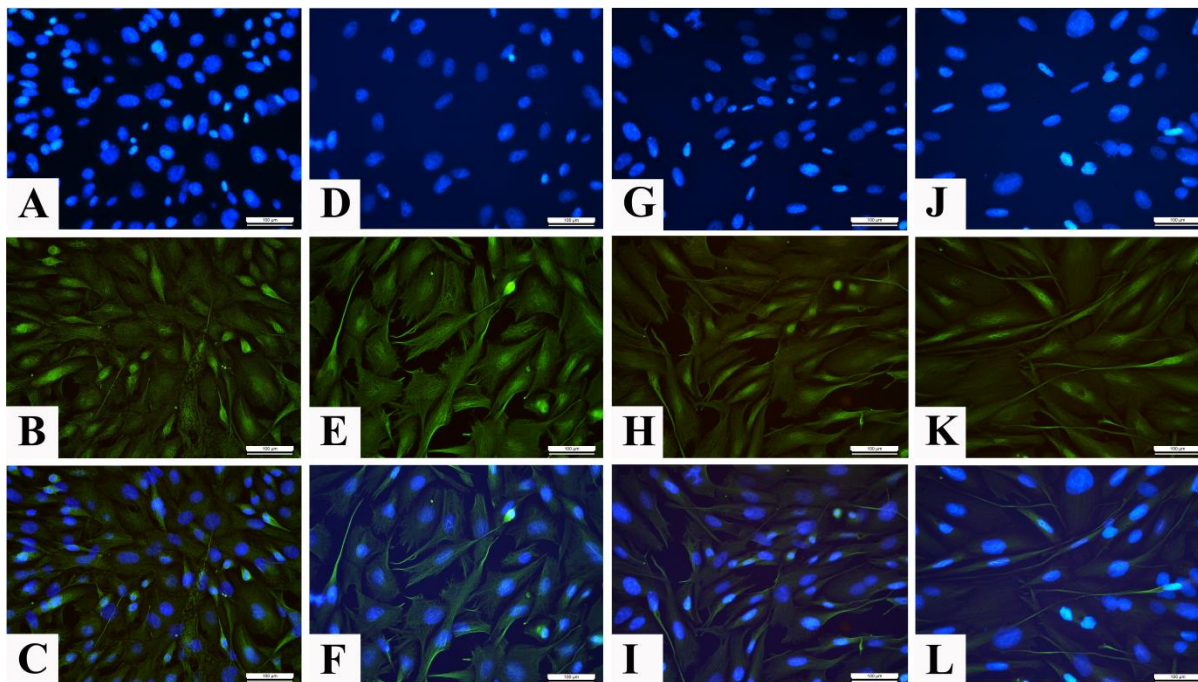


Slika 4.4.2. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®]. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA[®]: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA[®]: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA[®]: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uvećanju 400x, skala 50 μm .

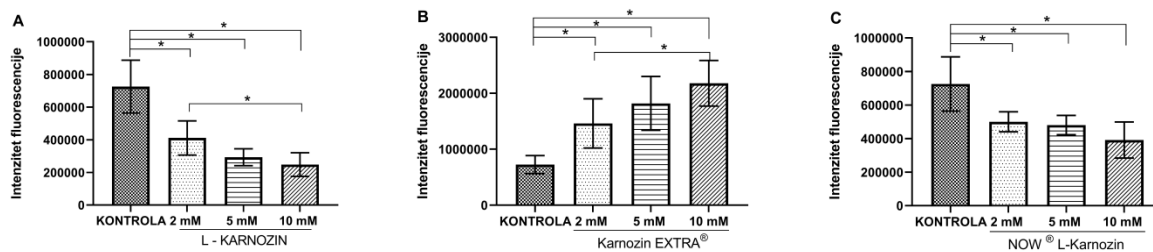
4.4.1.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Efekti preparata Now[®] L-karnozin nakon primene u različitim koncentracijama na BHK-21/C-13 ćelijama usloveli su smanjenje intenziteta imunofluorescentnog signala sekundarnog antitela vezanog za antigen vimentin (**Slika 4.4.3**). Posmatrajući reprezentativne mikrofotografije uočava se međusobno približavanje vlakana intermedijernog filameta vimentina i gubitak karakteristika mrežastog rasporeda.

Analizirajući vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina tretiranih grupa BHK-21/C-13 ćelija evidentirano je statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu ($F=54,201$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.4.1C**).



Slika 4.4.3. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM Now[®] L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM Now[®] L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM Now[®] L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .



Grafikon 4.4.1. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama bubrega hrčka. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.4.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Nakon 24 h tretmana BHK-21/C-13 ćelija ispitivanim preparatima u koncentraciji od 2 mM L-karnozina analizirane su vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije (**Grafikon 4.4.2A**). Statistički značajne različitosti evidentirane su pri poređenju svih eksperimentalnih grupa sa kontrolnom, kao i pri poređenju grupe 2 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F=54,201$; $p<0,0001$). Najviši intenzitet ekspresije vimentina beleži se u grupi 2 mM Karnozin EXTRA®, dok su vrednosti u grupi 2 mM Now® L-karnozin i 2 mM L-karnozin značajno niže u odnosu na kontrolnu.

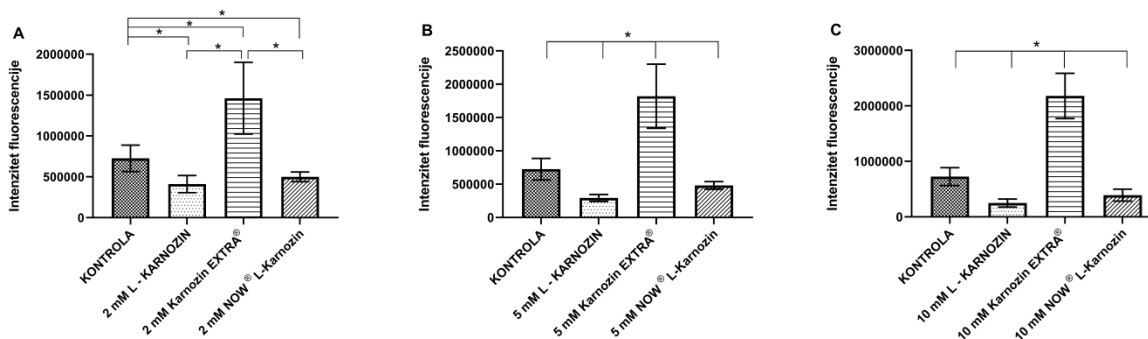
4.4.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Na **Grafikonu 4.4.2B** prikazane su kvantifikovane vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina kod BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin, kao i preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin pri koncentraciji od 5 mM karnozina u medijumu za rast. Drastičan porast izmerenih vrednosti zabeležen je u grupi 5 mM Karnozin EXTRA®, dok je sa druge strane, sprovedeni tretman u grupama 5 mM Now® L-karnozin i 5 mM L-karnozin uslovio signifikantni pad ukupnog intenziteta fluorescencije u odnosu na kontrolnu

grupu ($F=54,201$; $p<0,0001$). Takođe, značajne različitosti evidentirane su i nakon poređenja vrednosti ekspresije vimentina eksperimentalnih grupa međusobno ($p<0,0001$).

4.4.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi BHK-21/C-13 ćelija

Kvantifikacijom i obradom izmerenih vrednosti ukupnog intenziteta imunofluorescencije vimentina kod BHK-21/C-13 ćelija nakon sprovedenog tretmana ispitivanim preparatima pri koncentraciji 10 mM karnozina evidentirano je prisustvo statistički značajnih razlika međusobnim poređenjem eksperimentalnih grupa i u odnosu na kontrolnu grupu ($F=54,201$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.4.2C**). Naime, u grupi 10mM Karnozin EXTRA[®] izmerena je najviša vrednost ukupnog intenziteta fluorescencije intermedijernih filamenata. Nasuprot navedenog, u grupama 10 mM Now[®] L-karnozin i 10 mM L-karnozin prisutan je značajan pad TCCF u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi.



Grafikon 4.4.2. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA[®] i preparata Now[®] L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama bubrega hrčka nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

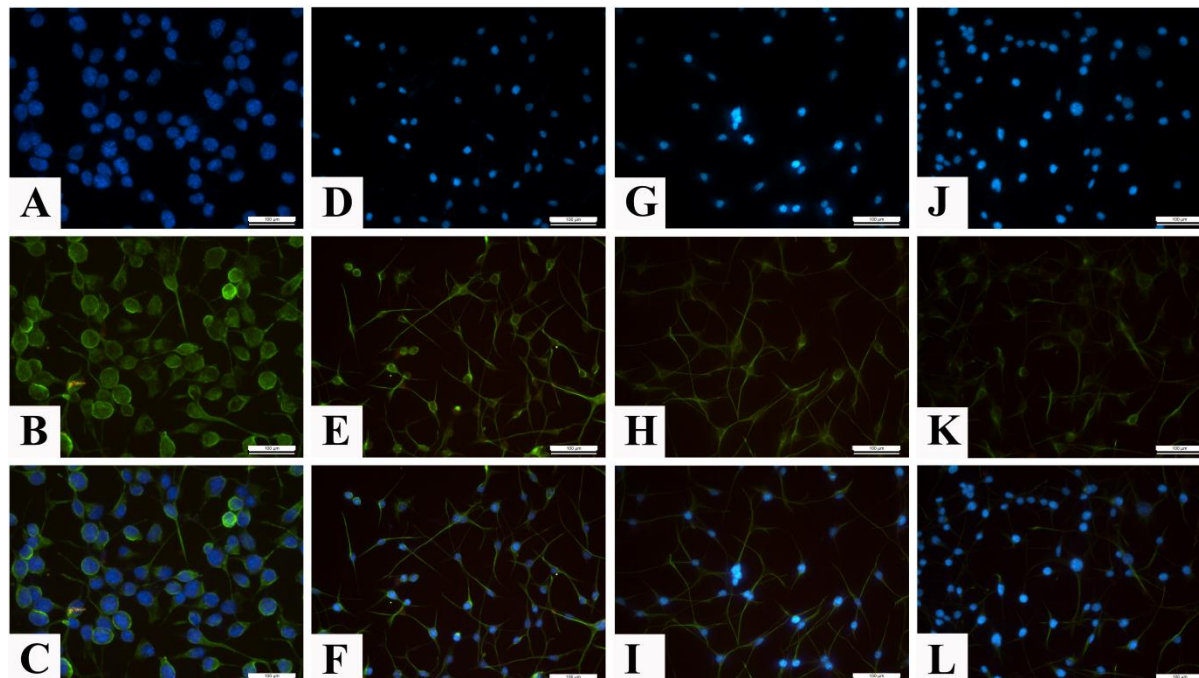
4.4.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)

Ekspresija vimentina je detektovana u netretiranim MRC-5 ćelijama. Zdrave ćelije humanih fetalnih fibroblasta pluća pokazuju ekstenzivnu ekspresiju intermedijernog filameta vimentina u čitavoj citoplazmi. Izmerena vrednost ukupnog intenziteta fluorescencije u ovoj grupi ćelija iznosila je $15,8 \pm 3,12$.

4.4.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

Na reprezentativnim mikrofotografijama (**Slika 4.4.4**) uočava se da je vimentin u MRC-5 ćelijama, tretiranim različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina, prisutan u citoplazmi ali se intenzitet fluorescencije evidentno smanjuje sa porastom koncentracije ispitivane supstance. Najizraženije smanjenje signala beleži se u grupi 10 mM L-karnozin.

Na **Grafikonu 4.4.3A** prikazani su kvantifikovani rezultati ekspresije intermedijernih filamenata vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija nakon sprovedenog tretmana. Uočava se statistički značajno smanjenje intenziteta fluorescencije obojenih ćelija nakon tretmana u odnosu na kontrolnu grupu ($F=6850,984$; $p<0,0001$).

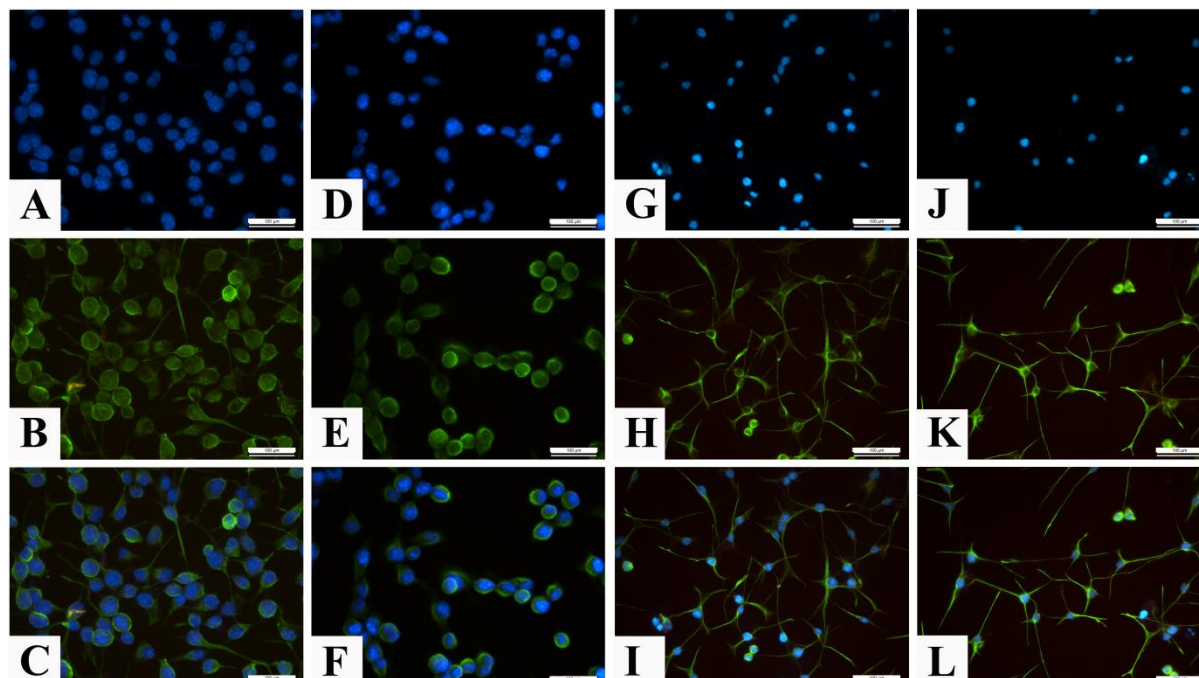


Slika 4.4.4. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste stupstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.4.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

Analizirajući reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama preparata Karnozin EXTRA® zapaža se da je signal fluorescencije intermedijernog filameta vimentina evidentno jači u odnosu na netretiranu grupu ćelija (**Slika 4.4.5**). Pojedine ćelije pored ekspresije vimentina u čitavoj citoplazmi sadrže i male regione intermedijernih filamenata koncentrisane u perifernim delovima ćelija neposredno uz ćelijsku membranu. Prisutne promene su uočljivije u grupama 5 mM Karnozin EXTRA® i 10 mM Karnozin EXTRA®.

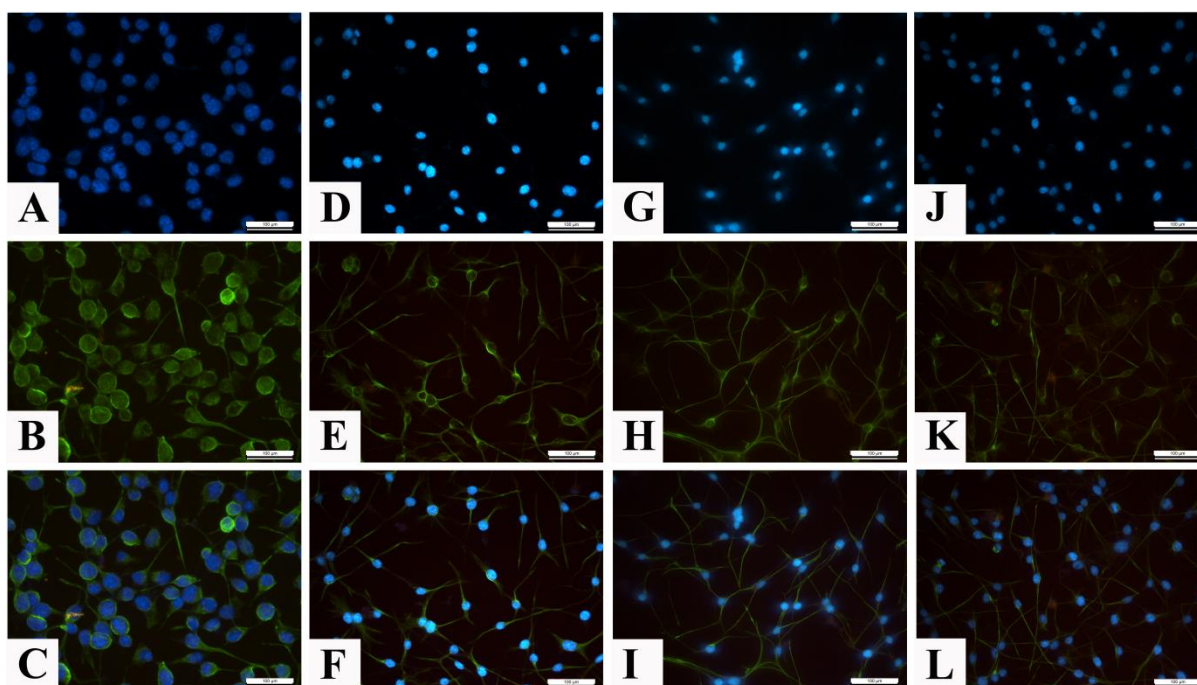
Grafički prikaz kvantifikacije fluorescencije u MRC-5 ćelijama eksperimentalnih grupa ukazuje na postojanje značajne različitosti izmerenih vrednosti ekspresije vimentina u odnosu na kontrolnu grupu ($F=6850,984$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.4.3B**). Značajnije dozno-zavisno odstupanje izmerenih vrednosti TCCF evidentirano je u grupama 5 mM i 10 mM Karnozin EXTRA[®] u odnosu na grupu 2 mM Karnozin EXTRA[®] ($p<0,0001$).



Slika 4.4.5. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®]. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA[®]: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA[®]: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA[®]: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

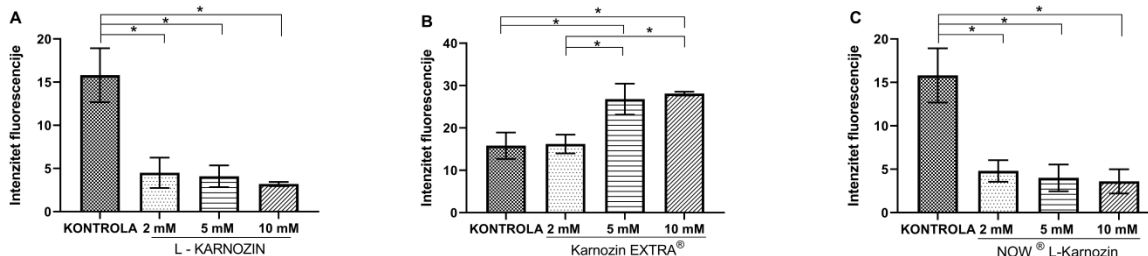
4.4.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

Na **Slici 4.4.6** prikazana je ekspresija proteina vimentina imunofluorescentno obojenih MRC-5 ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Na osnovu detektovane imunorekativnosti može se reći da postoji vidljivo smanjenje signala koje je dozno-zavisno u odnosu na kontrolnu grupu uz izmenjen oblik samih ćelija i gubitak karakterističnih svojstava vimentinske mreže.



Slika 4.4.6. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Now® L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Now® L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Now® L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 µm.

Na **Grafikonu 4.4.3C** predstavljeni su efekti sprovedenog tretmana na ukupan intenzitet fluorescencije intermedijernog filameta vimentina kod MRC-5 ćelijske linije. Vrednosti ekspresije ispitivanog markera eksperimentalnih grupa statistički se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu ($F=6850,984$; $p<0,0001$). Nakon sprovedenih tretmana uočava se trend opadanja izmerenih vrednosti TCCF u odnosu na grupu netretiranih ćelija.



Grafikon 4.4.3. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama fetalnih fibroblasta pluća. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.4.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

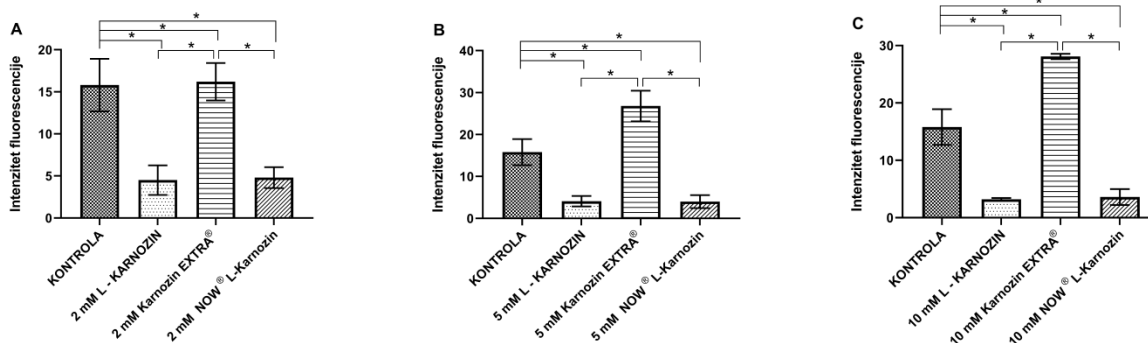
Kvantifikovani rezultati ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina kod obojenih MRC-5 ćelija nakon sprovedenog tretmana ispitivanim preparatima pri koncentraciji od 2 mM karnozina prikazani su na **Grafikonu 4.4.4A**. Poredivši vrednosti tretiranih grupa sa kontrolnom primećeno je postojanje statistički značajne razlike ($F=6850,984$; $p<0,0001$). Redukcija proteinske ekspresije ispitivanog markera prisutna je u grupama 2 mM L-karnozin i 2 mM Now® L-karnozin u odnosu na kontrolne vrednosti. Nasuprot navedenog, tretman preparatom Karnozin EXTRA® pri apilkovanoj koncentraciji od 2 mM karnozina indukuje povišenje izmerenih vrednosti u odnosu na kontrolnu i ostale eksperimentalne grupe ($p<0,0001$).

4.4.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

Sa **Grafikona 4.4.4B** nakon kvantifikacije rezultata ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina kod MRC-5 ćelija tretiranih koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata uočava se prisutvo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($F=6850,984$; $p<0,0001$). Ekspresija ispitivanog markera u grupi 5 mM L-karnozin slična je izmerenoj vrednosti u grupi 5 mM Now[®] L-karnozin, te nije evidentirano postojanje statistički značajne razlike ($p>0,05$). Međutim, u grupi 5 mM Karnozin EXTRA[®] zabeleženo je značajno povišenje vrednosti ukupne fluorescencije u poređenju sa ostalim grupama ($p<0,0001$).

4.4.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi MRC-5 ćelija

Na **Grafikonu 4.4.4C** su prikazane vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije vimentina tretiranih MRC-5 ćelija koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. Rezultati prikazani na ovom grafikonu jasno govore o postojanju statistički značajne razlike pri poređenju eksperimentalnih grupa sa kontrolnom ($F=6850,984$; $p<0,0001$). Takođe, značajna razlika je evidentirana i pri analiziranju vrednosti izmerenih u grupi 10 mM Karnozin EXTRA[®] u odnosu na ostale grupe ($p<0,0001$). Naime, sprovedeni tretmani ćelija L-karnozinom i preparatom Now[®] L-karnozin značajno smanjuju proteinsku ekspresiju vimentina. Dok sa druge strane, tretman 10 mM karnozinom iz preparata Karnozin EXTRA[®] indukuje drastično povećanje ekspresije ispitivanog markera.



Grafikon 4.4.4. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i preparata Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama fetalnih fibroblasta pluća nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.4.3. Ćelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

Uz pomoć Fiji kompijuterskog programa izvršena je analiza i kvantifikacija vrednosti eksprimiranosti markera vimentina u ćelijama adenokarcinoma dojke. U citoplazmi ispitivanih ćelija nije evidentirana pozitivnost intermedijernog filameta vimentina što je u skladu sa literaturnim navodima (285).

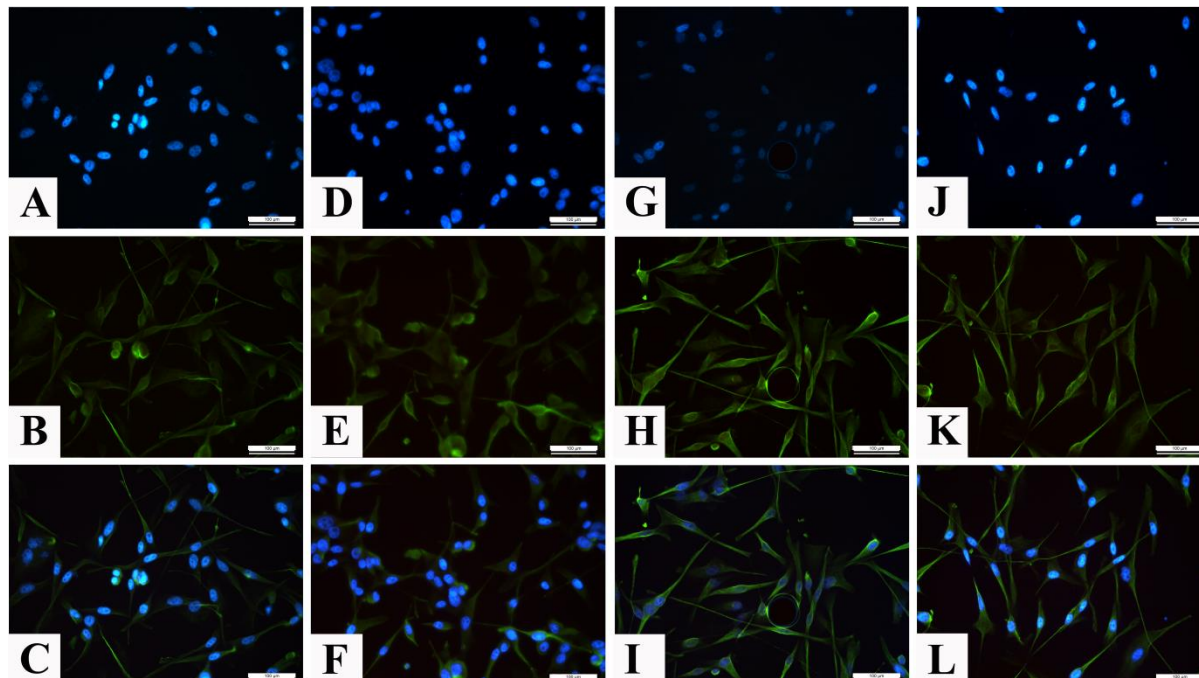
4.4.4. Čelije humanog glioblastoma (U87)

Uz pomoć imunofluorescentnog bojenja korišćenjem specifičnog Alexa Fluor® 488 antiteta pri detekciji proteina vimentina u ćelijama humanog glioblastoma, dokazan je nizak stepen imunoreaktivnosti. Izmerena vrednost ukupnog intenziteta fluorescencije ispitivanog proteina u grupi netretiranih ćelija iznosila je $1,9 \pm 0,69$. Na mikrofotografijama kontrolne grupe ćelija jasno se može videti citoplazmatska lokalizacija intermedijernih filamenata vimentina uz nešto naglašeniji intenzitet signala perinuklearno.

4.4.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Na **Slici 4.4.7.** prikazan je efekat različitih koncentracija karnozina iz preparata Now® L-karnozin na imunoreaktivnost citoplazmatskih intermedijernih filamenata kod ispitivane ćelijske linije. Naime, prisutno je diskretno smanjenje signala imunofluorescencije u odnosu na kontrolnu grupu, bez evidentiranih promena u izgledu, rasporedu i građi vimentinskih niti.

Kvantifikacijom i statističkom obradom rezultata sprovedenog imunofluorescentnog bojenja U87 ćelija nakon tretmana utvrđeno je da čista supstanca L-karnozin ne dovodi do statistički značajnog smanjenja vrednosti TCCF za vimentin u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($p > 0,05$) (**Grafikon 4.4.5A**). Takođe, postojanje značajnije različitosti među vrednostima eksperimentalnih grupa nije evidentirano ($p > 0,05$).

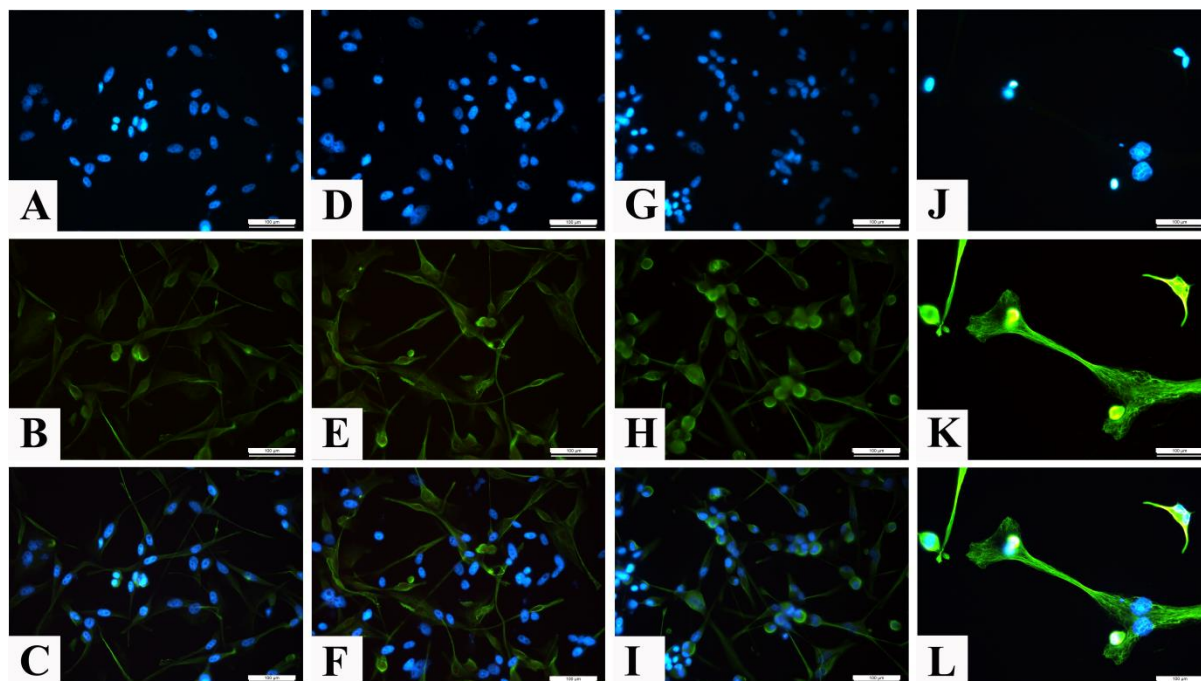


Slika 4.5.7. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 µm.

4.4.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Reprezentativne mikrofotografije (**Slika 4.4.8**) U87 ćelija bojenih imunofluorescentno na vimentin nakon sprovedenog tretmana ukazuju na prisutnu imunoreaktivnost u grupama 5 mM i 10 mM Karnozin EXTRA®. Prisutvo intermedijernih filamenata vimentina citoplazmatski odlika je ćelija svih eksperimentalnih grupa, međutim intenzitet signala perinuklearno je naglašeniji u grupama 5 i 10 mM Karnozin EXTRA® odnosu na kontrolnu. Treba istaći da se nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina usled promene morfoloških svojstava ćelija uočava stapanje pojedinačnih niti i formiranje snopova čime se stiče utisak veoma jakog signala.

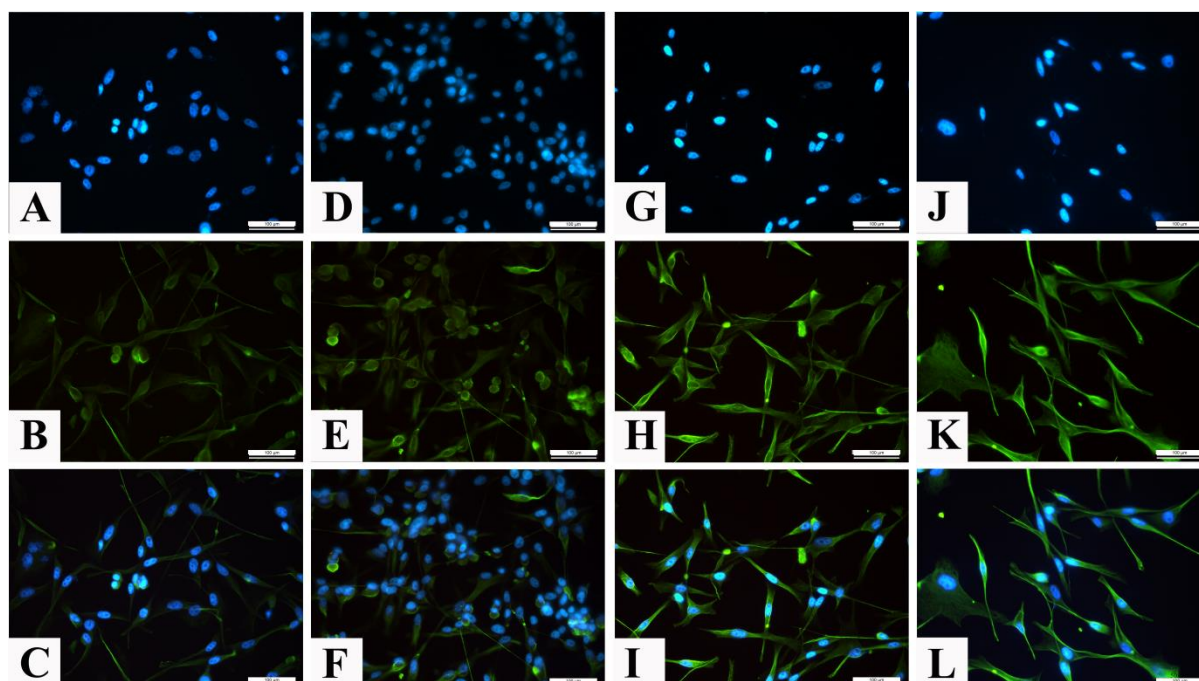
Na **Grafikonu 4.4.5B** predstavljene su kvantifikovane vrednosti imunofluorescentnog bojenja U87 ćelija na vimentin nakon 24 h tretmana. Značajna razlika u izmerenim vrednostima ekspresije prisutna je pri poređenju među eksperimentalnim grupama ($F=22,295$; $p<0,0001$). U grupi 2 mM Karnozin EXTRA[®] sprovedeni tretman nije ispoljio efekat ($p>0,05$), dok su se ćelije u grupama 5 mM i 10 mM Karnozin EXTRA[®] odlikovale značajno višim vrednostima u odnosu na kontrolnu grupu ($p<0,0001$).



Slika 4.4.8. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®]. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA[®]: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA[®]: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA[®]: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 µm.

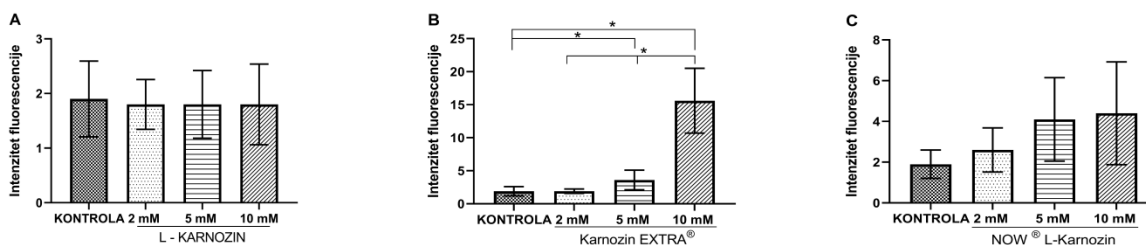
4.4.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Rerezentativne mikrofotografije imunofluorescentnog bojenja na vimentin U87 ćelija tretiranih različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin predstavljene su na **Slici 4.4.9**. Na osnovu prisutne imunoreaktivnosti u citoplazmi obojenih intermedijernih filamenata u grupama 5 i 10 Now® L-karnozin može se primetiti formiranje snopova spajanjem pojedinačnih intermedijernih vlakana kao i izmenjen izgled formirane mreže.



Slika 4.4.9. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na vimentin (**zeleni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Now® L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Now® L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Now® L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 µm.

Kvantifikacijom izmerenih vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije za ispitivani marker nakon inkubacije U87 ćelija pri različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin kao i statističkom obradom podataka nije uočeno postojanje značajnije različitosti izmerenih vrednosti među grupama (**Grafikon 4.4.5C**) ($p > 0,05$).



Grafikon 4.4.5. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama humanog glioblastoma. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD. * $p < 0,0001$

4.4.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Efekti sprovedenog tretmana na nivo ekspresije vimentina u citoplazmi ćelija humanog glioblastoma prikazani su na **Grafikonu 4.4.6A**. Nakon *posthoc Games Howell* testa za nejednake varijanse utvrđeno je nepostojanje statistički značajne razlike među grupama ($p > 0,05$).

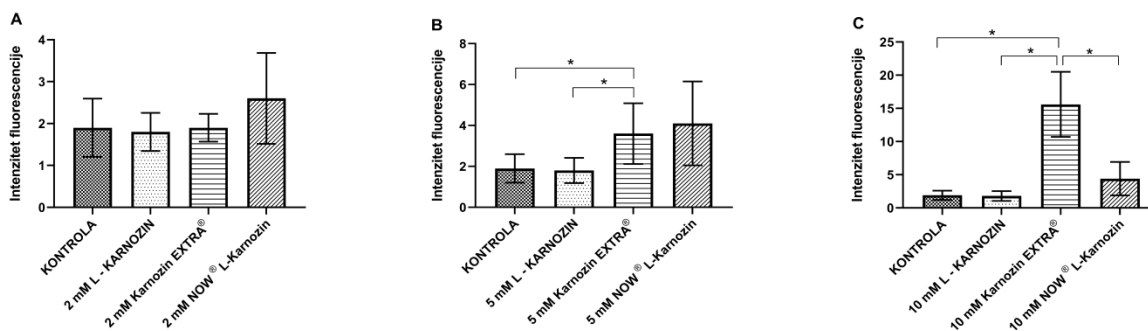
4.5.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Na **Grafikonu 4.4.6B** prikazan je uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina kod U87 ćelija. Uočava se da su vrednosti izmerenog TCCF za vimentin u grupi 5 mM Karnozin EXTRA® značajno više u poređenju sa kontrolnom ali i grupom 5 mM L-karnozin ($F = 22,295$; $p < 0,0001$). Dok sa druge strane, tretmani

čistom supstancom i preparatom Now® L-karnozin nisu usloveli nastanak značajnih različitosti u odnosu na grupu netretitanih ćelija ($p > 0,05$).

4.4.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije vimentina u citoplazmi U87 ćelija

Rezultati ekspresije vimentina u U87 ćelijama nakon 24 h inkubacije sa 10 mM karnozinom iz ispitivanih preparata predstavljeni su na **Grafikonu 4.4.6C**. Analizom izmereneih vrednosti može se zapaziti da sprovedeni tretman u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® je uslovio porast TCCF za vimentin u odnosu na grupu netretiranih ćelija kao i preostale eksperimentalne grupe ($F=22,295$; $p < 0,0001$).



Grafikon 4.4.6. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i preparata Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama humanog glioblastoma nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

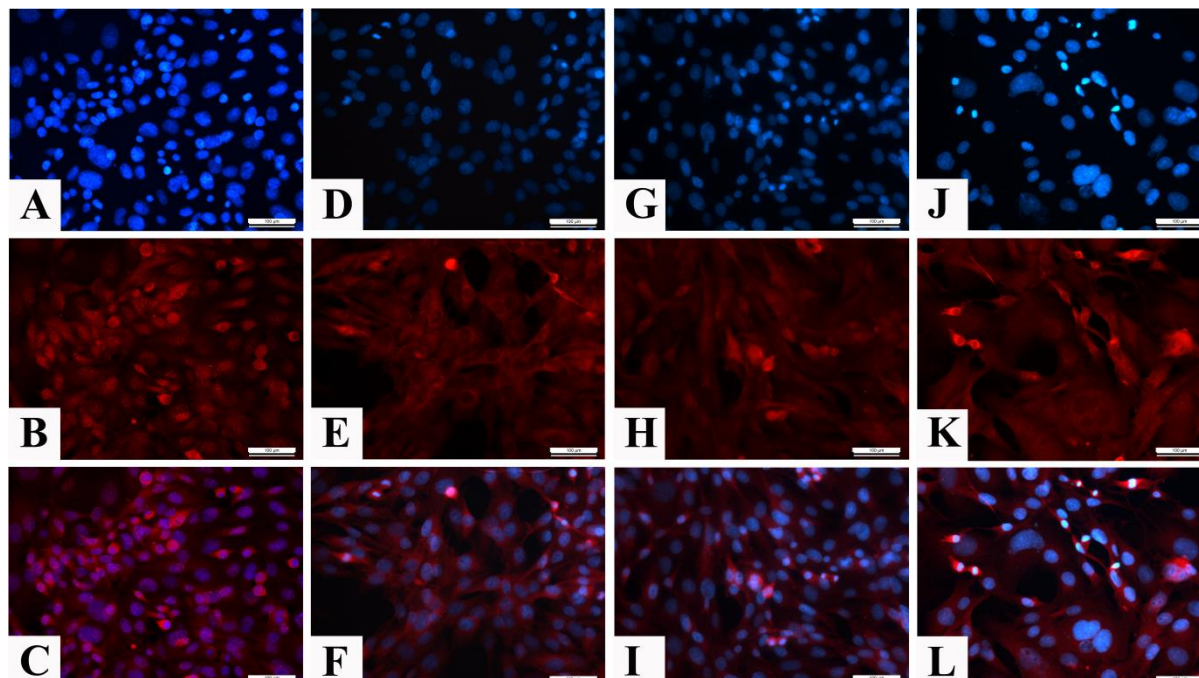
4.5. Efekti ispitivanih preparata na ekspresiju SOD2 nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija

U cilju analiziranja uticaja različitih koncentracija karnozina iz ispitivanih preparata na ekspresiju markera SOD2 u kontrinuiranim ćelijskim linijama sprovedeno je imunofluorescentno boljenje. Naime, protein SOD2 na reprezentativnim mikrofotografijama pokazuje crvenu fluorescenciju i lokalizovan je u mitohondrijama ispitivanih ćelija, dok su jedra bojena DAPI bojom i pokazuju plavu fluorescenciju.

4.5.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)

4.5.1.1. *Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija*

Efekti različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin na ekspresiju SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelijama predstavljeni su na **Slici 4.5.1**. Kvantifikovanjem izmerenih vrednosti TCCF za SOD2 kao i statističkom obradom rezultata uočeno je postojanje statistički značajne razlike pri poređenju grupe 10 mM L-karnozin sa kontrolnom ali i ostalim eksperimentalnim grupama (**Grafikon 4.5.1A**) ($F= 20,652$; $p<0,0001$). Naime, u ovoj grupi došlo je do porasta intenziteta signala za ispitivani marker.

