

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Sonja T. Misirlić Denčić

**MOLEKULARNI MEHANIZMI
CITOTOKSIČNOG DEJSTVA ESTARA
CIKLOHEKSIL ANALOGA
ETILENDIAMINDIPROPANSKE KISELINE
NA LEUKEMIJSKE ĆELIJE *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Sonja T. Misirlić Denčić

**MOLECULAR MECHANISMS OF THE *IN VITRO* ANTILEUKEMIC ACTION OF
CYCLOHEXYL-FUNCTIONALIZED
ETHYLENEDIAMINE DIPROPANOIC
ACID ESTERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Mentor: dr Ivanka Marković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

Komentor: dr sci. Tibor Sabo, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,
Hemijski fakultet

Komisija u sastavu:

dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

dr Vladimir Trajković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski
fakultet

akademik Ljubiša Rakić, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu,
Medicinski fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

*Mojim najmilijima: Olgii, Branku, Draganu, Vladimiru, Jovani i Petru,
čija me безусловna ljubav i neizmerna podrška vode kroz život, inspirišu na
svaki napredak i čine beskrajno srećnom i ponosnom*

Izradi ove doktorske disertacije u mnogome su svojim znanjem, nesebičnom podrškom i ljubavlju doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica. Koristim ovu priliku da im se svima srdačno zahvalim.

Najiskrenije se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Ivanki Marković na podršci i pomoći u razvoju moje naučno-istraživačke karijere kao i izradi ove doktorske disertacije, a pre svega na ukazanom velikom poverenju.

Posebnu zahvalnost dugujem i komentoru prof. dr Tiboru Sabo i njegovim saradnicima sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim savetima i sugestijama u toku pisanja segmenta ove disertacije koji se odnosio na hemijske karakteristike ispitivanih supstanci.

Neizmerno hvala prof. dr Aleksandri Isaković na dugogodišnjoj saradnji, pomoći i prijateljstvu, kao i primedbama i sugestijama tokom pisanja ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Vladimiru Trajkoviću na izuzetnoj pomoći u svim fazama izrade ove disertacije. Smatram se privilegovanom što sam u prilici da radim i učim od njega.

Posebno se zahvaljujem akademiku dr Ljubiši Rakiću koji mi je tokom celokupne naučno-istraživačke karijere bio najiskrenija podrška.

Neizmernu zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Vladimiru Bumbašireviću i doc. dr Tamari Kravić-Stevović na izradi preparata i tumačenju rezultata elektronske mikroskopije.

Hvala doc. dr Andriji Bogdanoviću čije je veliko kliničko iskustvo doprinelo sjajnom sugestijom da ispitamo i uticaj estara na diferencijaciju leukemijskih ćelija.

Najiskrenije se zahvaljujem celokupnom kolektivu Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu na svesrdnoj podršci i srdačnoj radnoj atmosferi. Posebnu zahvalnost dugujem tehničarima Nadi Bojović, Sanji Čabarkapi i Nikoli Mičiću koji su mi olakšali zahtevan laboratorijski rad. Veliko hvala dr Mariji Dulović i dr sci. med. Urošu Vilimanoviću na pomoći u imunoblotu. Posebno se zahvaljujem svom nekadašnjem studentu a sada bliskom saradniku dr Anđelki Isaković na dragocenoj višegodišnjoj saradnji, pomoći i podršci koja prevazilazi okvire ove disertacije.

Veliko hvala prof. dr Dušanu Popadiću i dr sci. Neveni Zogović, naučnom saradniku, na pomoći u izvođenju elektroforeze DNK.

Od sveg srca hvala mojoj najdražoj kumi dr sci. med. Katarini Paunović koja sa mnom deli dobro i zlo već dve decenije i koja mi je u svim fazama izrade ove disertacije bila nezamenljiva pomoć i podrška.

Veliko hvala mojim iskrenim prijateljicama, mr sci. med. dr Tatjani Živanović Radnić i dr Željki Stanojević na velikoj bezrezervnoj podršci.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici koja je nepresušan izvor ljubavi i iskrene podrške koja život znači.

Molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na leukemijske ćelije *in vitro*

Rezime

Cilj ovog istraživanja je bio da ispita molekularne mehanizme u osnovi citotoksičnog dejstva estara (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline na leukemijskim ćelijama. Vijabilitet ćelija je procenjivan testom aktivnosti kisele fosfataze i laktat dehidrogenaze, parametri apoptotske smrti ćelija, kao i diferencijacije su analizirani protočnom citometrijom i elektronskom mikroskopijom. Intranukleusna lokalizacija faktora pokretača apoptoze (AIF) je utvrđena tehnikom imunoblota. Pokazano je da metil-, etil- i propil-estar deluju citotoksično na HL-60, REH, MOLT-4, KG-1, JVM-2 i K-562 leukemijske ćelijske linije, dok ishodno jedinjenje (kiselina) i butil-estar nisu pokazali toksičnost u *in vitro* uslovima. Citotoksičnost etil-estra je bila najveća (IC₅₀: 10,7 - 45,4 μM), i uporediva sa cisplatinom, tipičnim proapoptotskim antitumorskim lekom. U osnovi antileukemijskog delovanja etil-estra na HL-60 ćelijsku liniju, najosetljiviju od ispitivanih, nalazila se hiperprodukcija superoksidnog anjona i depolarizacija mitohondrijalne membrane. Oštećenje mitohondrija je za posledicu imalo eksternalizaciju fosfatidil-serina, fragmentaciju DNK i sledstvenu apoptozu HL-60 ćelija. Fragmentacija DNK je bila posredovana translokacijom AIF-a iz mitohondrija u jedro, i prethodila je aktivaciji kaspaza, što je ukazalo na apoptozu nezavisnu od kaspaza. Ćelije tretirane subtoksičnim dozama etil-estra su pokazale morfološke znake granulocitne diferencijacije (segmentacija jedra i primarne granule u citoplazmi) kao i porast u ekspresiji markera diferencijacije CD11b i CD15. Sposobnost da uzrokuje apoptozu i diferencijaciju leukemijskih ćelija čini

cikloheksil analoge etilendiamindipropanske kiseline po tipu estara potencijalnim kandidatima za dalja predklinička istraživanja sa ciljem ispitivanja mogućnosti ulaska u buduće kliničke studije.

Ključne reči: leukemijske ćelije, citotoksičnost, oksidativni stres, apoptoza nezavisna od kaspaza, diferencijacija

Molecular mechanisms of the *in vitro* antileukemic action of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine dipropanoic acid esters

Abstract

The aim of the present study was to investigate antileukemic action of recently synthesized (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid esters. Cell viability was assessed by the acid phosphatase and LDH release assay, apoptosis- and differentiation-related parameters were analyzed by flow cytometry/electron microscopy, while intracellular localization of apoptosis-inducing factor (AIF) was determined by immunoblotting. It was demonstrated that methyl, ethyl and propyl ester were toxic to HL-60, REH, MOLT-4, KG-1, JVM-2 and K-562 leukemic cell lines, while the non-esterified parental compound and butyl ester were devoid of *in vitro* antileukemic action. The cytotoxic activity of the ethyl ester was the highest (IC₅₀: 10.7 - 45.4 μM) and comparable to that of the prototypical anticancer drug cisplatin. Its cytotoxic effect in HL-60 cells was associated with an increase in superoxide production and mitochondrial membrane depolarization, leading to apoptotic cell death characterized by phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation. DNA fragmentation preceded caspase activation and followed AIF translocation from mitochondria to nucleus, indicating that the observed apoptotic death was caspase-independent. Surviving cells displayed morphological signs of granulocytic differentiation (nuclear indentations and presence of cytoplasmic primary granules), as well as an increased expression of differentiation markers CD11b and CD15. The ability to induce both apoptosis and differentiation of leukemic cells makes the investigated

cyclohexyl analogues plausible candidates for further preclinical examination and probably clinical trials.

Keywords: leukemic cells, cytotoxicity, oxidative stress, caspase-independent apoptosis, differentiation

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. <i>Leukemije: značaj i klasifikacija</i>	1
1.2. <i>Kancerogeneza i leukemogeneza: koncept postojanja kancerske stem ćelije</i>	3
1.2.1. <i>Terapijske strategije u akutnoj mijeloidnoj leukemiji</i>	5
1.2.2. <i>Leukemogeneza akutne mijeloidne leukemije: mogućnost ciljanog terapijskog pristupa</i>	6
1.3. <i>Apoptoza</i>	11
1.3.1. <i>Spoljašnji put apoptoze</i>	14
1.3.2. <i>Unutrašnji put apoptoze</i>	15
1.4. <i>Cisplatin i njegovi analozi kao polazni molekuli za sintezu novih jedinjenja sa antitumorskim dejstvom</i>	18
1.4.1. <i>Estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline kao potencijalni antitumorski agensi</i>	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3. MATERIJAL I METODE.....	25
3.1. <i>Ćelijske kulture i reagensi</i>	25
3.2. <i>Ispitivanje uticaja estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na vijabilitet ćelija</i>	28

3.3.	<i>Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije superoksidnog anjona metodom protočne citometrije.....</i>	30
3.4.	<i>Utvrdjivanje internukleozomalne fragmentacije DNK primenom metode elektroforeze DNK.....</i>	34
3.5.	<i>Utvrdjivanje morfoloških promena primenom elektronske mikroskopije.....</i>	35
3.6.	<i>Ispitivanje ekspresije faktora pokretača apoptoze (AIF) i kaspaze-3 kao markera apoptoze i beklina-1 i LC3-II proteina kao markera autofagije.....</i>	36
3.7.	<i>Ispitivanje uticaja etil-estra cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na diferencijaciju leukemijskih ćelija.....</i>	37
3.8.	<i>Statistička analiza.....</i>	38
4.	REZULTATI.....	39
4.1.	<i>Estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline su toksični za lekemijske ćelijske linije</i>	40
4.2.	<i>Etil-estar dovodi do apoptoze HL-60 ćelija.....</i>	45
4.3.	<i>Etil-estrom posredovana apoptoza je uzrokovana oksidativnim stresom, depolarizacijom unutrašnje membrane mitohondrija i translokacijom AIF iz mitohondrija u jedro.....</i>	53
4.4.	<i>Etil-estar podstiče diferencijaciju HL-60 ćelija.....</i>	59
4.5.	<i>Etil-estar indukuje apoptozu leukemijskih ćelija izolovanih iz uzoraka periferne krvi pacijenata obolelih od leukemija.....</i>	63
5.	DISKUSIJA.....	67
5.1.	<i>Cikloheksil analozi etilendiamindipropanske kiseline su toksični za lekemijske ćelijske linije. Povezanost hemijske strukture ovih jedinjenja i njihove antitumorske efikasnosti.....</i>	68

5.2. Etil-estar izaziva apoptozu leukemijskih ćelija.....	72
5.3. Apoptoza indukovana etil-estrom je udružena sa oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i translokacijom AIF u jedro.....	76
5.4. Etil-estar stimuliše diferencijaciju HL-60 ćelija.....	79
5.5. Mononuklearne ćelije periferne krvi leukemijskih pacijenata su osjetljivije na dejstvo etil-estra od istih ćelija zdravih dobrovoljaca.....	82
6 ZAKLJUČAK.....	84
7. LITERATURA.....	86

1. UVOD

1.1. *Leukemije: značaj i klasifikacija*

Leukemije, zajedno sa limfomima, mijelomom i mijelodisplastičnim sindromima predstavljaju maligna oboljenja hematopoetskog tkiva. Maligna oboljenja su značajan uzrok mortaliteta kako u svetskoj populaciji, tako i kod nas. Prema statističkim podacima za 2011. god. na teritoriji SAD je registrovano preko 1,5 milion novoobolelih od kancera (Siegel et al., 2011). Takođe, preko 250 000 ljudi u SAD boluje ili se oporavlja od nekog oblika leukemije (<http://www.lls.org/#/resourcecenter/freeducationmaterials/generalcancer/facts>). Predviđa se da će u toku 2012. god. smrtnost od leukemija u SAD biti preko 20 000 ljudi, sa blagim porastom mortaliteta kod osoba starijih od 65 godina, kod kojih je akutna mijeloidna leukemija naročito česta (<http://www.who.int/whosis/mort/download/en/index.html>). Smatra se i da samo u SAD jedan odrastao čovek i jedno dete bivaju dijagnostikovani sa leukemijom na svakih 5 minuta, pri čemu leukemije čine čak 1/3 mortaliteta od malignih bolesti u populaciji mlađoj od 14 godina, a akutna limfocitna leukemija se izdvaja kao vodeći uzrok smrti od maligniteta kod dece starosti do 7 godina (<http://www.lls.org>).