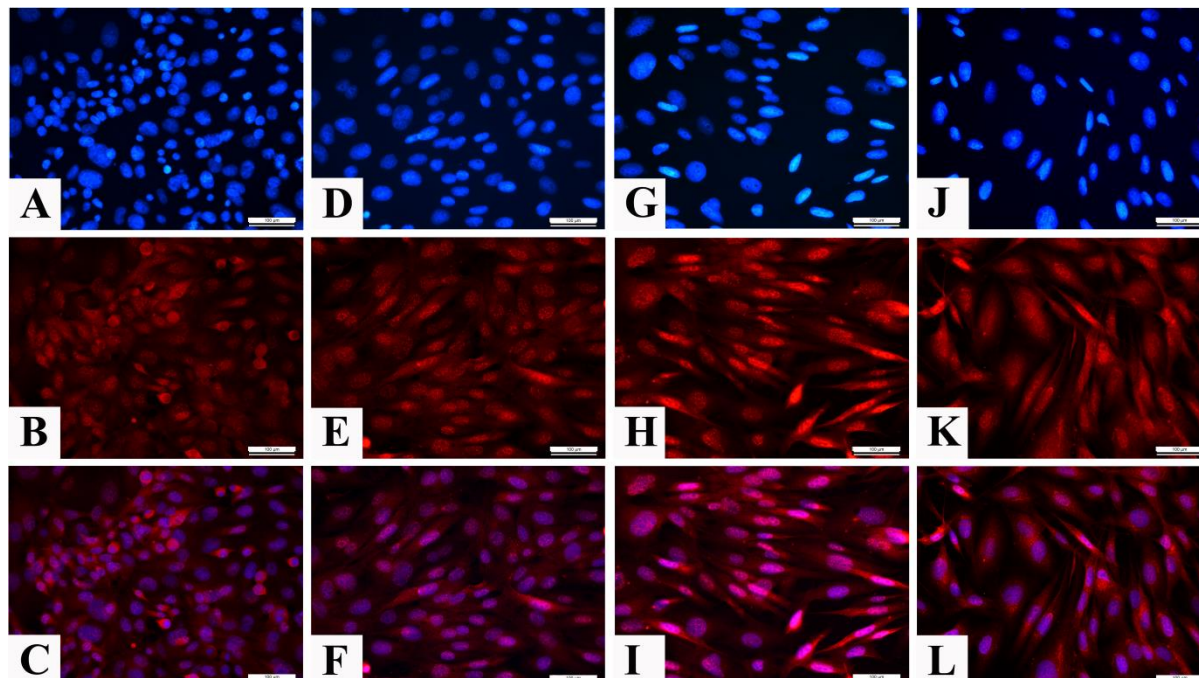


Slika 4.5.1. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste stupstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.5.1.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija

Na **Slici 4.5.2** prikazano je imunofluorescentno bojenje SOD2 markera kontrolne i eksperimentalnih grupa BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz ispitivanog preparata. Pri poređenju kvantifikovanih vrednosti TCCF, primećeno je postojanje statistički značajne razlike nakon inkubacije ćelija sa koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® u odnosu na kontrolnu ali grupu ćelija tretiranu koncentracijom od 2 mM karnozina (**Grafikon 4.5.1B**) ($F= 20,652$; $p<0,0001$). Takođe, i na reprezentativnim mikrofotografijama zapaža se da pri koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina iz ispitivanog

preparata u medijumu za rast, u mitohondrijama ćelija dolazi do pojačanja ekspresije SOD2 markera.

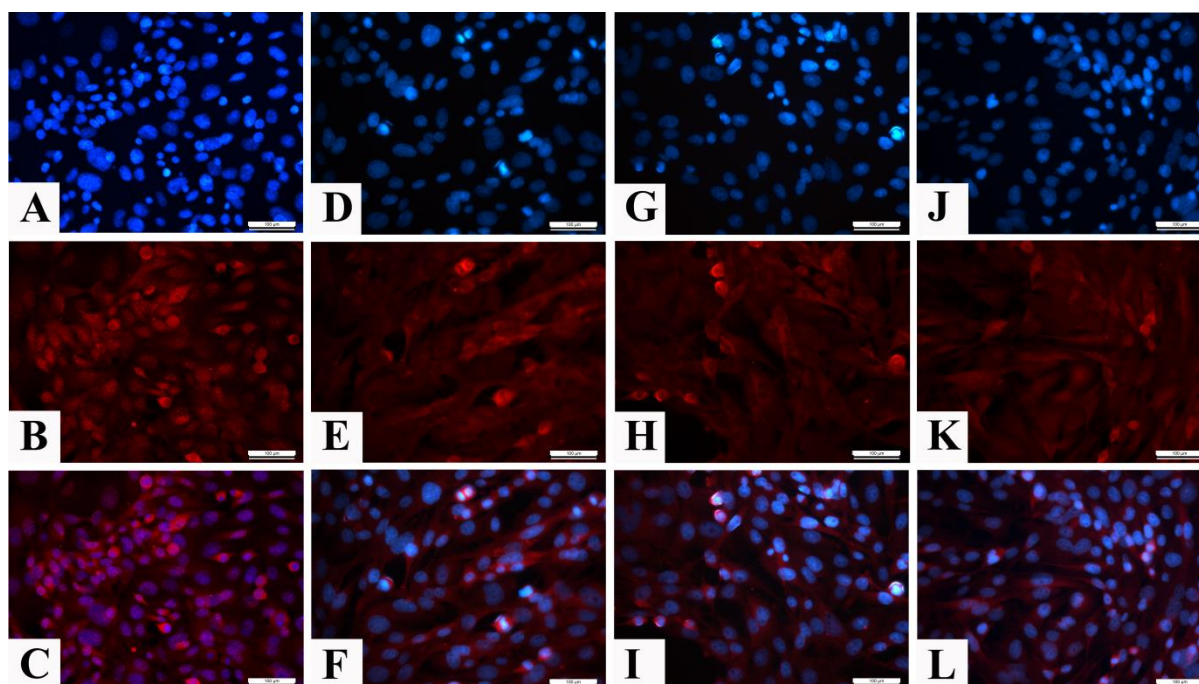


Slika 4.5.2. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®]. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA[®]: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA[®]: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA[®]: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 µm.

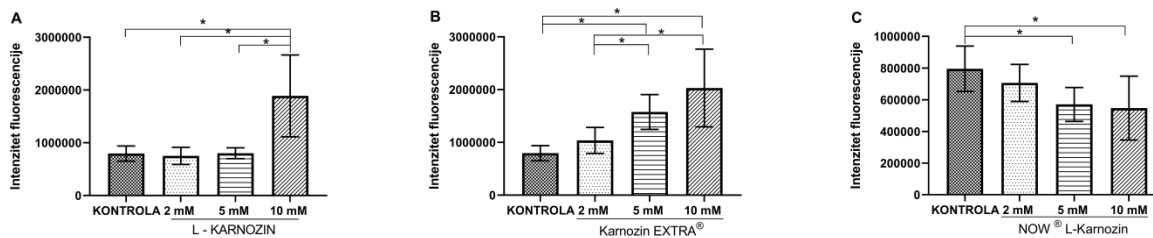
4.5.1.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija

Rerezentativne mikrofotografije imunofluorescentnog bojenja na SOD2 marker BHK-21/C-13 ćelija tretiranih različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin predstavljene su na **Slici 4.5.3**. Statističkom obradom kvantifikovanih vrednosti TCCF uočava se postojanje značajne razlike pri poređenju grupa ćelija tretiranih koncentracijom od 5 i 10 mM

karnozina iz ispitivanog preparata u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi (**Grafikon 4.5.1C**) ($F= 20,652$; $p<0,0001$). Tretman BHK-21/C-13 ćelija preparatom Now[®] L-karnozin u koncentraciji od 5 i 10 mM karnozina u medijumu za rast uslovio je smanjenje imunoreaktivnosti ispitivanog markera u mitohondrijama.



Slika 4.5.3. Reprezentativne mikrofotografije BHK-21/C-13 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM Now[®] L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM Now[®] L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM Now[®] L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .



Grafikon 4.6.1. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija bubrega hrčka. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < p < 0,0001$

4.5.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija

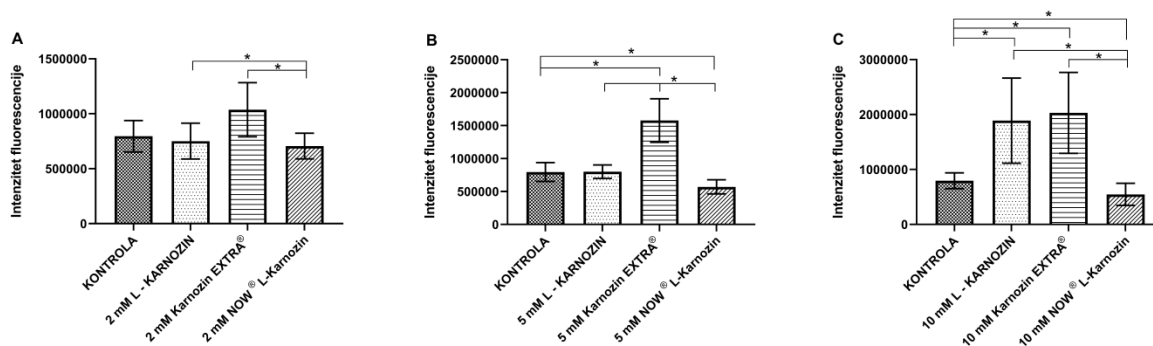
Na **Grafikonu 4.5.2A** predstavljen je uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija. Tretman preparatom Now® L-karnozin doveo je do statistički značajnog smanjenja izmerenih vrednosti TCCF u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F = 20,652$; $p < 0,0001$).

4.5.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija

Nakon 24 h tretmana BHK-21/C-13 ćelija koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata analizirane su vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije za SOD2 marker (**Grafikon 4.5.2B**). Postojanje statistički značajne razlike izmerenih vrednosti prisutno je pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa kao i pri poređenju grupa ćelija tretiranih preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u odnosu na kontrolnu grupu ($F = 20,652$; $p < 0,0001$). Tretman preparatom Karnozin EXTRA® uslovio je porast ekspresije ispitivanog markera, dok se sa druge strane u grupi ćelija nakon tretmana preparatom Now® L-karnozin beleži smanjenje imunofluorescentnog signala u odnosu na ostale grupe.

4.5.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 u mitohondrijama BHK-21/C-13 ćelija

Efekti sprovedenog tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na nivo ekspresije SOD2 markera u mitohondrijama ćelija bubrega hrčka prikazani su na **Grafikonu 4.5.2C**. Ćelije tretirane čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Karnozin EXTRA[®] pokazuju jači intenzitet signala u odnosu na kontrolnu kao i grupu tretiranu preparatom Now[®] L-karnozin ($F= 20,652$; $p<0,0001$). Nasuprot navedenog, značajni pad vrednosti TCCF za SOD2 prisutan je u grupi 10 mM Now[®] L-karnozin pri poređenju sa vrednosti izmerenim u kontrolnoj kao i ostalim eksperimentalnim grupama ($p<0,0001$).

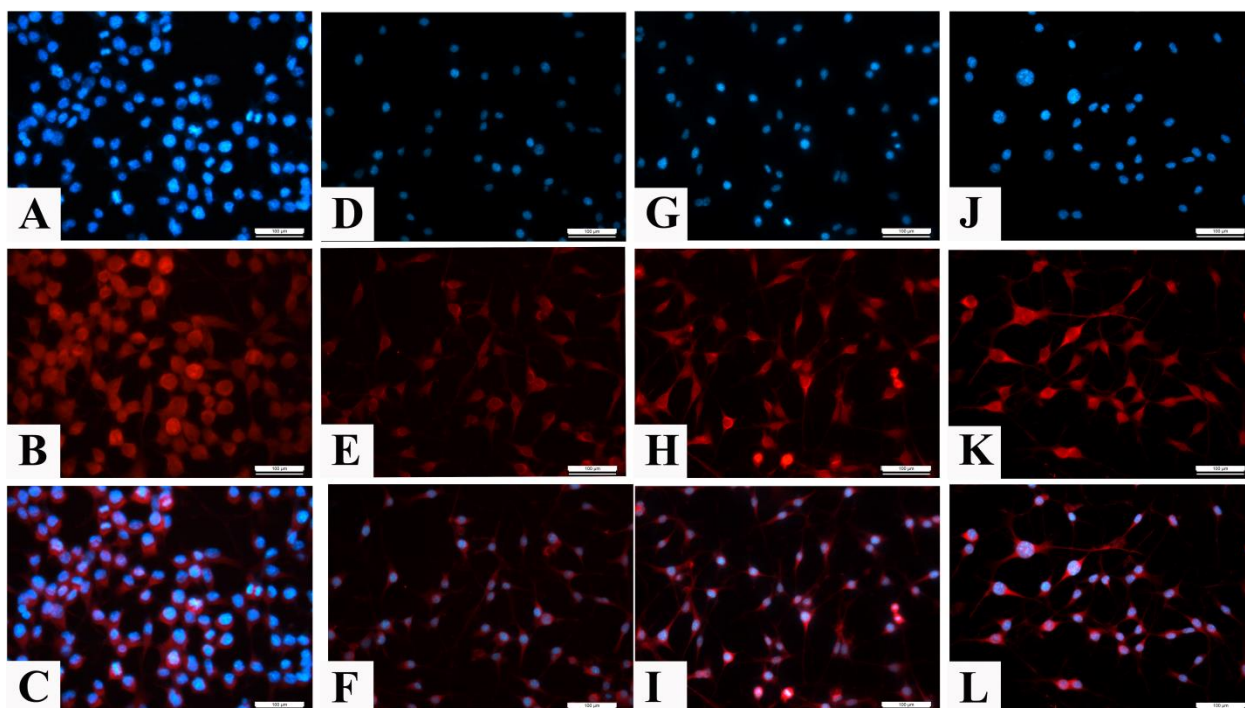


Grafikon 4.5.2. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA[®] i preparata Now[®] L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija bubrega hrčka nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A) 2 mM**, **B) 5 mM** i **C) 10 mM** karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < p<0,0001$

4.5.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)

4.5.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozina na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

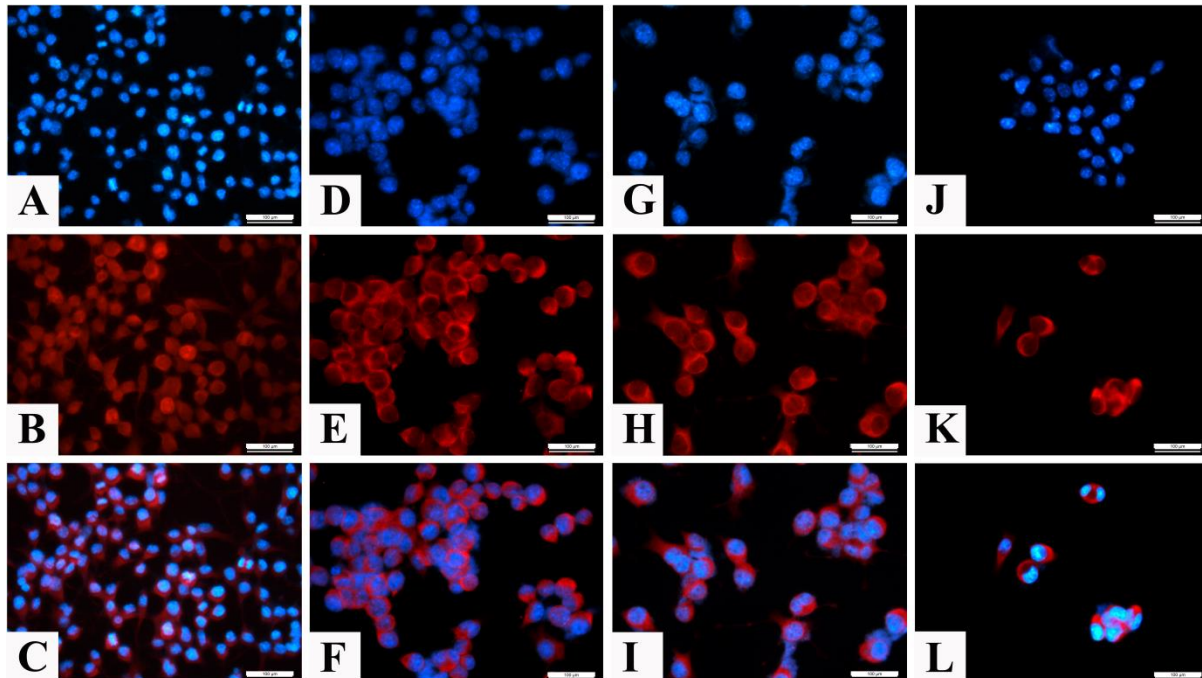
Na **Slici 4.5.4** prikazan je efekat različitih koncentracija čiste supstance L-karnozin na imunoreaktivnost SOD2 markera u mitohondrijama ispitivane ćelijske linije. Značajne različitosti evidentirane su pri međusobnom poređenju grupe ćelija tretirane koncentracijom od 10 mM L-karnozina u odnosu na ostale grupe ($F=15,234$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.5.3A**). Naime, u ovoj eksperimentalnoj grupi izmerene su najviše vrednosti TCCF za SOD2 marker.



Slika 4.5.4. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.5.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

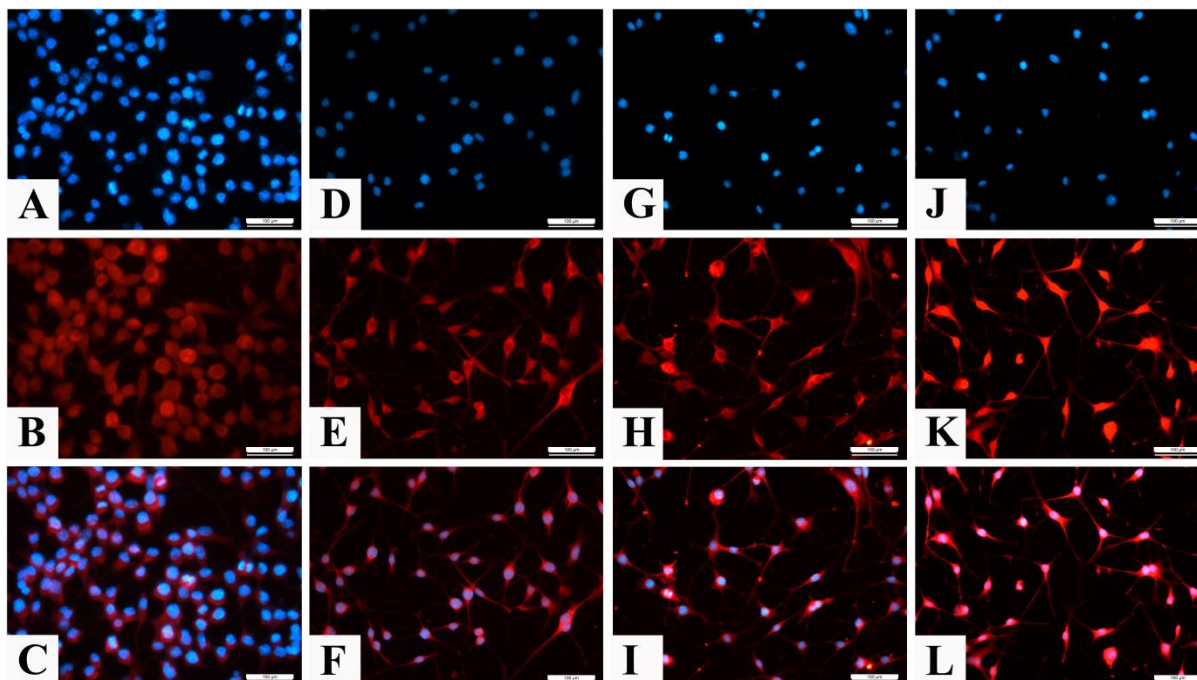
Na reprezentativnim mikrofotografijama (**Slika 4.5.5**) uočava se imunoreaktivnost SOD2 markera u mitohondrijama ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća nakon sprovedenog tretmana. Kvantifikovani rezultati TCCF vrednosti predstavljeni su na **Grafikonu 4.5.3B**. Postojanje statistički značajne razlike prisutno je nakon tretmana svim ispitivanim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnoj grupi, ali i poređenjem među eksperimentalnim grupama ($F=15,234$; $p<0,0001$). Tretman ćelija najvećom koncentracijom uslovio je najizraženije intenziviranje imunofluorescentnog signala.



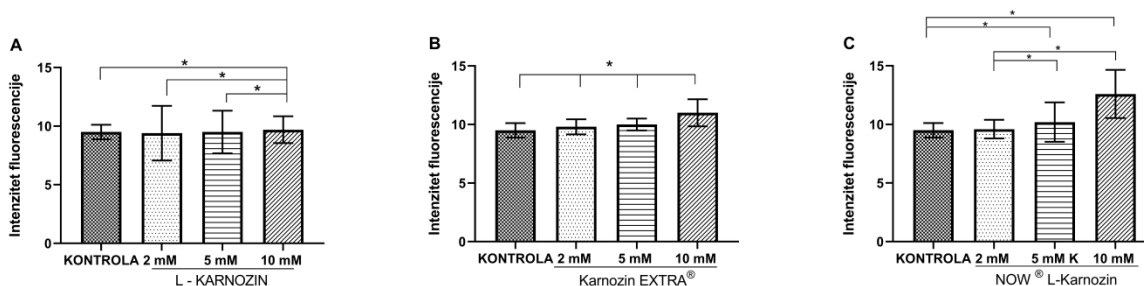
Slika 4.5.5. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®]. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA[®]: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA[®]: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA[®]: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μ m.

4.5.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

Rerezentativne mikrofotografije imunofluorescentnog bojenja na SOD2 u mitohondrijama ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća tretiranih različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin predstavljene su na **Slici 4.5.6**. U grupama 5 i 10 mM Now® L-karnozin beleži se porast vrednosti intenziteta imunofluorescencije uz postojanje statistički značajne razlike pri poređenju imunoreaktivnosti sa kontrolnom i grupom tretiranom 2 mM koncentracijom karnozina ($F=15,234$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.5.3C**).



Slika 4.5.6. Reprezentativne mikrofotografije MRC-5 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM Now® L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM Now® L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM Now® L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .



Grafikon 4.5.3. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija fetalnih fibroblasta pluća. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD. * $p < 0,0001$

4.5.2.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

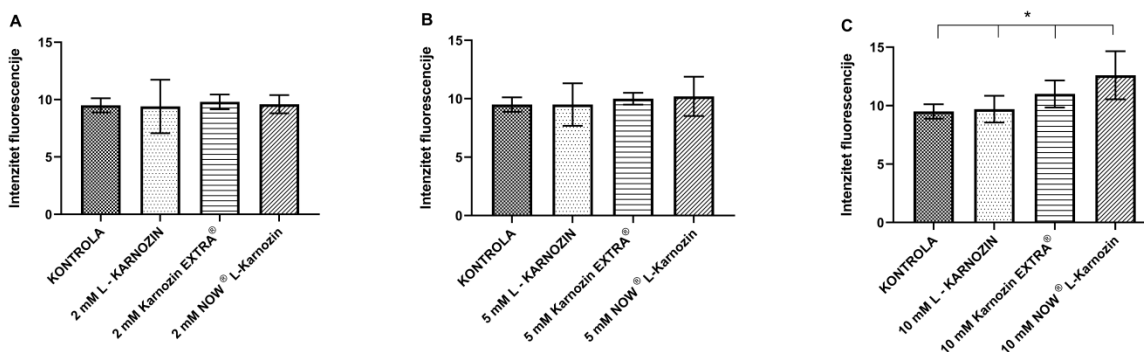
Na **Grafikonu 4.5.4A** prikazani su rezultati imunofluorescentnog bojenja MRC-5 ćelija na SOD2 marker nakon tretmana 2 mM koncentracijom karnozina iz ispitivanih preparata. Analizom izmerenih vrednosti nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike među grupama ($p > 0,05$).

4.5.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

Nakon *posthoc Games Howell* testa za nejednake varijanse utvrđeno je da u pogledu izmerenih vrednosti intenziteta fluorescencije za ispitivani marker nakon 24 h tretmana MRC-5 ćelija koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata, nema značajne različitosti među grupama ($p > 0,05$) (**Grafikon 4.5.4B**).

4.5.2.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MRC-5 ćelija

Efekti sprovedenog tretmana na nivo ekspresije SOD2 u mitohondrijama ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća prikazani su na **Grafikonu 4.5.4C**. Analizom vrednosti intenziteta fluorescencije kao i poređenjem istih među grupama evidentirano je postojanje značajne različitosti nakon tretman ispitivanim preparatima usled primene koncentracije od 10 mM karnozina ($F=15,234$; $p<0,0001$). Najniže izmerene vrednosti TCCF za ispitivani marker uočene su nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin, dok se najviše izmerene vrednosti uočavaju usled tretmana preparatom Now® L-karnozin.

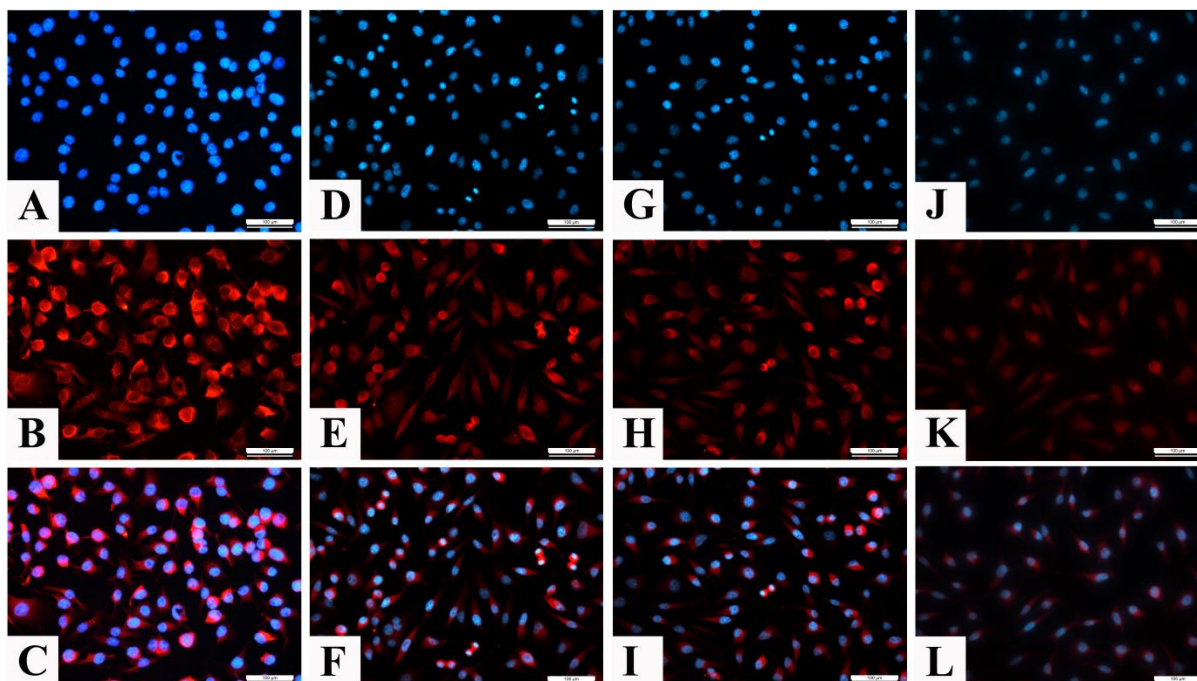


Grafikon 4.5.4. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA® i preparata Now® L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija fetalnih fibroblasta pluća nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,05$

4.5.3. Čelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

4.5.3.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

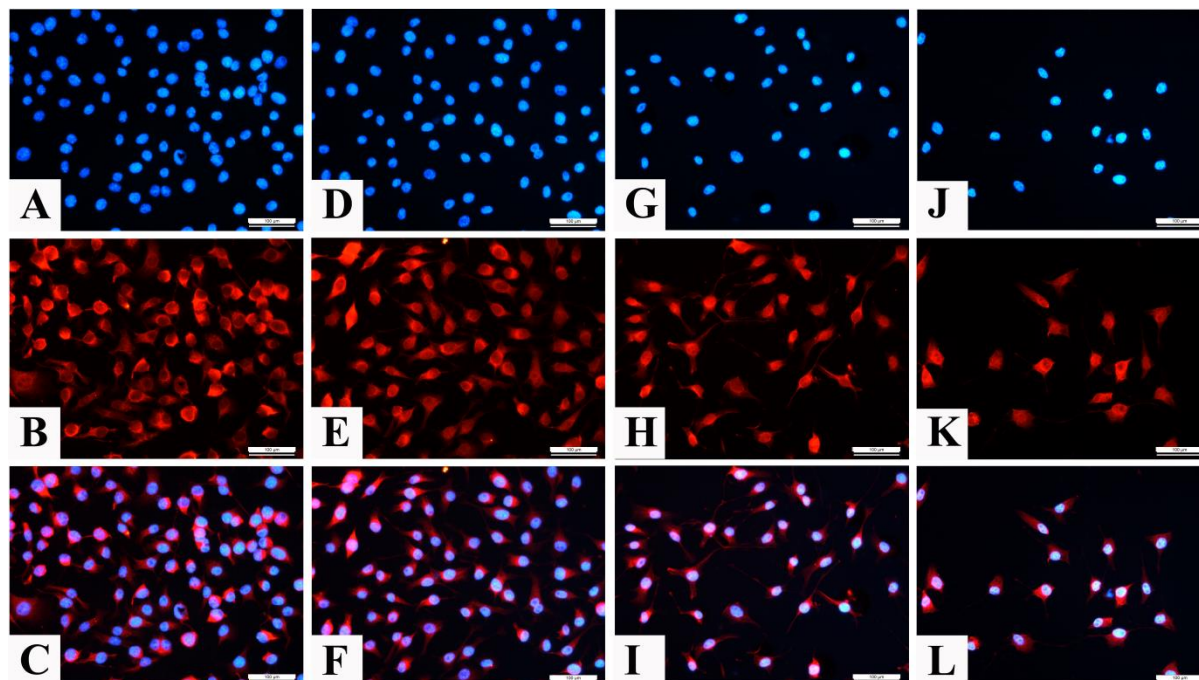
Analizirajući reprezentativne mikrofotografije MCF-7 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama L-karnozina zapaža se da je signal fluorescencije SOD2 evidentno slabiji u odnosu na netretiranu grupu ćelija (**Slika 4.5.7**). Sa **Grafikon 4.5.5A** uočeno je da su izmerene vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije za ispitivani marker u eksperimentalnim grupama statistički značajno niže u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($F=51,804$; $p<0,0001$).



Slika 4.5.7. Reprezentativne mikrofotografije MCF-7 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.5.3.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

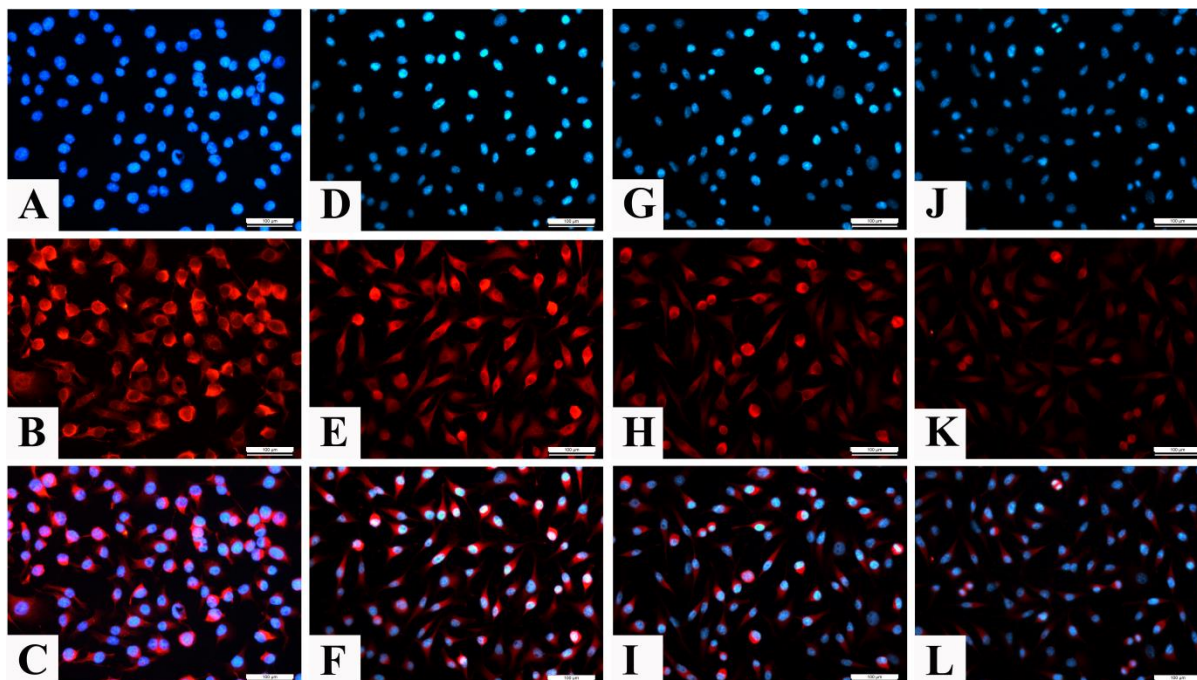
Na Slici 4.6.8 prikazana je ekspresija SOD2 markera imunofluorescentno obojenih MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Kvantifikacijom imunoreaktivnosti u mitohondrijama ćelija za ispitivani marker i nakon *posthoc Games Howell* testa utvrđeno je postojanje statistički značajne različitosti izmerenih vrednosti svih eksperimentalnih grupa niže vrednosti u odnosu na kontrolnu ($F=51,804$; $p<0,0001$) (Grafikon 4.5.5B).



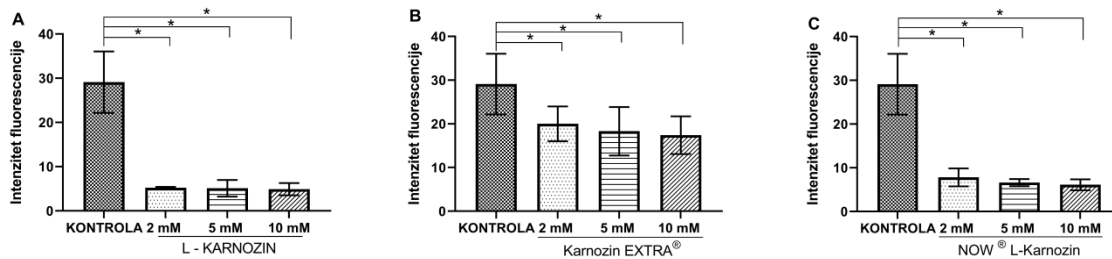
Slika 4.5.8. Reprezentativne mikrofotografije MCF-7 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA®: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA®: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA®: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.5.3.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

Nakon sprovedenog 24 h tretmana MCF-7 ćelija različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin vršeno je imunofluorescentno bojenje u cilju utvđivanja stepena ekspresije SOD2 u mitohondrijama ove ćelijske linije (Slika 4.5.9). Naime, prisustvo različite koncentracije karnozina u medijumu za rast ćelija doprinelo je smanjenju intenziteta imunoreaktivnosti kod svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu ($F=51,804$; $p<0,0001$) (Grafikon 4.5.5C).



Slika 4.5.9. Reprezentativne mikrofotografije MCF-7 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**crveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Kontrolna grupa: **A)** DAPI, **B)** vimentin i **C)** DAPI+vimentin; 2 mM Now® L-karnozin: **D)** DAPI, **E)** vimentin i **F)** DAPI+vimentin; 5 mM Now® L-karnozin: **G)** DAPI, **H)** vimentin i **I)** DAPI+vimentin; 10 mM Now® L-karnozin: **J)** DAPI, **K)** vimentin i **L)** DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .



Grafikon 4.5.5. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog adenokarcinoma dojke. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.5.3.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

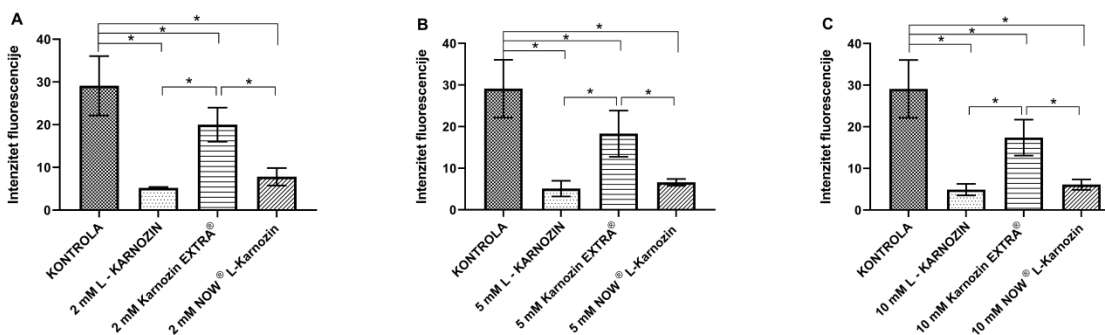
Na **Grafikonu 4.5.6A** predstavljeni su rezultati uticaja 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama MCF-7 ćelija. Sprovedeni tretman doveo je do statistički značajnog smanjenja vrednosti TCCF u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na izmerenu vrednost kod netretiranih ćelija ($F=51,804$; $p<0,0001$). Značajnije smanjenje ekspesije ispitivanog markera prisutno je u grupama ćelija tretiranih L-karnozinom i preparatom Now® L-karnozin u odnosu na grupu tretiranu karnozinom iz preparata Karnozin EXTRA®.

4.5.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

Analizirajući kvantifikovane vrednosti imunoreaktivnosti za SOD2 marker u mitohondrijama MCF-7 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata zapaža se da je TCCF znatno niži u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na netretiranu grupu ćelija ($F=51,804$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.5.6B**). U grupama ćelija tretiranih čistom supstancom L-karnozin i karnozinom iz preparata Now® L-karnozin uočavaju se statistički značajno niže vrednosti TCCF nego u grupi ćelija tretiranoj preparatom Karnozin EXTRA® ($p<0,0001$).

4.5.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama MCF-7 ćelija

Sa **Grafikona 4.5.6C** uočava se da je sprovedeni tretman koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata uslovio statistički značajno smanjenje vrednosti TCCF za SOD2 marker u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu ($F=51,804$; $p<0,0001$). Takođe, postojanje značajne razlike izmerenih vrednosti intenziteta fluorescencije prisutne su i pri poređenju grupe ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA[®] u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($p<0,0001$). Tretman čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Now[®] L-karnozin uslovili su izaženije smanjenje imunoreaktivnosti u odnosu na kontrolnu ali i grupu 10 mM Karnozin EXTRA[®].

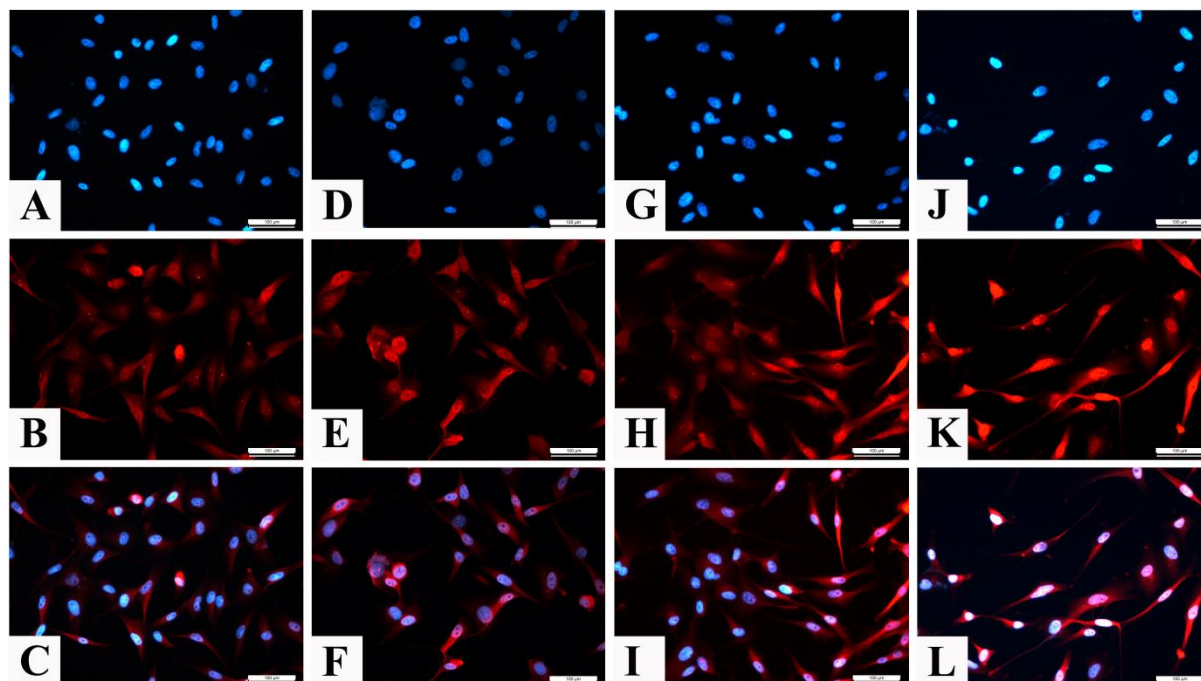


Grafikon 4.5.6. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA[®] i preparata Now[®] L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog adenokarcinoma dojke nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.5.4. Čelije humanog glioblastoma (U87)

4.5.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija

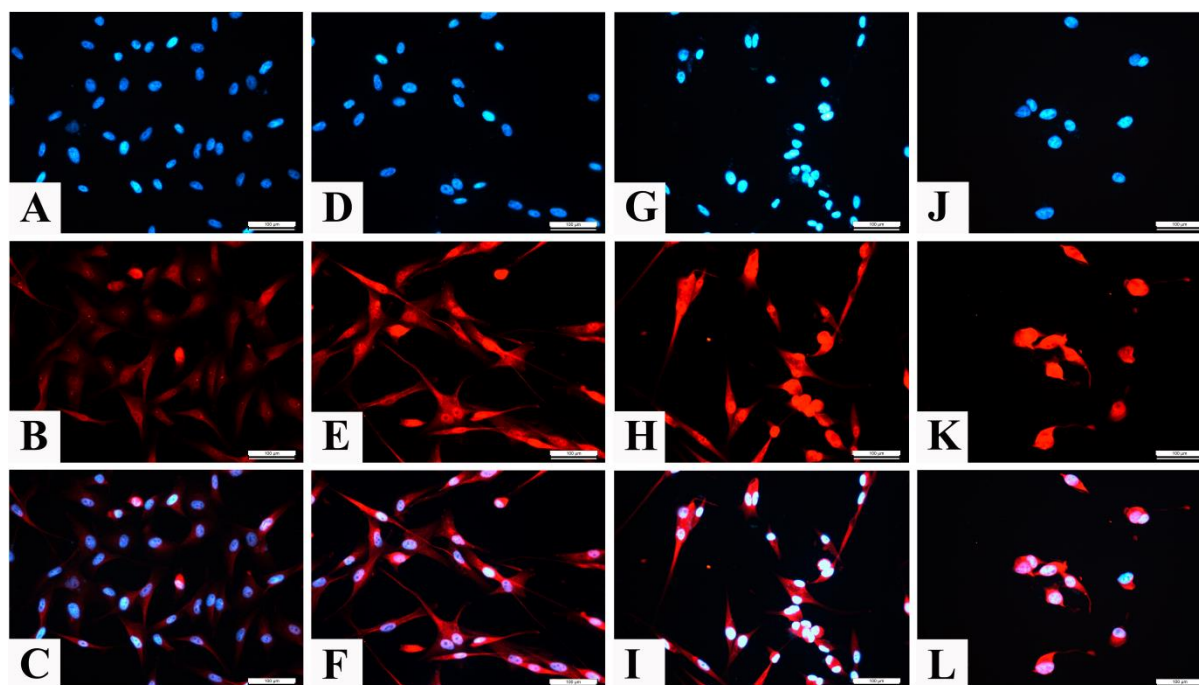
Nakon 24 h tretmana U87 ćelija različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina vršeno je imunofluorescentno bojenje u cilju utvđivanja stepena ekspresije SOD2 markera (**Slika 4.5.10**). Sa **Grafikona 4.5.7A** uočava se da izmerene vrednosti TCCF za ispitivani marker imaju trend dozno-zavisnog rasta, međutim statistički značajna razlika među grupama nije evidentirana ($p > 0,05$).



Slika 4.5.10. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**creveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μ m.