Leukemije karakteriše prekomerna, nekontrolisana produkcija nezrelih, maligno-transformisanih belih krvnih ćelija (neutrofila, monocita i limfocita) koje su izgubile svoje fiziološke hematopoetske karakteristike. Njihova brojčana dominacija potiskuje zdrave prekursore hematopoeze što za posledicu ima anemiju, sklonost ka krvavljenju i infekcijama (Cripe, 1997). Najopštijom podelom leukemije se mogu klasifikovati u četiri tipa: akutnu limfoblastnu, akutnu mijeloidnu, hroničnu limfocitnu i hroničnu mijeloidnu leukemiju. Leukemija je limfocitna tj. limfoblastna ukoliko se maligno transformisala prekursorska ćelija limfocitne loze. Mijeloidna leukemija nastaje malignom

transformacijom prekursora eritrocita, trombocita i nekih tipova belih krvnih ćelija. Sa druge strane, karakteristika akutnih leukemija je prisustvo mladih, slabo diferentovanih ćelija tzv. blasta (mijelo- i limfoblasti), dok hronične leukemije imaju malo ili nimalo blasta (<http://www.lls.org/#/diseaseinformation/leukemia/>).

Međutim, trenutno aktuelna kategorizacija leukemija, ustanovljena od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO), odlikuje se izuzetnom složenosti, obzirom da je bazirana prevashodno na citogenetskim karakteristikama maligno transformisanih ćelija hematopoetskog tkiva (Vardiman et al., 2009). Naime, ova klasifikacija izdvaja sledeće grupe leukemija:

1. akutne mijeloidne leukemije
2. mijelodisplastične sindrome
3. mijelodisplastične/mijeloproliferativne bolesti
4. hronične mijeloproliferativne bolesti
5. bolesti mast ćelija (mastocitoze)

Unutar svake grupe se nalazi više podgrupa od kojih su neke formirane na osnovu tipa genetičke mutacije, najčešće translokacije, koji dominira u tom obliku leukemije. Tako se unutar akutnih mijeloidnih leukemija (AML), između ostalih, izdvajaju akutne mijeloidne leukemije sa rekurentnim genetičkim abnormalnostima. Ova podgrupa AML uključuje npr. akutnu mijeloidnu leukemiju sa $t(8;21)(q22;q22)$ (AML1/ETO) i akutnu promijelocitnu leukemiju (APL) sa $t(15;17)(q22;q1)$ (PML/RAR α). Sa druge strane, u grupi hroničnih mijeloproliferativnih bolesti nalazi se, između ostalih, hronična mijelogena leukemija sa Filadelfija hromozomom (Ph hromozom, $t(9;22)(q34;q11)$,BCR/ABL-positive) (Vardiman et al., 2009).

Ovako složena klasifikacija je posledica permanentnog porasta znanja o citogenetskim i fenotipskim karakteristikama malignih bolesti hematopoeznog tkiva što je, takođe, doprinelo i poboljšanju lečenja obolelih od leukemija (Baleyrier et al., 2011). Naime, pored transplantacije koštane srži - jedine u

terapijskom smislu optimalne metode (Rodriguez and Stiff, 2003), danas su aktualna i tri farmakološka pristupa u onko-hematologiji: konvencionalni hemioterapeutici, ciljna terapija molekulima koji interferiraju sa signalnim putevima uključenim u određenom tipu leukemija (npr. inhibitori tirozin kinaze u terapiji hronične mijeloidne leukemije) i terapija monoklonskim antitelima (Tsiftoglou et al., 2009; Baleyrier et al., 2011). U nekim slučajevima se primenjuje i terapija zračenjem (Filippi et al., 2007). Ipak, potpuna remisija bolesti tj. iščezavanje svih njenih simptoma i znakova kao i funkcionalno osposobljavanje koštane srži se vrlo retko postiže, te neki pacijenti postaju rezistentni na terapiju i na kraju ipak podležu bolesti (Stone et al., 2004). U skladu sa tim traganje za novim, uspešnijim antileukemijskim lekovima ne jenjava. Veliki napori se konstantno ulažu u sintezu novih, potencijalno specifičnijih i manje toksičnih hemioterapeutika sa ciljem uspešnijeg lečenja leukemija.

1.2. Kancerogeneza i leukemogeneza: koncept postojanja kancerske stem ćelije

Maligna transformacija ćelije je složen proces, koji obuhvata više sukcesivnih događaja na nivou regulacije ekspresije gena koji kontrolišu ćelijski ciklus, diferencijaciju i ćelijsku smrt (Hanahan and Weinberg, 2000). Uprkos monoklonalnom poreklu većine tumora, stalne stečene mutacije genetskog materijala dovode do pojave novih subpopulacija tumorskih ćelija, od kojih neke pokazuju osobine koje im obezbeđuju prednost u uslovima intenzivne proliferacije, u odnosu na postojeće tumorske i zdrave ćelije (Mimeault and Batra, 2010). Ovo za posledicu ima veliku heterogenost kancerskih ćelija koje se međusobno razlikuju i u pogledu morfologije, imunofenotipa, kariotipa i genske ekspresije (Heppner, 1984), ali i u pogledu proliferativnog potencijala (Wantzin and Killimann, 1977).

Prvi dokazi da maligni tumor kod čoveka može nastati malignom transformacijom stem ćelije ili pak od progenitora u kome su mutacije dovele do poremećaja regulacije ćelijskog ciklusa, pronađeni su upravo na malignim bolestima krvi (Lapidot et al., 1994). Naime, trenutno je aktuelan koncept postojanja tzv. leukemijskih stem ćelija koje su za razliku od ostalih leukemijskih ćelija rezistentne na hemio- i radioterapiju i verovatno odgovorne za relaps bolesti nakon inicijalne remisije (Buss and Ho, 2011). Poznato je da su stem ćelije hematopoeze pluripotentne, a jedina karakteristika koja ih razlikuje od ćelija-potomaka, takođe pluripotentnih, progenitora pojedinih loza je njihova jedinstvena sposobnost samoobnavljanja tj. produkcija ćelija sa identičnim stem ćelijskim potencijalom kao i roditeljska ćelija. Samoobnavljanje, pri tome, može da bude simetrično, ukoliko nastaju dve ćerke ćelije sa istim karakteristikama pluripotentne stem ćelije, ili pak asimetrično ukoliko nastaju jedna ćerka ćelija sa osobinama stem ćelije i druga ćerka ćelija sa osobinama nishodnog progenitora sa redukovanim deobnim potencijalom (Warner et al., 2004). U fiziološkim oklonostima stem ćelije hematopoeze se retko dele, ali kada to čine uvek koriste asimetričan princip neophodan da se u vremenu održi stalan broj svih ćelija hematopoeze i konstantna produkcija svih uobičenih elemenata krvi bez deplecije (Dick, 2003). Kada se procesi samoobnavljanja i diferencijacije nađu u raskoraku, ili pak dođe do poremećaja njihove regulacije, nastaje leukemija (Warner et al., 2004).

Danas se ne govori samo o leukemijskim stem ćelijama, već se smatra da se unutar svakog tumora može identifikovati subpopulacija kancerskih stem ćelija (Mackillop et al., 1983; Buick and Pollak, 1984). Ovakav koncept kancerogeneze je primenljiv i na druge tumore, kao što su karcinom dojke (Al-Hajj et al., 2003) i neki tumori CNS-a (Hemmati et al., 2003; Singh et al., 2003). Ova saznanja ukazuju na neophodnost ulaganja dodatnih napora radi identifikacije i karakterizacije kancerskih stem ćelija za svaki tip maligniteta, čime bi se stekli uslovi za delotvorniji terapijski pristup.

1.2.1. Terapijske strategije u akutnoj mijeloidnoj leukemiji

Akutna mijeloidna leukemija (AML) predstavlja grupu poremećaja koji nastaju kao posledica zastoja u diferencijaciji stem/progenitorskih ćelija hematopoeze i njihove prekomerne proliferacije sa sledstvenom akumulacijom i dominacijom mijeloblasta u koštanoj srži (Stone et al., 2004; Han et al., 2011). Standardna hemioterapija ima uspeha samo kod izvesnog broja (30-40%) vrlo mladih adolescenata ili pak starijih pacijenata obolelih od AML. Iako transplantacija koštane srži doprinosi izlečenju, ona se primenjuje uglavnom kod mlađih pacijenata i pacijenata u remisiji bolesti (Stone et al., 2004). Ograničena efikasnost standardne terapije i bolje razumevanje molekularnih dešavanja u patogenezi ovog oboljenja otvorili su mogućnost za kliničke studije u kojima se ispituju novi potencijalni hemioterapeutici i efikasnije terapijske strategije u AML (Norsworthy et al., 2012).

Terapija AML je višefazna (početna, faza konsolidacije i terapija održavanja) uz poseban pristup terapiji bolesti u fazi relapsa (Han et al., 2011). U prvoj, početnoj fazi, hemioterapija ima za cilj da izazove potpunu mijelosupresiju, tj. da eliminiše sve elemente hematopoetskog tkiva iz koštane srži obolelog, i to kako one maligno transformisane, tako i zdrave. Cilj ovog pristupa je da se omogući repopulacija koštane srži zdravim ćelijama čime bi se pacijent uveo u remisiju (< 5 % mijeloblasta u koštanoj srži). Lekovi koji se primenjuju u ovoj fazi su antraciklini (daunorubicin i citarabin), alternativno etopozid i idarubicin. Kada se remisija postigne, neophodna je dodatna terapija (konsolidaciona) da bi se eliminisale i nedetektibilne leukemijske ćelije. Ovaj efekat se obezbeđuje alogenom stem ćelijskom transplantacijom koja, pak, nosi velik rizik za inicijalan mortalitet, dugoročan morbiditet i hroničnu "graft-versus-host" bolest (Stone et al., 2004; Han et al., 2011). Oko 15% obolelih, zbog toga, ipak dobija post-remisionu hemioterapiju u vidu velikih doza citarabina. Oboleli od posebnog tipa AML, akutne promijelocitne leukemije (APL), zbog zastoja u diferencijaciji leukemijskih ćelija, koje zbog toga postaju manje

osetljive na hemioterapeutike, u početnoj fazi lečenja primaju *all-trans*-retinoičnu kiselinu (ATRA) koja stimuliše diferencijaciju i povećava terapijski odgovor (Tallman, 1996). U postremisionoj fazi se uvode i neki antimetaboliti *per os* (Stone et al., 2004).

Dva leka su nedavno odobrena za primenu u terapiji AML: arsen trioksid (Soignet et al., 2001) i gemtuzumab ozogamicin (Sievers et al., 2004). Arsen trioksid se pokazao efikasnim u terapiji APL, posebno kod pacijenata koji su ušli u relaps bolesti, a razmatra se i njegova upotreba u inicijalnom protokolu za hemioterapiju APL (Stone et al., 2004). Gemtuzumab ozogamicin je anti- CD-33 imunotoksin konjugat koji se pokazao efikasnim u terapiji drugog relapsa AML nakon šestomesečne remisije (Sievers et al., 2004).

Veliki uspeh imatiniba, inhibitora tirozin kinaze, u terapiji hronične mijeloidne leukemije i bolje upoznavanje sa patofiziološkim mehanizmima leukemogeneze AML, otvorili su mogućnost i ciljanog pristupa terapiji AML-a.

1.2.2. Leukemogeneza akutne mijeloidne leukemije: mogućnost ciljanog terapijskog pristupa

Leukemogeneza podrazumeva niz stečenih promena na genetskom materijalu hematopoetskih stem ćelija koje ih transformišu u leukemijske stem ćelije. U tom smislu AML karakteriše akumulacija velikog broja nezrelih blasta, tzv. mijeloblasta, zaustavljenih u različitim fazama diferencijacije. Zbog toga se zastoje u sazrevanju ćelija tj. disfunkcija diferencijacije smatra ključnim događajem AML leukemogeneze. Dodatno, da bi klon leukemijskih ćelija u nekom trenutku postao dominantan, neophodna je i njihova brojčana dominacija u odnosu na ostale ćelije koštane srži, pri čemu porast broja leukemijskih ćelija može biti ili posledica njihovih učestalijih deoba ili pak porasta potencijala samoobnavljanja leukemijskih stem ćelija. Iako su i nezrele i zrele ćelije mijeloidne loze kratkog života, promene u mehanizmu ćelijske smrti

mogu doprineti porastu broja leukemijskih ćelija. Na kraju, porast proliferativnog potencijala leukemijske stem ćelije u nekom trenutku mora uključiti aktivaciju telomeraza da bi se proliferacija neograničeno odvijala (Warner et al., 2004). Svaki od ovih događaja u osnovi leukemogeneze AML, kao što su zastoj u diferencijaciji, epigenetičke promene, intenzivirana proliferacija, poremećaj samoobnavljanja, porast preživljavanja tj. zaobilaženje mehanizama ćelijske smrti, te očuvana telomerazna aktivnost, biće posebno razmatrani u kontekstu mogućnosti ciljane terapije.