4.5.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija

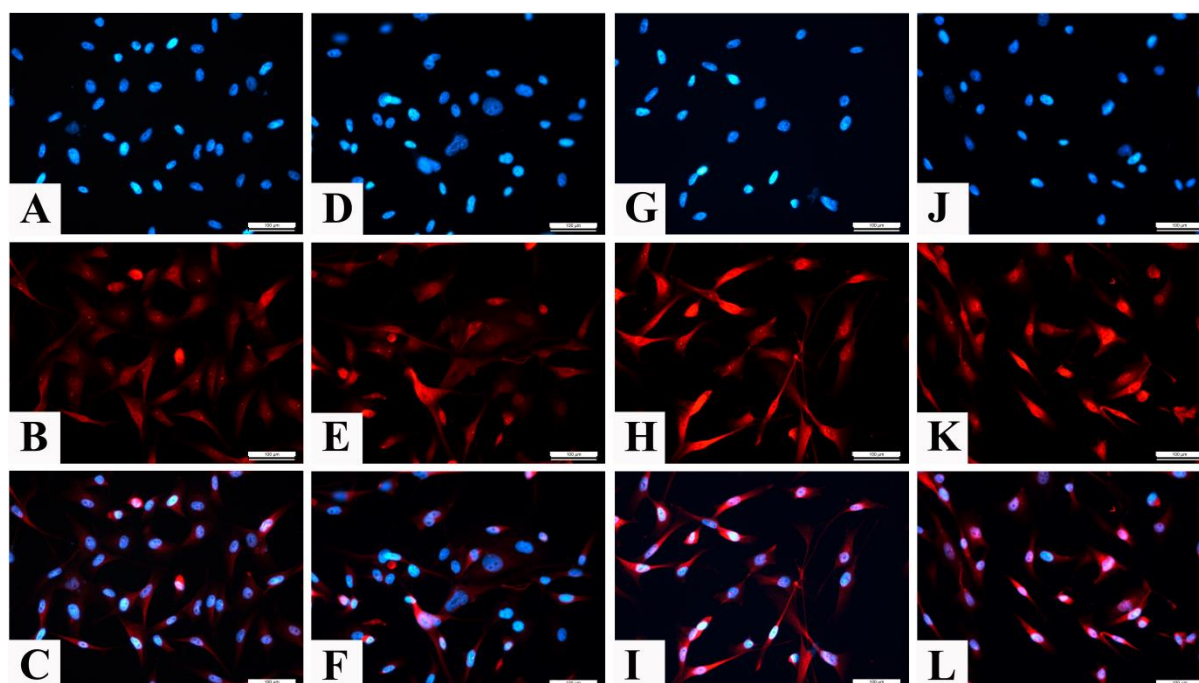
Efekti sprovedenog tretmana na nivo ekspresije SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog glioblastoma prikazani su na **Grafikonu 4.5.7B**. Analizom mikrofotografija (**Slika 4.5.11**) i kvantifikacijom rezultata stiče se utisak dozno-zavisnog porasta intenziteta fluorescencije. Međutim, statističkom obradom podataka nakon *posthoc Games Howell testa* za nejednake varijanse primećeno je da nema značajne razlike u izmerenim vrednostima ($p > 0,05$).



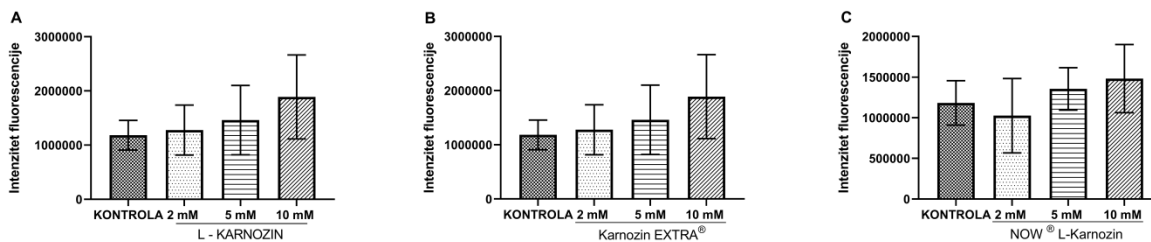
Slika 4.5.11. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**creveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM Karnozin EXTRA®: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM Karnozin EXTRA®: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM Karnozin EXTRA®: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .

4.5.4.3. Uticaj preparata Now[®] L-karnozin na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija

Analizirajući reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama preparata Now[®] L-karnozin zapaža se da je signal fluorescencije SOD2 u mitohondrijama naglašeniji u odnosu na netretiranu grupu ćelija (**Slika 4.5.12**). Upotrebom *posthoc Games Howell* testa za nejednake varijanse nije evidentirano postojanje statistički značajne razlike među grupama ($p > 0,05$) (**Grafikonu 4.5.7C**).



Slika 4.5.12. Reprezentativne mikrofotografije U87 ćelija obeleženih imunofluorescentnim bojenjem na SOD2 (**creveni signal**) uz obeležavanje jedara DAPI bojom (**plavi signal**), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now[®] L-karnozin. Kontrolna grupa: **A**) DAPI, **B**) vimentin i **C**) DAPI+vimentin; 2 mM Now[®] L-karnozin: **D**) DAPI, **E**) vimentin i **F**) DAPI+vimentin; 5 mM Now[®] L-karnozin: **G**) DAPI, **H**) vimentin i **I**) DAPI+vimentin; 10 mM Now[®] L-karnozin: **J**) DAPI, **K**) vimentin i **L**) DAPI+vimentin. Fotografije su uslikane pri uveličanju 400x, skala 50 μm .



Grafikon 4.5.7. Efekat **A)** čiste supstance L-karnozina, **B)** preparata Karnozin EXTRA® i **C)** preparata Now® L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog glioblastoma. Ispitivane ćelije su inkubirane sa različitim koncentracijama karnozina tokom 24 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD. * $p < 0,0001$

4.5.4.4. *Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija*

Na **Grafikonu 4.5.8A** prikazane su vrednosti intenziteta fluorescencije za SOD2 marker u mitohondrijama humanog glioblastoma nakon 24 h tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. Postojanje statistički značajne razlike u pogledu izmerenih vrednosti među grupama nije evidentirano ($p > 0,05$).

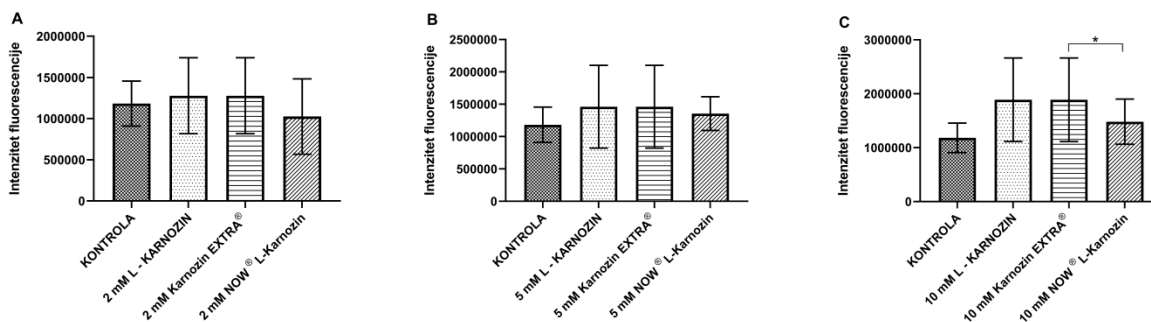
4.5.4.5. *Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija*

Kvantifikacijom rezultata nakon imunofluorescentnog bojenja i statističkom obradom podataka primećeno je nepostojanje statistički značajne razlike izmerenih vrednosti intenziteta imunofluorescentnog signala za SOD2 marker ćelija humanog glioblastoma usled tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata ($p > 0,05$) (**Grafikona 4.5.8B**).

4.5.4.6. *Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na intenzitet fluorescencije SOD2 markera u mitohondrijama U87 ćelija*

Nakon sprovedenog 24 h tretmana U87 ćelija karnozinom iz ispitivanih preparata u koncentraciji od 10 mM vršeno je imunofluorescentno bojenje u cilju utvrđivanja stepena

ekspresije SOD2 u mitohondrijama. Sa **Grafikona 4.5.8C** uočava se da nije evidentirano postojanje statistički značajne razlike pri poređenju izmerenih vrednosti u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolu ($p > 0,05$). Analizom intenziteta fluorescencije nakon tretmana ćelija preparatom Karnozin EXTRA[®] primećuje se intenziviranje jačine signala u odnosu na grupu ćelija tretiranih preparatom Now[®] L-karnozin ($F=7,461$; $p < 0,0001$).



Grafikon 4.5.8. Efekat čiste supstance L-karnozina, preparata Karnozin EXTRA[®] i preparata Now[®] L-karnozin na ekspresiju SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog glioblastoma nakon 24 h tretmana koncentracijom od **A)** 2 mM, **B)** 5 mM i **C)** 10 mM karnozina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.6. Efekti ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije nakon tretmana kontinuiranih ćelijskih linija

4.6.1. Ćelije bubrega hrčka (BHK-21/C-13)

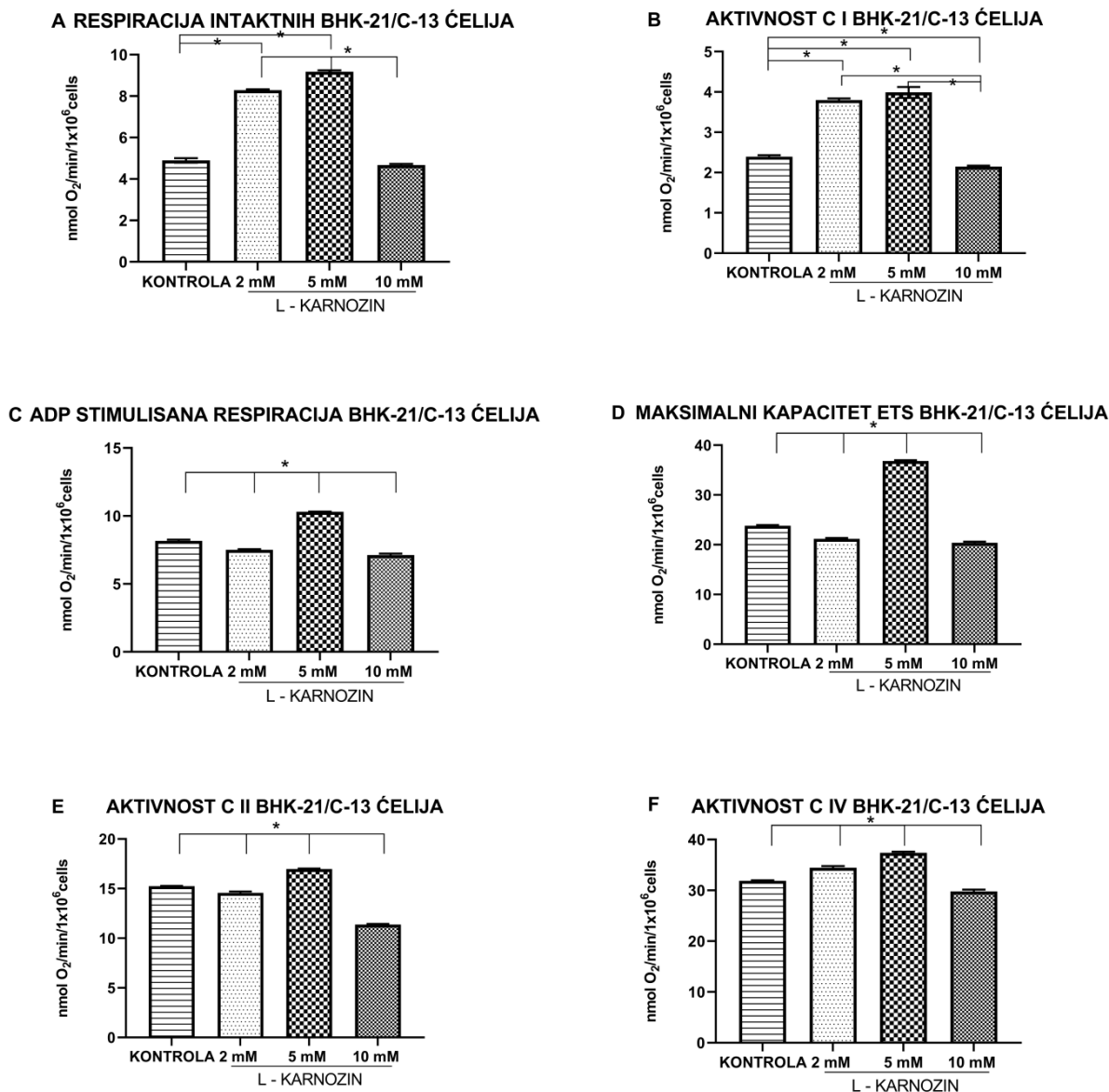
Kako bi aplikovana koncentracija egzogenih supstrata bila adekvatna i uniformna, prvenstveno je određena koncentracija digitonina koja je potrebna za narušavanje integriteta ćelijske membrane kontinuirane ćelijske linije bubrega hrčka. Primenom adekvatnog protokola kao i titracijom supstrata i inhibitora utvrđeno je da je potrebna administracija digitonina od 5 µg/ml.

4.6.1.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija

Izmerene vrednosti stope respiracije ispitivanih parametara mitohondrija BHK-21/C-13 ćelija nakon sprovedenog 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina predstavljene su na **Grafikonu 4.6.1A-F**. U pogledu vrednosti stope potrošnje kiseonika analiziranih parametara predstavljenih na **Grafikonima 4.6.1C-F** prisutan je isti trend. Tretman koncentracijom od 2 i 5 mM L-karnozina uzrokovao je statistički značajan porast izmerenih vrednosti u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe ($p < 0,0001$). Dok je sa druge strane u grupi 10 mM L-karnozin zabeležen značajan pad vrednosti analiziranih parametara mitohondrijske respiracije u odnosu na ostale eksperimentalne kao i grupu netretiranih ćelija ($p < 0,0001$).

Analizom izmerenih vrednosti respiracije „intaktnih ćelija“ bubrega hrčka nakon sprovedenog tretmana uočava se postojanje statistički značajne razlike pri poređenju grupa ćelija teretiranih koncentracijom od 2 i 5 mM karnozina u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ($F=18941,594$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.1A**). Takođe, poređenjem izmerenih vrednosti eksperimentalnih grupa u pogledu ovog parametra beleži se prisustvo statistički značajne razlike ($F=18941,594$; $p < 0,0001$). Najniža izmerena vrednost stope respiracije prisutna je u grupi 10 mM L-karnozin.

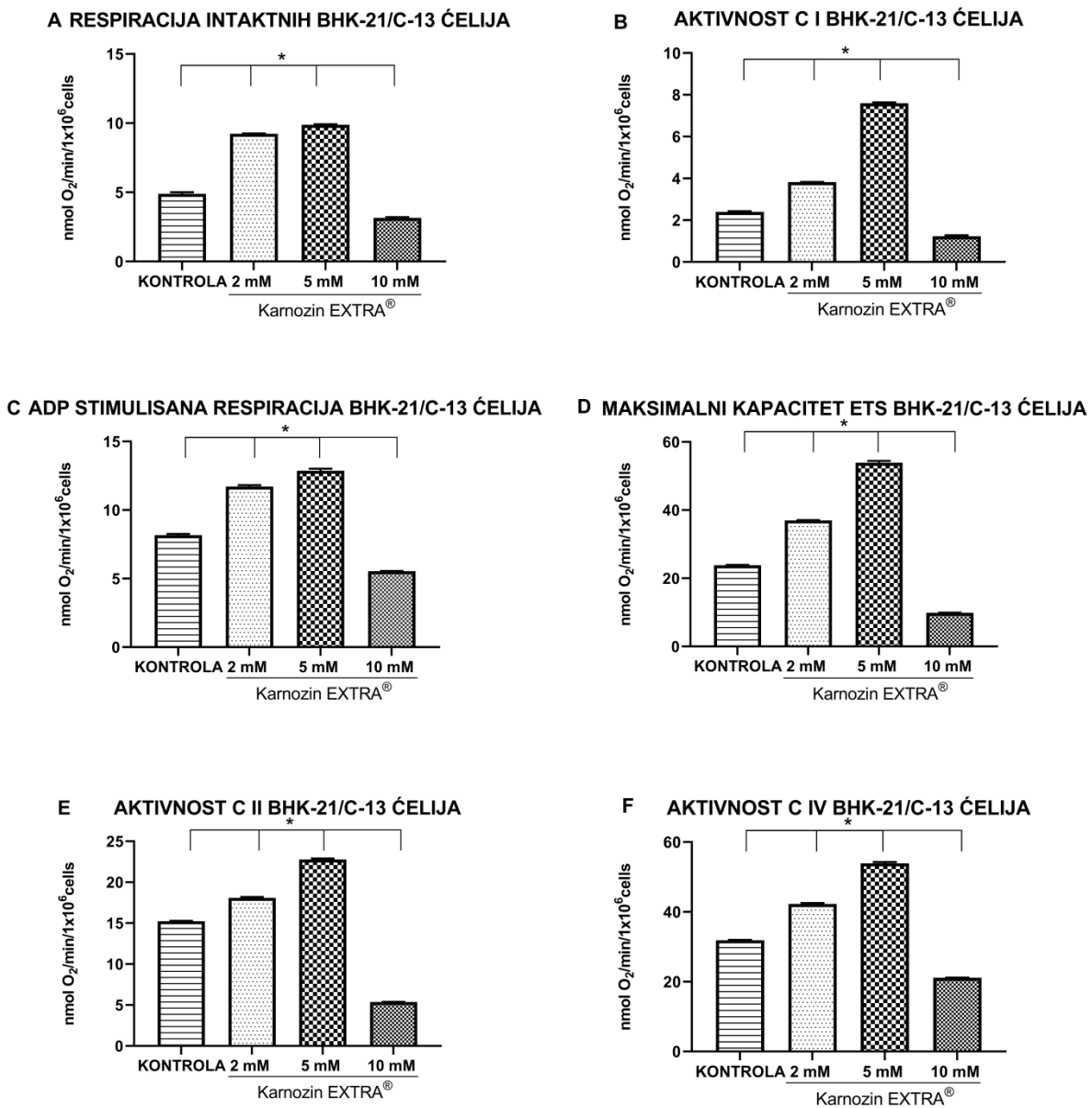
Na **Grafikonu 4.6.1B** predstavljeni su efekti sprovedenog tretmana na aktivnost kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija BHK-21/C-13 ćelija. Uočava se postojanje statistički značajne razlike pri poređenju vrednosti eksperimentalnih grupa sa kontrolnom ($F=15997,329$; $p<0,0001$). Naime, sprovedeni tretman koncentracijom od 2 i 5 mM karnozina uslovio je stimulaciju aktivnosti ovog kompleksa dok je sa druge strane tretman koncentracijom od 10 mM karnozina uslovio smanjenje aktivnosti ovog parametra ($F=15997,329$; $p<0,0001$).



Grafikon 4.6.1. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.1.2. *Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija*

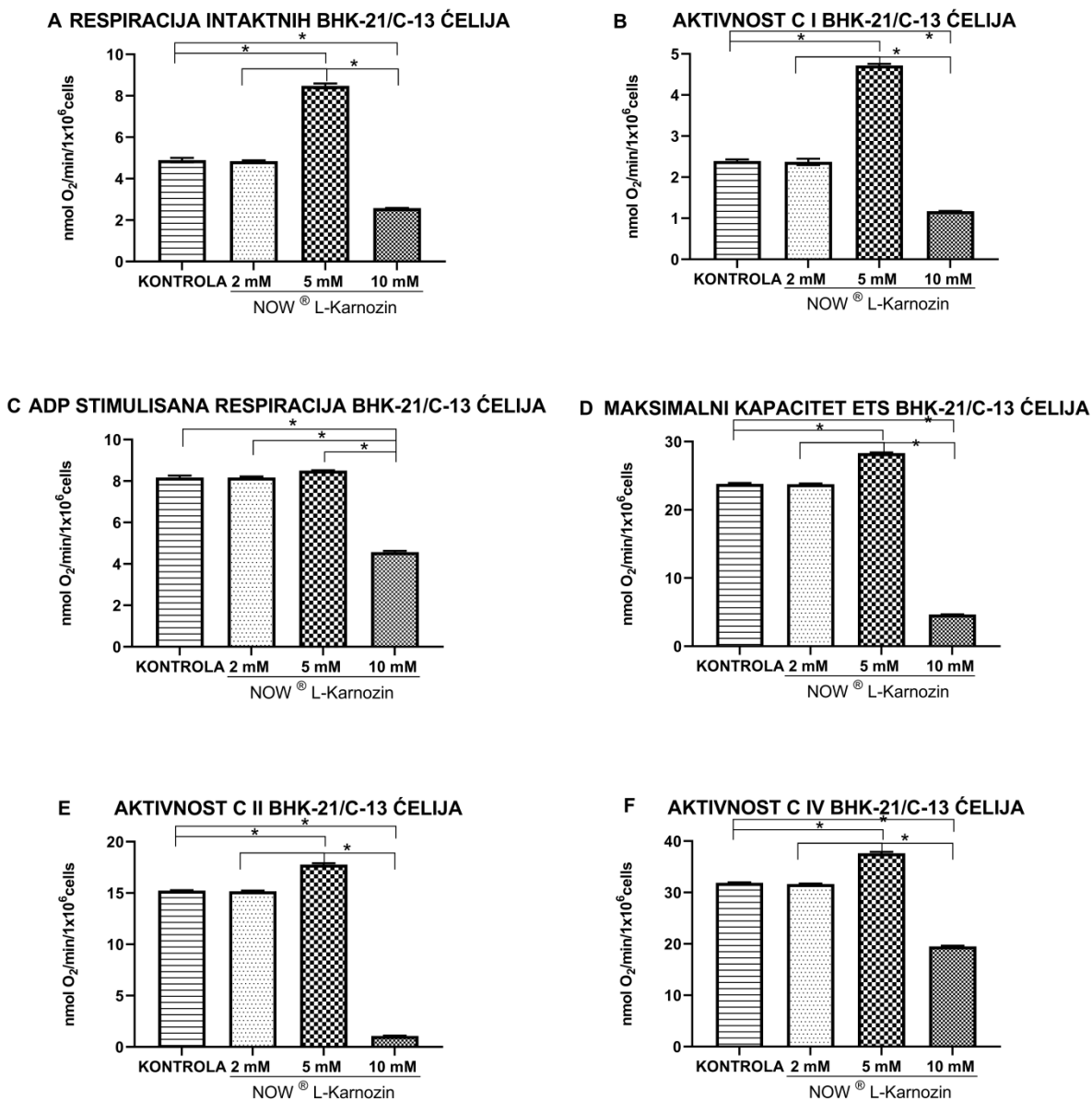
Na **Grafikonu 4.6.2A-F** predstavljeni su rezultati dobijeni merenjem parametara mitohondrijske respiracije nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Poređenjem izmerenih vrednosti potrošnje kiseonika među eksperimentalnim grupama prisutna je značajna razlika u pogledu svih analiziranih parametara ($p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.2A-F**). Naime, evidentan je statistički značajan porast stope respiracije ćelija u grupama 2 i 5 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$). Nasuprot navedenog, u grupi ćelija tretiranih koncentracijom od 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® beleži se postojanja značajnog pada stope potrošnje kiseonika svih analiziranih parametara u odnosu na vrednosti izmerene kod netretiranih ćelija ($p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.2. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.1.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija

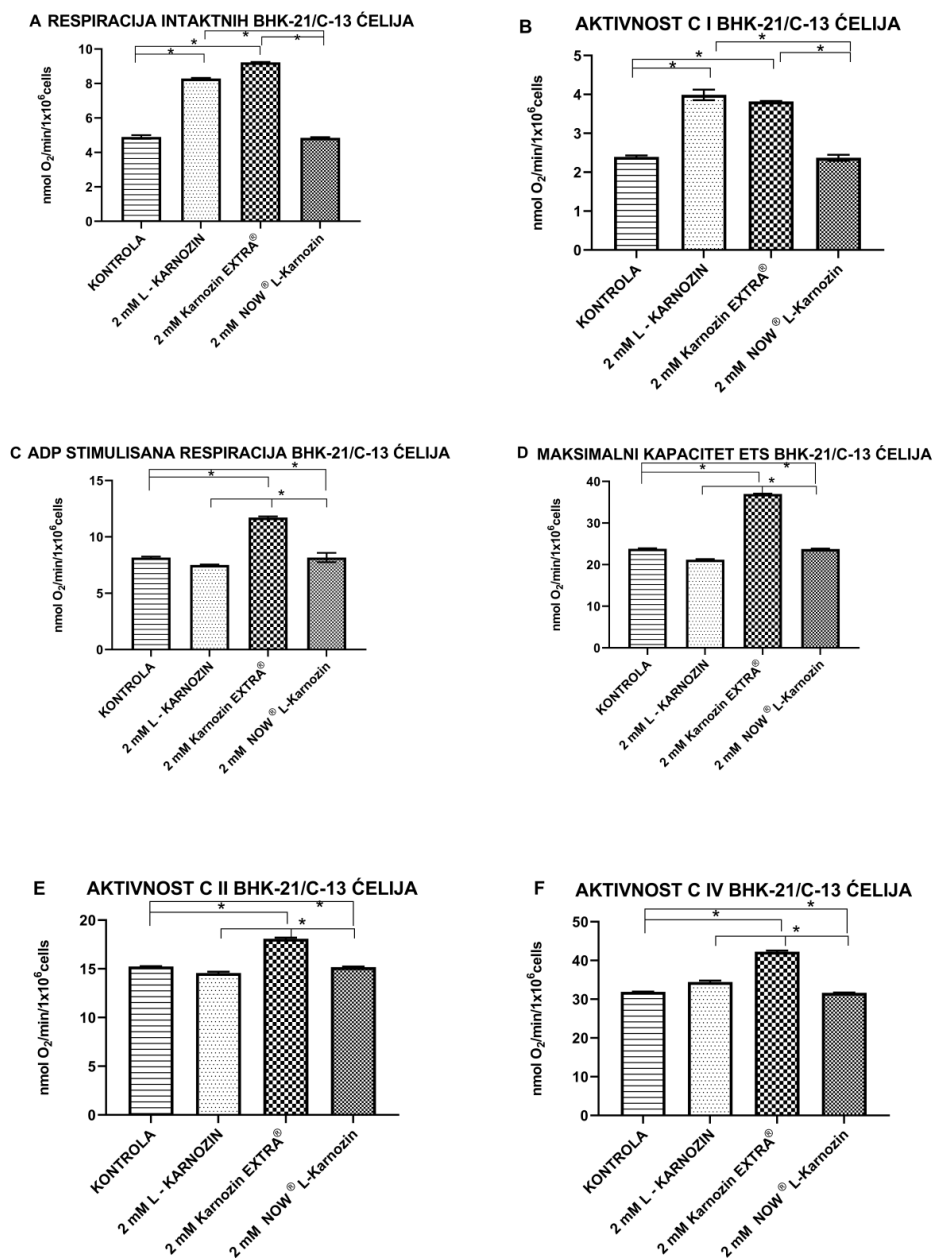
Stopa respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon sprovedenog tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozina predstavljena je na **Grafikonu 4.6.3A-F**. Poredivši vrednosti analiziranih parametara nakon tretmana koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata uočeno je postojanje statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$) (**Grafikonu 4.6.3A, B i D-F**). U grupi 5 mM Now® L-karnozin došlo je do najizraženijeg povećanja stope potrošnje kiseonika u odnosu na kontrolnu i preostale eksperimentalne grupe. Međutim, sa druge strane ćelije tretirane koncentracijom od 10 mM karnozina pokazuju značajan pad izmerenih vrednosti u odnosu na ostale eksperimentalne kao i u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.3. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.1.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija

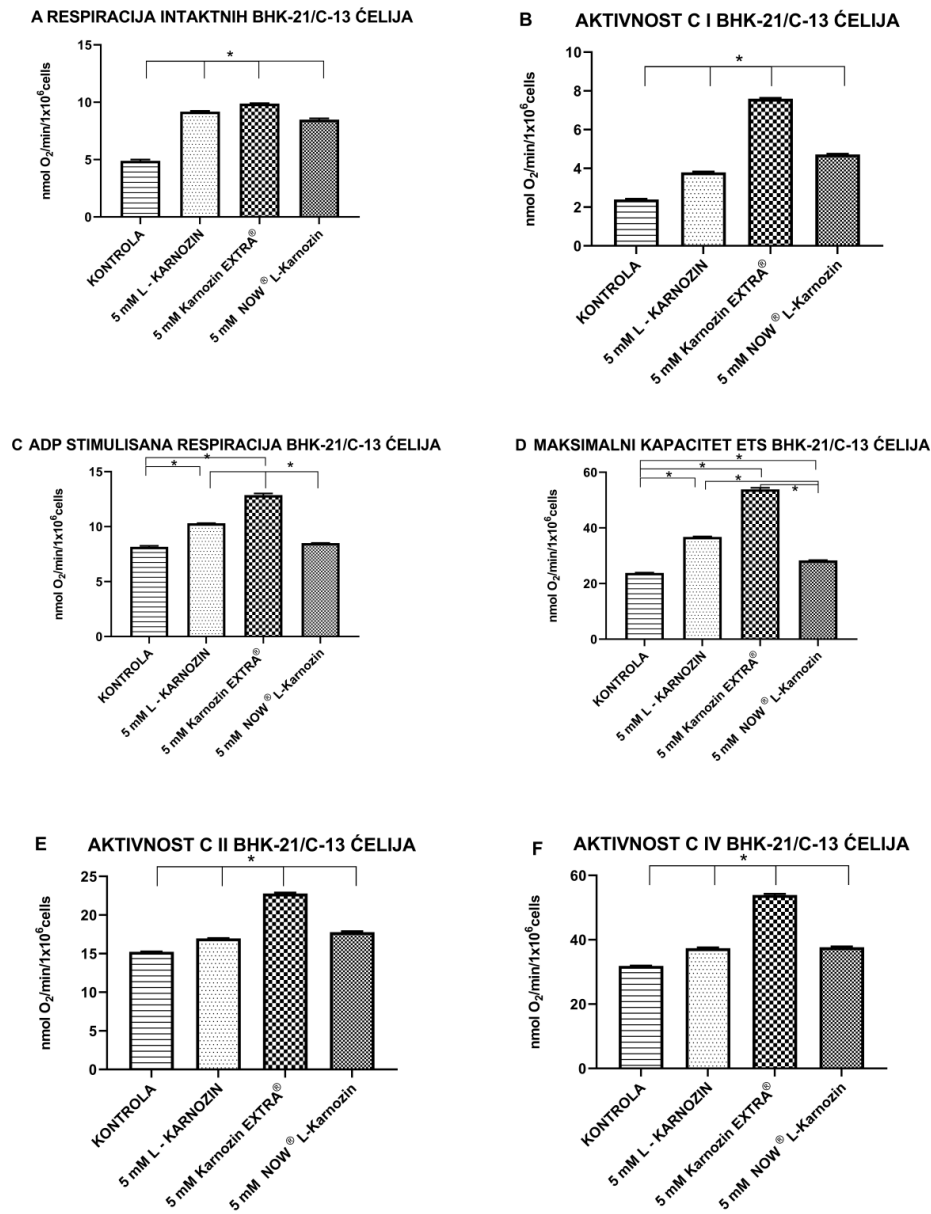
Na **Grafikonu 4.6.4A-F** prikazane su izmerene vrednosti stepena respiracije pri analizi parametara koji govore o bioenergetskim karakteristikama mitohondrija nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. Primećuje se postojanje statistički značajne razlike izmerenih vrednosti u grupama tretiranim čistom supstancom L-karnozina i karnozinom iz preparata Karnozin EXTRA[®] u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi ($p < 0,0001$). Postojanje razlike u izmerenim vrednostima ispitivanih parametara takođe je prisutno i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($p < 0,0001$). Naime, sprovedeni tretman L-karnozinom kao i preparatom Karnozin EXTRA[®] doveo je do stimulacije respiracije te se u ovim eksperimentalnim grupama beleži porast stope potrošnje kiseonika u odnosu na netretiranu grupu ćelija. Tretman preparatom Karnozin EXTRA[®] uslovio je najizraženiji porast stope respiracije svih analiziranih parametara, dok sa druge strane pri primeni preparata Now[®] L-karnozina nije evidentirano postojanje značajne razlike u stopi potrošnje kiseonika u odnosu na izmerene vrednosti u kontrolnoj grupi.



Grafikon 4.6.4. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.6.1.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija

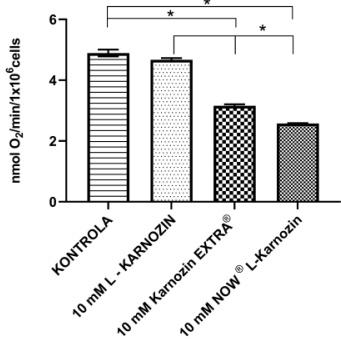
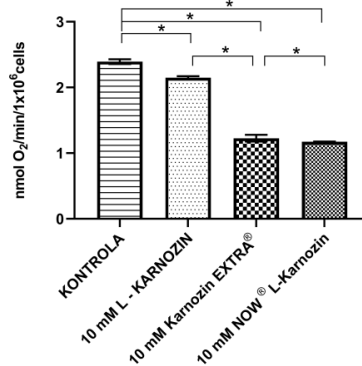
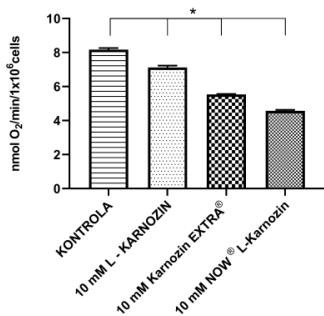
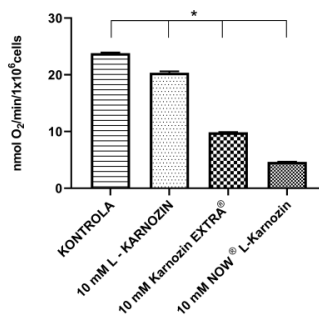
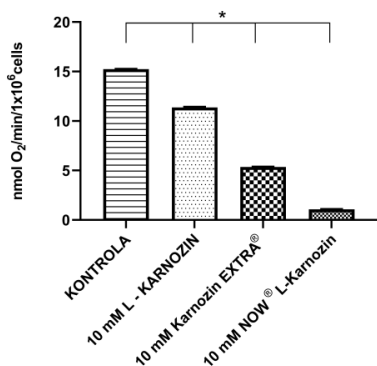
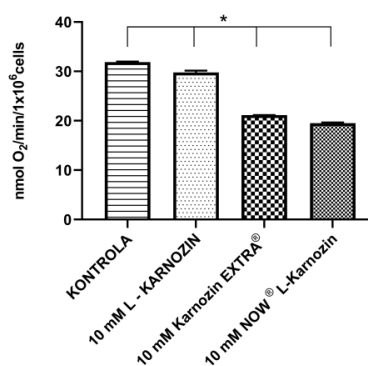
Na **Grafikonu 4.6.5A-F** predstavljeni su rezultati dobijeni merenjem parametara mitohondrijske respiracije nakon 24 h tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata. Evidentno je postojanje stimulacije respiracije nakon sprovedenog tretmana u vrednostima svih analiziranih parametara u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$). U grupi 5 mM Karnozin EXTRA® ćelije pokazuju najveći stepen potrošnje kiseonika u odnosu na ostale grupe tretiranih ćelija ($p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.5. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.1.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija

Efekati sprovedenog tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija prikazani su na **Grafikonu 4.6.6A-F**. Beleži se postojanje statistički značajne razlike izmerenih vrednosti u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu kao i pri međusobnom poređenju tretiranih grupa ćelija **Grafikonu 4.6.6C-F** ($p < 0,0001$). Sprovedeni tretmani usloveli su trend smanjenja stope respiracije u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na grupu netretiranih ćelija. Najveći inhibitorni uticaj na stopu potrošnje kiseonika svih ispitivanih parametara prisutan je u grupi 10 mM Now[®] L-karnozin.

A RESPIRACIJA INTAKTNIH BHK-21/C-13 ČELIJA**B AKTIVNOST C I BHK-21/C-13 ČELIJA****C ADP STIMULISANA RESPIRACIJA BHK-21/C-13 ČELIJA****D MAKSIMALNI KAPACITET ETS BHK-21/C-13 ČELIJA****E AKTIVNOST C II BHK-21/C-13 ČELIJA****F AKTIVNOST C IV BHK-21/C-13 ČELIJA**

Grafikon 4.6.6. Parametri mitohondrijske respiracije BHK-21/C-13 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD.

* $p < 0,0001$

4.6.2. Humani fetalni fibroblasti pluća (MRC-5)

U cilju permeabilizacije ćelijske membrane humanih fetalnih fibroblasta pluća prvenstveno je određena koncentracija digitonina aplikacijom supstrata kao i inhibitora u komoru reakcinog suda aparata *Oxygraph plus*. Utvrđeno je da je potrebno 20 µg/ml digitonina za narušavanje integriteta ćelijske membrane a da se pritom ne ošteti spoljašnja membrana mitohondrija i ne izazove posledično oslobađanje citohroma c.

4.6.2.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija

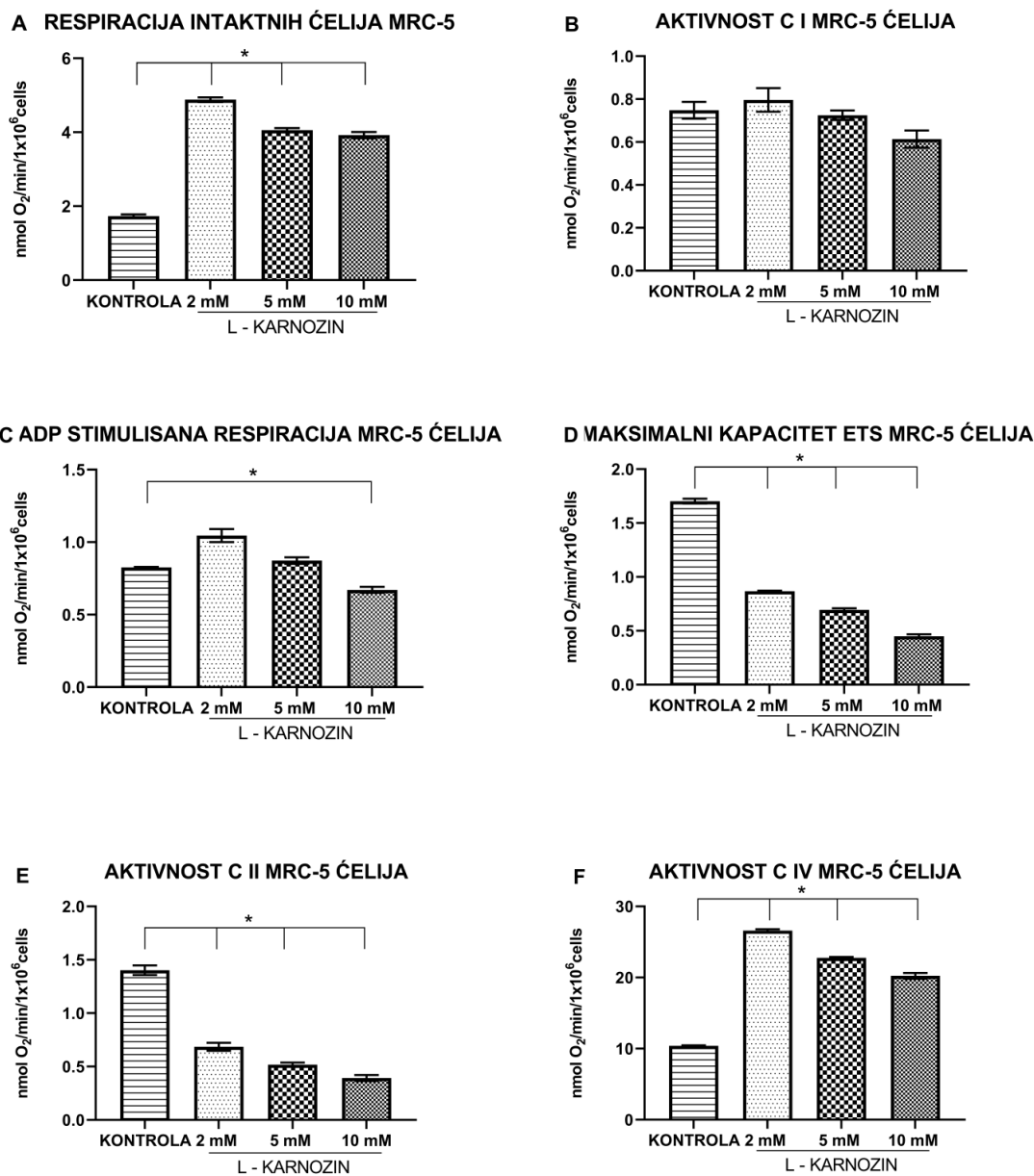
Na **Grafikonu 4.6.7A-F** prikazani su efekti primene različitih koncentracija čiste supstance L-karnozina na ispitivane parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija.

Primena čiste supstance L-karnozina u sve tri ispitivane koncentracije uslovlila je porast stope potrošnje kiseonika koji je prisutan pri analizi vrednosti respiracije "intaknih ćelija" humanih fetalnih fibroblasta pluća (**Grafikon 4.6.7A**), a takođe isti trend se beleži i kada je u pitanju aktivnost C IV (**Grafikon 4.6.7F**). Razlika u izmerenim vrednostima prisutna je i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($F= 2927,258$; $p<0,0001$).

U pogledu izmerenih vrednosti stope potrošnje kiseonika koje govore u prilog aktivnosti C I, sprovedeni tretman različitim koncentracijama L-karnozina nije uzrokovao promenu vrednosti u odnosu na grupu netretiranih (**Grafikon 4.6.7B**) ($p>0,05$).

Nakon administracije ADP-a koji stimulise transport elektrona duž respiratornog lanca mitohondrija, stopa potrošnje kiseonika je bila znatno niža u grupi ćelija tretiranoj 10 mM L-karnozinom pri poređenju sa kontrolnom (**Grafikon 4.6.7C**) ($F= 368,618$; $p<0,0001$).

Značajno smanjenje stope respiracije registrovano je i pri analizi vrednosti maksimalnog kapaciteta ETS mitohondrija (**Grafikon 4.6.7D**) ($F= 564,349$; $p<0,0001$) kao i pri analizi aktivnosti C II nakon sprovedenog tretmana u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi (**Grafikon 4.6.7E**) ($F= 236,141$; $p<0,0001$). Naime, zabeleženo je dozno-zavisno smanjenje potrošnje kiseonika.