Diferencijacija: Zajednička odlika svih AML je zastoj u diferencijaciji sa akumulacijom više od 20% blasta u koštanoj srži (Gilliland and Tallman, 2002). Takođe, sve AML karakteriše rearanžman u genima za alfa receptor za retinoičnu kiselinu (RAR α) koji je član familije inducibilnih transkripcionih faktora za retinoičnu kiselinu. Ovaj receptor u odsustvu retinoične kiseline gradi heterodimer sa receptorom za retinoid X (RXR) i posreduje u nastanku represornog kompleksa sa osobinom deacetilacije histona, čime se podstiče kondenzacija hromatina i onemogućava transkripcija (Lo-Coco and Ammatuna, 2006). Genetičku abnormalnost APL čini fuzija tumor-supresorskog gena promijelocitne leukemije (PML) i RAR α gena. Hibridni protein, PML/RAR α , koji nastaje na ovaj način, onemogućava normalnu diferencijaciju hematopoeznih progenitora (Lo-Coco and Ammatuna, 2006; Wang and Chen, 2008). Terapijska primena ATRA se zato pokazala vrlo efikasnom u terapiji APL. Naime, ATRA aktivacijom specifičnog promotorskog regiona (RARE), za koji se vezuje RAR α , indukuje potpunu, ali ne i dugoročnu, remisiju kod većine obolelih (Dilworth and Chambon, 2000; Glass and Rosenfeld, 2000).

Epigenetske promene: Brojne studije su pokazale da se epigenetske modifikacije u metilaciji DNK i aktivnosti histon-deacetilaze nalaze u osnovi AML (Han et al., 2011). Epigenetske modulacije podrazumevaju promene u ekspresiji gena, a ne u njihovoj genskoj sekvenci i odnose se na promenu u aktivnosti enzima uključenih u postreplikacionu modifikaciju DNK (Jones and Baylin, 2007). U tom smislu, inhibitori histon-deacetilaze (npr. romidepsin;

Odenike et al., 2008) i inhibitori DNK metil-transferaze (npr. azacitidin; Fenaux et al., 2009), posebno u kombinaciji, mogu doprineti uspešnosti terapijskog odgovora u AML (Gozzini and Santini, 2005).

Proliferacija: Obezbeđivanje porasta proliferativnog kapaciteta AML ćelija se najverovatnije može objasniti činjenicom da su dve mitogene receptorske tirozin kinaze za faktore rasta, Flt-3 i c-kit, vrlo često mutirane u AML (Reilly, 2003). Međutim, blasti imaju skroman proliferativan potencijal (Wantzin and Killmann, 1977), a leukemijske stem ćelije uglavnom ne pokazuju povećanje proliferativnih kapaciteta (Terpstra et al., 1996). Dakle, može se pretpostaviti da je došlo do mutacije u ćeliji progenitora nishodno od leukemijske stem ćelije, usled čega je njegov proliferativni kapacitet povećan (Warner et al., 2004), što je najverovatnije posledica stimulacije faktorima rasta poreklom iz ćelija u okruženju (Guan and Hogge, 2000). Inhibitori Flt-3 kinaze koji se danas ispituju u terapiji AML su PKC-412 (midostaurin), CEP-701 (lestaurtinib), SU-11248 (sunitinib), MLN-518 (tandutinib), KW-2449, SU-5416 i sorafenib (Fiedler et al., 2003; Fiedler et al., 2005; Stone et al., 2005, DeAngelo et al., 2006; Knapper et al., 2006; Pratz et al., 2009; Safaian et al., 2009; Han et al., 2011). Imatinib mezilat (GLIVEC) je inhibitor kit kinaze (Heinrich et al., 2000) koji se već primenjuje u kliničkoj praksi, a Apck110 je potentni c-kit inhibitor koji ne deluje na zdrave ćelije koštane srži ali ispoljava inhibitorno dejstvo prema AML blastima (Faderl et al., 2009). Dodatno, u 10-50% pacijenata sa AML su nađene mutacije u genima za proteine ras familije (Stone et al., 2004), koje takođe mogu biti odgovorne za nekontrolisanu proliferaciju. Naime, ras proteini podležu posttranslacionoj obradi i između ostalog dobijaju farnezil-lipidnu komponentu koja im obezbeđuje translokaciju u ćelijsku membranu i sledstvenu aktivaciju. Inibitori farnezil transferaze (FTI), kao što je tipifarnib, ušli su u fazu II kliničkih studija u terapiji AML (Karp et al., 2008). Takođe, aktivacija receptorskih tirozin kinaza dovodi i do aktivacije PI3K (fosfatidilinozitol-3 kinaze), koja dalje aktivira PDK1 (fosfoinozitol-zavisnu kinazu). Nadalje, PDK1, fosforilacijom aktivira protein kinazu B (AKT), a ona

aktivira mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*), što za posledicu ima aktivaciju signala koji promovišu proliferaciju ćelija, ali i redukuju apoptozu (Manning and Cantley, 2007; Naughton et al., 2009). Naime, AKT suprimira apoptozu koju pokreće BAD, proapoptotski član Bcl2 familije proteina regulatora apoptoze (Tzifi et al., 2012). Poremećaj regulacije ovog signalnog puta je u osnovi etiopatogeneze mnogih maligniteta (Kim et al., 2005; Horn et al., 2008), a njegova aktivacija se smatra odgovornom i za rezistenciju prema hemioterapeuticima (Martelli et al., 2005). Novodizajnirani AKT inhibitori indukuju apoptozu tumorskih ćelija i deluju antiproliferativno (Deng et al., 2012). Iako je u AML izmenjena aktivacija i regulacija PI3K/AKT/mTOR signalnog puta (Xu et al., 2003), uvođenje rapamicina, inhibitora mTOR, u terapijski protokol za refraktarni, relapsirajući oblik AML nije dalo očekivani doprinos uspešnosti terapije (Perl et al., 2009).

Samoobnavljanje: Samoobnavljajući potencijal leukemijskih ćelija, uključujući i stem ćelije leukemogeneze, veći je nego zdravih hematopoetskih stem ćelija (Bonnet and Dick, 1997; Cashman et al., 1997; Hope et al., 2004). Za ovu karakteristiku se smatra odgovornom prekomerna ekspresija Bmi-1 gena (Dick, 2003). Ovaj gen kontroliše ekspresiju Hox gena, a njegova prekomerna ekspresija rezultuje ekspanzijom i transformacijom hematopoetskih stem ćelija (Kroon et al., 1998). Činjenica da isti geni kontrolišu samoobnavljajući potencijal leukemijskih i stem ćelija hematopoeze govori u prilog porekla leukemijskih stem ćelija iz stem ćelija hematopoeze (Warner et al., 2004).

Preživljavanje: Zaobilazanje apoptotske mašinerije omogućava duže preživljavanje leukemijskih progenitora što stvara uslove za sticanje novih mutacija, a promene u genetskom materijalu koje utiču na diferencijaciju mogu doprineti i preživljavanju. Tako, kod čoveka PML/RAR α štiti progenitore hematopoeze od apoptoze (Grignani et al., 2000). Dodatno, prisustvo apoptoze je ključna razlika između mijelodisplastičnih sindroma (MDS) i AML (Albitar et al., 2002). Naime, progresija iz MDS u AML se dovodi u vezu sa porastom u ekspresiji antiapoptotskih nasuprot proapoptotskih članova Bcl-2 familije

(Davis and Greenberg, 1998). U tom smislu se čak aktivacija antiapoptotskih članova Bcl-2 familije smatra odgovornom ne samo za preživljavanje mijeloblasta, već i za rezistenciju na komercijalne hemioterapeutike (Campos et al., 1993). Zbog toga na značaju dobija terapijski pristup usmeren prema antiapoptotskoj mašineriji aktivnoj u leukemijskim ćelijama. Antisens Bcl-2 oligonukleotid (G3139) se pokazao efikasnim u kombinaciji sa hemioterapijom u lečenju AML (Marcucci et al., 2003). Drugi protein angažovan u preživljavanju leukemijskih progenitora je IL-3 receptor (IL-3R), čija ushodna regulacija može biti mehanizam odgovoran za preživljavanje leukemijskih ćelija u AML (Testa et al., 2004). Naime, stimulacija IL-3R dovodi do aktivacije MCL1 člana Bcl-2 familije kao i do aktivacije antiapoptotskog transkripcionog faktora NF- κ B (Wang et al., 2003; Guthridge et al., 2004). Transkripcioni faktor NF- κ B je konstitutivno aktiviran u većini AML i u leukemijskim stem ćelijama, ali ne i u stem ćelijama hematopoeze, pa se smatra ključnim molekulom za preživljavanje leukemijskih stem ćelija (Warner et al., 2004). Dizajniran je i inhibitor NF- κ B, MG-132, koji ima sposobnost indukcije apoptoze u leukemijskim stem ćelijama (Guzman et al., 2001). Ipak, u žiži interesovanja na polju maligniteta krvi danas se nalaze mikro RNK (miRNK), male nekodirajuće RNK dužine 20-25 nukleotida koje regulišu gensku ekspresiju na nivou transkripcije (Drakaki and Iliopoulos, 2009). Smatra se da miRNK utiču na supresiju regulatornih gena za diferencijaciju ćelija, ćelijski ciklus i apoptozu (Rushworth et al., 2012). Dodatno miRNK učestvuju u regulaciji ekspresije više od 30% gena, a oko 50% gena za miRNK se nalazi u regionima genoma koji se dovode u vezu sa različitim malignitetima (Calin et al., 2004). U tom smislu je do danas identifikovano 6 ključnih miRNK koje regulišu NF- κ B signalni put u leukemijama, a moguće je da će se u budućoj terapiji tumora koristiti komplementarne miRNK sekvence, tzv. anti-miRNK u cilju njihove inaktivacije (Garzon et al., 2010).

Održavanje telomera: Ćelije imaju ograničenu *in vitro* proliferativnu sposobnost koja se objašnjava i skraćivanjem telomera u sukcesivnim ćelijskim deobama (Hayflick, 1997), usled smanjivanja aktivnosti telomeraza, enzima

zaduženih za replikaciju telomera. Za razliku od većine somatskih ćelija, hematopoetske stem ćelije i progenitori pojedinih loza poseduju telomeraznu aktivnost (Engelhardt et al., 1997). Ipak, telomere stem ćelija hematopeze se skraćuju sa godinama kao i nakon transplantacije (Rufer et al., 1999; Rufer et al., 2001), što ukazuje da telomerazna aktivnost u progenitorskim ćelijama nije dovoljna da u potpunosti spreči skraćivanje telomera (Warner et al., 2004). Imajući u vidu ogroman proliferativan kapacitet leukemijskih stem ćelija, nameće se zaključak da bi jedan od esencijalnih elementa leukemogeneze mogao biti sticanje mehanizama za održavanje telomerne funkcije, čime bi se obezbedio neograničen proliferativni potencijal (Hanahan and Weinberg, 2000). Visoka telomerazna aktivnost je primećena u više od 70% AML, iako je dužina telomera kod AML blasta manja u odnosu na zdrave ćelije (Ohyashiki et al., 2002). Zato se pretpostavlja da je porast ukupne telomerazne aktivnosti prevashodno posledica velikog broja ćelija u deobi, a ne nužno stimulacije ekspresije gena za telomerazu. Povećanje genske ekspresije, kao alternativni mehanizam, verovatno nastaje u kasnim fazama leukemogeneze, usled skraćivanja telomera tokom intenzivirane proliferacije leukemijskih ćelija (Yui et al., 1998; Warner et al., 2004).

1.3. Apoptoza

Apoptoza je tip programirane ćelijske smrti kojim višecelijski organizmi odstranjuju neželjene ćelije u različitim okolnostima (Kerr et al., 1972). Kao takva, angažovana je u toku razvića tj. embriogeneze, ali i u toku starenja, kao homeostatski mehanizam za održavanje populacija različitih ćelija unutar tkiva (Elmore, 2007). Dramatične morfološke i biohemijske promene u arhitekturi ćelije i njenoj funkcionalnosti u toku apoptoze pripremaju ćeliju za prepoznavanje i uklanjanje od strane fagocitnog sistema u odsustvu zapaljenske

reakcije organizma tako da je oštećenje okolnih ćelija minimalno (Kerr et al., 1972; Taylor et al., 2008).

Morfološke karakteristike apoptoze su dobro ispitane zahvaljujući svetlosnoj i elektronskoj mikroskopiji (Häcker, 2000). Ćelije u ranoj apoptozi se svetlosnom mikroskopijom identifikuju kao smanjene, smežurane i piknotične (Kerr et al., 1972). Njihova citoplazma postaje gušća, a organele se međusobno približavaju. Piknoza je posledica kondenzacije hromatina. U histološkom smislu, apoptoza zahvata pojedinačnu ćeliju ili manju grupu ćelija koje se nakon hematoksilin-eozin bojenja vide kao okrugle ćelije eozinofilne citoplazme sa ljubičastim gustim i fragmentisanim jedrom. Elektronska mikroskopija, takođe, u ranim fazama apoptoze identifikuje agregate zgusnutog hromatina u blizini jedarne membrane (Elmore, 2007). U završnoj fazi apoptoze, uočava se pupljenje ćelijske membrane, jedro se cepa i obrazuju se apoptotska tela. Apoptotska tela predstavljaju delove citoplazme sa gusto spakovanim organelama, sa ili bez fragmenata jedra, koji su okruženi očuvanom ćelijskom membranom. Celovite su i membrane organela. U organizmu, makrofagi i parenhimalne ćelije brzo fagocituju apoptotske ćelije, razlažući ih u fagolizozomima, pri čemu ne oslobađaju medijatore inflamacije (Savill and Fadok, 2000; Kurosaka et al., 2003).