Grafikon 4.6.7. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

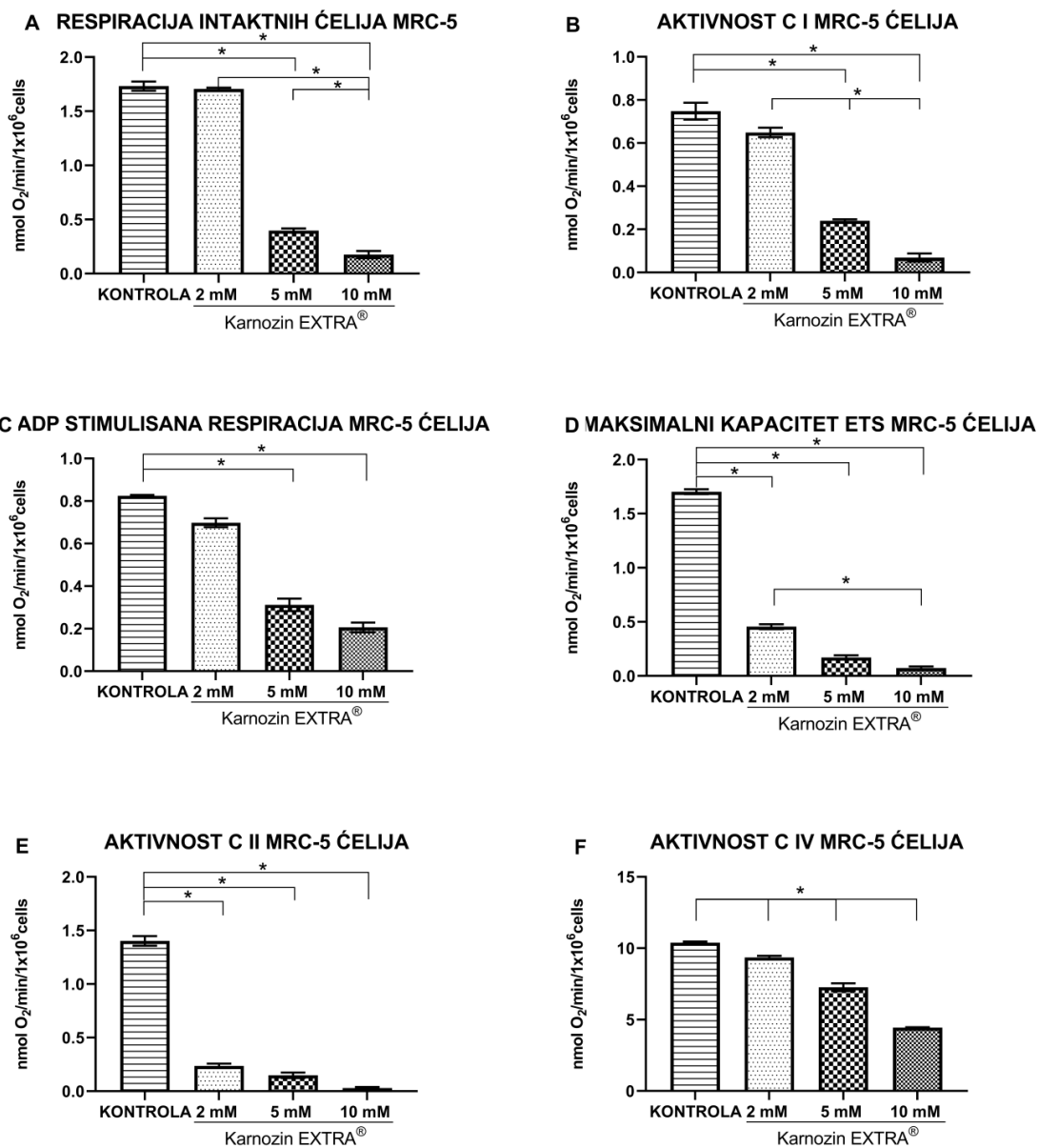
4.6.2.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija

Na **Grafikonu 4.6.8A-F** predstavljene su izmerene vrednosti ispitivanih parametara mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. Utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u pogledu svih analiziranih parametara pri poređenju izmerenih vrednosti stope respiracije grupa ćelija tretiranih koncentracijom od 5 i 10 mM karnozina u odnosu na kontrolnu ($p < 0,0001$). Pored navedenog, sprovedeni tretman koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanog preparata uslovio je smanjenje vrednosti stope respiracije koje govore u prilog smanjenja maksimalnog kapaciteta ETS mitohondrija, kao i o aktivnosti C II i C IV pri poređenju sa vrednostima kontrolne grupe (**Grafikoni 4.6.8D, E i F**) ($F=564,349$; $F=236,141$ i $F=64549,919$; $p < 0,0001$).

U pogledu vrednosti koje govore o respiraciji "intaktnih ćelija" primećuje se postojanje statistički značajne razlike pri poređenju grupe 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na grupe ćelija tretirane koncentracijom od 2 i 5 mM karnozina iz ispitivanog preparata (**Grafikon 4.6.8A**) ($F=2927,258$; $p < 0,0001$). Naime, nakon sprovedenog tretmana ćelija humanih fibroblasta pluća koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata prisutano je izrazito smanjenje stope potrošnje kiseonika u odnosu na ostale eksperimentalne grupe.

Analizirajući vrednosti stope potrošnje kiseonika koje odražavaju aktivnost C I i C IV uočava se prisustvo dozno-zavisnog smanjenja nakon sprovedenih tretmana (**Grafikoni 4.6.8B i F**) ($F=473,724$ i $F=64549,919$; $p < 0,0001$).

Postojanje statistički značajne razlike evidentirano je pri poređenju vrednosti maksimalnog kapaciteta ETS nakon tretmana koncentracijom od 2 i 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata, pri čemu je koncentracija od 10 mM uzrokovala drastičan pad stope potrošnje kiseonika (**Grafikon 4.6.8F**) ($F=564,349$; $p < 0,0001$).



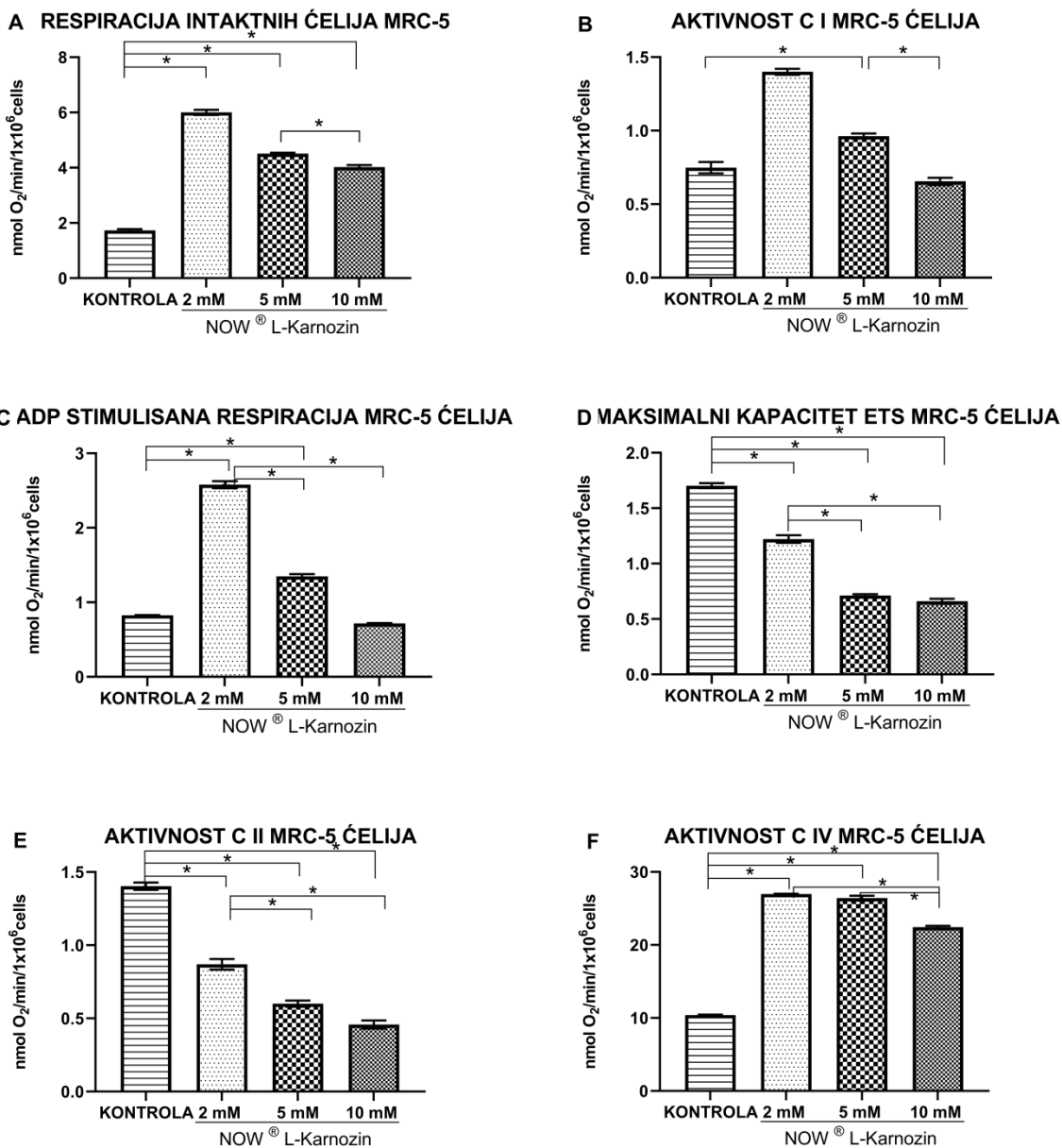
Grafikon 4.6.8. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.2.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija

Efekti sprovedenog tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelijske linije predstavljeni su na **Grafikonu 4.6.9A-F**. Analizirajući vrednosti ispitivanih parametara uočava se da je statistički značajna razlika prisutna pri poređenju eksperimentalnih grupa sa kontrolnom (**Grafikoni 4.6.9A,D-F**) ($p < 0,0001$). Dok sa druge strane, kada je u pitanju aktivnost C I postojanje iste beleži se samo nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanog preparata u odnosu na kontrolnu grupu (**Grafikon 4.6.9B**) ($F=473,724$; $p < 0,0001$). Nakon administracije ADP-a statistički značajna razlika je evidentna pri poređenju grupa tretiranih koncentracijom od 2 i 5 mM karnozina iz preparata Now® L-karnozin u odnosu na grupu netretiranih ćelija (**Grafikon 4.6.9C**) ($F=368,618$; $p < 0,0001$).

Stopa respiracije "intaktnih ćelija" merena je pre dodavanja digitonina, odnosno pre permeabilizacije ćelijske membrane i uočava se da je sprovedeni tretman doveo do povećanja potrošnje kiseonika (**Grafikon 4.6.9A**). Postojanje statistički značajne razlike uočava se pri poređenju grupa ćelija tretiranih koncentracijom od 5 i 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata ($F=2927,258$; $p < 0,0001$). Navedeni trend povećanja potrošnje kiseonika prisutan je i u pogledu aktivnosti C IV (**Grafikon 4.6.9F**). Analizirajući vrednosti ovog parametra beleži se postojanje statistički značajne razlike nakon tretmana MRC-5 ćelija koncentracijom od 10 mM u odnosu na grupe 2 i 5 mM Now® L-karnozin ($F=64549,919$; $p < 0,0001$).

Nasuprot navedenog, smanjenje stope respiracije prisutno u pogledu vrednosti maksimalnog kapaciteta elektron transportnog lanca i aktivnosti C II (**Grafikoni 4.6.9D i E**). Statistički značajna razlika uočava se pri poređenju vrednosti stope respiracije nakon tretmana MRC-5 ćelija koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanog preparata u odnosu na grupe 5 i 10 mM Now® L-karnozin ($F=564,349$ i $F=236,141$; $p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.9. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.2.4. *Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija*

Na **Grafikonu 4.6.10A-F** predstavljeni su efekti sprovednog tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija.

Pri analizi stope respiracije „intaktnih ćelija“ uočava se da su sprovedeni tretmani čistom supstancom L-karnozin i preparatom Now® L-karnozin usloveli stimulaciju respiracije u poređenju sa kontrolnom grupom (**Grafikon 4.6.10A**) ($F=2927,258$; $p<0,0001$). Takođe, statistički značajna razlika postoji i pri poređenju vrednosti izmerenih nakon tretmana preparatom Karnozin EXTRA® u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F=2927,258$; $p<0,0001$). Naime, tretman ovim preparatom nije uslovio značajne promene stope respiracije u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi ($p>0,05$).

U pogledu aktivnosti C I sprovedeni tretman preparatom Now® L-karnozin doveo je do stimulacije aktivnosti a ujedno i porasta stope respiracije u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj ali i ostalim eksperimentalnim grupama (**Grafikon 4.6.10B**) ($F=473,724$; $p<0,0001$).

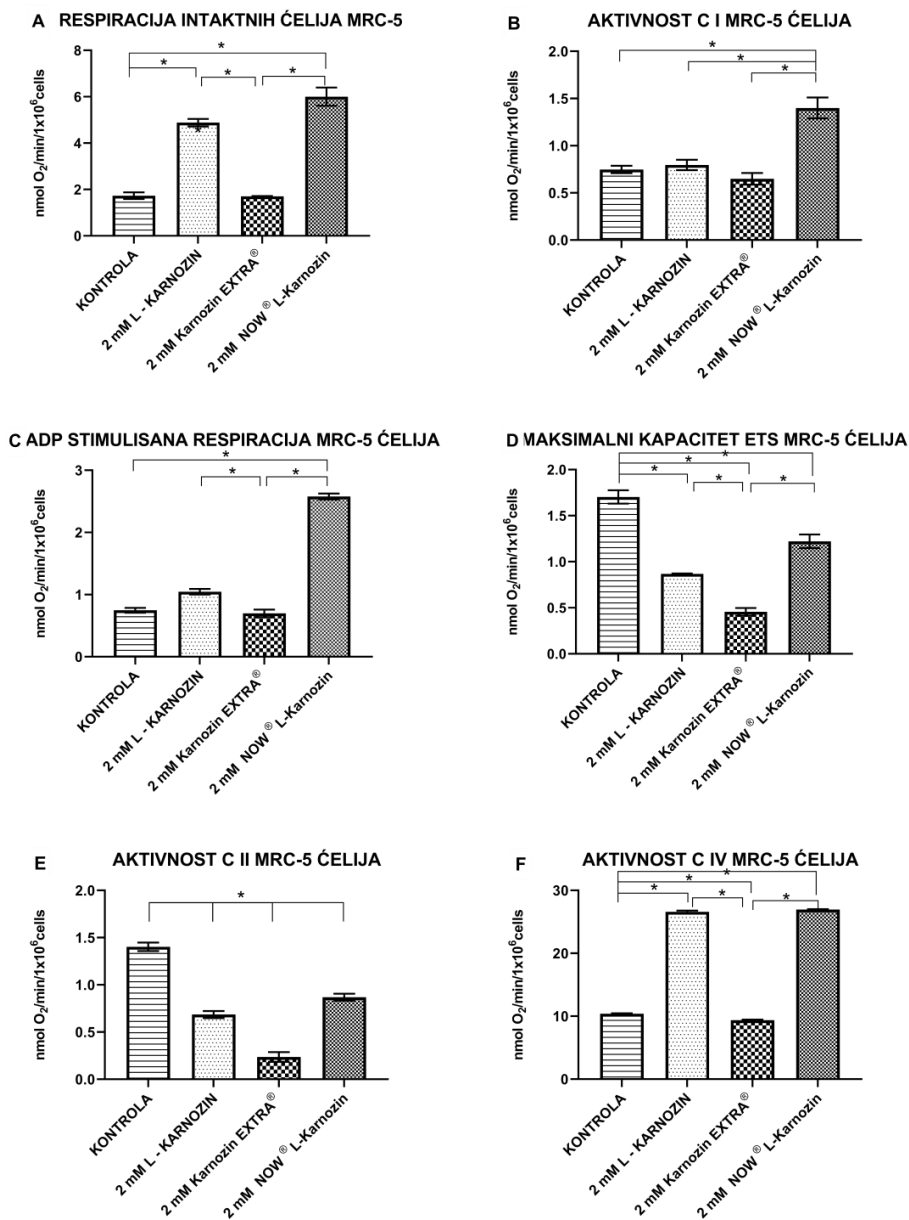
Nakon administracije supstrata ADP-a merena je stopa potrošnje kiseonika i zapaža se da je tretman preparatom Now® L-karnozin doprineo povećanju potrošnje kiseonika u odnosu na kontrolnu grupu ali i grupu ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA® pri istoj koncentraciji karnozina (**Grafikon 4.6.10C**) ($F=368,618$; $p<0,0001$). Takođe, statistički značajna razlika je prisutna i pri poređenju tretmana preparatom Karnozin EXTRA® u odnosu na tretman čistom supstancom L-karnozin ($F=368,618$; $p<0,0001$).

Pri analizi efekata sprovedenih tretmana na vrednosti maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema mitohondrija humanih fetalnih fibroblasta pluća uočava se inhibitorni uticaj u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi (**Grafikon 4.6.10D**) ($F=564,349$; $p<0,0001$). Naime, najizraženije smanjenje stope respiracije uzrokovano je preparatom Karnozin EXTRA® u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F=564,349$; $p<0,0001$).

Tretman humanih fetalnih fibroblasta pluća u koncentraciji od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata uslovio je smanjenje stope respiracije koja govori u prilog aktivnosti C II u odnosu na

kontrolnu grupu (**Grafikon 4.6.10E**) ($F=236,141$; $p<0,0001$). Postojanje statistički značajne razlike prisutno je i pri međusobnom poređenju vrednosti eksperimentalnih grupa ($F=236,141$; $p<0,0001$).

Merenjem aktivnosti C IV, zapaža se stimulacija aktivnosti usled tretmana čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Now® L-karnozin u odnosu na vrednosti u grupi netretiranih ćelija (**Grafikon 4.6.10F**) ($F=64549,919$; $p<0,0001$). Sa druge strane, preparat Karnozin EXTRA® ispoljio je inhibitorski uticaj na stopu respiracije u odnosu na kontrolnu ali i ostale eksperimentalne grupe ($F=64549,919$; $p<0,0001$).

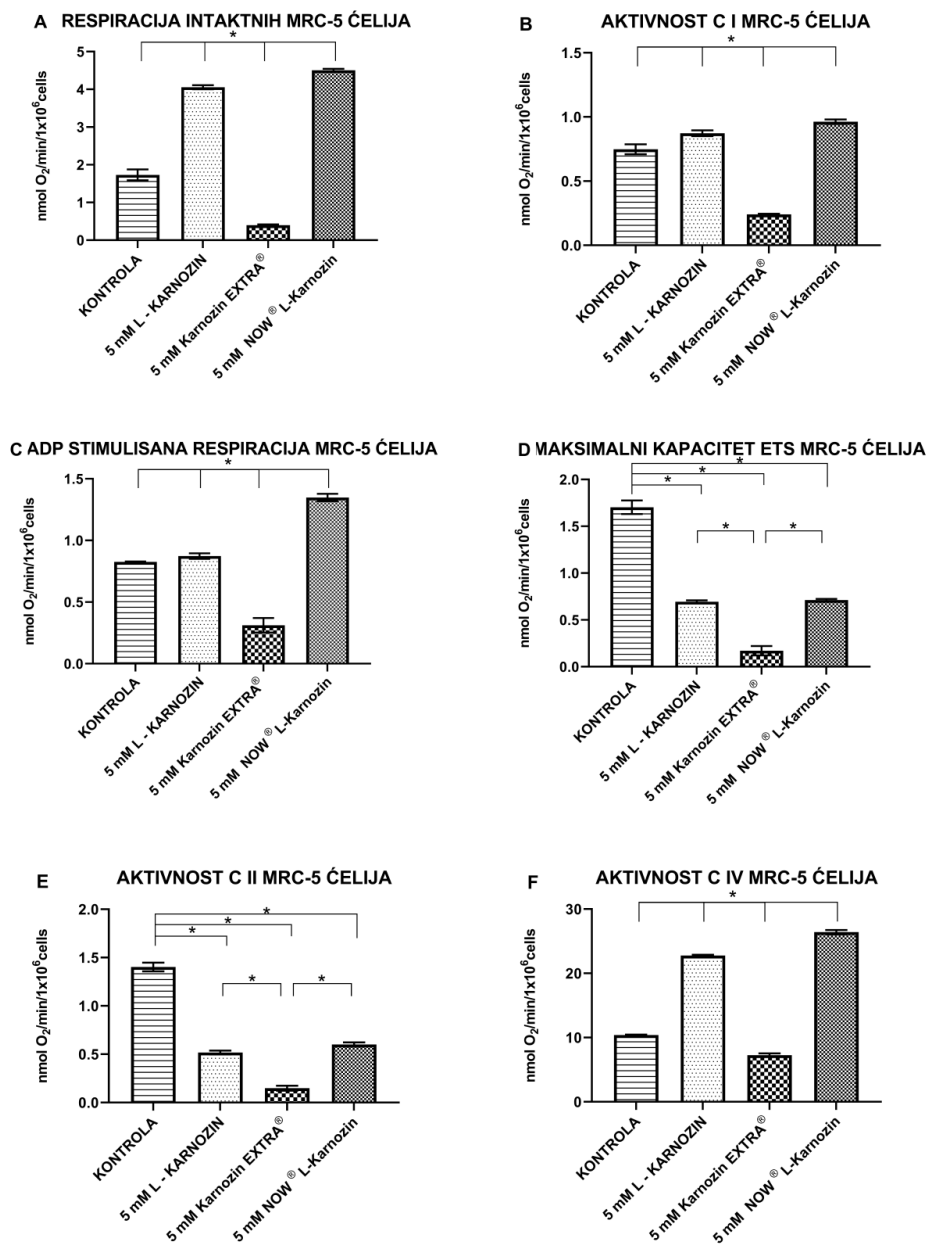


Grafikon 4.6.10. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.2.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija

Vrednosti stope respiracije ispitivanih parametara koji govore u prilog bioenergetskog potencijala mitohondrija MRC-5 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata prikazane su na **Grafikonu 4.6.11A-F**. Statistički značajna razlika prisutna je pri međusobnom poređenju izmerenih vrednosti eksperimentalnih grupa ali i u odnosu na kontrolnu grupu u pogledu vrednosti svih analiziranih parametara ($p < 0,0001$).

Analizirajući vrednosti koje govore u prilog maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema mitohondrija (**Grafikon 4.6.11D**) ($F=564,349$; $p < 0,0001$) kao i aktivnosti C II (**Grafikon 4.6.11E**) ($F=236,141$; $p < 0,0001$) sprovedeni tretmani ispoljili su inhibitorni uticaj na stopu potrošnje kiseonika u odnosu na grupu netretiranih ćelija. Dok sa druge strane, tretman čistom supstancom L-karnozin i preparatom Now[®] L-karnozin u pogledu svih ostalih ispitivanih parametara dovode do stimulacije respiracije tretiranih ćelija. Međutim, primena preparata Karnozin EXTRA[®] uzrokovala je statistički značajno smanjenje stope respiracije u odnosu na ostale grupe u pogledu vrednosti svih analiziranih parametara.

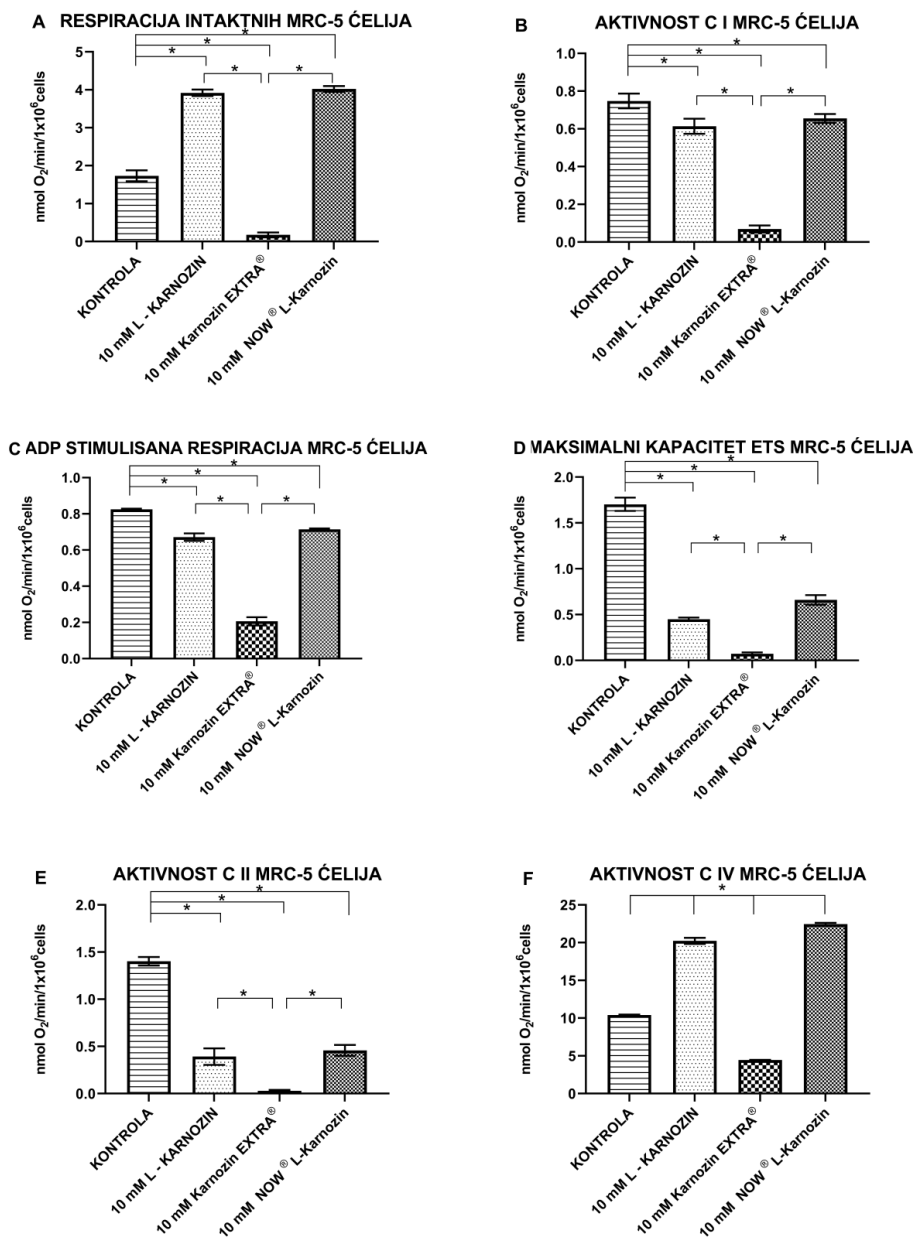


Grafikon 4.6.11. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.2.6. *Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija*

Na **Grafikonu 4.6.12A-F** prikazane su vrednosti stope potrošnje kiseonika analiziranih parametara mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija tretiranih koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. Statistički značajna razlika je evidentna pri poređenju izmerenih vrednosti eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu ($p < 0,0001$).

Naime, odgovor ćelija na sprovedene tretmane ogleda se u vidu smanjenja stope respiracije ispitivanih parametara (**Grafikon 4.6.12B-E**). Međutim, kada je u pitanju stopa respiracije "intaktnih ćelija" (**Grafikon 4.6.12A**) ($F=2927,258$; $p < 0,0001$) i aktivnost C IV (**Grafikon 4.6.12F**) ($F=64549,919$; $p < 0,0001$) tretman L-karnozinom i preparatom Now® L-karnozin usloveli su povećanje stope potrošnje kiseonika, dok je tretmani preparatom Karnozin EXTRA® doprineo statistički značajnom smanjenju respiracije.



Grafikonu 4.6.12. Parametri mitohondrijske respiracije MRC-5 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.3. Čelije adenokarcinoma dojke (MCF-7)

Pomoću aparata *Oxygraph plus* prvenstveno smo odredili potrebnu koncentraciju digitonina za permeabilizaciju ćelijske membrane MCF-7 ćelija kako bi se aplikacijom egzogenih supstrata u daljem radu postigle adekvatne koncentracije istih unutar mitohondrija ćelija. Pri koncentraciji od 15 µg/ml digitonina uvideli smo da je postignut željeni efekat a da je pritom integritet spoljašnje mitohondrijske membrane ostao nenarušen.

4.6.3.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

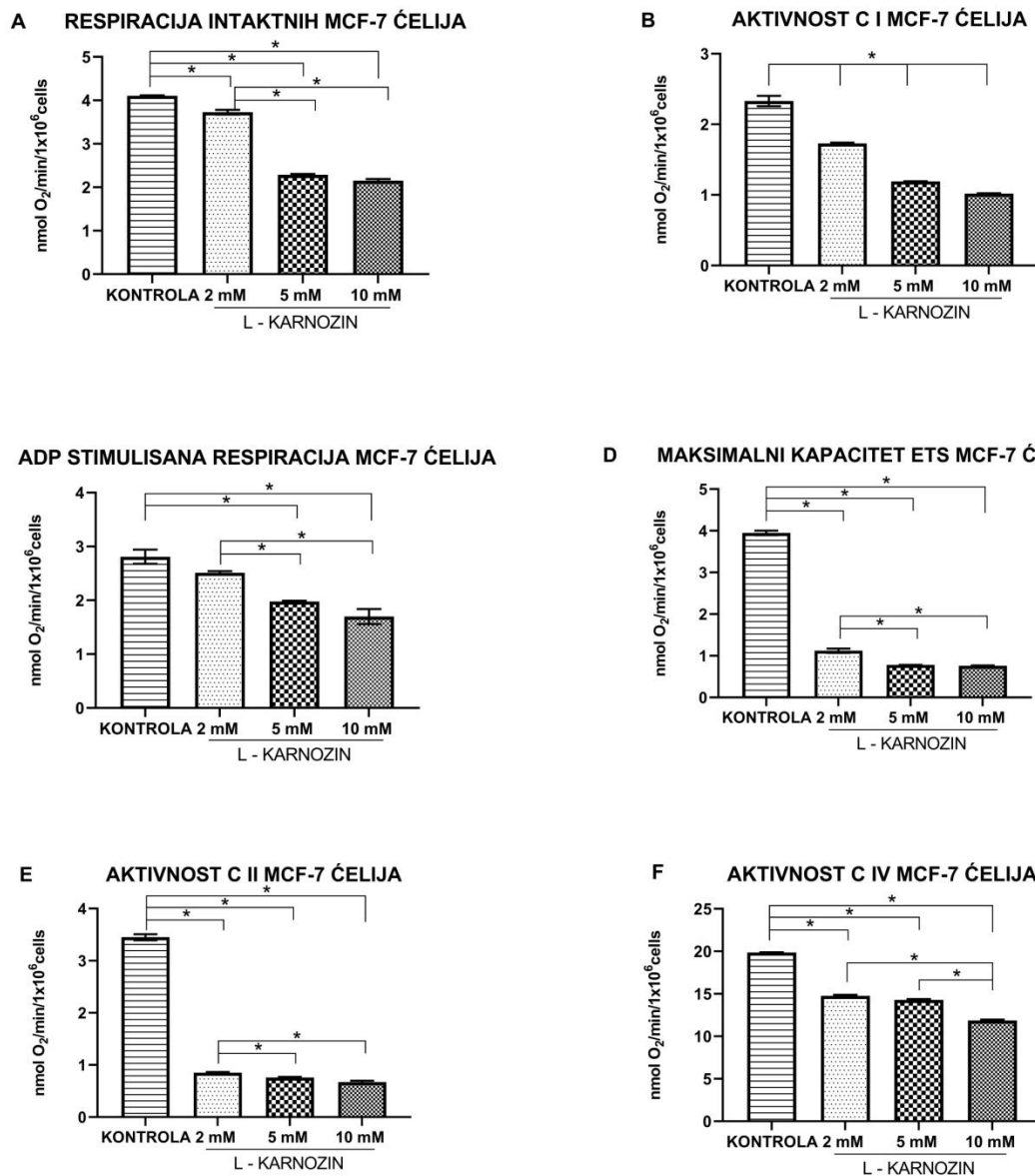
Vrednosti stope respiracije analiziranih parametara mitohondrijske funkcije MCF-7 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama L-karnozina prikazani su na **Grafikonu 4.6.13A-F**.

Analizirajući vrednosti stope respiracije "intaktnih ćelija", aktivnost C II i vrednosti potrošnje kiseonika koje govore u prilog maksimalnog kapaciteta ETS zapaža se isti trend uslovljen efektima sprovedenog tretmana (**Grafikon 4.6.13A, D i E**). Naime, prisutno je dozno-zavisno smanjenje potrošnje kiseonika tretiranih ćelija pri poređenju sa vrednostima kontrolne grupe ($p < 0,0001$). Značajno smanjenje stope respiracije beleži se usled tretmana koncentracijama od 5 i 10 mM L-karnozina u odnosu na grupu ćelija tretiranih koncentracijom od 2 mM L-karnozin ($p < 0,0001$).

Sprovedeni tretman ispoljio je inhibitorni uticaj na aktivnost C I koji je dozno-zavistan u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnoj grupi, te je postojanje statistički značajne razlike prisutno i pri poređenju eksperimentalnih grupa međusobno ($F=2312,082$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.13B**).

U pogledu izmerenih vrednosti stope potrošnje kiseonika usled administracije supstrata ADP-a, postojanje statistički značajne razlike prisutno je u grupama 5 i 10 mM L-karnozin u odnosu na kontrolnu ($F=2321,225$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.13C**). Takođe, smanjenje stope respiracije uočava se i pri poređenju izmerenih vrednosti unutar ovih grupa sa grupom ćelija tretiranom koncentracijom od 2 mM L-karnozin ($F=2321,225$; $p < 0,0001$).

Značajno smanjenje stope respiracije nakon sprovedenog tretmana MCF-7 ćelija različitim koncentracijama L-karnozina registrovano je pri analizi vrednosti koje govore u prilog aktivnosti C IV u odnosu na kontrolnu grupu ($F=4269,469$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.1F**).

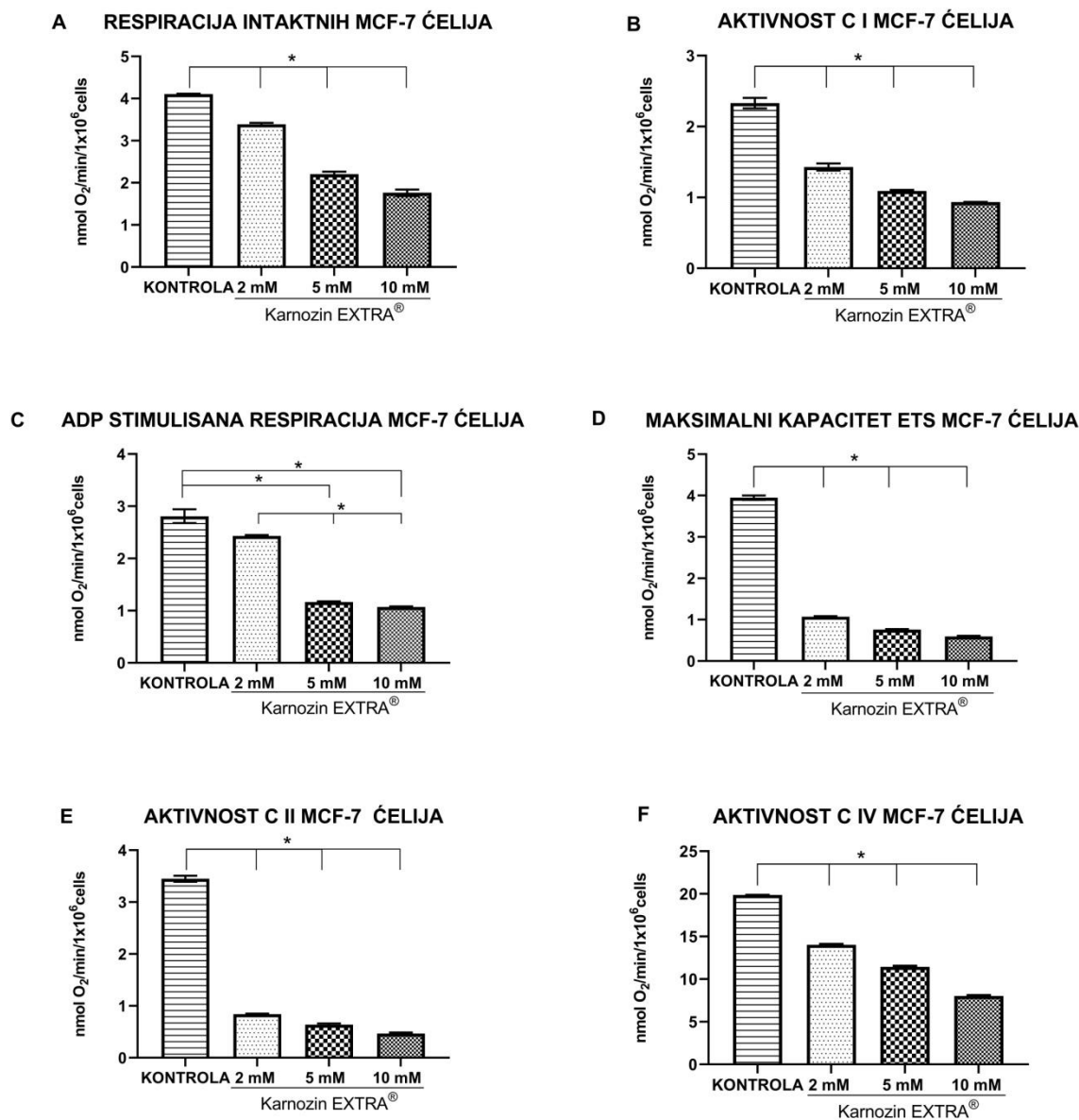


Grafikonu 4.6.13. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD. * $p < 0,0001$

4.6.3.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

Grafikon 4.6.14A-F prikazuje rezultate stope potrošnje kiseonika MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®.

Izmerene vrednosti govore u prilog postojanja statistički značajne razlike analiziranih parametara svih eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu ($p < 0,0001$). Naime, prisutno je dozno-zavisno smanjenje stope respiracije. Odstupanje od navedenog uočeno je nakon administracije ADP-a u komoru reakcionog suda nakon čega je prisutno evidentno smanjenje stope respiracije samo usled tretmana ćelija koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® ($F=2321,225$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.14C**). Takođe, postojanje značajne različitosti izmerenih vrednosti uočava se i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa u pogledu svih analiziranih parametara ($p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.14. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.3.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

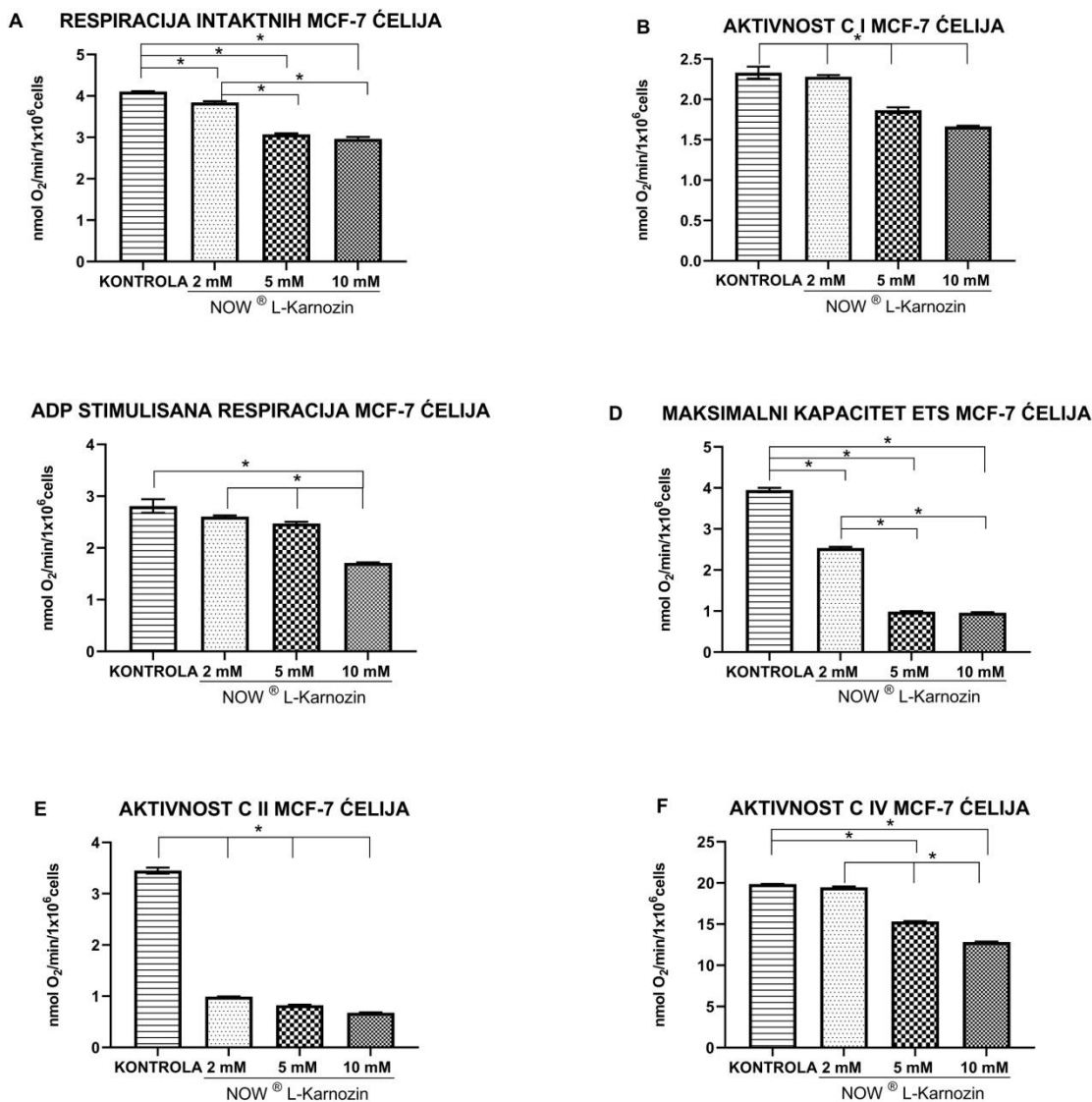
Na **Grafikonu 4.6.15A-F** predstavljeni su rezultati ispitivanih parametara mitohondrijske funkcije MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin.

Stopa respiracije “intaktnih ćelija” kao i vrednosti maksimalnog kapaciteta ETS tretiranih ćelija statistički se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu grupu ($F=1072,389$ i $F=1660,266$; $p<0,0001$) (**Grafikoni 4.6.15A i D**). Postojanje značajne razlike izmerenih vrednosti prisutno je i pri poređenju grupa 5 i 10 mM Now® L-karnozin u odnosu na vrednosti izmerene nakon tretmana koncentracijom od 2 mM ($p<0,0001$).

Analizirajući izmerene vrednosti usled ADP-om stimulisane respiracije beleži se trend smanjenja stope potrošnje kiseonika pri tretmanu ćelija koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata kako u odnosu na kontrolnu tako i u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F=2321,225$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.15C**).

Dobijeni rezultati ukazuju na dozno-zavisno smanjenje stope respiracije koje govore u prilog aktivnosti C I i C II tretiranih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu ($F=2312,082$ i $F=754,086$; $p<0,0001$) (**Grafikoni 4.6.15B i E**). Značajna razlika stope potrošnje kiseonika prisutna je i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($p<0,0001$).

Analizirajući aktivnost C IV nakon sprovedenog tretmana uočeno je značajno smanjenje stope respiracije u grupama 5 i 10 mM Now® L-karnozin u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ($F=4269,469$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.15F**). Značajna razlika prisutna je i pri poređenju izmerenih vrednosti među eksperimentalnim grupama ($F=4269,469$; $p<0,0001$).