Ćelije u apoptozi podležu nizu funkcionalnih promena. U biohemijskom smislu, ove promene podrazumevaju razgradnju proteina, unakrsno povezivanje proteina, fragmentaciju jedarne DNK i pomeranje fosfatidil-serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj lipidnog dvosloja ćelijske membrane (Hengartner, 2000). Mnoga od ovih dešavanja su posledica aktivacije kaspaza. Kaspaze su cistein-proteaze, koje su u ćeliji prisutne u neaktivnoj zimogenoj formi kao prokaspaze. Njihova aktivacija je lančana, tj. jedna aktivirana kaspaza aktivira drugu, ona treću i tako redom. Proteolitička kaskada lančane aktivacije kaspaza amplifikuje, tj. pojačava intenzitet signala, što rezultuje smrću ćelije. Kaspaze mogu biti inicijatorne (kaspaze- 2, 8, 9 i 10), egzekutivne tj. izvršne (kaspaze- 3, 6 i 7) i inflamatorne (kaspaze- 1, 4 i 5) (Rai et al., 2005). Pored ovih,

identifikovane su i druge kaspaze (kaspaze- 11, 12, 13 i 14) koje imaju i druge uloge različite od onih u apoptozi, a čija je ekspresija drugačija u embrionalnim tkivima u odnosu na adulta (Hu et al., 1998; Nakagawa et al., 2000; Koenig et al., 2001; Kang et al., 2002). Unakrsno povezivanje proteina koje se dešava u apoptozi je rezultat aktivacije tkivne transglutaminaze, EC 2.3.2.13 (Nemes et al., 1996). Ovaj enzim pripada porodici transglutaminaza a uloga mu je da povezuje ϵ -amino grupu lizinskih rezidua i γ -karboksamidnu grupu glutaminskih rezidua unutar jednog lanca proteina ili između različitih lanaca proteina, čime oni postaju jako rezistentni na razlaganje (Griffin et al., 2002). Sa druge strane, fragmentacija DNK je posledica aktivacije Ca^{2+} - i Mg^{2+} - zavisnih endonukleaza, i dokazuje se gel elektroforezom u prisutvu etidijum bromida i ultravioletnom iluminacijom (Bortner et al., 1995). Ekspresija markera koji na površini ćelije osiguravaju rano prepoznavanje od strane fagocita, tipa fosfatidil-serina, takođe se smatra važnim događajem u apoptozi (Bratton et al., 1997).

Apoptotska mašinerija je vrlo kompleksna. Postoje dva glavna puta apoptoze: spoljašnji, koji započinje aktivacijom receptora smrti, i unutrašnji, koga započinju signali mitohondrijalnog porekla (Elmore, 2007). Treći, alternativni put, podrazumeva citotoksičnost T-limfocita posredovanu perforin-granzim sistemom (Martinvalet et al., 2005). Sva tri puta imaju specifičan, sebi svojstven početak, ali jedinstven završetak tj. egzekutivnu fazu koja podrazumeva aktivaciju kaspaze-3, fragmentaciju jedarne DNK, proteolizu citoskeletnih i jedarnih proteina, unakrsno povezivanje proteina, fragmentaciju jedra, obrazovanje apoptotskih tela, ekspresiju markera za prepoznavanje od strane fagocita i fagocitozu kao završni događaj (Elmore, 2007).

1.3.1. Spoljašnji put apoptoze

Spoljašnji put apoptoze započinje aktivacijom receptora smrti na ćelijskoj membrani koji pripadaju superfamiliji gena za faktor nekroze tumora (eng. *tumor necrosis factor*, TNF) (Locksley et al., 2001). Svi članovi ove familije imaju slične ekstraćelijske domene bogate cisteinom i imaju unutarćelijski, citoplazmatski, domen koji se naziva domen smrti (Ashkenazi and Dixit, 1998). Domen smrti ima ključnu ulogu u prenosu signala sa površine ćelije u njenu unutrašnjost. Poznati su sledeći ligandi tj. stimulišući molekuli i njima svojstveni receptori smrti: FasL/FasR; TNF- α /TNFR1; Apo3L/DR3; Apo2L/DR4 i Apo2L/DR5 (Chicheportiche et al., 1997; Ashkenazi and Dixit, 1998; Peter and Krammer, 1998; Suliman et al., 2001; Rubio-Moscardo et al., 2005).

Redosled događanja unutar ćelije koji karakterišu spoljašnji put apoptoze je najbolje okarakterisan kao stimulacija signala smrti preko FasL/FasR i TNF- α /TNFR1 modela (Elmore 2007; Taylor et al., 2008). Vezivanje liganada, FasL ili TNF- α , provocira aktivaciju adaptornih proteina npr. FADD (eng. *Fas-associated death domain protein*) tj. TRADD (eng. *TNF-receptor associated death domain protein*) (Wajant, 2002), koji aktiviraju i podstiču agregaciju nekolicine molekula kaspaze-8. Aktivirana kaspaza-8 pokreće egzekutivnu fazu apoptoze (Elmore, 2007). Kaspaza-8, naime, proteolitički aktivira kaspazu-3 i kaspazu-7. Kaskada aktivacije kaspaza se nastavlja (kaspaza-3 aktivira kaspaze 6 i 2; kaspaza-6 aktivira kaspaze 8 i 10) i kulminira funkcionalnim i morfološkim promenama koje rezultuju smrću ćelije.

U nekim okolnostima na nivou aktivacije kaspaze-8 mogu da se susretnu spoljašnji i unutrašnji put apoptoze (Igney and Krammer, 2002). Naime, aktivirana kaspaza-8 može proteolitički da aktivira BID (Esposti, 2002), protein iz proapoptotske familije proteina koji poseduju samo BH3 domen (eng. *BH3-only proteins*), koji deluje na mitohondrije tako što stimuliše oslobađanje citohroma C i posledično obrazovanje apoptozoma. Apoptozom nastaje

udruživanjem približno 7 molekula faktora-1 za aktivaciju apoptotskih proteaza tzv. APAF1 (eng. *apoptotic protease-activating factor-1*) i isto toliko homodimera aktivirane kaspaze-9 (Taylor et al., 2008).

1.3.2. Unutrašnji put apoptoze

Unutrašnji put aktivacije apoptoze počiva na signalima koji delovanjem na mitohondrije pokreću kaskadu događaja koji ćeliju uvode u apoptozu u odsustvu stimulacije receptora smrti (Elmore, 2007). U unutrašnjem putu programirane ćelijske smrti stresor direktno aktivira neki od proteina *BH3-only* familije što dovodi do oslobađanja molekula iz međumembranskog prostora mitohondrija koji onda započinju kaskadu događaja koja rezultuje smrću ćelije (Tzifi et al., 2012).