Grafikon 4.6.15. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.3.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

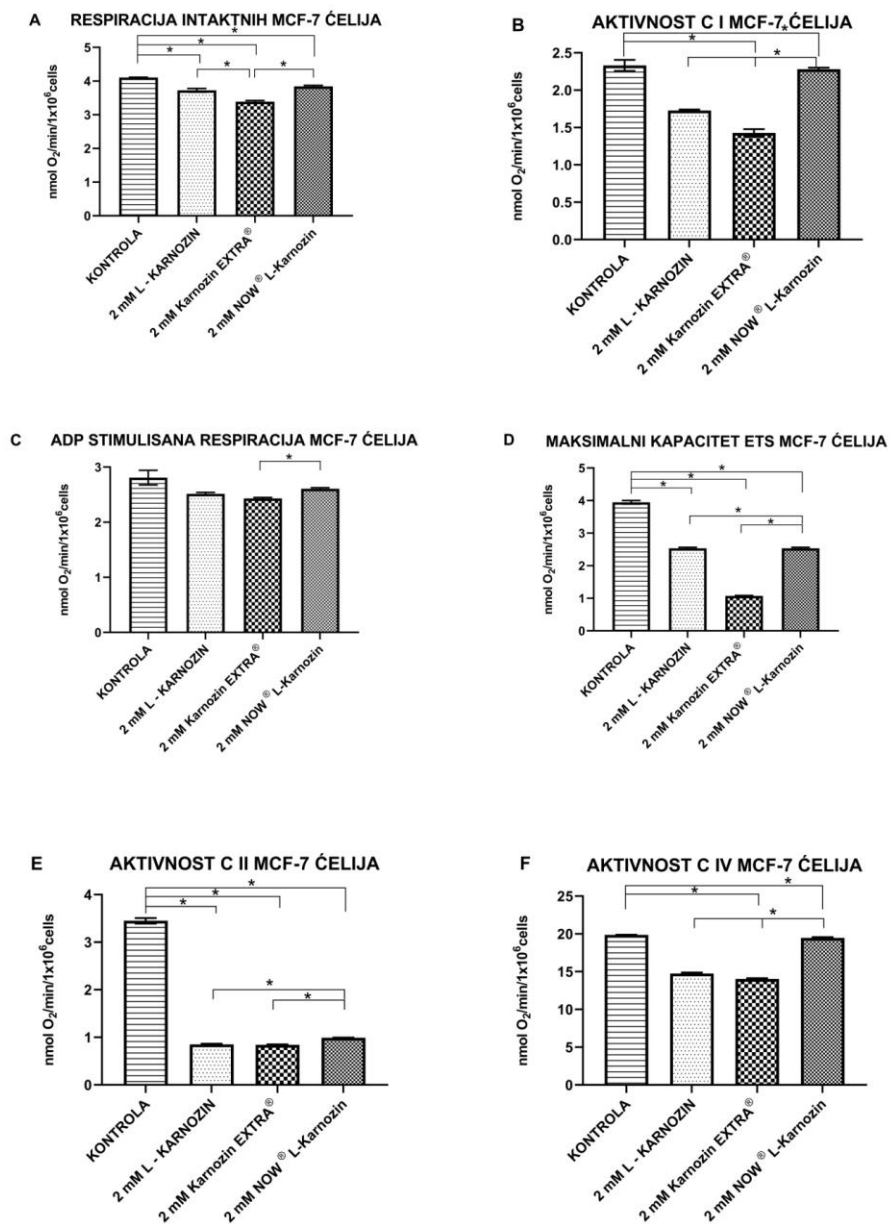
Na **Grafikonu 4.6.16A-F** predstavljen je uticaj 24 h tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na mitohondrijsku funkciju MCF-7 ćelija.

Analizom vrednosti koje govore o respiraciji "intaktnih ćelija" uočava se da je sprovedeni tretman u svim eksperimentalnim grupama doveo do smanjenja stope respiracije pri poređenju sa kontrolnom grupom ($F=1072,389$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.16A**). Najizraženiji je uticaj preparata Karnozin EXTRA[®], pri čemu se izmerene vrednosti stope respiracije značajno razlikuju u odnosu na vrednosti ostalih eksperimentalnih grupa ($F=1072,389$; $p<0,0001$).

U pogledu efekta koje sprovedeni tretman ispoljava na aktivnost C I i C IV primećuje se inhiborni uticaj kao i postojanje statistički značajne razlike grupa 2 mM Karnozin EXTRA[®] i 2 mM Now[®] L-karnozin u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($F=2312,082$ i $F=4269,469$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.16B i F**). Postojanje statistički značajne razlike takođe je prisutno i pri poređenju vrednosti među eksperimentalnim grupama ($F=2312,082$ i $F=4269,469$; $p<0,0001$).

Na **Grafikonu 4.6.16C** primećuje se da sprovedeni tretman koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata nije uzrokovao promene u stopi respiracije nakon aplikacije supstrata ADP-a u komoru reakcionog suda sa MCF-7 ćelijama ($p>0,05$). Međutim, postojanje statistički značajne razlike pristno je pri poređenju vrednosti respiracije ćelija usled tretmana preparatom Karnozin EXTRA[®] i Now[®] L-karnozin ($F=2321,082$; $p<0,0001$).

Značajno smanjenje stope respiracije registrovano je pri analizi vrednosti maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema mitohondrija kao i u pogledu aktivnosti C II nakon sprovedenog tretmana u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi ($F=1660,266$ i $F=754,086$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.16D i E**). Izmerena stopa potrošnje kiseonika bila je znajčno niža u grupama 2 mM L-karnozin i 2 mM Karnozin EXTRA[®] u odnosu na grupu ćelija tretiranu preparatom Now[®] L-karnozin ($F=1660,266$; $p<0,0001$).



Grafikon 4.6.16. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

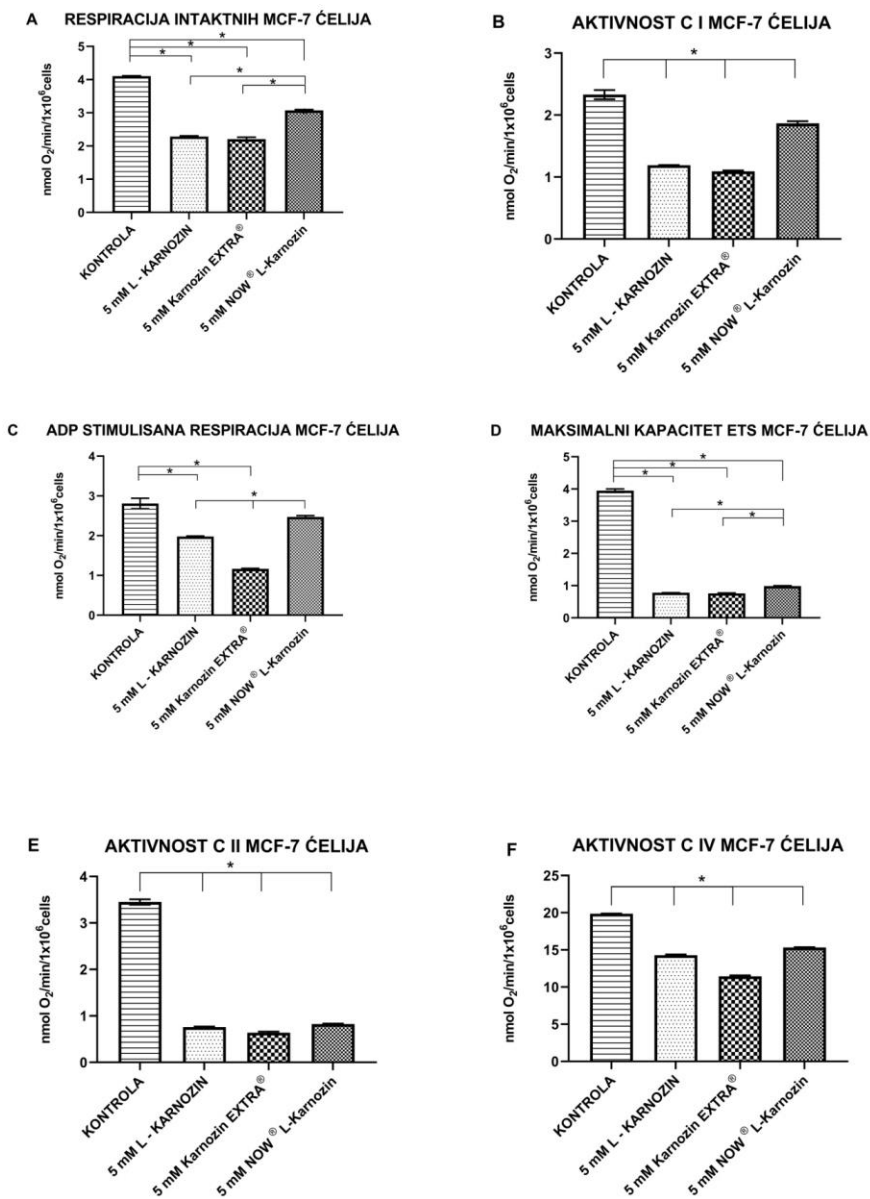
4.6.3.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

Vrednosti stope potrošnje kiseonika analiziranih parametara mitohondrijske funkcije MCF-7 ćelija nakon 24 h tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina is ispitivanih preparata predstavljene su na **Grafikonu 4.6.17A-F**.

Stopa respiracije "intaktnih ćelija" kao i vrednosti maksimalnog kapaciteta ETS nakon sprovedenog tretmana statistički se značajno razlikuju u odnosu na kontrolnu grupu ($F=1072,389$ i $F=1660,266$; $p<0,0001$) (**Grafikoni 4.6.17A i D**). Takođe, primećuje se da tretmani čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Karnozin EXTRA[®] dovode do značajnog smanjenja stope potrošnje kiseonika u odnosu na grupu ćelija tretiranu preparatom Now[®] L-karnozin ($F=1072,389$ i $F=1660,266$; $p<0,0001$).

Usled stimulacije transporta elektrona duž elektron transportnog lanca mitohondrija aplikacijom ADP-a u reakcionim sudovima sa MCF-7 ćelijama, beleži se smanjenje stope respiracije nakon tretmana L-karnozinom i preparatom Karnozin EXTRA[®] u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnoj grupi ($F=2321,225$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.17C**). Razlike u stopi respiracije prisutne su i pri međusobnom poređenju izmerenih vrednosti eksperimentalnih grupa ($F=2321,225$; $p<0,0001$). Naime, najizraženiji inhibicioni uticaj uslovio je tretman preparatom Karnozin EXTRA[®].

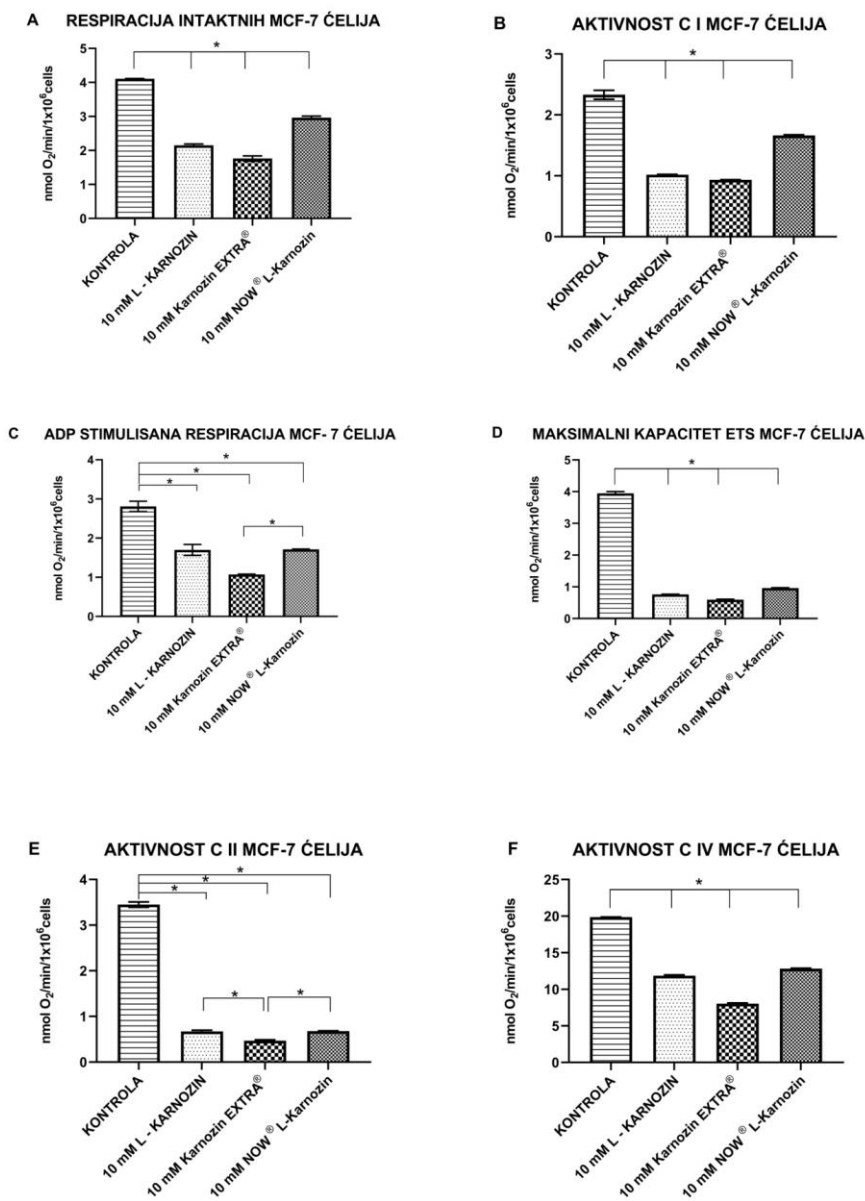
Na **Grafikonima 4.6.17B, E i F** uočava se inhibiciono dejstvo karnozina iz ispitivanih preparata na aktivnost C I, C II i C IV u odnosu na kontrolnu grupu ($F=2312,082$, $F=754,086$ i $F=4269,469$; $p<0,0001$). Razlike u stopi respiracije prisutne su i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($p<0,0001$).



Grafikon 4.6.17. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.3.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija

Na **Grafikonu 4.6.18A-F** uočava se inhibitorno dejstvo karnozina iz ispitivanih preparata u koncentraciji od 10 mM karnozina na analizirane parametre mitohondrijske funkcije u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,0001$). Razlike u stopi respiracije prisutne su i pri međusobnom poređenju eksperimentalnih grupa ($p < 0,0001$). Odstupanje od navedenog prisutno je u slučaju izmerenih vrednosti stope respiracije nakon aplikacije supstrata ADP-a pri čemu je postojanje značajne razlike prisutno u pogledu izmerenih vrednosti u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na grupu ćelija tretiranih preparatom Now® L-karnozin ($F=2321,225$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.18C**). Dok, kada je u pitanju uticaj na aktivnost C II pored navedenog statistički značajna razlika prisutna je i pri poređenju vrednosti stope respiracije grupe 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na grupu 10 mM L-karnozin ($F=754,086$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.18E**).



Grafikon 4.6.18. Parametri mitohondrijske respiracije MCF-7 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4. Čelije humanog glioblastoma (U87)

U cilju merenja aktivnosti pojedinih kompleksa respiratornog lanca mitohondrija nakon aplikacije egzogenih supstrata u reakcionim sudovima, prvenstveno je određena koncentracija digitonina potrebna za narušavanje integriteta ćelijske membrane kontinuirane ćelijske linije humanog glioblastoma. Utvrđeno je da je potrebna aplikacija digitonina u koncentraciji od 5 µg/ml.

4.6.4.1. Uticaj čiste supstance L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Na **Grafikonu 4.6.19A-F** predstavljeni su efekti 24 h tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelijske linije.

U pogledu vrednosti stope potrošnje kiseonika merenih na "intaktnim ćelijama" postojanje značajne razlike evidentno je nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina (**Grafikon 4.6.19A**). Sprovedeni tretman ćelija u ovoj koncentraciji uslovio je smanjenje stope respiracije u odnosu na kontrolnu ali i preostale eksperimentalne grupe ($F=588,826$; $p<0,0001$).

Merem aktivnosti C I uočeno je značajno smanjenje stope respiracije u grupama 5 i 10 mM L-karnozin u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($F=162,789$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.19B**).

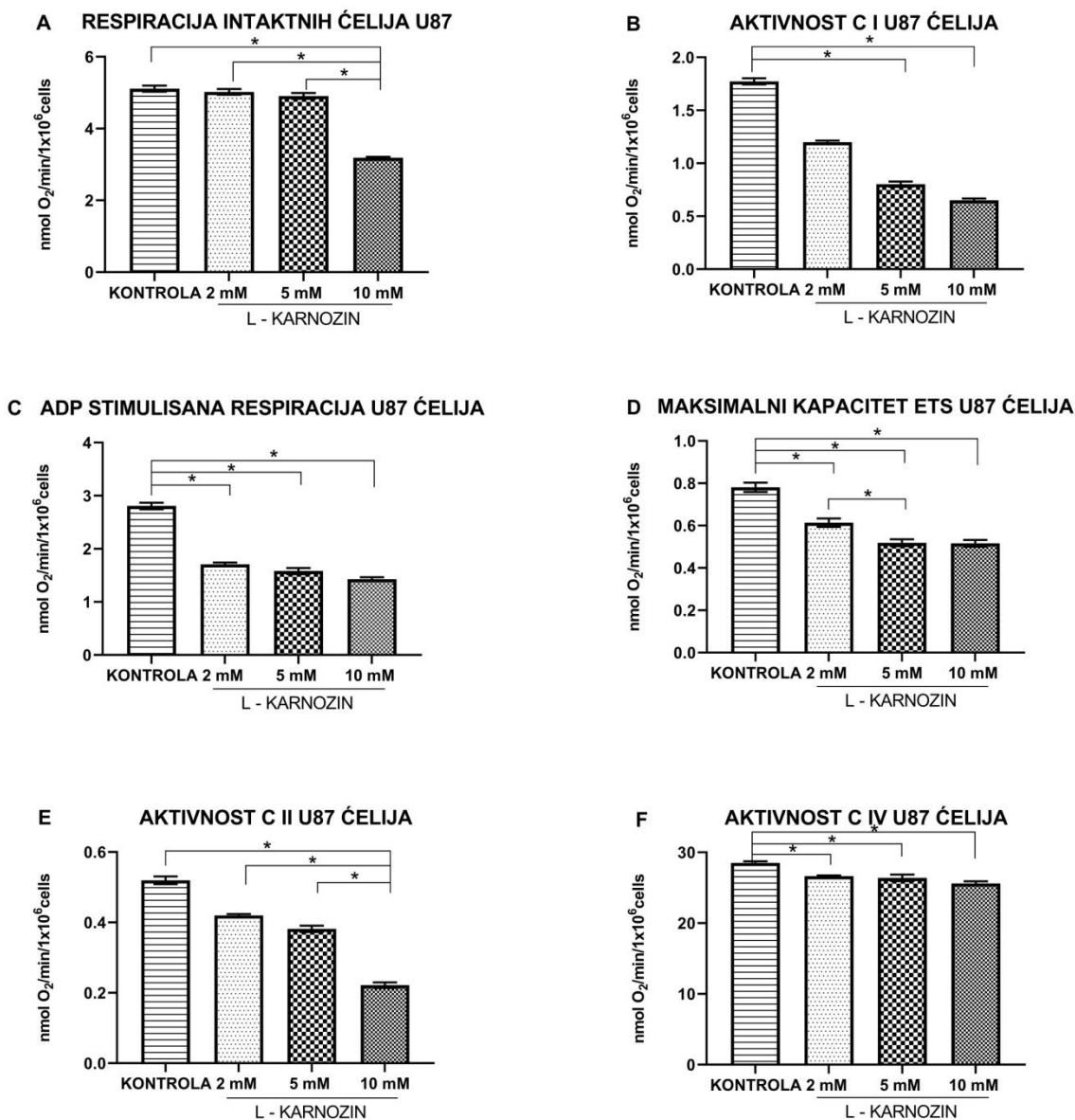
Stopa potrošnje kiseonika je takođe bila znatno niža nakon aministracije ADP-a (**Grafikon 4.6.19C**). Navedeno smanjenje zapaženo je u svim eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolnom ($F=300,739$; $p<0,0001$).

Evidentno je postojanje razlike u izmerenim vrednostima pri analizi maksimalnog kapaciteta elektron transportnog lanca mitohondrija u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu ($F=22,219$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.19D**). Takođe, postojanje značajne razlike uočava se i pri poređenju izmerenih vrednosti u grupi 5 mM L-karnozin u odnosu na grupu 2 mM L-karnozin ($F=22,219$; $p<0,0001$). Naime, tretman ćelija koncentracijom od 5 mM karnozina uslovio je smanjenje stope respiracije.

Izmerene vrednosti stope respiracije koje govore u prilog aktivnosti C II ukazuju na evidentnu inhibiciju aktivnosti nakon tretmana koncentracijom od 10 mM L-karnozina kako u

odnosu na vrednost kontrolne grupe tako i u odnosu na grupe tretirane drugim koncentracijama ($F=37,099$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.19E**).

Aplikacijom TMPD-a i askorbata, u reakcionim sudovima sa respiratornim medijumom i permeabilizovanim U87 ćelijama, merena je aktivnost C IV (**Grafikon 4.6.19F**). Sprovedeni tretman uslovio je smanjenje aktivnosti ispitivanog kompleksa u odnosu na izmerene vrednosti kontrolne grupe ($F=48,579$; $p<0,0001$).



Grafikon 4.7.19. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4.2. Uticaj preparata Karnozin EXTRA® na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Nakon sprovedenog 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® mereni su parametri mitohondrijske respiracije (**Grafikon 4.6.20A-F**).

U pogledu izmerenih vrednosti respiracije "intaktnih ćelija", pre dodavanja digitonina u koncentraciji kojom se postiže permeabilizacija ćelijske membrane, uočava se postojanje statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u odnosu na kontrolnu ($F=588,826$; $p<0,0001$). Takođe, postojanje značajne različitosti u pogledu smanjenja stope potrošnje kiseonika prisutno je i pri međusobnom poređenju grupe 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na ćelije tretirane koncentracijom od 2 i 5 mM karnozina ($F=588,826$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.20A**).

Po aplikaciji supstrata piruvata i malata praćena je aktivnost C I (**Grafikon 4.6.20B**). Postojanje statistički značajne razlike je evidentno pri poređenju eksperimentalnih grupa sa kontrolnom ($F=162,789$; $p<0,0001$). Uočava se smanjenje aktivnosti C I sa porastom koncentracije L-karnozina u medijumu za rast ćelija. Drastično smanjenje aktivnosti C I prisutno je u grupi 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na grupu tretiranu koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanog preparata ($F=162,789$; $p<0,0001$).

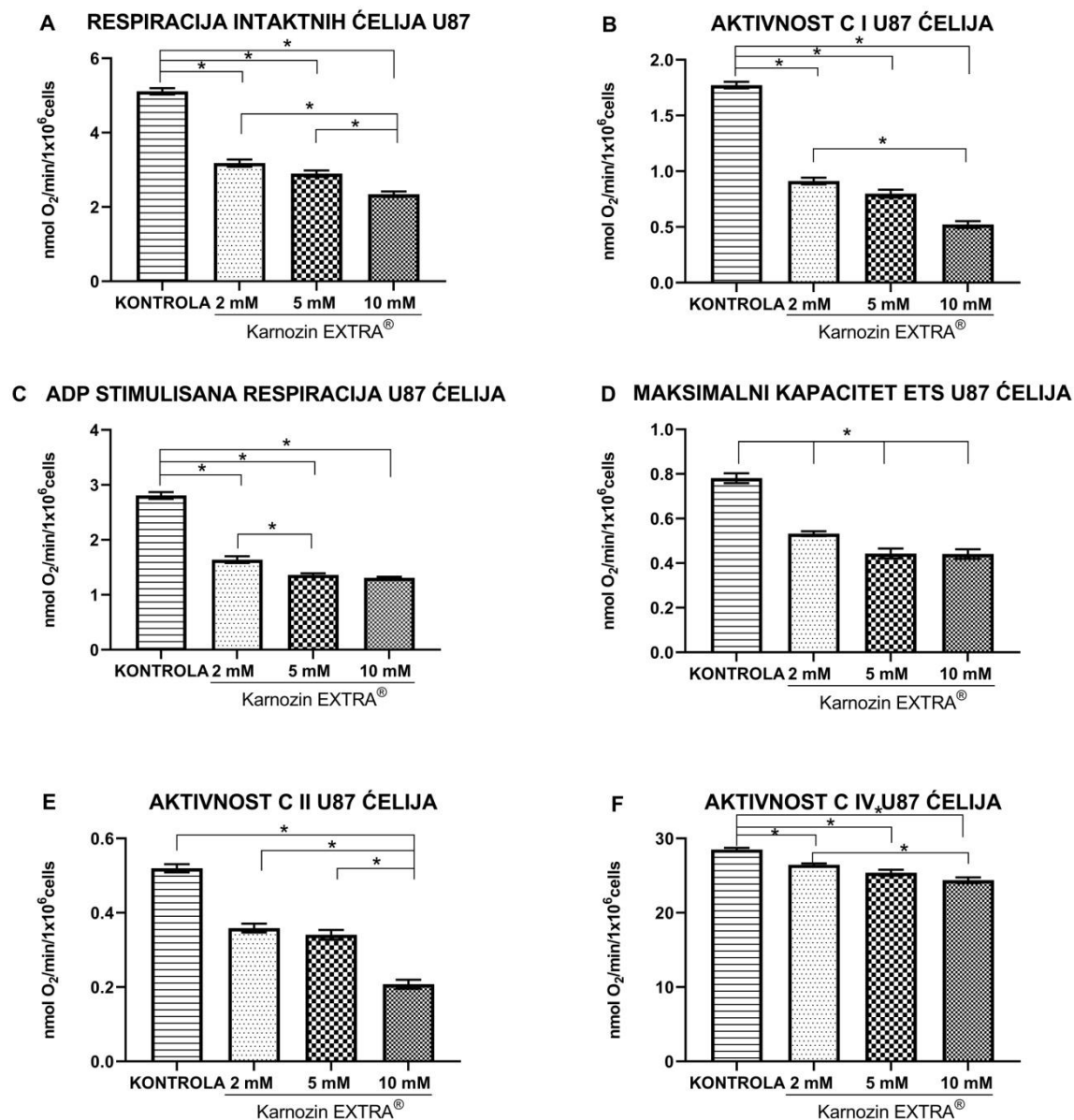
Nakon stimulacije transporta elektrona duž respiratornog lanca mitohondrija usled primene supstrata ADP-a stopa potrošnje kiseonika je bila znatno niža u svim eksperimentalnim grupama u poređenju sa kontrolnom ($F=300,739$; $p<0,0001$). Takođe, evidentno je smanjenje stope izmerenih vrednosti i među grupama ćelija tretiranih koncentracijom od 5 mM karnozina u odnosu na grupu 2 mM Karnozin EXTRA® ($F=300,739$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.20C**).

Značajno smanjenje stope respiracije registrovano je pri analizi vrednosti maksimalnog kapaciteta ETS mitohondrija nakon sprovedenog tretmana u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi ($F=22,219$; $p<0,0001$). Izmerena stopa potrošnje kiseonika se statistički značajno razlikovala i među svim eksperimentalnim grupama ($F=22,219$; $p<0,0001$). U grupi 10 mM Karnozin EXTRA® uticaj ispitivane supstance je najizraženiji (**Grafikon 4.6.20D**).

Analizirajući aktivnost C II primećuje se značajno smanjenje stope respiracije nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata (**Grafikon 4.6.20E**).

Naime, nakon sprovedenog tretmana ćelija pri ovoj koncentraciji statistički značajna razlika u izmerenim vrednostima prisutna je i u odnosu na kontrolnu grupu ali i ostale eksperimentalne grupe ($F=37,099$; $p<0,0001$).

Aktivnost C IV u ćelijama nakon sprovedenog tretmana bila je znatno manja u poređenju sa kontrolom ($F=48,579$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.20F**). Takođe, postojanje značajnog smanjenja stope potrošnje kiseonika evidentirano je i pri poređenju vrednosti među grupama ćelija tretiranih koncentracijama od 10 mM karnozina u odnosu na 2 mM Karnozin EXTRA® ($F=48,579$; $p<0,0001$).



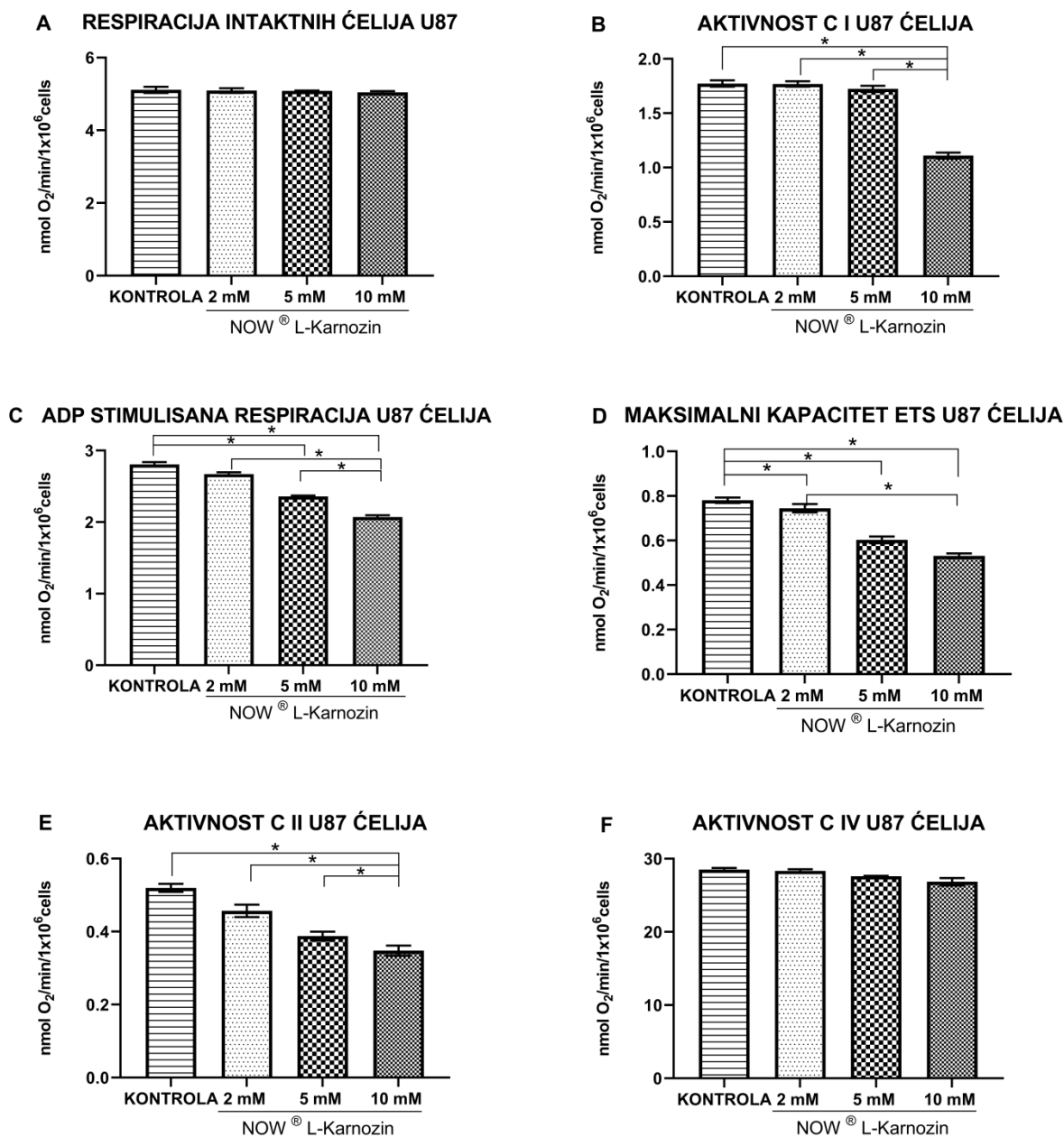
Grafikon 4.6.20. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Karnozin EXTRA®. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4.3. Uticaj preparata Now® L-karnozin na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Na **Grafikonu 4.6.21A-F** prikazani su analizirani parametri mitohondrijske respiracije nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. Sprovedeni tretman nije uslovio značajne promene stope respiracije “intaktnih ćelija” ($p > 0,05$) (**Grafikoni 4.6.21A, E i F**).

U pogledu aktivnosti C I i C II tretman koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata doveo je do značajnog smanjenja izmerenih vrednosti stope respiracije u odnosu na kontrolnu ali i ostale eksperimentalne grupe ($F=162,789$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.21B**).

Smanjenje stope respiracije nakon stimulacije rada ETS usled aplikacije supstrata ADP-a prisutno je u grupama 5 i 10 mM Now® L-karnozin u odnosu na izmerene vrednosti u kontrolnoj grupi ($F=300,739$; $p < 0,0001$) (**Grafikon 4.6.21C**). Evidentno je da je sprovedeni tretman koncentracijom do 10 mM karnozina iz ispitivanog preparata uslovio značajni pad stope potrošnje kiseonika u odnosu na ostale eksperimentalne grupe ($F=300,739$; $p < 0,0001$).



Grafikon 4.6.21. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana različitim koncentracijama karnozina iz preparata Now® L-karnozin. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4.4. Uticaj koncentracije od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Efekat tretmana U87 ćelijske linije, koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata, na parametre mitohondrijske respiracije predstavljen je na **Grafikonu 4.6.22A-F**.

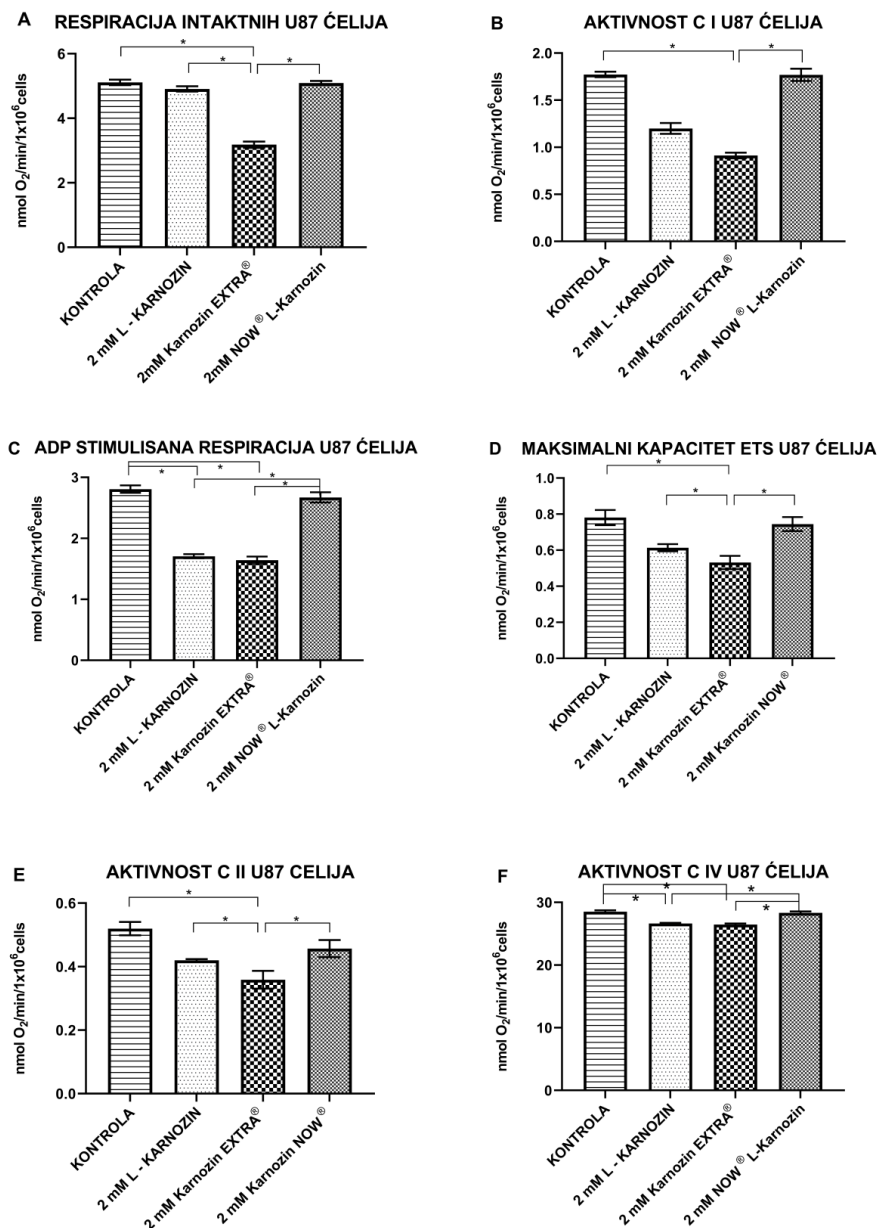
Analizirajući vrednosti stope potrošnje kiseonika "intaktnih ćelija" kao i aktivnost C II nakon sprovedenog tretmana beleži se postojanje statistički značajnog smanjenja u grupi 2 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj kao i ostalim eksperimentalnim grupama ($F=588,826$; $p<0,0001$) (**Grafikoni 4.6.22A i E**).

Merenjem aktivnosti C I respiratornog lanca mitohondrija ispitivane ćelijske linije nakon sprovedenog tretmana različitim preparatima karnozina utvrđena je smanjena aktivnost u grupi 2 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na izmerenu vrednost u kontrolnoj grupi kao i u odnosu na grupu ćelija tretiranu preparatom Now® L-karnozin ($F=162,789$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.22B**).

Sprovedeni tretman U87 ćelijske linije koncentracijom od 2 mM L-karnozina i 2 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® uslovio je pad stope respiracije nakon aplikacije supstrata ADP-a u odnosu na izmerenu vrednost kod netretiranih ćelija ($F=300,739$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.22C**). Takođe, uočava se i evidentno smanjenje potrošnje kiseonika nakon tretmana navedenim preparatima u odnosu na grupu 2 mM Now® L-karnozin ($F=300,739$; $p<0,0001$).

Nakon primene supstrata FCCP u reakcionim sudovima sa respiratornim medijumom i U87 ćelijama vršeno je merenje maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema mitohondrija (**Grafikon 4.6.22D**). Statistički značajna razlika prisutna je pri poređenju grupe 2 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na kontrolnu ali i ostale eksperimentalne grupe ($F=22,219$; $p<0,0001$).

Inhibitorni uticaj na stopu respiracije koja govori u prilog aktivnosti C IV prisutan je nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Karnozin EXTRA® u odnosu na grupu netretiranih ćelija ($F=48,579$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.22F**). Takođe, evidentno je postojanje značajnog smanjenja izmerenih vrednosti i pri poređenju grupe 2 mM L-karnozin i grupe 2 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na stopu respiracije ćelija tretiranih preparatom Now® L-karnozin ($F=48,579$; $p<0,0001$).



Grafikonu 4.6.22. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 2 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4.5. Uticaj koncentracije od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Parametri mitohondrijske respiracije ćelija humanog glioblastoma nakon sprovedenih tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina predstavljeni su na **Grafikonu 4.6.23A-F**.

U pogledu vrednosti respiracije "intaktnih ćelija" tretman preparatom Karnozin EXTRA[®] uslovio je izrazit pad vrednosti u odnosu na kontrolnu kao i preostale eksperimentalne grupe (F=588,826; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23A**).

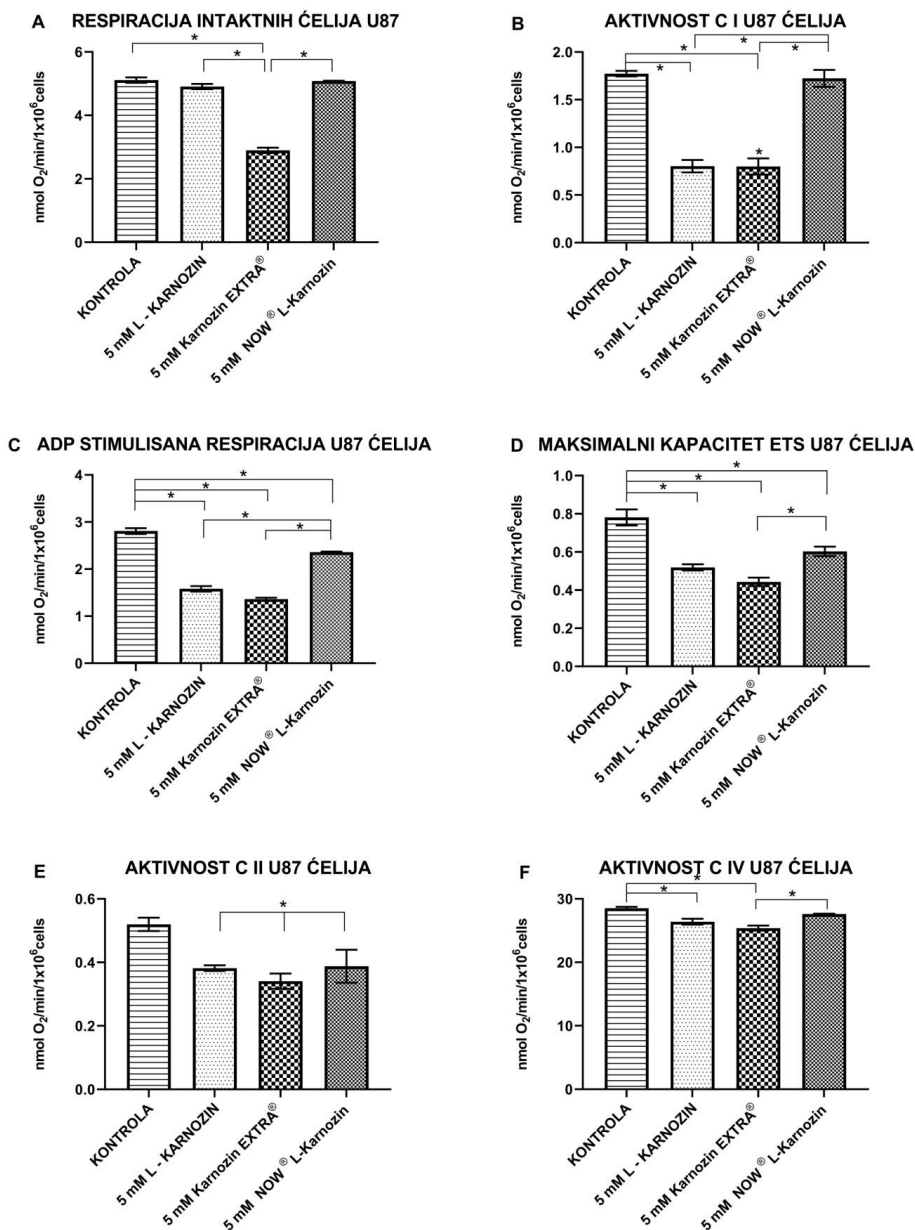
Evidentno je postojanje statistički značajnog smanjenja stope respiracije koja govori u prilog aktivnosti C I nakon tretmana čistom supstancom L-karnozina kao i preparatom Karnozin EXTRA[®] kako u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi tako i nakon tretmana preparatom Now[®] L-karnozin (F=162,789; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23B**).

Nakon aplikacije supstrata ADP-a, uočava se smanjenje izmerenih vrednosti stope potrošnje kiseonika u eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu (F=300,739; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23C**). Statistički značajno smanjenje izmerenih vrednosti beleži se i pri poređenju grupa 5 mM L-karnozin i 5 mM Karnozin EXTRA[®] u odnosu na grupu ćelija tretiranu preparatom Now[®] L-karnozin (F=300,739; p<0,0001).

Sprovedeni tretman koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata uslovio je smanjenje stope respiracije koja govori o maksimalnom kapacitetu ETS u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnoj grupi (F=22,219; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23D**). Takođe, postojanje značajne razlike izmerenih vrednosti prisutno je i pri poređenju grupe 5 mM Karnozin EXTRA[®] sa grupom 5 mM Now[®] L-karnozin (F=22,219; p<0,0001).

Poredivši vrednosti među eksperimentalnim grupama koje govore u prilog aktivnosti C II uočava se postojanje značajne razlike (F=37,099; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23E**).

Analizirajući aktivnost C IV uočava se statistički značajno smanjenje izmerenih vrednosti u grupama 5 mM L-karnozin i 5 mM Karnozin EXTRA[®] u odnosu na kontrolnu (F=48,579; p<0,0001) (**Grafikon 4.6.23F**). Postojanje značajne razlike prisutno je i pri poređenju izmerenih vrednosti u grupi ćelija tretiranih preparatom Karnozin EXTRA[®] u odnosu na grupu koja je tretirana Now[®] L-karnozinom (F=48,579; p<0,0001).



Grafikon 4.6.23. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 5 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$

4.6.4.6. Uticaj koncentracije od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata na parametre mitohondrijske respiracije U87 ćelija

Ispitivani parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelijske linije nakon sprovedenog tretmana prikazani su na **Grafikonu 4.6.24A-F**.

Analizom vrednosti stope potrošnje kiseonika "intaktnih ćelija" uočava se postojanje značajnog smanjenja nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin kao i usled primene preparata Karnozin EXTRA® u odnosu na kontrolu ($F=588,826$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.24A**).

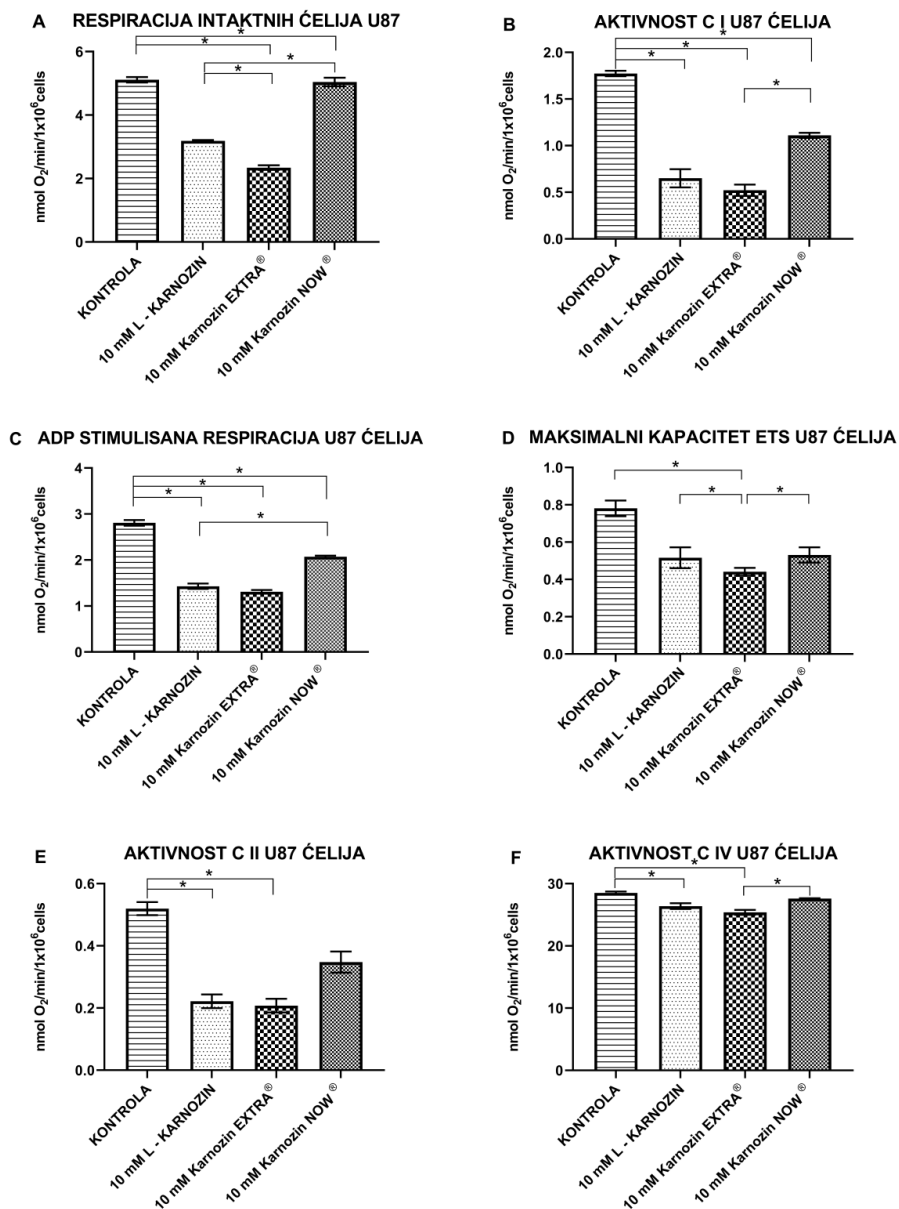
Značajan inhibitorski uticaj sprovedenog tretmana na aktivnost C I prisutan je u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na vrednosti kontrolne ($F=162,789$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.24B**). Statistički značajna razlika prisutna je i pri međusobnom poređenju izmerenih vrednosti grupe 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na ćelije tretirane preparatom Now® L-karnozin ($F=162,789$; $p<0,0001$).

Nakon administracije ADP-a, stopa potrošnje kiseonika bila je znatno niža u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnoj ($F=300,739$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.24C**). Postojanje statistički značajne razlike prisutno je i pri poređenju stope respiracije nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin u odnosu na grupu ćelija tretiranih preparatom Now® L-karnozin ($F=300,739$; $p<0,0001$).

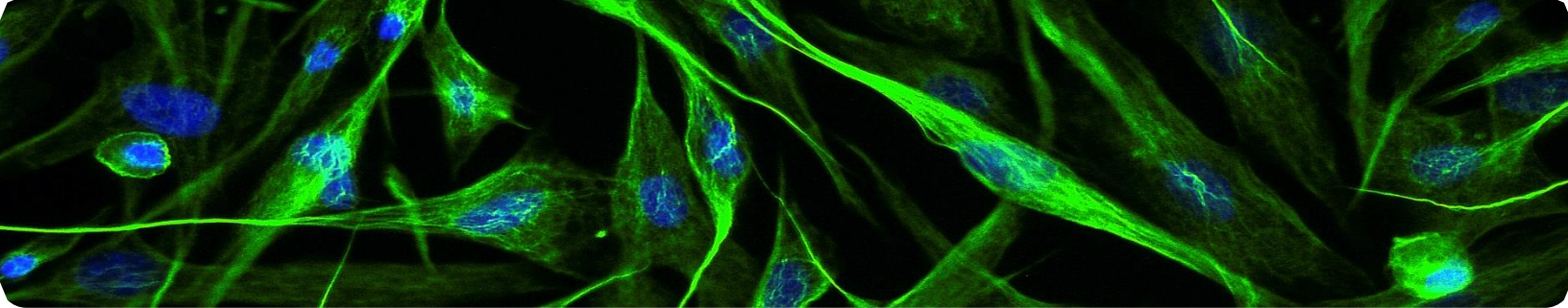
Sprovedeni tretman ispitivanim preparatima na ćelijskoj liniji humanog glioblastoma nije ispoljio efekte na stopu potrošnje kiseonika koja govori o vrednostima maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema mitohondrija ($p>0,05$).

Merenjem aktivnosti C II respiratornog lanca mitohondrija U87 ćelija, njegova smanjena aktivnost prisutna je u grupi 10 mM L-karnozin i grupi 10 mM Karnozin EXTRA® u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnoj grupi ($F=37,099$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.24E**).

Aktivnost C IV u ćelijama nakon sprovedenog tretmana L-karnozinom i preparatom Karnozin EXTRA® bila je znatno manja u poređenju sa kontrolom ($F=48,579$; $p<0,0001$) (**Grafikon 4.6.24F**). Takođe, postojanje značajne razlike evidentirano je i pri poređenju vrednosti stope respiracije nakon tretmana preparatom Karnozin EXTRA® u odnosu na vrednosti izmerene u grupi 10 mM Now® L-karnozin ($F=48,579$; $p<0,0001$).



Grafikon 4.6.24. Parametri mitohondrijske respiracije U87 ćelija nakon tretmana koncentracijom od 10 mM karnozina iz ispitivanih preparata. **A)** Respiracija “intaktnih ćelija”, **B)** Aktivnost kompleksa I (C I), **C)** ADP stimulisana respiracija – *state 3*, **D)** Maksimalni oksidacioni kapacitet elektron transportnog sistema (ETS) nakon primene FCCP-a, **E)** Aktivnost kompleksa II (C II), **F)** Aktivnost kompleksa IV (C IV). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti±SD. * $p < 0,0001$



5. DISKUSIJA

Prethodna istraživanja su uglavnom ispitivala efekte čiste supstance L-karnozina u svrhu spoznaje uloga karnozina vršeći razne tretmane kontinuiranih ćelijskih linija kao i životinjskih modela (269, 273-275). Analizirani su različiti efekti kao što su antitumorski potencijal, antiproliferativni i antioksidativni uticaji, kao i delovanje na bioenergetski potencijal i produkciju energije na ćelijskom nivou.

U ovom radu je prvi put ispitan i opisan antitumorski potencijal karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u *in vitro* uslovima na kontinuiranim tumorskim linijama humanog adenokarcinoma dojke i humanog glioblastoma. Ispitivanje antitumorskog potencijala sprovedeno je putem opsežnog sagledavanja brojnih mogućih nivoa na kojima karnozin ispoljava svoje delovanje. Naime, analiziran je uticaj na proliferativni kapacitet, morfološke karakteristike, migratornu sposobnost, ekspresiju vimentina u citoplazmi kao i SOD2 markera u mitohondrijama tretiranih ćelija. Bitan akcenat je stavljen i na efekte sprovedenih tretmana na energetski metabolizam i mitohondrijsku respiraciju MCF7 i U87 kontinuiranih ćelijskih linija. Kako bi se sagledali mogući uticaji ovih preparata na organizam čoveka čitav koncept studije sproveden je i na zdravoj ćelijskoj liniji bubrega hrčka kao i na ćelijama humanih fetalnih fibroblasta pluća.

Proliferacija zdravih ćelija podrazumeva rast i deobu ćelija u svrhu zamene ćelija sa ograničenim životnim vekom. U ćelijskom rastu kao i procesu proliferacije ćelijski ciklus igra centralnu ulogu. Izmene u regulaciji ćelijskog ciklusa mogu dovesti do prekomerene proliferacije ćelija, a ujedno i akumulacije abnormalnog broja istih (286). Bitan udeo u nastanku i progresiji malignih tumora imaju upravo izmenjen proliferativni kapacitet kao i vijabilnost samih ćelija (287). Brojna istraživanja se baziraju na proučavanjima supstanci čijom primenom se postiže

supresija abnormalne proliferacije i rasta tumorskih ćelija (288-290). Poznato je da L-karnozin deluje kao regulator ćelijskog ciklusa i igra ključnu ulogu upravo u proliferaciji (291-293).

Inicijalno ispitivanje potencijalnog citotoksičnog efekta čiste supstance L-karnozin kao i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na tumorskim ćelijskim linijama (MCF-7 i U87) sprovedli smo upotrebom MTT testa, koji meri aktivnost mitohondrija. U našem istraživanju, sve eksperimentalne grupe ćelija humanog adenokarcinoma dojke i humanog glioblastoma pokazale su značajno dozno-zavisno smanjenje broja živih ćelija u odnosu na ćelije kontrolne grupe. Takođe, usled sprovedenih tretmana evidentan je i uticaj na morfološka svojstva obe tumorske ćelijske linije uz gubitak karakterističnog oblika i dimenzija kao i pojavu plutajućih ćelija u medijumu za rast. Najizraženiji efekat na proliferativnu aktivnost obe tumorske kontinuirane ćelijske linije zabeležen je u eksperimentalnim grupama tretiranim preparatom Karnozin EXTRA®.

Prethodna istraživanja potvrđuju rezultate naše studije, i navode da je antiproliferativni efekat čiste supstance karnozina uočen na brojnim kontinuiranim ćelijskim linijama kao što su: ćelije karcinoma debelog creva (HCT116), ćelije humanog cervikalnog karcinoma (HeLa), ćelije skvamoznog karcinoma grlića materice (SiHa), ćelije karcinoma želuca (SGC-7901), ćelije karcinoma dojke (ZR-75-1) kao i ćelije humanog glioblastoma (269, 270, 274, 294-298).

Naime, Lee i saradnici analizirali su efekat L-karnozina na kontinuiranoj ćelijskoj liniji HCT116 (270). Tretman ćelija je sproveden koncentracijom od 100 i 200 mM L-karnozina tokom 24 h i rezultirao je značajnom inhibicijom proliferacije i prisustvom apoptoze u tretiranim grupama. Iste efekte na ovoj ćelijskoj liniji dokazala je još jedna grupa istraživača pri čemu su sprovedli 24 h tretman ćelija koncentracijom L-karnozina u opsegu od 50 do 100 mM i primetili statistički značajno smanjenje vijabilnih ćelija čak za 50% od vrednosti izmerenih u kontrolnoj grupi (269). Interesantno je da su na istoj ćelijskoj liniji svoje istraživanje vršili i Hsieh SL i saradnici, međutim oni su ćelije tretirali značajno nižim koncentracijama karnozina (5, 10 i 15 mM) iako je inkubacija ćelija nakon aplikacije ove supstance bila duža (72h i 96h) te se smatrala hroničnim tretmanom (299). Primetili su statistički značajno smanjenje procenta vijabilnih ćelija kao i promenu morfoloških svojstava tretiranih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu.

U istraživanju sprovedenom od strane Bao Y i saradnika navodi se inhibitorni uticaj L-karnozina na proliferativnu aktivnost HeLa i SiHa ćelija (294). Naime, tretman ovih ćelijskih linija vršen je tokom 48 h L-karnozinom u koncentraciji od 5, 20, 50 i 100 mM. Analizom rezultata nakon MTT testa, uočili su dozno-zavistan efekat sprovedenog tretmana na proliferativnu aktivnost ispitivanih ćelijskih linija. Na HeLa ćelijskoj liniji nakon tretmana koncentracijom od 5 mM L-karnozina vijabilnost ćelija iznosila je 88,09%. Značajnije smanjenje vrednosti vijabilnih ćelija uočili su nakon tretmana koncentracijom od 20 mM L-karnozina (67,82%), dok je najizraženiji antiproliferativni efekat pokazala koncentracija od 50 mM L-karnozina (21,89%). Sa druge strane, na SiHa ćelijskoj liniji sprovedeni tretman koncentracijom od 5 mM L-karnozina nije ispoljio značajan uticaj na stepen proliferacija (97,59% vijabilnih ćelija), dok su koncentracije od 20 mM (81,58%) i 50 mM (65,32%) uslovile smanjenje vijabilnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Na obe ispitivane ćelijske linije L-karnozin u koncentraciji od 100 mM doveo je do masivne ćelijske smrti što je rezultovalo prisustvom velikog broja plutajućih ćelija u medijumu za rast.

Shen i saradnici proučavali su efekat karnozina na vijabilnost SGC-7901 kontinuirane ćelijske linije (274). Nakon 24 h tretmana ćelija koncentracijom karnozina od 5 i 20 mM primetili su pad vijabiliteta na 84,0%, odnosno 57,9% u odnosu na kontrolnu grupu. U istom istraživanju navode da su tokom 48 h tretmana efekti bili još izraženiji, antiproliferativna aktivnost karnozina dovela je do pada vijabiliteta na 73,5% u grupi 5 mM odnosno 45,9% u grupi 20 mM u odnosu na vrednosti kontrolne grupe.

Rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa studijom koja je vršila ispitivanje citotoksičnog efekta L-karnozina na četiri kontinuirane ćelijske linije glioblastoma (U87, T98G, G55T2 i U343) (298). Naime, Seidel C i saradnici su nakon 48h tretmana navedenih ćelijskih linija karnozinom u koncentraciji od 50 mM uočili značajno smanjenje vijabilnosti u svim kontinuiranim linijama na najmanje 80% u odnosu na netretiranu grupu ćelija (298). Takođe, još jedna grupa istraživača govori o sposobnosti L-karnozina u efektivnoj inhibiciji primarnih ćelija humanog glioblastoma u prisustvu piruvata kao i potencijalnoj upotrebi ovog dipeptida kao suplementa u terapiji redukcije tumora i produžetka stope preživljavanja obolelih pacijenata (297).

Brojna istraživanja ispitivala su mehanizam koji leži u osnovi antiproliferativnog dejstva karnozina na ćelije karcinoma (269, 300). Jedno od potencijalnih objašnjenja jeste da karnozin dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi putem inhibicije prelaska iz G1 u S fazu (269). Naime, L-karnozin ispoljava uticaj na ćelijski ciklus i apoptozu tumorskih ćelija putem smanjenja ekspresije survina, CDK₁, CDK₂, ciklina E₁, CDC_{25B}, CDC₆. Usled zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G₁ fazi, ekspresija survina se naglo smanjuje (300). Survin je član porodice gena inhibitora apoptoze, a takođe i molekularni biomarker kod karcinoma (301, 302). CDK₁ je neophodan za G₂/M tranziciju, međutim literaturni podaci navode da CDC_{25B} posreduje u aktivaciji CDK₁ i progresiji u S fazu ćelijskog ciklusa (303). CDK₂ zajedno sa cilinom E₁ uzrokuje faznu tranziciju G₁/S (300, 303, 304). Pored navedenih markera udruženo ciklin D i CDK₄ kao i ciklin E₁ i CDK₂ promovišu G₁/S tranziciju (305). Smanjenje regulacije CDC₆ neophodne za replikaciju DNK usloviće nastanak apoptoze usled sprečavanja ćelija da uđu u S fazu ćelijskog ciklusa (306, 307).

Pretražujući literaturne podatke naišli smo na studije čiji rezultati su u saglasnosti sa našim u pogledu uticaja karnozina na vijabilitet ćelija zdrave ćelijske linije bubrega hrčka (269, 308). Barbara Iovine i saradnici kao zdravu ćelijsku liniju koristili su humanu ćelijsku liniju fibroblasta kože (BJ5ta) na čiji proliferativni kapacitet sprovedeni tretman čistom supstancom karnozina nije imao uticaja (269). Pozitivni efekti karnozina navode se u još jednom istraživanju usled tretmana zdrave ćelijske linije pacovskih mioblasta (L6) koncentracijom karnozina od 10, 20 i 30 mM u medijumu za rast (308). Uočili su nezavisno od primenjene koncentracije da su ćelije zadržale morfološke karakteristike koje odlikuju kontrolnu grupu kao i da tretmani nisu ispoljili citotoksični efekat na ispitivanim ćelijama (308).

U ovoj doktorskoj disertaciji nakon 24 h tretmana BHK-21/C-13 uvideli smo da primena čiste supstance i preparata Now[®] L-karnozin u koncentraciji karnozina od 2, 5 i 10 mM kao i preparata Karnozin EXTRA[®] u koncentraciji od 2 i 5 mM karnozina ne ispoljavaju citotoksični potencijal. Takođe, morfološka svojstva tretiranih grupa ćelija su bila neizmenjena pri poređenju sa karakteristikama koje su odlikovale ćelije kontrolne grupe. Međutim, u grupi 10 mM Karnozin EXTRA[®] primećeno je da je sprovedeni tretman uzrokovao značajni pad vijabiliteta kao i nastanak

značajnih varijacija u ćelijskoj morfologiji pri poređenju sa kontrolnom ali i ostalim eksperimentalnim grupama. Imajući u vidu složenost sastava kapsule ovog preparata, nismo mogli da utvrdimo da li je ovaj rezultat posledica visoke koncentracije L-karnozina, aktivnost drugih sastojaka kapsule, ili oboje.

U pogledu efekata ispitivanih preparata na proliferativnu aktivnost humanih fetalnih fibroblasta pluća uočili smo da primena L-karnozina kao i preparata Now® L-karnozin u sve tri ispitivane koncentracije nije usloвила citotoksično dejstvo kao ni uticaj na morfološka svojstva ćelija što je u saglasnosti sa istraživanjima sprovedenim od strane McFarland GA i Holliday R (309, 310). Nakon tretmana MRC-5 ćelija karnozinom pri koncentracijama od 20 i 30 mM ova grupa istraživača je primetila da ćelije rastu sa normalnom stopom udvostručenja populacije u standardnom medijumu za rast uz očuvanost tipičnih morfoloških karakteristika koje poseduju ćelije kontrolne grupe.

Međutim, tretman ove ćelijske linije preparatom Karnozin EXTRA® u svim ispitivanim koncentracijama doveo je do statistički značajnog smanjenja vijabilnih ćelija uz nastanak varijacija u pogledu morfoloških karakteristika u odnosu na kontrolnu grupu. U svrhu objašnjenja postignutog inhibitornog uticaja ovog preparata na vijabilnost kao i promenu morfoloških svojstava ove ćelijske linije potrebno je sprovesti dodatna istraživanja koja bi se bazirala na ispitivanju efekata konsistuenata kapsule.

Migratorna sposobnost i proces invazije karakteristike su maligniteta kao i nastanka recidiva tumora (311, 312). Upravo zbog ovih činjenica od posebne je važnosti utvrditi uticaj ispitivanih preparata na procese migracije tumorskih ćelija.

Oppermann H i saradnici proučavali su infiltrativni potencijal kao i sposobnost migracije ćelija kontinuirane linije humanog glioblastoma (T98G) usled tretmana karnozinom (313). U svojoj studiji primenili su poseban model pri čemu su ćelije glioblastoma zasejavane unutar centralnog prstena postavljenog u bunarić ploče sa 12 otvora, dok su zdrave ćelije fibroblasta sejali izvan postavljenog prstena. Prsteni su uklanjani nakon 4 h po nastanku adhezivnosti ćelija za zidove bunarića ploče a zatim su ćelije inkubirane tokom vremenskog perioda od 2 nedelje uz

prisustvo različitih koncentracija karnozina (10, 25, 50 i 75 mM). Pri analizi rezultata uočili su da se površina prekrivena tumorskim ćelijama konstantno smanjivala sa porastom koncentracije karnozina, a statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu je uočena u grupi ćelija tretiranih koncentracijom od 50 mM karnozina. Pri koncentraciji od 75 mM karnozina primetili su potpuno odsustvo adheriranih tumorskih ćelija za zidove bunarića ploče što je ukazivalo ne samo na inhibiciju proliferacije već i na potpuno uništenje tumorskih ćelija primenom ovog dipeptida tokom 2 nedelje. U ranijim istraživanjima, ćelije su obično izlagane tretmanu karnozina tokom 24, 48 ili 96 h (273) ali ne i tokom 2 nedelje. Kraći vremenski period izlaganja tumorskih ćelija karnozinu rezultovao je u redukciji proliferacije ali ne i kompletne eliminacije tumorskih ćelija.

Analizom sprovedenog "scratch" eseja uočili smo da rezultati našeg istraživanja takođe ukazuju da usled tretmana ćelija kontinuirane ćelijske linije humanog glioblastoma ispitivanim preparatima karnozina u različitim koncentracijama dolazi do posledičnog dozno-zavisnog smanjenja sposobnosti ka migraciji. Netretirana grupa ćelija se odlikovala velikom migratornom sposobnošću i gotovo u potpunosti nastali defekt je bio prekriven ćelijama ($25,84 \pm 0,240\%$ početne vrednosti defekta). Međutim, usled tretmana čistom supstancom L-karnozin najizraženiji inhibicioni uticaj ka migraciji ćelija primećen je u grupi tretiranoj koncentracijom od 10 mM karnozina ($78,47 \pm 0,186\%$ u odnosu na vrednosti izmerene u 0 h). Pored navedenog i tretmani nižim koncentracijama pokazali su inhibicioni potencijal ka migratornoj sposobnosti na ispitivanoj ćelijskoj liniji (u grupi 5 mM L-karnozin $66,74 \pm 0,135\%$ i u grupi 2 mM L-karnozin $60,45 \pm 0,110\%$ u odnosu na vrednosti izmerene u 0 h). Primena preparata Now® L-karnozin takođe je uslovlila statistički značajno dozno-zavisno smanjenje migratorne sposobnosti ćelija sa sličnim % vrednostima površine prisutnog defekta koja je uočena i nakon tretmana L-karnozinom. Srednje vrednosti defekta uslovljene tretmanom ovim preparatom iznosile su $57,76 \pm 0,081\%$, $64,51 \pm 0,393\%$, $68,77 \pm 0,192\%$ za primenjene koncentracije od 2, 5 i 10 mM karnozina u medijumu za rast.

Usled tretmana U87 ćelija preparatom Karnozin EXTRA® površina praznog prostora u odnosu na početnu vrednost u 0 h statistički se značajno razlikovala u svim primenjenim koncentracijama. U grupi 2 mM Karnozin EXTRA® površina prisutnog defekta je iznosila $62,79 \pm 0,124\%$, dok je u grupi 5 mM ta vrednost bila značajno veća ($81,72 \pm 0,214\%$) u odnosu na tretmane istom koncentracijom karnozina kada su u pitanju L-karnozin i preparat Now® L-karnozin. Posebno treba naglasiti ispoljene efekte postignute koncentracijom od 10 mM karnozina iz ovog preparata. Primećeno je drastično smanjenje broja vijabilnih ćelija adheriranih za površinu flaska pri čemu je procentualna vrednost površine praznog prostora bila najveća ($103 \pm 0,111\%$) u odnosu na izmerene vrednosti ostalih eksperimentalnih grupa iste koncentracije karnozina. Sve ovo govori u prilog ne samo o inhibitornom potencijalu na migratornu sposobnost već i potpunom uništenju tumorskih ćelija ove ćelijske linije, što je u saglasnosti sa navodima u istraživanju sprovedenom od strane Oppermann H i saradnika (313).

Postavlja se interesantno pitanje da li procesi koji smanjuju migratornu sposobnost kao i proliferaciju tumorskih ćelija nakon kratkotrajnog izlaganja karnozinu mogu posledično dovesti do nastanka ćelijske smrti pri ekspoziciji karnozinu istih ćelija u dužem vremenskom periodu (313) ili u kraćem vremenskom periodu kada je u pitanju tretman preparatom Karnozin EXTRA® na kontinuiranoj ćelijskoj liniji humanog glioblastoma.

Kako vimentin predstavlja ključnu komponentu citoskeleta sa bitnim biološkim funkcijama na ćelijskom nivou od posebne važnosti je bilo ispitati uticaj čiste supstance L-karnozina kao i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na stepen imunoreaktivnosti ovog proteina u citoplazmi ćelija. Poseban akcenat u literaturi se stavlja na uloge vimentina tokom procesa migracije ćelija zbog njegove interakcije sa mikotubulima i aktinom (314, 315), a takođe poznata je i njegova uloga tokom procesa EMT ali i metastaziranja karcinomskih ćelija.

Naime, mreža vimentinskih filamenata je blisko povezana ali i funkcionalno zavisna od mikrotubula (316, 317, 318). Upravo zbog ovakve povezanosti često se može primetiti postojanje "kolapsa" u blizini nukleusa usled promena na nivou mikrotubula pod uticajem kolhicina (317). U istraživanju sprovedenom od strane Gan i saradnika kroz kvantitativni sistematski pristup

objašnjena je ova zavisna veza u sklopu citoskeletnog sistema tokom procesa ćelijske migracije (319). Primenom "scratch" eseja autori su analizirali retinalne epitalne ćelije koje eksprimiraju fluorescentno obeležen vimentin i tubulin. Postizanje konfluentnog monosloja pratili su putem kompjuterskog fotografisanja i praćenja migracije realne slike vijabilnih ćelija (319). Primećeno je da su vimentinski filamenti stabilni tokom 20 minuta nakon tretmana sa nokodazolom kao i da su mikrotubuli koji su u vezi sa vimentinom bili otporniji nakon sprovedenog tretmana. Takođe, navodi se i da su mikrotubuli zapravo koristili vimentinske filamente kao osnovu za rast po prekidanju tretmana. Upravo ova povezanost filamenata pruža formiranje "memorije" potrebne za kontinuirano održavanje polariteta ćelija od strane mikrotubula kratkog životog veka (319). Međutim, molekularna priroda mikrotubul-vimentin povezanosti još uvek nije razjašnjena, iako postoje značajni dokazi da se ona ostvaruje putem drugih proteina ili usled procesa fosforilacije (320, 321).

Sa druge strane, aktinski filamenti se reorganizuju u različite nizove formirajući skelet ali i potporu za membranske produžetke kao što su lamelopodije i filopodije što upravo omogućuje procese migracije ćelija (314). Komunikacija vimentina sa aktinskim filamentom odvija se direktno preko repnog domena vimentina ali i indirektno preko proteina plektina (322). Pored navednog u literaturi se opisuje još jedan protein koji je u bliskoj povezanosti sa vimentinom a to je *capping* protein (CP) regulator *CARMIL2* (CP, Arp2/3, myosin-I) koji omogućuje formiranje lamelopodija kao i migraciju ćelija zavisnu od vimentina (323).

Pretražujući literaturne podatke naišli smo na mali broj istraživanja koja govore o uticaju L-karnozina na ekspresiju vimentina kod zdravih kontinuiranih ćelijskih linija (324, 325). U našem istraživanju sprovedenom u svrhu utvrđivanja uticaja čiste supstance L-karnozin kao i preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin na ekspresiju vimentina u ćelijama dve kontinuirane zdrave ćelijske linije fibroblasta vršeno je imunofluorescentno bojenje i kvantifikacija dobijenih rezultata. Sprovedeni 24 h tretmani zdravih ćelijskih linija L-karnozinom i karnozinom iz preparata Now® L-karnozin doveli su do smanjenja ekspresije vimentina. Pri analizi tretiranih BHK-21/C-13 i

MRC-5 ćelija pod fluorescentnim mikroskopom primetili smo i promene u rasporedu samih vlakana intermedijernih filamenata kao i gubitak karakterističnih svojstava vimentinske mreže.

Ikeđa D i saradnici sprovedili su istraživanje na ćelijskoj liniji embrionalnih pacovskih fibroblasta (3Y1-B) u cilju ispitivanja efekata L-karnozina na ekspresiju vimentina (324). Fibroblasti su rasli tokom 7 dana u DMEM medijumu tretiranom 30 mM L-karnozinom. Organizaciju i građu vimentinskih filamenata pratili su i analizirali putem imunofluorescentnog mikroskopa i primetili su da sprovedeni tretman dovodi do stimulacije razvoja vimentinskih filamenata u kultivisanim ćelijama. Tretirane ćelije su takođe pokazivale i izmenjen oblik, bile su izduženije i tanje u odnosu na ćelije kontrolne grupe. Primenom imunoblot metode u svrhu određivanja nivoa ekspresije vimentina na fibroblastima ustanovili su statistički značajan porast nivoa ekspresije vimentina po ćeliji u grupi tretiranoj L-karnozinom u odnosu na kontrolnu.

Navodi sprovedenog istraživanja su u saglasnosti sa našim rezultatima dobijenim nakon analize tretmana preparatom Karnozin EXTRA® na kontinuiranim ćelijskim linijama BHK-21/C-13 i MRC-5. Naime, sve tri ispitivane koncentracije karnozina iz preparata nakon 24 h tretmana uslovile su porast intenziteta signala za protein vimentin. Takođe, pri analizi ćelija pod fluorescentnim mikroskopom zapazili smo da sa porastom koncentracije karnozina iz ispitivanog preparata dolazi i do promene oblika samih ćelija kao i prisutva izmenjenih svojstava i građe intermedijernih filamenata. Ćelijska linija BHK-21/C-13 nakon tretmana se odlikovala prisustvom grupisanih snopova vlakana, dok su se u citoplazmi MRC-5 ćelija mogli vizualizovati mali regioni intermedijernih filamenata koncentrisani u perifernim delovima ćelija neposredno uz ćelijsku membranu. U literaturi se navodi da promene u eksprimiranosti vimentina zdravih ćelija uslovljene primenom karnozina mogu rezultovati u za sada još uvek nepoznatim efektima na ćelijske događaje te je stoga potrebno sprovesti dalja istraživanja u svrhu određivanja mehanizama odgovornih za nastale promene ekspresije kako bi se što bolje razumele fiziološke uloge karnozina (324).

Povećana ekspresija vimentina u epitelnim ćelijama pored povećanja mortaliteta ćelija, uslovljava i promene u obliku ćelija ali i gubitak međućelijskih veza (326, 327). Messica Y i

saradnici su sprovodili istraživanje na invazivnoj ćelijskoj liniji karcinoma dojke (MDA-MB-231) u cilju ispitivanja kako ekspresija vimentina reguliše mehanička, migratorna i invazivna svojstva karcinoma dojke (328). Karakteristika ove ćelijske linije jeste da su podložnije deformacijama kao i da su osetljivije u odnosu na druge karcinomske ćelije dojke. Primećeno je da usled nedostatka ekspresije vimentina dolazi do značajnog smanjenja sposobnosti ćelija za migracijom i invazijom.

U ovoj doktorskoj disertaciji analiziran je nivo ekspresije vimentina u citoplazmi MCF-7 ćelija. Ćelijska linija adenokarcinoma dojke (MCF-7) poseduje karakteristike epitela diferenciranih mlečnih žlezda. Ove ćelije pokazuju pozitivnost na epitelne markere kao što su E-kadherin, β -katenin i citokaretin 18 (CK18) dok su sa druge strane negativne na mezenhimalne markere kao što su vimentin i α glatki mišićni aktin (α -SMA) (329). Dobijeni rezultati u našem istraživanju su u skladu sa literaturnim navodima. Naime, kontrolna grupa MCF-7 ćelijske linije u našoj studiji se odlikovala odsustvom ekspresije proteina vimentina u citoplazmi ćelija.

Astrociti predstavljaju specijalizovane glijalne ćelije ključne u funkcionisanju CNS (330). Cistoskelet astrocita sastoji se od IF vimentina, nestina i glijalnog fibrilarnog kiselog proteina (GFAP) (331, 332). GFAP predstavlja ključan IF protein zrelih astrocita u fiziološkim uslovima, dok je vimentin visoko ekspresiran kod astrocita tokom normalnog razvoja CNS-a kao i usled povreda CNS-a (332). Dobro je poznato da je usled povećane ekspresije vimentina prisutna povećana ćelijska pokretljivost i invazivnost astrocita u procesu formiranja glioma (327, 333). Nasuprot navednog, kombinovana redukcija ekspresije proteina kao što su vimentin, GFAP i nestin uzrokuju smanjenje brzine kretanja astrocita usled masivne ćelijske migracije (334) kao grupe u procesima zavisnim od ćelijsko-ćelijskog kontakta (335). De Pascalis C i saradnici u svom istraživanju koristili su primarne astrocite pacova sa smanjenom ekspresijom vimentina uz očuvanost proteina GFAP i nestina (334). Upotrebom "scratch" eseja primetili su perpendikularno naglašeno prisustvo aktinskih stres vlakana uz sam defekt, zatim smanjenje aktinskih stres vlakana paralelno raspoređenih uz sam defekt kao i smanjenje retrogradnog kretanja aktina. Usled trostrukog "knockdown" intermedijernih filamenata astrocita nastaju promene i na nivou

morfologije ali i adherentnih veza. Pored navedenog primećeno je i da se sistem interemedijernih filamenata astrocita umnogome menja i uslovljava smanjenje mehaničke povezanosti kao i fokalne adhezivnosti aktin-miozinske mreže.

U sprovedenom istraživanju utvrdili smo nizak stepen imunofluorescentnog signala za protein vimentin u kontrolnoj grupi kontrinuirane ćelijske linije humanog glioblastoma. Nakon sprovedenog tretmana čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Now[®] L-karnozin u svim ispitivanim koncentracijama evidentno je da nema statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu kada je u pitanju nivo ekspimiranosti ovog proteina. U grupi 2 mM Karnozin EXTRA[®] takođe nije evidentirano postojanje značajne različitosti, međutim nakon tretmana koncentracijom od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA[®] dokazali smo pojačan stepen ekspresije vimentina u odnosu na kontrolnu kao i ostale eksperimentalne grupe.

Usled posmatranja ćelijske migracije u *in vitro* uslovima potrebno je posebnu pažnju posvetiti i ćelijskoj gustini, faktorima sredine kao i koncentraciji supstrata u medijumu za rast. Prekomerena ekspresija vimentina može ukazivati na promene u filamentoznoj mreži, pa se u cilju određivanja specifičnosti izmena i modifikacija u građi filamenata mora pristupiti i novijim genskim analizama. Takođe, potencijalno objašnjenje povećanja ekspimiranosti vimentina može biti povezano sa izmenjenim morfološkim svojstvima uzrokovanim tretmanom u smislu promene oblika i veličine samih ćelija uslovljavajući time povećanje imunoreaktivnosti na manjoj površini ćelija (336).

Brojna istraživanja navode kao jednu od mnogobrojnih uloga karnozina njegovo učešće u smanjenju oksidativnog stresa *in vitro* ali i u *in vivo* uslovima (206). Antioksidativna svojstva karnozina zasnivaju se na njegovoj reakciji sa superoksidnim anijonima (337, 338), reaktivnim aldehydima kao što su 4-hidroksinonenal i akrolein (339-342) ili karbonilnim grupama u oksidativnim proteinima (343).

Poznato je da ROS predstavljaju centralni pokretač u nastanku mitohondrijske disfunkcije, što ujedno dovodi i do smanjenja mitohondrijskog potencijala (344). Upravo iz ovih razloga, stroga regulacija nivoa ROS-a je neophodna za održavanje vitalnosti ćelija kao i izbegavanje

oksidativnog oštećenja usled izlaganja stresu (345). SOD enzimi predstavljaju porodicu antioksidativnih enzima koji katalizuju konverziju ROS u H_2O_2 kod eukariotskih ćelija (346). SOD2 enzim ispoljava svoju funkciju kroz regulaciju oksidativnog stresa i energetskog metabolizma (347).

Oberley i saradnici prvi su pretpostavili da bi MnSOD mogao biti gen koji je ključan u ciljanoj terapiji čime bi se smanjenjem aktivnosti MnSOD postigla promena malignog fenotipa tumorskih ćelija (348). Promene nivoa produkcije O_2^- i H_2O_2 pomoću MnSOD i drugih antioksidativnih enzima mogu promeniti intracelularno redoks stanje te posledično regulisati aktivaciju faktora transkripcije ili kaskadne transdukcije signala u kontroli ćelijskog rasta. Dakle, prepostavlja se da promene intracelularne koncentracije nivoa O_2^- i H_2O_2 mogu igrati fundamentalnu ulogu u supresiji tumora (349).

Dobro je poznato da je ekspresiranost SOD2 markera veća kod ćelija raka dojke u poređenju sa ćelijama zdravog tkiva (350). Ovo povećanje ekspresije je posebno evidentno kod tumora višeg histološkog i kliničkog gradusa (351). U našem istraživanju, primenom imunofluorescentnog bojenja MCF-7 ćelijske linije na SOD2 antigen i kvantifikacijom signala imunoreaktivnosti uočili smo visoku pozitivnost u ekspresiranosti SOD2 u mitohondrijama ćelija kontrolne grupe što je u skladu sa literaturnim navodima.

Prekomerena ekspresija SOD2 u tumorskim ćelijama korelira sa pojačanom ekspresijom i aktivnošću matriks metaloproteinaze (MMP), što uslovljava pojačanu degradaciju matriksa kao i oslobađanje citokina i faktora rasta a time se ujedno promovise nastanak metastaza (352). Zhang HJ i saradnici su primetili, vršeći istraživanje na MCF7 ćelijskoj liniji koja je estrogen pozitivna, da usled povećanja ROS dolazi ujedno i do pojačane ekspresije SOD2 što posledično dovodi do aktivacije MMP-2 (353). Takođe, usled prekomerene ekspresije SOD2 u fibrosarkomu HT-1080 kao i u ćelijama karcinoma bešike (253J) značajno se podstiče migracija i invazija tumorskih ćelija kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima (354-356). U literaturi postoje navodi i da p53 ima sposobnost indukcije ekspresije SOD2 markera indirektnim putem (357, 358). Jedan od potencijalnih efekata povećane ekspresije SOD2 jeste značajno smanjenje aktivnosti

katalaze, što posledično rezultira povećanom proizvodnjom H_2O_2 (354, 359) za koju se pokazalo da pojačava ekspresiju MMP-1 (360), a takođe može povećati i nivoe VEGF i MMP-9 koji pospešuju ćelijsku invaziju i angiogenezu (361, 362). Zapravo viši nivo ekspresije SOD2 uzrokuje povećanu ekspresiju gena povezanih sa metabolizmom ROS, ali i nastankom hipoksije i EMT (363). Nedavna istraživanja su dokazala da SOD2 može igrati bitnu ulogu u fenotipskoj tranziciji tumora ka invazivnijim, otpornijim na lekove i prometastatskim fenotipovima (364, 365). Pored navedenog, povećana ekspresija SOD2 u tumorskim ćelijama povezana je i sa prisustvom udaljenih metastatskih promena u organizmu pacijenta, lošijom prognozom i pre svega lošijom stopom preživljavanja (366, 367).

U skladu sa navedenim, rezultati našeg istraživanja govore o povoljnom uticaju karnozina u svrhu supresije tumorskih ćelija humanog adenokarcinoma dojke. Naime, ekspresija SOD2 nakon sprovedenog tretmana MCF-7 ćelijske linije čistom supstancom L-karnozin kao i ispitivanim preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin statistički je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu ćelija. Značajnije smanjenje ispitivanog markera je prisutno u grupama ćelija tretiranih L-karnozinom i preparatom Now® L-karnozin u odnosu na grupu tretiranu karnozinom iz preparata Karnozin EXTRA® u svim ispitivanim koncentracijama.

Sa druge strane, analizirajući uticaj čiste supstance karnozina kao i ispitivanih preparata na ekspresiranost SOD2 u mitohondrijama ćelija humanog glioblastoma primetili smo da sprovedeni tretmani nisu ispoljili značajnije promene u odnosu na netretiranu grupu ćelija. Moguće objašnjenje koje leži u osnovi ovog nalaza jeste niska koncentracija karnozina u medijumu za rast ćelija, te bi se primenom viših koncentracija u narednim istraživanjima otklonila ova sumnja. Pretražujući literaturne podatke, nismo naišli na radove koji su se bavili istraživanjem uticaja karnozina na ekspresiranost SOD2 markera u mitohondrijama ćelija glioblastoma. Međutim, brojna istraživanja svedoče o primeni Temozolomida u tretmanu ovih ćelija (368, 369). Sprovodeći istraživanje na U87 ćelijskoj liniji Chien i saradnici primetili su da usled smanjenja ekspresije SOD2 nakon primene Temozolomida dolazi do indukcije apoptoze, smanjenje

formiranja kolonija u *in vitro* eksperimentima kao i povećanje stope preživljavanja kod pacijenata (370).

Iako je cilj ove disertacije bio ispitivanje uticaja karnozina na tumorskim ćelijama, inkubacijom zdravih ćelija pri istim koncentracijama ispitivanih preparata stekli smo uvid o potencijalnim efektima u fiziološkim uslovima kao i prepostavkama šta se odvija unutar organizma usled moguće primene ove supstance. Pretražujući literaturu naišli smo na istaživanja koja su se bavila analizom uticaja karnozina na ekspresiranost SOD2 u zdravim ćelijama. Nakon inkubacije zdrave kontinuirane ćelijske linije L6 koncentracijom od 10, 20 i 30 mM karnozina u medijumu za rast prisutan je porast u ekspresiranosti SOD2 pri poređenju sa netretiranom grupom mioblasta (308). Takođe, u *in vivo* uslovima suplementacija karnozinom pokazala je porast mišićne SOD2 aktivnosti kod svinja (371). Rezultati našeg istraživanja su u saglasnosti sa literaturnim navodima. Naime, usled tretmana zdravih ćelijskih linija BHK-21/C-13 i MRC-5 čistom supstancom L-karnozin pri koncentraciji od 10 mM karnozina u medijumu za rast uočili smo porast ekspresije SOD2 markera u citoplazmi ispitivanih ćelija u odnosu na kontrolne grupe ($p < 0,0001$). Međutim, primena nižih koncentracija (2 i 5 mM karnozina) u tretmanu obe grupe ćelija nije uslovlila nastanak značajnije različitosti u nivou ekspresije ovog markera u odnosu na kontrolnu grupu. Analizirajući uticaj preparata Karnozin EXTRA® na intenzitet fluorescencije SOD2 proteina, uočili smo da je tretman karnozinom pri koncentracijama od 5 i 10 mM na obe zdrave ćelijske linije uslovio značan porast vrednosti TCCF ($p < 0,0001$). Iste efekte je uslovio i tretman MRC-5 ćelijske linije preparatom Now® L-karnozin pri koncentracijama karnozina od 5 i 10 mM ($p < 0,0001$).

U svom istraživanju Fakhruddin S i saradnici navode da je produkcija ROS-a u mitohondrijskom kompartmentu ključni faktor koji uzrokuje nastanak oksidativnog oštećenja i posledičnu apoptozu zdravih ćelija bubrega (372). U literaturi postoje navodi da H_2O_2 i drugi ROS mogu prouzrokovati povećanu permeabilnost mitohondrijske membrane (373, 374). Kao posledica dugotrajnog izlaganja ROS-u mitohondrije gube sposobnost da održe adekvatan membranski potencijal što na kraju dovodi do nastanka apoptoze ćelija (375). Usled narušavanja

integriteta mitohondrijske membrane stvara se jedan začarani krug. Gubitkom citohroma c iz intermembranskog prostora smanjuje se sinteza ATP-a kao i curenje elektrona a time dolazi i do povećanja produkcije ROS-a (376). Oslobođanje citohroma c je posredovano proteinom kao što je Bax a to u krajnjem dovodi do nastanka apoptoze ćelija. Zaštitini efekti karnozina u zdravim ćelijama usled prisustva H_2O_2 ogledaju se upravo u smanjenju oslobođanja citohroma c iz mitohondrija u ćelijski matriks, a takođe i nivoi ekspresije Bax su značajno niži u prisustvu karnozina. Sve navedeno sugeriše da karnozin ima zaštitini efekat prema zdravim ćelijama inhibicijom apoptoze indukovane od strane mitohondrija (377).

U fiziološkim uslovima jako je bitna ravnoteža između produkcije prooksidanasa kao i njihovo eliminisanje putem zaštitnih mehanizama od strane endogenih enzima (378). Nedavna istaživanja su dokazala da mitohondrijska MnSOD2 dovodi do smanjenja mitohondrijske produkcije ROS i time ujedno ima ulogu u prevenciji nastanka mitohondrijskog oštećenja. Pored navedenog, povećana ekspresija SOD2 kod zdravih ćelija smanjuje apoptozu uzrokovanu H_2O_2 , peroksidaciju lipida kao i izmene u produkciji stvaranja mitohondrijskog ATP-a (379, 380).

Iako literaturni navodi govore u prilog zaštitnog mehanizma karnozina na ćelijskom nivou povećanjem ekspresiranosti SOD2 markera kod zdravih ćelija što posledično prevenira nastanak apoptoze usled smanjenja delovanja ROS na mitohondrije, u ovoj doktorskoj disertaciji primetili smo da usled inkubacije BHK-21/C-13 ćelija pri koncentraciji od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Now® L-karnozin dolazi do značajnog smanjenja ekspresiranosti SOD2 markera u citoplazmi ovih ćelija. Slične rezultate dobili su i Palin MF i saradnici u svojoj studiji sprovedenoj na primarnoj ćelijskoj liniji mišića prasića (381). Aplikacija 10 mM karnozina u medijumu za rast ćelija dovela je do smanjenja SOD2 aktivnosti u odnosu na kontrolnu grupu, dok tretmani koncentracijom od 25 i 50 mM karnozina nisu imali efekta. U fiziološkim koncentracijama, karnozin pokazuje aktivnost kao i SOD2, zapravo u mogućnosti je da formira komplekse za prenos naelektrisanja sa superoksidnim anjonima (O_2^-) (382). Stoga, dejstvo karnozina može dovesti i do smanjenih potreba za ćelijskom aktivnošću SOD2 što može biti potencijalno objašnjenje uočenog smanjenja

aktivnosti SOD2 enzima usled tretmana zdravih ćelijskih linija karnozinom (381). Međutim, dodatna istraživanja su potrebna da bi se sa sigurnošću moglo dati objašnjenje ovog nalaza.

Smatra se da mitohondrije predstavljaju centralne regulatore u procesima invazije i metastaziranja karcinomskih ćelija (383, 384). Zapravo, produkcija ROS se odvija na nivou mitohondrijskog respiratornog lanca i upravo se iz tog razloga ove organele smatraju ključnim u procesima ćelijske migracije i invazije (385). Proizvodnja ROS-a u mitohondrijama regulisana je putem porodice proteina Bcl-2 (386). Iako su prvobitno identifikovani kao ključni regulatori ćelijske smrti (387), određeni članovi porodice Bcl-2 takođe učestvuju u procesima migracije, invazije i metastaziranja tumorskih ćelija (386). Naime, Bcl-X_L, Bcl-2, and Bcl-w dovode do stimulacije kompleksa I, kao glavnog izvora u mitohondrijskom respiratornom lancu odakle potiče dodatna proizvodnja ROS-a. Prekomerena produkcija ROS-a zatim uzrokuje povećanje ekspresije Bcl-v ili Bcl-KSL markera što pospešuje nastanak ćelijske invazije (388).

Opšte je poznato da su metaboličke promene jedno od obeležja karcinomskih ćelija. Za razliku od zdravih ćelija, tumorske ćelije su izuzetno heterogene sa individualnim metaboličkim karakteristikama u zavisnosti od vrste tkiva od kog potiču. Ruski naučnik Otto Warburg je prvi opisao da tumorske ćelije uglavnom koriste glikolizu kao osnovni put u produkciji energije uprkos prisustvu adekvatnog nivoa kiseonika (389). Ovaj fenomen korišćenja glikolize kao manje efikasnog energetskog puta često se spominje pod nazivom "aerobna glikoliza" ili "Warburgov efekat". Pretežno korišćenje glikolize za proizvodnju ATP-a u tumorskim ćelijama dovelo je do nastanka hipoteze o prisutnom slabo efikasnom mitohondrijskom respiratornom sistemu u ovim ćelijama. Međutim, ova slika varira u zavisnosti od tipa tumora, njegovog gradusa, porekla tumorskih ćelija kao i lokalizacije unutar tkiva (390).

Poslednjih godina, koncept "aerobne glikolize" kao osnovnog vida metabolizma tumorskih ćelija doveden je u pitanje, jer zapravo neke tumorske ćelije pokazuju visoku stopu proizvodnje energije putem OXPHOS-a (383, 391, 392). Rezultati istraživanja sprovedenog na kliničkom materijalu karcinoma dojke kod ljudi pokazali su da je u pitanju visoko oksidativni tumor kod kog je mitohondrijska respiracija izrazito povećana i osetljiva na inhibitore

respiratornog lanca mitohondrija (393, 394). Naime, glavni izvor produkcije ATP-a i dobijanja energije u ćelijama ovog karcinoma jeste OXPHOS i navodi se da čak 80% proizvedenog ATP-a nastaje ovim putem (395).

Noviji koncepti u tretmanu kancerskih ćelija se upravo razvijaju u pogledu fokusiranja na ćelijski metabolizam mitohondrija koji verovatno igra ključnu ulogu u veoma efektivnim terapijskim dostignućima za selektivno delovanje na malignitet (383). Od davnina je poznato da karnozin na tumorskim ćelijama ispoljava svoj antitumorski potencijal delujući i na bioenergetski kapacitet ovih ćelija putem inhibicije glikolize (274, 294). Rezultati našeg istraživanja govore u prilog antitumorskog potencijala ove supstance putem delovanja na mitohondrijski vid produkcije energije kod visoko-oksidativnog tumora kao što je adenokarcinom dojke. Analizom postignutih efekata usled tretmana MCF-7 ćelijske linije čistom supstancom L-karnozin, kao i preparatima Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin zabeležili smo inhibiciju produkcije energije na svim nivoima respiratornog lanca. Sprovedeni tretman uslovio je smanjenje aktivnosti C I, C II i C IV kompleksa, a najizraženiji inhibicioni potencijal evidentiran je primenom preparata Karnozin EXTRA® u svim ispitivanim koncentracijama.

Bao i sardanici istraživali su uticaj karnozina na stopu potrošnje kiseonika na HeLa ćelijama (294). U svom ogledu tretman su vršili tokom 48 h koncentracijom karnozina od 20 mM u medijumu za rast. Bazalni nivo potrošnje kiseonika se značajno smanjio u odnosu na grupu ne tretiranih ćelija. Takođe, navode i inhibicioni uticaj karnozina na aktivnost kompleksa (C I-C IV) respiratornog lanca mitohondrija tretiranih ćelija.

Proteolitička subjedinica kazeinolitičke proteaze (ClpP) jedna je od primarnih proteaza bitnih za održavanje homeostaze mitohondrijskog matriksa i mitohondrijskih proteina. Pored navedenog, uključena je i u regulisanju aktivnosti C I i C II respiratornog lanca mitohondrija pa samim tim i u proces mitohondrijskog disanja. Naime, Bao i sardanici u svojoj studiji primetili su da je sprovedeni tretman karnozinom na HeLa ćelijama doveo do značajnog smanjenja ekspresije ClpP kako na nivou transkripcije tako i na nivou translacije (294). Nedavno je objavljeno da smanjenje ekspresiranosti mitohondrijskog ClpP čini karcinomske ćelije osetljivijim na cisplatin,

lek koji se široko primenjuje u terapiji (396). Stoga se može pretpostaviti da inhibitorni uticaji karnozina na aktivnost kompleksa respiratornog lanca mogu biti uslovljeni smanjenjem ekspresije ovog proteina. Međutim, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja da bi se sa sigurnošću moglo reći da ClpP može biti meta za karnozin u lečenju karcinoma.

Drugo potencijalno objašnjenje inhibicije aktivnosti kompleksa respiratornog lanca mitohondrija (C I, III i IV) usled tretmana tumorskih ćelija karnozinom leži u osnovi promena H^+ puferskog kapaciteta koji nastaje kao posledica inkubacije ćelija, čime se narušava elektrohemijski gradijent od kog je zavisna aktivnost kompleksa V koji generiše produkciju ATP-a u ćelijama (294). Naime, kompleksi respiratornog lanca mitohondrija su povezani sa pumpanjem H^+ jona iz mitohondrijskog matriksa u intermembranski prostor i time dolazi do stvaranja elektrohemijskog gradijenta tokom procesa prenosa elektrona duž respiratornog lanca (43).

Dobro je poznato da je anaerobna glikoliza glavni vid ćelijske produkcije ATP-a u fetalnim organima (397), kao i da se povećanje mitohondrijskog respiratornog kapaciteta dešava tokom razvoja kako bi se metabolizam fetusa prilagodio izmenjenim uslovima sredine, odnosno rođenju (398). U svom istraživanju Bellance N i sardanici ustanovili su da se bioenergetski profil ćelija plućnog epidermoidnog karcinoma (HLF-a) i humanih fetalnih plućnih ćelija (MRC-5), poreklom iz istog tkiva, odlikuje velikim procentom proizvodnje ATP-a putem glikolize (399). Suprotno navedenom, u zdravim fibroblastima kože, udeo u mitohondrijskom OXPHOS kapacitetu u produkciji energije odlazi više od 50% ukupno proizvedenog ATP-a (400). Kada su HLF i MRC-5 ćelije inkubirane u medijumu lišenom glukoze u periodu od 48 h, proizvodnja ATP-a se odvijala iz alternativnih energetske supstrata. Ovo je ujedno i dokaz da se OXPHOS zapravo koristi kao alternativni energetski put kada je nivo dostupnosti glukoze ograničen, ali treba napomenuti da je stepen produkcije u toj situaciji dosta niži. Maksimalni kapacitet mitohondrijske sinteze ATP-a korišćenjem piruvata i malata kao energetske supstrata, bio je značajno niži u HLF-a i MRC-5 permeabilizovanim ćelijama, u poređenju sa ukupnim nivoom ATP-a proizvedenog usled prisustva glukoze u medijumu za rast ćelija. Ono što je još interesantno a jedna je od bitnih karakteristika MRC-5 ćelija kao ćelija fetalnog tkiva a ujedno i HLF-a karcinomskih ćelija jeste

prisustvo izrazitog smanjenja nivoa ekspresije proliferator-aktiviranog receptora g kaoaktivatora 1 (PGC1a), mitohondrijskog transkripcionog faktora A (mtTFA) kao i kompleksa respiratornog lanca mitohondrija (C I, II, III i IV) u poređenju sa ćelijama plućnog tkiva kod odraslih ljudi (399). Primenom Western blot analize u fetalnim ćelijama pluća kao i HLF-a ćelijama otkrivena je povećana koncentracija glikolitičkog enzima GAPDH u odnosu na ćelije zdravog plućnog tkiva odraslih. Visoka ekspimiranost glikolitičkih gena ranije je dokumentovana u brojnim tipovima karcinoma i objašnjenja putem stabilizacije transkripcionog faktora - hipoksija inducibilnog faktora 1α (HIF- 1α) (401). Potencijalna interakcija između HIF- 1α i PGC1a mogla bi objasniti inhibiciju mitohondrijske biogeneze kod MRC-5 ćelija (399, 402).

Pretražujući literaturne podatke nismo naišli na studije koje su se bavila ispitivanjem efekata L-karnozina na bioenergetski potencijal humanih fetalnih fibroblasta pluća. Inkubacijom MRC-5 ćelija tokom 24 h perioda pri različitim koncentracijama čiste supstance L-karnozina kao i karnozina iz preparata Now® L-karnozin u medijumu za rast ćelija analizirali smo uticaj na stepen potrošnje kiseonika kao i aktivnost kompleksa respiratornog lanca mitohondrija. Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji govore o inhibitornom dejstvu sprovedenog tretmana na aktivnost C I respiratornog lanca mitohondrija kod ove ćelijske linije kao i posledičnom smanjenju vrednosti maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema pri inkubaciji ćelija u sve tri primenjene koncentracije ispitivane supstance. Najizraženiji inhibitorni uticaj primećen je u grupama ćelija tretiranih koncentracijom od 10 mM karnozina. Međutim, usled inkubacije ove ćelijske linije u prisustvu karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® u medijumu za rast, uočen je inhibitorni potencijal na svim nivoima uključujući respiraciju intaktnih ćelija, aktivnost kompleksa C I, II, IV a time i posledični inhibitorni efekat na maksimalni kapacitet elektron transportnog sistema mitohondrija. Ovaj uticaj je primećen usled tretmana MRC-5 ćelija pri svim ispitivanim koncentracijama sa najizraženijim efektom u grupi 10 mM Karnozin EXTRA®. Zbog svojih specifičnih karakteristika ove ćelijske linije, kako bi se dalo potencijalno objašnjenje ovakvog nalaza usled aplikacije preparata Karnozin EXTRA® potrebno je proširiti studiju i ispitati

molekularni nivo delovanja pojedinačnih konstituenata kapsule na bioenergetski profil MRC-5 ćelija.

Sa druge strane, efekti koje sprovedeni tretman izaziva na zdravim BHK-21/C-13 ćelijama su u suprotnosti u odnosu na zabeležene kod MRC-5 ćelijske linije. Usled 24 h inkubacije BHK-21/C-13 ćelija pri koncentracijama od 2 i 5 mM čiste supstance L-karnozina kao i karnozina iz ispitivanih preparata prisutno je povećanje potrošnje kiseonika kao i stimulacija aktivnosti kompleksa respiratornog lanca mitohondrija (C I, II, IV) što dovodi i do povećanja maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema kao i do povećane produkcije energije od strane ovih organela. Međutim, pozitivni uticaj u smislu stimulacije proizvodnje ATP-a nije zabeležen i pri izlaganju ove ćelijske linije koncentraciji od 10 mM čistog karnozina kao ni karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin. Moguće objašnjenje ovog nalaza jeste da je visoka koncentracija ispitivane supstance u medijumu za rast uslovila i povećanje koncentracije unutar samih ćelija što je prouzrokovalo promene na nivou bioenergetskog potencijala mitohondrija usled verovatno početnog narušavanja integriteta mitohondrijske membrane.

Oppermann H i saradnici sprovodili su istraživanje na U87 ćelijskoj liniji pri čemu su ispitivali antitumorski potencijal karnozina (403). Analizirajući uticaj 50 mM karnozina tokom 24 h perioda na produkciju energije u ćelijama humanog glioblastoma primetili su smanjenje produkcije ATP-a između 44 i 89% (prosečno $75 \pm 15\%$) u odnosu na ne tretiranu grupu ćelija. Shen Y i saradnici, takođe su ispitivali efekte karnozina na stopu potrošnje kiseonika i energetske metabolizam ćelija kontinuirane ćelijske linije pacovskog glioma (C6) (274). Rezultati nakon 48 h perioda inkubacije ćelija u medijumu za rast pri tretmanu karnozinom u koncentraciji od 20 mM ukazali su na značajno smanjenje produkcije ATP-a a samim tim i posledično smanjenje respiracije. Sve navedeno ukazuje da je inhibicija glikolize jedna od posledica delovanja karnozina.

U literaturi se navodi i hipoteza da karnozin ima udela u smanjenju dostupnosti NAD^+ i ova prepostavka se može smatrati tačnom samo ako je efekat koji ispoljava karnozin specifičan za tumorske ćelije (404). Druga mogućnost potencijalnog delovanja karnozina na bioenergetski

potencijal jeste smanjenje dostupnosti piruvata usled glikolitičkog razlaganja glukoze pod uticajem karnozina. Naime, i ovaj proces značajno potiskuje regeneraciju NAD^+ za proces glikolize koji se odvijaju u ćelijama. Poznato je da karnozin reaguje sa aldehidima (405), ili sa drugim dipeptidima koji sadrže histidin, odnosno sa karbonil grupama uopšte (406). Upravo zbog ovih specifičnosti može reagovati sa jednim ili više metabolita u glikolitičkom putu.

Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji u vezi inhibitornog uticaja karnozina na energetske metabolizam ćelija glioblastoma, zapravo stepen produkcije ATP-a, procesa koji leže u osnovi adekvatnog funkcionisanja respiratornog lanca mitohondrija, u skladu su sa rezultatima drugih autora koji su pokazali antitumorski potencijal ove supstance putem delovanja na bioenergetski profil. Naime, primena preparata Karnozin EXTRA[®] u svim ispitivanim koncentracijama nakon tretmana U87 ćelijske linije uslovlila je inhibiciju produkcije energije i stopu potrošnje kiseonika kako na nivou "intaktnih" ćelija, tako i nakon permeabilizacije ćelijske membrane i primenom supstrata Krebsovog ciklusa. Evidentan je inhibitorni uticaj i na aktivnost svih ispitivanih kompleksa elektron transportnog sistema (CI, CII i CIV) kao i smanjenje maksimalnog kapaciteta respiratornog lanca u produkciji ATP-a. Slični efekti zabeleženi su i pri tretmanu ove ćelijske linije čistom supstancom L-karnozin kao i karnozinom i preparata Now[®] L-karnozin, međutim tek pri koncentraciji od 10 mM karnozina u medijumu za rast. Potencijalno objašnjenje ovog nalaza može biti u osnovi dužine inkubatornog perioda nakon tretmana kao i niske koncentracije ispitivane supstance, da bi se otklonile sumnje i uvideli efekti na bioenergetski potencijal, u narednim eksperimentima potrebno je produžiti inkubacioni period kao i primeniti veću koncentraciju ispitivane supstance.



6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata sprovedenog istraživanja u *in vitro* uslovima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Analizom **morfoloških karakteristika i stepena proliferacije:**

a) - zdravih ćelija bubrega hrčka (BHK-21/C-13) i humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) nakon tretmana čistom supstancom L-karnozina i karnozinom iz preparata Now® L-karnozin u svim ispitivanim koncentracijama nisu zabeležene promene. Isti efekti primećeni su i nakon tretmana preparatom Karnozin EXTRA® u koncentracijama od 2 i 5 mM karnozina na BHK-21/C-13 ćelijama.

- evidentirano je da su tretmani zdravih BHK-21/C-13 ćelija koncentracijom od 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® kao i MRC-5 ćelija u svim ispitivanim koncentracijama karnozina iz ovog preparata usloveli nastanak morfoloških varijacija kao i smanjenje broja vijabilnih ćelija.

b) ćelija humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) i humanog glioblastoma (U87) primećeno je da su sprovedeni tretmani usloveli evidentan gubitak karakterističnog oblika i promene u dimenzijama kao i prisustvo plutajućih ćelija u medijumu za rast, uz izražen citotoksični efekat.

2. Analizom **migratorne sposobnosti tumorskih ćelija:**

a) ustanovljena je slaba migratorna sposobnost kontrolne grupe ćelija kontinuirane ćelijske linije humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7).

- b) zabeležen je dozno-zavisni inhibitorni uticaj na migraciju ćelija kontinuirane ćelijske linije humanog glioblastoma (U87) usled sprovedenih tretmana.
3. Analizom efekata ispitivanih preparata na **ekspresiju vimentina**:
- a) - utvrđeno je da primena čiste supstance L-karnozina kao i karnozina iz preparata Now® L-karnozin, u svim ispitivanim koncentracijama, kod ćelija obe zdrave ćelijske linije dovodi do smanjenja ekspresije vimentina uz nastanak evidentnih promena u rasporedu samih vlakana intermedijernih filamenata kao i gubitak karakterističnih svojstava vimentinske mreže.
- evidentirano je da primena preparata Karnozin EXTRA® u sve tri ispitavne koncentracije karnozina u citoplazmi ćelija obe zdrave ćelijske linije uslovljava porast intenziteta imunofluorescentnog signala za ispitivani protein.
- b) - ustanovljeno je da primena koncentracija od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® na ćelijama humanog glioblastoma (U87) dovodi do porasta vrednosti ukupnog intenziteta fluorescentnog signala na protein vimentin.
- u citoplazmi ćelija humanog glioblastoma (U87) nakon tretmana čistom supstancom L-karnozin i preparatom Now® L-karnozin u svim ispitivanim koncentracijama kao i preparatom Karnozin EXTRA® pri koncentraciji od 2 mM karnozina nisu uočene značajne različitosti u stepenu ekspresije vimentina.
4. Analizom efekata ispitivanih preparata na **nivo ekspresije oksidativnog (SOD2) markera**:
- a) - lokalizovanog u mitohondrijama ćelija, primećeno je da su tretmani preparatom Karnozin EXTRA® pri koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina na obe zdrave ćelijske linije doveli do značajnog porasta vrednosti ukupnog intenziteta fluorescencije. Isti efekat evidentiran je i usled tretmana čistom supstancom L-karnozin u koncentraciji od 10 mM, dok niže koncentracije (2 i 5 mM) nisu uslovile značajne promene.

- primećeno je da usled tretmana koncentracijama od 5 i 10 mM karnozina iz preparata Now® L-karnozin u mitohondrijama ćelija bubrega hrčka (BHK-21/C-13) dolazi do značajnog smanjenja eksprimiranosti, dok se kod ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) beleži porast ekspresije ispitivanog markera.
 - b) - evidentirano je da sprovedeni tretmani na ćelijama humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) dovode do značajnog smanjenja nivoa eksprimiranosti.
 - u mitohondrijama ćelija humanog glioblastoma (U87) sprovedeni tretmani ne uzrokuju značajnije promene u odnosu na kontrolnu grupu.
5. Analizom efekata ispitivanih preparata na **energetski metabolizam**:
- a) - zdravih ćelija bubrega hrčka (BHK-21/C-13) primećeno je da su sprovedeni tretmani uslovlili povećanje produkcije energije putem stimulacije aktivnosti kompleksa respiratornog lanca mitohondrija kao i maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema. Međutim, primena ispitivanih preparata u koncentraciji od 10 mM karnozina ispoljava inhibitorno dejstvo na svim nivoima respiratornog lanca mitohondrija uz posledično smanjenje proizvodnje energije.
 - zdravih ćelija humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) sprovedeni tretmani čistom supstancom L-karnozin kao i preparatom Now® L-karnozin pri svim ispitivanim koncentracijama uslovlili su inhibiciju aktivnosti kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija uz posledično smanjenje vrednosti maksimalnog kapaciteta elektron transportnog sistema. Primena preparata Karnozin EXTRA® pri svim ispitivanim koncentracijama na ovoj ćelijskoj liniji uzrokovala je inhibiciju produkcije energije delujući na svim nivoima respiratornog lanca mitohondrija.
 - b) - ustanovljeno je da su sprovedeni tretmani doveli do inhibicije produkcije energije u ćelijama humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) delujući na svim nivoima respiratornog lanca mitohondrija. Isti efekti zabeleženi su i pri tretmanima ćelija

humanog glioblastoma (U87) preparatom Karnozin EXTRA® u svim ispitivanim koncentracijama.

- primećeno je da se tek primenom koncentracije od 10 mM karnozina u vidu čiste supstance kao i iz preparata Now® L-karnozin na ćelijama humanog glioblastoma (U87) postiže inhibitorski efekat na svim nivoima respiratornog lanca mitohondrija uz posledično smanjenje produkcije energije.

Antitumorski potencijal čiste supstance L-karnozina kao i karnozina iz preparata Karnozin EXTRA® i Now® L-karnozin u *in vitro* uslovima na kontinuiranim tumorskim linijama humanog adenokarcinoma dojke i humanog glioblastoma ispoljava se kroz više nivoa delovanja. Izmena morfoloških svojstava u pogledu oblika i veličine ćelija, inhibicija migracije ćelija koje poseduju ovu sposobnost, uticaj na ekspresiranost proteina vimentina i SOD2 markera, kao i delovanje na energetske metabolizam ćelija u smislu redukcije proizvodnje energije u krajnjem dovode do ispoljavanja citotoksičnih efekata ovih preparata na MCF-7 i U87 ćelijskim linijama. Međutim, i pored sveobuhvatnih pokušaja da se utvrdi tačan mehanizam delovanja L-karnozina usled uslovljavanja ovih promena na karcinomske ćelije još uvek je nepoznanica, te ostaje otvoreno pitanje za naredna istraživanja putem kojih molekularnih i celularnih mehanizama karnozin ispoljava svoj antitumorski potencijal kako bi se ova enigma u potpunosti razjasnila. Rezultati izneti u ovoj doktorskoj disertaciji na tumorskim ali i zdravim ćelijskim linijama govore o potrebi za daljim *in vivo* i kliničkim istraživanjima a sve u svrhu dalekosežnog cilja buduće primene ovih preparata kako u preventivne a tako i u terapijske svrhe kod obolelih pacijenata.

7. LITERATURA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359(5):492-507.
3. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer.* 2021;24(1):102-14.
4. Weinberg RA. *The biology of cancer*, 2nd edn. Garland Science, Taylor & Francis group, New York; 2014.
5. Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The mechanics of single cell and collective migration of tumor cells. *J Biom Eng.* 2017;139(2):0210051-9.
6. Xu WX, Wang DD, Zhao ZQ, Zhang HD, Yang SJ, Zhang Q, et al. Exosomal microRNAs shuttling between tumor cells and macrophages: cellular interactions and novel therapeutic strategies. *Cancer Cell Int.* 2022;22(1):1-9.
7. Alvarez CL, Troncoso MF, Espelt MV. Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: Roles in epithelial–mesenchymal transition, cell migration, and invasion. *J Cell Physiol.* 2022;237(1):389-400.
8. Craene BD, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(2):97-110.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
10. Jung H, Yoon SR, Lim J, Cho HJ, Lee HG. Dysregulation of rho GTPases in human cancers. *Cancers (Basel).* 2020;12(5):1–17.
11. Masi I, Caprara V, Bagnato A, Rosanò L. Tumor cellular and microenvironmental cues controlling invadopodia formation. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:584181.
12. Pagano E, Elias JE, Schneditz G, Saveljeva S, Holland LM, Borrelli F, et al. Activation of the GPR35 pathway drives angiogenesis in the tumour microenvironment. *Gut.* 2022;71(3):509-20.
13. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003;22(42):6549-56.
14. Loizzi V, Del Vecchio V, Gargano G, De Liso M, Kardashi A, Naglieri E, et al. Biological pathways involved in tumor angiogenesis and bevacizumab based anti-angiogenic therapy with special references to ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1967.

15. Kikuchi S, Yoshioka Y, Prieto-Vila M, Ochiya T. Involvement of extracellular vesicles in vascular-related functions in cancer progression and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2584.
16. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Epub .* 2007;392(3):371-9.
17. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia.* 2015;3:83-92.
18. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, et al. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology.* 1997;54(3):177-84.
19. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269(43):26988-95.
20. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine.* 2011;17(11):1359-70.
21. Breg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Biochemistry, New York, United States of America;* 2015.
22. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys.* 2014;68(3):475-8.
23. Chandel NS. Glycolysis. *Cold Spring Harb Perspec Biol.* 2021;13(5):a040535.
24. Scheffler IE. *Mitochondria. John Wiley & Sons;* 2011.
25. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, et al. Lipids reprogram metabolism to become a major carbon source for histone acetylation. *Cell Rep.* 2016;17(6):1463-72.
26. Park JO, Rubin SA, Xu YF, Amador-Noguez D, Fan J, Shlomi T, et al. Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nat Chem Biol.* 2016;12(7):482-9.
27. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science.* 2000;287(5454):848-51.
28. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun.* 2020;11(1):102.
29. Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(3):254-61.
30. Devin A, Rigoulet M. Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C52-8.
31. Nicholls DG. *Bioenergetics. Academic Press. London;* 2013.

32. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2011;1807(12):1507-38.
33. Chance B, Williams GR. A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature.* 1955;176(4475):250-4.
34. Muller FL, Liu Y, Abdul-Ghani MA, Lustgarten MS, Bhattacharya A, Jang YC, et al. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J.* 2008;409(2):491-9.
35. Siebels I, Dröse S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(10):1156-64.
36. Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Ghelli A, Rugolo M, Daldal F. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(11-12):1332-9.
37. Vercellino I, Sazanov LA. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23(2):141-61.
38. KrÖGER A, Klingenberg M. The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *Eur J Biochem.* 1973;34(2):358-68.
39. Margoliash E, Ferguson-Miller S, Tulloss J, Kang CH, Feinberg BA, Brautigan DL, et al. Separate intramolecular pathways for reduction and oxidation of cytochrome c in electron transport chain reactions. *Proc Natl Acad Sci.* 1973;70(11):3245-9.
40. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(5-6):639-47.
41. Gasmi A, Peana M, Arshad M, Butnariu M, Menzel A, Bjørklund G. Krebs cycle: activators, inhibitors and their roles in the modulation of carcinogenesis. *Arch Toxicol.* 2021;95(4):1161-78.
42. Reid RA, Moyle J, Mitchell P. Synthesis of adenosine triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria. *Nature.* 1966;212(5059):257-8.
43. Ramsay RR. Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. *ChemTexts.* 2019;5(2):1-4.
44. Entsch B, Ballou DP. Flavins. In: Lennarz WJ, Lane MD (eds) *Encyclopedia of Biological Chemistry.* Academic Press, London. 2013;309–13.
45. Beinert H. Trails of inquiry and thought leading toward today's bioenergetics. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Bioenergetics.* 1992;1101(2):125-33.
46. Hagen WR. EPR spectroscopy of complex biological iron–sulfur systems. *J Biol Inorg Chem.* 2018;23(4):623-34.

47. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc.* 2008;3(6):965-76.
48. Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol.* 2015;4:381-98.
49. Pérez-Mejías G, Díaz-Quintana A, Guerra-Castellano A, Díaz-Moreno I, Miguel A. Novel insights into the mechanism of electron transfer in mitochondrial cytochrome c. *Coord Chem Rev.* 2022;450:214233.
50. Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science.* 2010;329(5990):448-51.
51. Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature.* 2013;494(7438):443-8.
52. Kaila VR. Long-range proton-coupled electron transfer in biological energy conversion: Towards mechanistic understanding of respiratory complex I. *J R Soc Interface.* 2018;15(141):20170916.
53. Jones AJ, Blaza JN, Varghese F, Hirst J. Respiratory complex I in *Bos taurus* and *Paracoccus denitrificans* pumps four protons across the membrane for every NADH oxidized. *J Biol Chem.* 2017;292(12):4987-95.
54. Crofts AR. The cytochrome bc(1) complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:689–733
55. Wikstrom M, Sharma V, Kaila VR, Hosler JP, Hummer G. New perspectives on proton pumping in cellular respiration. *Chem Rev.* 2015;115(5):2196-221.
56. Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 4.* Academic, London; 2013.
57. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *Journal Cell Biol.* 1981;91(3):227s-55s.
58. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Ann Rev Biochem.* 2003;72:77-109.
59. Schägger H. Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB life.* 2001;52(3-5):119-28.
60. Najafi N, Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H, Hayes AW, Karimi G. Chemical agents protective against rotenone-induced neurotoxicity. *Toxicol Environ Chem.* 2022;104(1):149-75.
61. Jardim-Messeder D, Margis-Pinheiro M, Sachetto-Martins G. Salicylic acid and adenine nucleotides regulate the electron transport system and ROS production in plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2022;1863(6):148559.

62. Barzegari A, Omid Y, Landon R, Gueguen V, Parvizpour S, Meddahi-Pellé A, et al. The protective effect of N-acetylcysteine on antimycin A-induced respiratory chain deficiency in mesenchymal stem cells. *Chem Biol Interact.* 2022;360:109937.
63. Nielson JR, Nath AK, Doane KP, Shi X, Lee J, Tippetts EG, et al. Glyoxylate protects against cyanide toxicity through metabolic modulation. *Sci Rep.* 2022;12(1):1-6.
64. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-33.
65. Koc EC, Haciosmanoglu E, Claudio PP, Wolf A, Califano L, Friscia M, et al. Impaired mitochondrial protein synthesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Mitochondrion.* 2015;24:113-21.
66. Nicolay BN, Danielian PS, Kottakis F, Lapek JD, Sanidas I, Miles WO, et al. Proteomic analysis of pRb loss highlights a signature of decreased mitochondrial oxidative phosphorylation. *Genes Dev.* 2015;29(17):1875-89.
67. Frezza C, Pollard PJ, Gottlieb E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. *J Mol Med.* 2011;89(3):213-20.
68. Lin CS, Wang LS, Tsai CM, Wei YH. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interact. Cardiovasc Thorac Surg.* 2008;7(6):954-8.
69. LaBiche RA, Demars MA, Nicolson GL. Transcripts of the mitochondrial gene ND5 are overexpressed in highly metastatic murine large cell lymphoma cells. *Vivo.* 1992;6(4):317-24.
70. Glaichenhaus N, Leopold P, Cuzin F. Increased levels of mitochondrial gene expression in rat fibroblast cells immortalized or transformed by viral and cellular oncogenes. *The EMBO J.* 1986;5(6):1261-5.
71. Raimundo N, Baysal BE, Shadel GS. Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med.* 2011;17(11):641-9.
72. Menendez JA, Alarcón T, Joven J. Gerometabolites: the pseudohypoxic aging side of cancer oncometabolites. *Cell Cycle.* 2014;13(5):699-709.
73. Nam H, Campodonico M, Bordbar A, Hyduke DR, Kim S, Zielinski DC, et al. A systems approach to predict oncometabolites via context-specific genome-scale metabolic networks. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(9):e1003837.
74. Frezza C, Gottlieb E. Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin Cancer Biol.* 2009; 19(1):4-11.
75. Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab.* 2014;2(1):1-9.

76. Waniewski RA, Martin DL. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci.* 1998;18(14):5225-33.
77. Sharma R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990–2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer.* 2019;26(4):428-45.
78. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int Journal Cancer.* 2021;149(4):778-89.
79. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, Cabanes A, Caleffi M, Dunstan Yataco JA, et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. *Cancer.* 2020;126:2379-93.
80. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, et al. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: A collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* 2013;14:1009–19.
81. Zhang X, Tworoger S, Eliassen AH, Hankinson SE. Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137:883–92.
82. Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvåle G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: Exploring interaction effects. *Br J Cancer.* 2004;92:167–75.
83. Ursin G, Bernstein L, Lord SJ, Karim R, Deapen D, Press MF, et al. Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *Br J Cancer.* 2005;93:364–71.
84. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64:9–29.
85. McGuire A, Brown JAL, Malone C, McLaughlin R, Kerin MJ. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers.* 2015;7:908–29.
86. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: Collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001;358:1389–99.
87. Wu HC, Do C, Andrulis IL, John EM, Daly MB, Buys SS, et al. Breast cancer family history and allele-specific DNA methylation in the legacy girls study. *Epigenetics.* 2018;13:240–50.
88. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann Oncol.* 2015;26:1291–9.
89. Shahbandi A, Nguyen HD, Jackson JG. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends Cancer.* 2020;6:98–110.

90. Corso G, Veronesi P, Sacchini V, Galimberti V. Prognosis and outcome in CDH1-mutant lobular breast cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2018;27:237–8.
91. Kechagioglou P, Papi RM, Provatopoulou X, Kalogera E, Papadimitriou E, Grigoropoulos P, et al. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: Heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* 2014;34:1387–400.
92. Chen J, Lindblom A. Germline mutation screening of the STK11/LKB1 gene in familial breast cancer with LOH on 19p. *Clin Genet.* 2001;57:394–7.
93. Yedjou CG, Sims JN, Miele L, Noubissi F, Lowe L, Fonseca DD, et al. Health and Racial Disparity in Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1152:31–49.
94. ACS. American Cancer Society (2016) Breast Cancer Facts & Figures, 2015–2016. American Cancer Society; Atlanta, GA, USA: 2016
95. Hilakivi-Clarke L. Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters. *Breast Cancer Res.* 2014;16:208.
96. Palmer JR. Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:1509–14.
97. Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J. Use of hormone replacement therapy and risk of breast cancer: Nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. *BMJ.* 2020;371:m3873.
98. Wernli KJ, Ms JMH, Trentham-Dietz A, Newcomb PA. Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2009;18:284–90.
99. Chen X, Wang Q, Zhang Y, Xie Q, Tan X. Physical Activity and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis of 38 Cohort Studies in 45 Study Reports. *Value Health.* 2018;22:104–28.
100. Hoffinan-Goetz L. Influence of Physical Activity and Exercise on Innate Immunity. *Nutr. Rev.* 2009;56:S126–30.
101. Kolb R, Zhang W. Obesity and Breast Cancer: A Case of Inflamed Adipose Tissue. *Cancers.* 2020;12:1686.
102. Sun L, Zhu Y, Qian Q, Tang L. Body mass index and prognosis of breast cancer. *Medicine.* 2018;97:e11220.
103. Terry PD, Rohan TE. Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: A review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2002;11:953–71.
104. Report on the implementation of the Council Recommendation on Cancer Screening in the European Union. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu> (25 March 2019, date last accessed).
105. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition—summary document. *Ann Oncol* 2007;19(4):614–22.

106. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30(8):1194-220.
107. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B, Decker T, Federico M, Gilbert FJ, et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer* 2010;46(8): 1296–316.
108. Erber R, Hartmann A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care*. 2020;15:327–36.
109. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt S, Tan PH, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast. 2012.
110. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008;216:141–50.
111. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*. 2014;465(1):1-4.
112. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses With Clinical Implications. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:10869–74.
113. Saha T, Lukong KE. Breast cancer stem-like cells in drug resistance: A review of mechanisms and novel therapeutic strategies to overcome drug resistance. *Front Oncol*. 2022;12:856974.
114. Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF. Molecular classification of breast cancer. *PET clinics*. 2018;13(3):325-38.
115. Gregório AC, Lacerda M, Figueiredo P, Simões S, Dias S, Moreira JN. Therapeutic implications of the molecular and immune landscape of triple-negative breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(4):701-16.
116. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PV, Blumencranz PW, et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *Jama*. 2011;305:569–75.
117. Morrow M, Jagsi R, McLeod MC, Shumway D, Katz, S. J. Surgeon attitudes toward the omission of axillary dissection in early breast cancer. *Jama Oncol*. 2018;4:1511–16.
118. Poodt IGM, Spronk PER, Vugts G, Dalen T, Peeters V, Rots ML et al. Trends on axillary surgery in nondistant metastatic breast cancer patients treated between 2011 and 2015: a Dutch population-based study in the ACOSOG-Z0011 and AMAROS era. *Ann Surg*. 2018;268:1084–90.
119. McCahill LE, Single RM, Bowles EJ, Feigelson HS, James TA, Barney T, et al. Variability in reexcision following breast conservation surgery. *Jama*. 2012;307(5):467-75.

120. Wang T, Bredbeck BC, Sinco B, Shubeck S, Baskin AS, Skolarus T, et al. Variations in persistent use of low-value breast cancer surgery. *Jama surgery*. 2021;156(4):353-62.
121. Caudle AS, Yang WT, Krishnamurthy S, Mittendorf EA, Black DM, Michael Z Gilcrease MZ et al. Improved axillary evaluation following neoadjuvant therapy for patients with node-positive breast cancer using selective evaluation of clipped nodes: implementation of targeted axillary dissection. *J Clin Oncol*. 2016;34:1072–8.
122. Delaney G, Barton M, Jacob S. Estimation of an optimal radiotherapy utilization rate for breast carcinoma. *Cancer*. 2003;98(9):1977–86.
123. Vinh-Hung V, Verschraegen C. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumour recurrence and mortality. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(2):115–21.
124. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(16),1233–41.
125. Swanick CW, Smith BD. Indications for adjuvant radiation therapy in breast cancer: a review of the evidence and recommendations for clinical practice. *Chin Clin Oncol*. 2016; 5(3):9.
126. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, Struikmans H, Van Den Bogaert W, Barillot I, et al. Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1378–87.
127. Forker LJ, Choudhury A, Kiltie AE. Biomarkers of tumour Radiosensitivity and predicting benefit from radiotherapy statement of search strategies used and sources of information *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2015;27:561–9.
128. Olivares-Urbano MA, Griñán-Lisón C, Marchal JA, Núñez MI. CSC radioresistance: a therapeutic challenge to improve radiotherapy effectiveness in cancer. *Cell*. 2020;9(7):1651.
129. Liu YQ, Wang XL, He DH, Cheng YX. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: a review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. *Phytomedicine*. 2021;80:153402.
130. Tao JJ, Visvanathan K, Wolff AC. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast*. 2015;24:S149–53.
131. Chan J, Adderley H, Alameddine M, Armstrong A, Arundell D, Fox R, et al. Permanent hair loss associated with taxane chemotherapy use in breast cancer: A retrospective survey at two tertiary UK cancer centres. *Eur J Cancer Care*. 2021;30:e13395.

132. Demuth A, Czerniak U. Eating habits and preferences of Polish women undergoing treatment for breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(6):1803-08.
133. Rafiq S, Huma N, Gulzar N, Murtaza MA, Hussain I. Effect of cheddar cheese peptide extracts on growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction in human lung cancer (H-1299) cell line. *Int J Dairy Techn.* 2018;71(4):975-80.
134. Gaspar-Pintiliescu A, Oancea A, Cotarlet M, Vasile AM, Bahrim GE, Shaposhnikov S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition, antioxidant activity and cytotoxicity of bioactive peptides from fermented bovine colostrum. *Int J Dairy Techn.* 2020;73(1):108-16.
135. Algorashi I, Goldvaser H, Ribnikar D, Cescon DW, Amir E. Evolution in sites of recurrence over time in breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy. *Cancer Treat Rev.* 2018;70:138-43.
136. Blok EJ, Derks MG, van der Hoeven JJ, van de Velde CJ, Kroep JR. Extended adjuvant endocrine therapy in hormone-receptor positive early breast cancer: current and future evidence. *Cancer Treat Revi.* 2015;41(3):271-6.
137. Harbeck N. Advances in targeting HER2-positive breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2018;30(1):55-9.
138. Ahmed S, Sami A, Xiang J. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer.* 2015;22(2):101-16.
139. Diana A, Franzese E, Centonze S, Carlino F, Della Corte CM, Ventriglia J, et al. Triple-negative breast cancers: systematic review of the literature on molecular and clinical features with a focus on treatment with innovative drugs. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(10):1-1.
140. McCann KE, Hurvitz SA. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context.* 2018;7.
141. Martel S, Maurer C, Lambertini M, Pondé N, De Azambuja E. Breast cancer treatment-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2017;16(9):1021-38.
142. Omoruyi SI, Ekpo OE, Semenya DM, Jardine A, Prince S. Exploitation of a novel phenothiazine derivative for its anti-cancer activities in malignant glioblastoma. *Apoptosis.* 2020;25(3-4):261-74.
143. Rehan M, Mahmoud MM, Tabrez S, Hassan HM, Ashraf GM. Exploring flavonoids for potential inhibitors of a cancer signaling protein PI3Ky kinase using computational methods. *Anticancer Res.* 2020;40(8):4547-56.
144. Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 2006;66(1):159-67.

145. Cvetkoivč-Dožič D, Skender-Gazibara M, Dožič S. Morphological and molecular features of diffuse infiltrating astrocytoma. *Arch Oncol.* 2004;12:38–9
146. Karcher S, Steiner HH, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H, et al. Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int J Cancer.* 2006;118:2182–9.
147. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol.* 1999;1:44–51.
148. Fan X, Xiong Y, Wang Y. A reignited debate over the cell (s) of origin for glioblastoma and its clinical implications. *Front Med.* 2019;13(5):531-9.
149. Alessandrini F, Ceresa D, Appolloni I, Pagani F, Poliani PL, Marubbi D, et al. Glioblastoma models driven by different mutations converge to the proneural subtype. *Cancer lett.* 2020;469:447-55.
150. Lindberg N, Jiang Y, Xie Y, Bolouri H, Kastemar M, Olofsson T, et al. Oncogenic signaling is dominant to cell of origin and dictates astrocytic or oligodendroglial tumor development from oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci.* 2014;34(44):14644-51.
151. Herholz K. Brain tumors: an update on clinical PET research in gliomas. *In Seminars in nuclear medicine.* 2017;47(1):5-17.
152. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;359(5):492-507.
153. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006;2:494–503.
154. Padmalatha C, Harruff RC, Ganick D, Hafez GB. Glioblastoma multiforme with tuberous sclerosis. Report of a case. *Arch Pathol Lab Med.* 1980;104:649–50.
155. Grips E, Wentzensen N, Sutter C, Sedlacek O, Gebert J, Weigel R, et al, Glioblastoma multiforme as a manifestation of Turcot syndrome. *Nervenarzt.* 2002;73:177–82
156. Sánchez-Ortiga R, Boix Carreño E, Moreno-Pérez O, Picó Alfonso A. Glioblastoma multiforme and multiple endocrine neoplastic type 2 A. *Med Clin (Barc).* 2009;133:196–7.
157. Broekman ML, Risselada R, Engelen-Lee J, Spliet WG, Verweij BH. Glioblastoma multiforme in the posterior cranial fossa in a patient with neurofibromatosis type I. *Case Report Med.* 2009;2009:757898.
158. Moorthy RK, Rajshekhar V. Development of glioblastoma multiforme following traumatic cerebral contusion: case report and review of literature. *Surg Neurol.* 2004;61:180–4.
159. Lam PY, Di Tomaso E, Ng HK, Pang JC, Roussel MF, Hjelm NM. Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *Br J Neurosurg.* 2000;14:28–32.
160. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455:1061–8.

161. Kabat GC, Etgen AM, Rohan TE. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:2421–7.
162. Benson VS, Pirie K, Green J, Casabonne D, Beral V. Million Women Study Collaborators Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the million women study cohort. *Br J Cancer.* 2008;99:185–90.
163. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* 2002;62:3347–50.
164. Wang J, Yao L, Zhao S, Zhang X, Yin J, Zhang Y et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biol Ther.* 2012;13:389–400.
165. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2012;4:278–99.
166. Lakhan SE, Harle L. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2009;3:87.
167. Levine SA, McKeever PE, Greenberg HS. Primary cerebellar glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 1987;5:231-6.
168. Lakhan SE, Harle L. Difficult diagnosis of brainstem glioblastoma multiforme in a woman: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2009;3:87.
169. Gee TS, Ghani AR, Idris B, Awang MS. Case report: a rare case of pediatric conus medularis glioblastoma multiforme. *Med J Malaysia.* 2012;67:438-41.
170. Sanli AM, Turkoglu E, Dolgun H, Sekerci Z. Unusual manifestations of primary Glioblastoma Multiforme: A report of three cases. *Surg Neurol Int.* 2010;1:87.
171. Ulutin C, Fayda M, Aksu G, Cetinayak O, Kuzhan O, Ors F, et al. Primary glioblastoma multiforme in youngers patients: a single-instruction experience. *Tumori.* 2006;92:407-11.
172. Juveria S, Anant SK. Butterfly glioma. *N Engl J Med.* 2018;378(3):281.
173. Katsetos CD, Dráberová E, Legido A, Dumontet C, Dráber P. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J Cell Physiol.* 2009;221:505-13.
174. Schultz S, Pinsky GS, Wu NC, Chamberlain MC, Rodrigo AS, Martin SE. Fine needle aspiration diagnosis of extracranial glioblastoma multiforme: Case report and review of the literature. *Cytojournal.* 2005;2:19.
175. Kleihues P, Soylemezoglu F, Schäuble B, Scheithauer BW, Burger PC. Histopathology, classification and grading of gliomas. *Glia.* 1995;5:211-21.

176. Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H, Ikenaka K. GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev Neurosci*. 1997;19:49-57.
177. Rutka JT, Murakami M, Dirks PB, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K et al. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg*. 1997;87:420-30.
178. Dohan FC Jr, Kornblith PL, Wellum GR, Pfeiffer SE, Levine L. S-100 protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in human brain tumors. *Acta Neuropathol*. 1977; 40:123-8.
179. Rickert CH, Riemenschneider MJ, Schachenmayr W, Richter HP, Bockhorn J, Reifenberger G, et al. Glioblastoma with adipocyte-like tumor cell differentiation – histological and molecular features of a rare differentiation pattern. *Brain Pathol*. 2009;19:431-8.
180. Linkous AG, Yazlovitskaya EM. Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011;11:712-8.
181. Rojiani AM, Dorovini-Zis K. Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *J Neurosurg*. 1996;85:1078-84.
182. Louis DN, editor. WHO classification of tumours of the central nervous system. WHO; 2007.
183. Aamir A, Ul-Haque A. Morphological spectrum of vascular changes in glioblastoma multiforme. *I J Pathol*. 2006;4:1-5.
184. Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon. 2000.
185. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Choen C, Hammond EH et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res*. 2004;64:920-7.
186. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*. 2003;22:3407-11.
187. Biernat W. Molekularne podłoże procesu progresji złośliwości glejaków rozlanych ośrodkowego układu nerwowego. *Onkol Pol*. 1999;2:113-9.
188. Schröder R, Bien K, Kott R, Meyers I, Vössing R. The relationship between Ki-67 labeling and mitotic index in gliomas and meningiomas: demonstration of the variability of the intermitotic cycle time. *Acta Neuropathol*. 1991;82:389-94.
189. Mellinghoff IK, Gilbertson RJ. Brain tumors: challenges and opportunities to cure. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2343-5.

190. Stummer W, van den Bent MJ, Westphal M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta neurochir.* 2011;153(6):1211-8.
191. Lemée JM, Clavreul A, Aubry M, Com E, de Tayrac M, Eliat PA, et al. Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multidisciplinary analysis. *J Neuro-oncol.* 2015;122(1):53-61.
192. Weller M, Cloughesy T, Perry JR, Wick W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet?. *Neuro Oncol.* 2013;15(1):4-27.
193. Karcher S, Steiner HH, Ahmadi R, Zoubaa S, Vasvari G, Bauer H, et al. Different angiogenic phenotypes in primary and secondary glioblastomas. *Int J Cancer.* 2006;118:2182-9.
194. Chang JE, Khuntia D, Robins HI, Mehta MP. Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007;5:894-902.
195. Castro MG, Candolfi M, Kroeger K, King GD, Curtin JF, Yagiz K et al. Gene therapy and targeted toxins for glioma. *Curr Gene Ther.* 2011;11:155-80.
196. Kislin KL, McDonough WS, Eschbacher JM, Armstrong BA, Berens ME. NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion. *Neoplasia.* 2009;11:377-87.
197. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352:997-1003.
198. Davis ME. Glioblastoma: overview of disease and treatment. *Clin Onco Nurs.* 2016;20(5):S2-8.
199. Lakomy R, Kazda T, Selingerova I, Poprach A, Pospisil P, Belanova R, et al. Real-world evidence in glioblastoma: stupp's regimen after a decade. *Front Oncol.* 2020;10:840.
200. Gerstner ER, Batchelor TT. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer J.* 2012;18:45-50.
201. Specenier P. Bevacizumab in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012;12:9-18.
202. Chamberlain MC. Bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma. *Clin Med Insights Oncol.* 2011;5:117-29
203. Chen S, Ma J, Yang L, Teng M, Lai ZQ, Chen X, et al. Anti-glioblastoma activity of Kaempferol via Programmed cell death induction: involvement of autophagy and pyroptosis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:1410.
204. Alam S, Khan F. 3D-QSAR studies on Maslinic acid analogs for anticancer activity against breast cancer cell line MCF-7. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-13.

205. Jorgensen WL. The many roles of computation in drug discovery. *Science*. 2004;303:1813-18.
206. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W. Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiol Rev* 2013;93:1803–45
207. Toviwek B, Suwanasopee T, Koonawootrittriron S, Pongprayoon P. A computational insight into how human serum carnosinase 1 recognises carnosine and anserine. *Biophysic J*. 2022;121.3:50a-1.
208. Gulewitsch WL, Amiradžibi S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. *Ber Deutsch Chem Ges*. 1900;33(2):1902-3.
209. Clifford WM. The distribution of carnosine in the animal kingdom. *Biocheml J*. 1921;15(6):725.
210. Ackermann D , Timpe O , Poller K. Uber das anserin, einen neuen Bestandteil der Vogelmusculatur. *Hoppe-Seil Ztschr Physiol*. 1929;B183:S1–10.
211. Tolkatschewskaya NF. Zurr Kenntnis der Extraktstoffe der Muskeln. Uber des Extraktivstoffe des Hunherfleisherm. *Hoppe-Seil Ztschr Physiol Chem*. 1929;B185: S32.
212. Kamal MA, Jiang H, Hu Y, Keep RF, Smith DE. Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(4):R986-91.
213. Harris RC, Jones G, Hill CA, Kendrick IP, Boobis L, Kim C, et al. The carnosine content of v lateralis in vegetarians and omnivores. *FASEB J* 2007;21:A944–A944.
214. Davey CL. The significance of carnosine and anserine in striated skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 1960;89(2):303-8.
215. Purchas RW, Busboom JR. The effect of production system and age on levels of iron, taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine in beef muscles and liver. *Meat Sci*. 2005;70(4):589-96.
216. Crush KG. Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp Biochem Physiol*. 1970;34(1):3-0.
217. Calam DH, Waley SG. Amino acids and related compounds in the lens. *Biochem J*. 1964;93(3):526.
218. Mannion AF, Jakeman PM, Dunnett M, Harris RC, Willan PL. Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Europ J Appl Physiol Occup Physiol*. 1992;64(1):47-50.
219. Pan JW, Hamm JR, Rothman DL, Shulman RG. Intracellular pH in human skeletal muscle by 1H NMR. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85(21):7836-9.
220. Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci*. 2019;19(1):30-9.

221. Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA, Ivanova SA. Use of carnosine for oxidative stress reduction in different pathologies. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. 2016:2939087.
222. Dai Z, Lu XY, Zhu WL, Liu XQ, Li BY, Song L, et al. Carnosine ameliorates age-related dementia via improving mitochondrial dysfunction in SAMP8 mice. *Food & function*. 2020;11:2489-2497.
223. Berezhnoy DS, Stvolinsky SL, Lopachev AV, Devyatov AA, Lopacheva OM, Kulikova OI, et al. Carnosine as an effective neuroprotector in brain pathology and potential neuromodulator in normal conditions. *Amino Acids*. 2019;51:139-150.
224. Abraham DA, Undela K, Narasimhan U, Rajanandh MG. Effect of L-Carnosine in children with autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Amino Acids*. 2021;53:575-85.
225. Kianpour M, Yousefi R. Carnosine prevents different structural damages induced by methylglyoxal in lens crystallins. *Cell Biochem Biophys*. 2019;77:343-355.
226. Boldyrev AA, Dupin AM, Batrukova MA, Bavykina NI, Korshunova GA, YuP S. A comparative study of synthetic carnosine analogs as antioxidants. *Comp Biochem Physiol B Comp Biochem*. 1989;94(2):237-40.
227. Boldyrev AA, Dupin AM, AYa B, Babizhaev M, Severin SE. The antioxidative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int*. 1987;15(6):1105-13.
228. Decker EA, Livisay SA, Zhou S. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine. *Biochemistry*. 2000;65:766–70.
229. Baran EJ. Metal complexes of carnosine. *Biochemistry*. 2000;65:789–97.
230. Torreggiani A, Tamba M , Fini G. Binding of copper(II) to carnosine: raman and IR spectroscopic study. *Biopolymers*. 2000;57:149–59.
231. Matsukura T, Tanaka H. Applicability of zinc complex of l-carnosine for medical use. *Biochemistry*. 2000;65:817–23.
232. Pavlov AR , Revina AA , Dupin AM , Boldyrev AA , Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta*.1993;1157:304–12.
233. Tamba M , Torreggiani A. A pulse radiolysis study of carnosine in aqueous solution. *Int J Radiat Biol*. 1998;74:333–40.
234. Aydin AF, Kucukgergin C, Ozdemirler-Erata G, Kocak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology*. 2010;11(1):103–09.
235. Kim MY, Kim EJ, Kim YN, Choi C, Lee BH. Effects of alpha-lipoic acid and l-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. *Nutr Res Pract*. 2011; 5:421-28.

236. Liu WH, Liu TC, Yin MC. Beneficial effects of histidine and carnosine on ethanol-induced chronic liver injury. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1503–09.
237. Baykara B, Cilaker MS, Tugyan K, Tekmen I, Bagriyanik HA, Sonmez U, et al. The protective effects of carnosine in alcohol-induced hepatic injury in rats. *Toxicol Ind Health* 2012;30.1:25-32.
238. Severina IS, Bussygina OG, Pyatakova NV. Carnosine as a regulator of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry.* 2000;65:783–8.
239. Deutsch A, Eggleton P. The titration constants of anserine, carnosine and some related compounds. *Biochem J.* 1938;32:209–11.
240. Hultman E, Sahlin K. Acid-base balance during exercise. *Exercise Sports Sci Rev.* 1980; 8:41–128.
241. Baguet A, Bourgois J, Vanhee L, Achten E, Derave W. Important role of muscle carnosine in rowing performance. *J Appl Physiol.* 2010;109(4):1096-101.
242. Dawson R, Biasetti M, Messina S, Dominy J. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. *Amino Acids.* 2002;22: 309–24.
243. Schroder L, Schmitz CH, Bachert P. Carnosine as molecular probe for sensitive detection of Cu(II) ions using localized (1)H NMR spectroscopy. *J Inorg Biochem.* 2008;102:174–83.
244. Batrukova MA, Rubtsov AM. Histidine-containing dipeptides as endogenous regulators of the activity of sarcoplasmic reticulum Ca-release channels. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1324:142–50.
245. ZapataSudo G, Sudo RT, Lin M, Nelson TE. Calcium-sensitizing function for the dipeptide carnosine in skeletal muscle contractility. *Cell Physiol Biochem.* 1997;7:81–92.
246. Dutka TL, Lamb GD. Effect of carnosine on excitation-contraction coupling in mechanically-skinned rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25:203–13.
247. Lamont C, Miller DJ. Calcium sensitizing action of carnosine and other endogenous imidazoles in chemically skinned striated muscle. *J Physiol.* 1992;454:421–34.
248. Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DT, Worthington VC, Keown M, Michaelis J, et al. Pluripotent protective effects of carnosine, a naturally occurring dipeptide. *Ann NY Acad Sci.* 1998;854:37-53.
249. Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DT, Romero IA, Abbott JN. Toxic effects of beta-amyloid (25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci Lett.* 1998;242:105–8.
250. Corona C, Frazzini V, Silvestri E, Lattanzio R, La SR, Piantelli M, et al. Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *PLoS One.* 2011;6:e17971.

251. Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y, Shen Y, Zhang W, Chen Z. Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28:307–16.
252. Attanasio F, Convertino M, Magno A, Caflisch A, Corazza A, Haridas H, et al. Carnosine inhibits A beta 42 aggregation by perturbing the H-bond network in and around the central hydrophobic cluster. *Chembiochem.* 2013;14:583–92.
253. Horning MS, Blakemore LJ, Trombley PQ. Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. *Brain Res.* 2000;852:56–61.
254. Boldyrev A, Fedorova T, Stepanova M, Dobrotvorskaya I, Kozlova E, Boldanova N, et al. Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res.* 2008;11:821–7.
255. Chengappa KN, Turkin SR, Desanti S, Bowie CR, Brar JS, Schlicht PJ, et al. A preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of l-carnosine to improve cognition in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2012;142:145–52.
256. Chmielewska K, Dzierzbicka K, Inkielewicz-Stępiak I, Przybyłowska M. Therapeutic potential of carnosine and its derivatives in the treatment of human diseases. *Chem Res Toxicol.* 2020;33(7):1561-78.

257. Ghajar A, Khoae-Ardakani MR, Shahmoradi Z, Alavi AR, Afarideh M, Shalbahfan MR, et al. L-carnosine as an add-on to risperidone for treatment of negative symptoms in patients with stable schizophrenia: A double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Psychiatry Res.* 2018;262:94-101.
258. Schön M, Mousa A, Berk M, Chia WL, Ukropec J, Majid A, et al. The potential of carnosine in brain-related disorders: A comprehensive review of current evidence. *Nutrients.* 2019;11(6):1196.
259. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC, Becker M, Schaefer K, Black C, et al. Double-blind, placebo-controlled study of l-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J Child Neurol.* 2002;17:833–7.
260. Pfister F, Riedl E, Wang Q, vom HF, Deinzer M, Harmsen MC, et al. Oral carnosine supplementation prevents vascular damage in experimental diabetic retinopathy. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28:125–36.
261. Riedl E, Pfister F, Braunagel M, Brinkkotter P, Sternik P, Deinzer M, et al. Carnosine prevents apoptosis of glomerular cells and podocyte loss in STZ diabetic rats. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28:279–88, 2011.

262. Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol.* 2005;513:145–50.
263. Nagai K, Suda T. Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine—physiological considerations of its antineoplastic effects. *Nihon Seirigaku Zasshi.* 1986;48:741–7.
264. Babizhayev MA. Antioxidant activity of l-carnosine, a natural histidine-containing dipeptide in crystalline lens. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1004:363–71.
265. Yan H, Guo Y, Zhang J, Ding Z, Ha W, Harding JJ. Effect of carnosine, aminoguanidine, and aspirin drops on the prevention of cataracts in diabetic rats. *Mol Vis.* 2008;14:2282–91.
266. Attanasio F, Cataldo S, Fisichella S, Nicoletti S, Nicoletti VG, Pignataro B, et al. Protective effects of l- and d-carnosine on alpha-crystallin amyloid fibril formation: implications for cataract disease. *Biochemistry.* 2009;48:6522–31.
267. Artioli GG, Sale C, Jones RL. Carnosine in health and disease. *Eur J Sport Sci.* 2019;19(1):30-9.
268. Cheng JY, Yang JB, Liu Y, Xu M, Huang YY, Zhang JJ, et al. Profiling and targeting of cellular mitochondrial bioenergetics: inhibition of human gastric cancer cell growth by carnosine. *Acta Pharmacol Sin.* 2019;40(7):938-48.
269. Iovine B, Iannella ML, Nocella F, Pricolo MR, Bevilacqua MA. Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* 2012; 315:122–8.
270. Lee J, Park JR, Lee H, Jang S, Ryu SM, Kim H, et al. L-carnosine induces apoptosis/cell cycle arrest via suppression of NF- κ B/STAT1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2018;54(7):505-12.
271. Sale C, Artioli GG, Gualano B, Saunders B, Hobson RM, Harris RC. Carnosine: from exercise performance to health. *Amino acids.* 2013;44(6):1477-91.
272. Holliday R, McFarland GA. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br J Cancer.* 1996;73:966–71.
273. Renner C, Seyffarth A, de Arriba S, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F. Carnosine inhibits growth of cells isolated from human glioblastoma multiforme. *Int J Pept Res Ther.* 2008;14:127–35.
274. Shen Y, Yang J, Li J, Shi X, Ouyang L, Tian Y, et al. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells through both of the mitochondrial respiration and glycolysis pathways. *PLoS one.* 2014;9(8):e104632.

275. Mikuła-Pietrasik JU, Książek K. L-carnosine prevents the pro-cancerogenic activity of senescent peritoneal mesothelium towards ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 2016;36:665-71.
276. Lebeau PF, Chen J, Byun JH, Platko K, Austin RC. The trypan blue cellular debris assay: a novel low-cost method for the rapid quantification of cell death. *MethodsX.* 2019;6:1174-80.
277. Drljača J, Popović A, Bulajić D, Stilinović N, Vidičević Novaković S, Sekulić S, et al. Diazepam diminishes temozolomide efficacy in the treatment of U87 glioblastoma cell line. *CNS Neurosci Ther.* 2022;28(9):1447-57.
278. Kraijak K, Chao-Nan L, Ming-Tang C. Cell Viability and Cytotoxic Testing of Seventeen Asian Plant Extracts toward MARC-145 Cells by MTT Assay. *วารสาร เกษตร พระ วรณ มหาวิทยาลัย ราชภัฏ มหาสารคาม.* 2016;13(1):40-8.
279. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat protoc.* 2007;2(2):329-33.
280. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell cycle.* 2014;13(9):1400-12.
281. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat protoc.* 2008;3(6):965-76.
282. Shirazi FH, Zarghi A, Ashtarinezhad A, Kobarfard F, Nakhjavani M, Anjidani N et al. Remarks in successful cellular investigations for fighting breast cancer using novel synthetic compounds. Croatia: INTECH Open Access Publisher; 2011;85-102.
283. Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard LL, Petit A, Dulong C et al. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC cancer.* 2013;13(1):1-4.
284. Perrot-Applanat M, Di Benedetto M. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adh Migr.* 2012;6(6):547-53.
285. Messica Y, Laser-Azogui A, Volberg T, Elisha Y, Lysakovskaia K, Eils R et al. The role of vimentin in regulating cell invasive migration in dense cultures of breast carcinoma cells. *Nano Lett.* 2017;17(11):6941-8.
286. Chao DL, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Paulson TG, Cowan DS, et al. Cell proliferation, cell cycle abnormalities, and cancer outcome in patients with Barrett's esophagus: A long-term prospective study. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6988–95.

287. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S25-S54.
288. Loo G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14:64–73.
289. Sidlauskas K, Sidlauskiene R, Li N, Liobikas J. 5-Hydroxy-1, 4-naphthalenedione exerts anticancer effects on glioma cells through interaction with the mitochondrial electron transport chain. *Neurosci Lett.* 2017;639:207-14.
290. Weller M, Schmidt C, Roth W, Dichgans J. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? *Neurology.* 1997;48(6):1704-9.
291. Jia H, Qi X, Fang S, Jin Y, Han X, Wang Y et al. Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression. *Regul Pept.* 2009;154:69-76.
292. Schuhmacher M, Eick D. Dose-dependent regulation of target gene expression and cell proliferation by c-Myc levels. *Transcription.* 2013;4:192-7.
293. Zhang Z, Miao L, Wu X, Liu G, Peng Y, Xin X, et al. Carnosine inhibits the proliferation of human gastric carcinoma cells by retarding Akt/mTOR/p70S6K signaling. *J Cancer.* 2014;5:382-9.
294. Bao Y, Ding S, Cheng J, Liu Y, Wang B, Xu H et al. Carnosine inhibits the proliferation of human cervical gland carcinoma cells through inhibiting both mitochondrial bioenergetics and glycolysis pathways and retarding cell cycle progression. *Integr Cancer Ther.* 2018;17:80-91.
295. Prakash MD, Fraser S, Boer JC, Plebanski M, de Courten B, Apostolopoulos V. Anti-Cancer Effects of Carnosine—A Dipeptide Molecule. *Molecules.* 2021;26(6):1644.
296. Pandurangan M, Enkhtaivan G, Kim DH. Therapeutic efficacy of natural dipeptide carnosine against human cervical carcinoma cells. *J Mol Recognit.* 2016;29(9):426-35.
297. Christof R, Anne S, Susana GA, Jürgen M, Rolf G, Frank G. Carnosine inhibits growth of cells isolated from human glioblastoma multiforme. *Int J Pep Res Ther.* 2008;2:127–35.
298. Seidel C, Birkemeyer C, Baran-Schmidt R, Meixensberger J, Oppermann H, Gaunitz F. Viability of Glioblastoma Cells and Fibroblasts in the Presence of Imidazol-Containing Compounds. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5834.
299. Hsieh SL, Li JH, Dong CD, Chen CW, Wu CC. Carnosine suppresses human colorectal cancer cell proliferation by inducing necroptosis and autophagy and reducing angiogenesis. *Oncology Letters.* 2022;23(2):1-2.
300. Satyanarayana A, Hilton MB, Kaldis P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol Biol Cell.* 2008;19(1):65-77.

301. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res.* 2015;141(4):389.
302. Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *J Cancer.* 2016;7(3):314.
303. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
304. Geng Y, Lee YM, Welcker M, Swanger J, Zagodzón A, Winer JD, et al. Kinase-independent function of cyclin E. *Mol Cell.* 2007;25(1):127-39.
305. Gadbois DM, Peterson S, Bradbury EM, Lehnert BE. CDK4/cyclin D1/PCNA complexes during staurosporine-induced G1 arrest and G0 arrest of human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1995;220(1):220-5.
306. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 1998;396(6711):580-4.
307. Borlado LR, Méndez J. CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis.* 2008;29(2):237-43.
308. Rezzani R, Favero G, Ferroni M, Lonati C, Moghadasian MH. A carnosine analog with therapeutic potentials in the treatment of disorders related to oxidative stress. *PLoS One.* 2019;14(4):e0215170.
309. McFarland GA, Holliday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. *Exp Cell Res.* 1994;212(2):167-75.
310. McFarland GA, Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Exp Gerontol.* 1999;34(1):35-45.
311. Liu Q, Xue Y, Chen Q, Chen H, Zhang X, Wang L, et al. PomGnT1 enhances temozolomide resistance by activating epithelial-mesenchymal transition signaling in glioblastoma. *Oncol Rep.* 2017;38(5):2911-8.
312. Li DM, Chen QD, Wei GN, Wei J, Yin JX, He JH, et al. Hypoxia-Induced miR-137 Inhibition Increased Glioblastoma Multiforme Growth and Chemoresistance Through LRP6. *Front Oncol.* 2021;10:611699.
313. Oppermann H, Dietterle J, Purcz K, Morawski M, Eisenlöffel C, Müller W, et al. Carnosine selectively inhibits migration of IDH-wildtype glioblastoma cells in a co-culture model with fibroblasts. *Cancer Cell Int.* 2018;18(1):1-0.
314. Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, Waterman CM. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:315–33.
315. Esue O, Carson AA, Tseng Y, Wirtz. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J Biol Chem.* 2006;281(41):30393–9.

316. Ball EH and Singer SJ. Association of microtubules and intermediate filaments in normal fibroblasts and its disruption upon transformation by a temperaturesensitive mutant of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78(11):6986–90.
317. Goldman RD. The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J Cell Biol*. 1971;51(3):752–62.
318. Nieuwenhuizen RP, Nahidiazar L, Manders EM, Jalink K, Stallinga S, Rieger B. Co-Orientation: Quantifying Simultaneous Co-Localization and Orientational Alignment of Filaments in Light Microscopy. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131756.
319. Gan Z, Ding L, Burckhardt CJ, Lowery J, Zaritsky A, Sitterley K, et al. Vimentin Intermediate Filaments Template Microtubule Networks to Enhance Persistence in Cell Polarity and Directed Migration. *Cell Syst*. 2016;3(3):252–63.e8.
320. Sakamoto Y, Boëda B, Etienne-Manneville S. APC binds intermediate filaments and is required for their reorganization during cell migration. *J Cell Biol*. 2013;200(3):249–58.
321. Duan G and Walther D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol*. 2015;11(2):e1004049.
322. Svitkina TM, Verkhovsky AB, Borisy GG. Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1996;135(4):991–1007.
323. Lanier MH, Kim T, Cooper JA. CARMIL2 is a novel molecular connection between vimentin and actin essential for cell migration and invadopodia formation. *Mol Biol Cell*. 2015;26(25):4577–88.
324. Ikeda D, Wada SI, Yoneda C, Abe H, Watabe S. Carnosine stimulates vimentin expression in cultured rat fibroblasts. *Cell struct and funct*. 1999;24(2):79-87.
325. Popovic A, Drljaca J, Popovic M, Miljkovic D, Marinovic J, Ljubkovic M, et al. Mitochondrial Energy Metabolism in Baby Hamster Kidney (BHK-21/C13) Cells Treated with Karnozin EXTRA®. *Int J Morphol*. 2022;40(1).
326. Rogel MR, Soni PN, Troken JR, Sitikov A, Trejo HE, Ridge KM. Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *FASEB J*. 2011;25(11):3873–83.
327. Mendez MG, Kojima SI and Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010;24(6):1838–51.
328. Messica Y, Laser-Azogui A, Volberg T, Elisha Y, Lysakovskaia K, Eils R, et al. The role of Vimentin in Regulating Cell Invasive Migration in Dense Cultures of Breast Carcinoma Cells. *Nano Lett*. 2017;17(11):6941–8.

329. D'Anselmi F, Masiello MG, Cucina A, Proietti S, Dinicola S, Pasqualato A, et al. Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines. *PloS one*. 2013;8(12):e83770.
330. Zuchero JB and Barres BA. Glia in mammalian development and disease. *Development*. 2015; 142(22):3805–9.
331. Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, et al. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem*. 1999;274(34):23996–4006.
332. Hol EM and Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:121–30.
333. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT. Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior. *Am J Pathol*. 1997;150(2):483–95.
334. De Pascalis C, Pérez-González C, Seetharaman S, Boëda B, Vianay B, Burute M, et al. Intermediate filaments control collective migration by restricting traction forces and sustaining cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 2018;217(9):3031–44.
335. Mayor R and Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(2):97–109.
336. Davidson AF and Higgins AZ. Detection of volume changes in calcein-stained cells using confocal microscopy. *J Fluoresc*. 2013;23(3):393–8.
337. Kohen R, Misgav R, Ginsburg I. The SOD like activity of copper:carnosine, copper:anserine and copper:homocarnosine complexes. *Free Radic Res Commun*. 1991;12–13:179–85.
338. Klebanov GI, Teselkin YuO, Babenkova IV, Popov IN, Levin G, Tyulina OV, et al. Evidence for a direct interaction of superoxide anion radical with carnosine. *Biochem Mol Biol Int*. 1997;43:99–106.
339. Aldini G, Carini M, Beretta G, Bradamante S, Facino RM. Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: through what mechanism of reaction? *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:699–706.
340. Baba SP, Hoetker JD, Merchant M, Klein JB, Cai J, Barski OA, et al. Role of aldose reductase in the metabolism and detoxification of carnosine-acrolein conjugates. *J Biol Chem*. 2013;288:28163–79.
341. Zhao J, Posa DK, Kumar V, Hoetker D, Kumar A, Ganesan S, et al. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. *Amino Acids*. 2019;51:123–38.

342. Spaas J, Franssen WMA, Keytsman C, Blancquaert L, Vanmierlo T, Bogie J, et al. Carnosine quenches the reactive carbonyl acrolein in the central nervous system and attenuates autoimmune neuroinflammation. *J Neuroinflamm.* 2021;18:255.
343. Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech Ageing Dev.* 2021;122:1431–45.
344. Dalle Pezze P, Nelson G, Otten EG, Korolchuk VI, Kirkwood TB, von Zglinicki T Shanley DP. Dynamic modelling of pathways to cellular senescence reveals strategies for targeted interventions. *PLoS Comput Biol.* 2014;10:e1003728.
345. Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. Impact of therapeutically induced reactive oxygen species and radical scavenging by alpha-tocopherol on tumor cell adhesion. *Oncol Rep.* 2007;18:965–71.
346. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013;6:19.
347. Quijano C, Trujillo M, Castro L, Trostchansky A. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol.* 2016;8:28–42.
348. Oberley LW and Spitz DR. *Methods in Enzymology.* Academic Press: New York. 1984;105:457-69.
349. Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St Clair DK. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene.* 1997;14(4):481-90.
350. Hart PC, Mao M, de Abreu AL, Ansenberger-Fricano K, Ekoue DN, Ganini D, et al. MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nat Commun.* 2015;6:6053.
351. Dhar SK, Tangpong J, Chaiswing L, Oberley TD, Clair DK. Manganese superoxide dismutase is a p53-regulated gene that switches cancers between early and advanced stages. *Cancer Res.* 2011;71(21):6684-95.
352. Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, et al. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2001;276:14264–70.
353. Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, Kregel KC, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2002;277:20919–26.

354. Connor KM, Hempel N, Nelson KK, Dabiri G, Gamarra A, Belarmino J, et al. Manganese superoxide dismutase enhances the invasive and migratory activity of tumor cells. *Cancer Res.* 2007;67:10260–7.
355. Quirós I, Sáinz RM, Hevia D, García-Suárez O, Astudillo A, Rivas M, et al. Upregulation of manganese superoxide dismutase (SOD2) is a common pathway for neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2009;125:1497–504.
356. Dinney CP, Fishbeck R, Singh RK, Eve B, Pathak S, Brown N, et al. Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. *J Urol.* 1995;154:1532–8.
357. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, et al. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004;64(7):2350-6.
358. Dhar SK, Xu Y, St. Clair DK. Nuclear factor kappaB- and specificity protein 1-dependent p53-mediated bi-directional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene. *J Biol Chem.* 2010;285:9835–46.
359. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (SOD2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11:191–201.
360. Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, et al. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem.* 1999;274:25869–76.
361. Nelson KK, Ranganathan AC, Mansouri J, Rodriguez AM, Providence KM, Rutter JL, et al. Elevated SOD2 activity augments matrix metalloproteinase expression: Evidence for the involvement of endogenous hydrogen peroxide in regulating metastasis. *Clin Cancer Res.* 2003;9:424–32.
362. Guo D, Wang Q, Li C, Wang Y, Chen X. VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions. *Oncotarget.* 2017;8:77020.
363. He C, Danes JM, Hart PC, Zhu Y, Huang Y, de Abreu AL, et al. SOD2 acetylation on lysine 68 promotes stem cell reprogramming in breast cancer. *Proc Nat Acad Sci.* 2019;116(47):23534-41.
364. Hemachandra LM, Shin DH, Dier U, Iuliano JN, Engelberth SA, Uusitalo LM, et al. Mitochondrial superoxide dismutase has a protumorigenic role in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Res.* 2015;75(22):4973-84.

365. Zhu Y, Zou X, Dean AE, Brien JO, Gao Y, Tran EL, et al. Lysine 68 acetylation directs MnSOD as a tetrameric detoxification complex versus a monomeric tumor promoter. *Nat Commun.* 2019;10(1):1-5.
366. Che M, Wang R, Li X, Wang HY, Zheng XS. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. *Drug Discov.* 2016;21(1):143-9.
367. Liu Z, Li S, Cai Y, Wang A, He Q, Zheng C, et al. Manganese superoxide dismutase induces migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via H₂O₂-dependent Snail signaling. *Free Radic Biol and Med.* 2012;53(1):44-50.
368. Zhang WB, Wang Z, Shu F, Jin YH, Liu HY, Wang QJ, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by temozolomide contributes to apoptosis in glioblastoma cells via p53 activation and mTORC1 inhibition. *J Biol Chem.* 2010;285:40461–71.
369. Chang KY, Hsu TI, Hsu CC, Tsai SY, Liu JJ, Chou SW, et al. Specificity protein 1-modulated superoxide dismutase 2 enhances temozolomide resistance in glioblastoma, which is independent of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase. *Redox Biol.* 2017;13:655–64.
370. Chien CH, Chuang JY, Yang ST, Yang WB, Chen PY, et al. Enrichment of superoxide dismutase 2 in glioblastoma confers to acquisition of temozolomide resistance that is associated with tumor-initiating cell subsets. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):1-6.
371. Ma XY, Jiang ZY, Lin YC, Zheng CT, Zhou GL. Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2010;94:e286–e295.
372. Fakhruddin S, Alanazi W, Jackson KE. Diabetes-induced reactive oxygen species: mechanism of their generation and role in renal injury. *J Diabetes Res.* 2017; 2017:8379327.
373. Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, Tanaka T. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2002;274(1):16-24.
374. Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology. *Physiol Rev.* 2015;95(4):1111-55.
375. Rottenberg H, Hoek JB. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging cell.* 2017;16(5):943-55.
376. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94(3):909-50.

377. Cao Y, Xu J, Cui D, Liu L, Zhang S, Shen B, et al. Protective effect of carnosine on hydrogen peroxide–induced oxidative stress in human kidney tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;534:576-82.
378. Goodman M, Bostick RM, Dash C, Terry P, Flanders WD, Mandel J. A summary measure of pro-and anti-oxidant exposures and risk of incident, sporadic, colorectal adenomas. *Cancer Causes Control*. 2008;19(10):1051-64.
379. Reddy VN, Kasahara E, Hiraoka M, Lin LR, Ho YS. Effects of variation in superoxide dismutases (SOD) on oxidative stress and apoptosis in lens epithelium. *Exp Eye Res*. 2004 ;79(6):859-68.
380. Jang YC, Pérez VI, Song W, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, et al. Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *J Geront A Bio Sci Med Sci*. 2009;64(11):1114-25.
381. Palin MF, Lapointe J, Gariépy C, Beaudry D, Kalbe C. Characterisation of intracellular molecular mechanisms modulated by carnosine in porcine myoblasts under basal and oxidative stress conditions. *Plos One*. 2020;15(9):e0239496.
382. Pavlov AR, Revina AA, Dupin AM, Boldyrev AA, Yaropolov AI. The mechanism of interaction of carnosine with superoxide radicals in water solutions. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1157:304–12.
383. Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, Hogg N. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem J*. 2012;444(3):561-71.
384. Barbi de Moura M, Vincent G, Fayewicz SL, Bateman NW, Hood BL, Sun M, et al. Mitochondrial respiration: an important therapeutic target in melanoma. *PLoS One*. 2012;7:e40690.
385. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006;25(4):695-705.
386. Um HD. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. *Oncotarget*. 2016;7(5):5193.
387. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(2):99-109.
388. Kim EM, Park JK, Hwang SG, Um HD. Src and epidermal growth factor receptor mediate the pro-invasive activity of Bcl-w. *Tumor Biol*. 2016;37(1):1245-52.
389. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The J Gen Physiol* 1927;8(6):519.

390. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *Febs J.* 2007; 274:1393-1418.
391. Klepinin A, Chekulayev V, Timohhina N, Shevchuk I, Tepp K, Kaldma A, et al. Comparative analysis of some aspects of mitochondrial metabolism in differentiated and undifferentiated neuroblastoma cells. *J Bioenerg Biomembr.* 2014;46(1):17-31.
392. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC. The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? *Biofactors.* 2009;35(2):209-25.
393. Kaambre T, Chekulayev V, Shevchuk I, Karu-Varikmaa M, Timohhina N, Tepp K, Bogovskaja J, Kütner R, Valvere V, Saks V. Metabolic control analysis of cellular respiration in situ in intraoperational samples of human breast cancer. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(5):539-58.
394. Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, Birbe R, Witkiewicz AK, et al. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the “reverse Warburg effect” in positive lymph node tissue. *Cell Cycle.* 2012;11(7):1445-54.
395. Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J.* 364(1):309-15.
396. Zhang Y, Maurizi MR. Mitochondrial ClpP activity is required for cisplatin resistance in human cells. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1862:252-64.
397. Delaval E, Razanoelina M, Bastin J, Freund N, Bismuth J, Geloso JP. Mitochondrial activity of rat kidney during ontogeny. *J Dev Physiol.* 1990;14(1):1-5.
398. Hahn P, Skala J. Development of enzyme systems. *Clin Obstet Gynecol.* 1971;14(3):655-68.
399. Bellance N, Benard G, Furt F, Begueret H, Smolkova K, Passerieux E, et al. Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Internat J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2566-77.
400. Vincent AS, Phan TT, Mukhopadhyay A, Lim HY, Halliwell B, Wong KP. Human skin keloid fibroblasts display bioenergetics of cancer cells. *J Invest Dermatol.* 2008;128(3):702-9.
401. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):598-608.
402. Hara MR and Snyder SH. Nitric oxide–GAPDH–Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4):525-36.
403. Oppermann H, Schnabel L, Meixensberger J, Gaunitz F. Pyruvate attenuates the anti-neoplastic effect of carnosine independently from oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 2016;7(52):85848.

404. Hipkiss AR. NAD(+) and metabolic regulation of age-related proteotoxicity: A possible role for methylglyoxal? *Exp Gerontol.* 2010;45:395–99.
405. Xie Z, Baba SP, Sweeney BR, Barski OA. Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: From chemistry to clinical implications. *Chem Biol Interact.* 2013;16202:288–97.
406. Vistoli G, Colzani M, Mazzolari A, Maddis DD, Grazioso G, Pedretti A, et al. Computational approaches in the rational design of improved carbonyl quenchers: focus on histidine containing dipeptides. *Future Med Chem.* 2016;8:1721–37.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Антитуморски потенцијал и утицај на митохондријску респирацију Л-карнозина и његових формулација примењених на континуираним ћелијским линијама
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Завод за физиологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду б) Завод за хистологију и ембриологију, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду в) Центар за медицинско-фармацеутска истраживања и контролу квалитета (ЦЕМФИК), Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије, Клиничка истраживања, Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Ова докторска дисертација представља експерименталну студију спроведену у <i>in vitro</i> условима радом на континуираним туморским и здравим ћелијским линијама. Конципирана је са циљем да се утврди антитуморски потенцијал чисте супстанце Л-карнозин као и препарата Karnozin EXTRA[®] и Now[®] Л-карнозин на туморским ћелијама хуманог аденокарцинома дојке (MCF-7) и хуманог глиобластома (U87). Анализиран је утицај спроведених третмана на морфолошке карактеристике, степен пролиферације, миграторну способност, експримираност протеина виментина у цитоплазми и супероксид-дизмутазе у митохондријама ћелијка као и утицај биоенергетски профил. Како би се сагледали могући ефекти испитиваних препарата на организам човека читав концепт</p>

студије спроведен је и на здравим ћелијским линијама бубрега хрчка (ВНК-21/С-13) и ћелијама хуманих феталних фибробласта плућа (MRC-5).

1.2 Врсте података

а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: континуиране ћелијске линије хуманог аденокарцинома дојке, хуманог глиобластома, хуманих феталних фибробласта плућа и ћелијска линија бубрега хрчка

ђ) снимци, фотографије: микрофотографије нативних ћелијских култура, микрофотографије ћелија континуираних ћелијских линија обојених стандардним хистолошким бојењем (хематоксилин и еозин- ХЕ), микрофотографије имунофлуоресцентно обојених ћелија

е) текст, литературни изводи

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: експериментална испитивања

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

Табеле (4), слике (52), графикони (48).

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека _____.xls_____

б) SPSS фајл, датотека _____.sav_____

в) PDF фајл, датотека _____.pdf_____

д) Текст фајл, датотека _____.doc, .docx_____

е) JPG фајл, датотека _____.jpg_____

ф) Остало, датотека _____.psd_____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли **Велики број варијабли**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) **Сваки експеримент је независно изведен најмање три пута, у оквиру којих је сваки узорак припремљен у најмање три реплике уколико није другачије назначено.**

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је _____
- б) варијабле које се више пута мере односе се на _____
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, Експерименти на континуираним ћелијским линијама хуманог аденокарцинома дојке, хуманог глиобластома, хуманих феталних фибробласта плућа и ћелијама бубрега хрчка, анализа утицаја чисте супстанце Л-карнозина и препарата који ову супстанцу садрже на вијабилност третираних ћелија, утицај на морфолошке карактеристике, хистолошка и имунофлуоресцентна анализа третираних ћелија, анализа утицаја испитиваних препарата на миграторну способност ћелија које исту поседују и анализа биоенергетског потенцијала односно функције митохондријске респирације након спроведених третмана.

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип **Прикупљање података анализом доступне литературе.**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је применом различитих статистичких метода и поређењем са литературним подацима.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? **Да** Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање
Истраживање је одобрено од стране Етичке комисије Медицинског факултета у Новом Саду, 24.04.2019. године под бројем 01-39/74.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Александра Поповић aleksandra.popovic@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Александра Поповић aleksandra.popovic@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Александра Поповић aleksandra.popovic@mf.uns.ac.rs