Kontrolu nad dešavanjima na nivou mitohondrija vrše pripadnici Bcl2 familije proteina (Cory and Adams, 2002), dok tumor-supresorni protein p53 (produkt tumor supresornog gena TP53; Cotter, 2009) ima, pak, najvažniju ulogu u aktivaciji članova ove familije proteina. Familija proteina Bcl2 ima antiapoptotske članove (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, BCL2A1, MCL1, BCL-B) i proapoptotske članove (BAX, BAK i BOK), a pripadaju joj i članovi *BH3-only* familije (BIK, HRK, BIM, BAD, BID, PUMA, NOXA, BMF) (Taylor et al., 2008).

Kada se, usled dejstva egzogenog ili endogenog stresora, prevaziđe kritičan prag pri kome aktivirani proapoptotski pripadnici *BH3-only* familije proteina nadvladaju aktivnost antiapoptotskih proteina Bcl2 familije pokreće se mašinerija unutrašnjeg puta programirane ćelijske smrti. Tada dolazi do asimilacije BAX-BAK proapoptotskih članova Bcl2 familije proteina tj. njihove oligomerizacije (Taylor et al., 2008). Naime, dok je BAK integralni protein spoljašnje mitohondrijalne membrane koji podleže konformacionim promenama i agregaciji nakon stimulacije apoptotske mašinerije (Tzifi et al., 2012), BAX je monomerni citosolni protein koji se integriše u spoljašnju

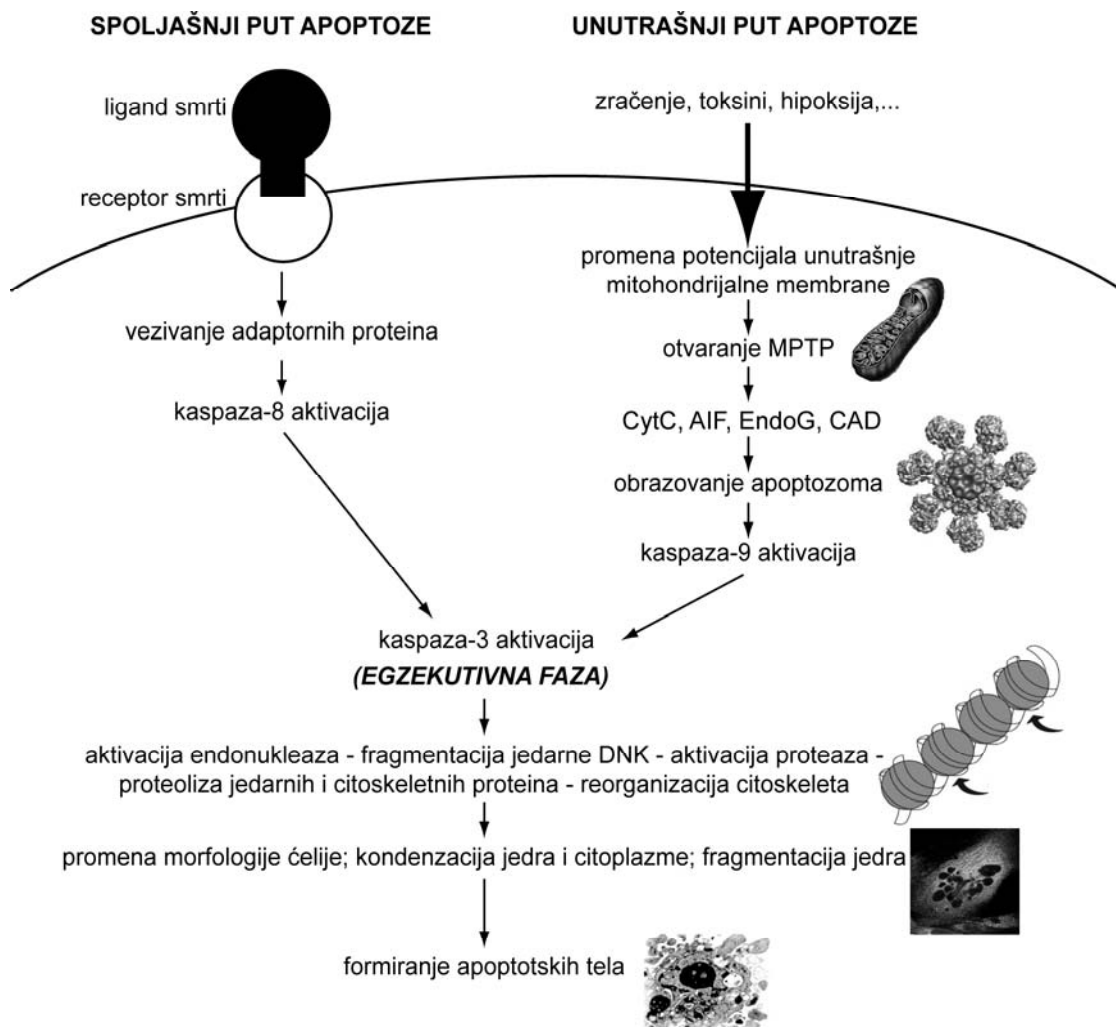
mitohondrijalnu membranu nakon aktivacije, oligomerizuje i spaja sa BAK. Uz to, BAX se dalje vezuje za voltažno-zavisni anjonski kanal (VDAC) na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani (Narita et al., 1998). Adenin-nukleotid translokaza, VDAC i ciklofilin D obrazuju mitohondrijalnu permeabilizacionu poru (eng. *mitochondrial permeabilisation pore*; MPTP) na mestu kontakta unutrašnje i spoljašnje mitohondrijalne membrane. Pora se otvara vezivanjem BAX i kroz nju, citohrom C, AIF i prokaspaza-9, između ostalih, napuštaju međumembranski prostor mitohondrija i dospevaju u citosol (Crompton, 1999). Proteini BAX i BAK su takođe prisutni i u membrani endoplazmatskog retikuluma gde doprinose apoptozi, kontrolom unutarćelijske koncentracije Ca^{2+} (Tzifi et al., 2012). Dodatno, p53 može da direktno aktivira BAX (Chipuk et al., 2004), a defosforilacija BAD člana *BH3-only* familije proteina vodi njegovoj translokaciji u mitohondrijalnu membranu i posledičnom oslobađanju citohroma C (Zha et al., 1996). *In vitro* rezultati govore i da prekomerna ekspresija *BH3-only* proteina PUMA, dovodi do prekomerne ekspresije BAX proteina, promene njegove konformacije i ugradnje u spoljašnju mitohondrijalnu membranu, što je preduslov za oslobađanje citohroma C u citoplazmu (Liu et al., 2003). Još jedan *BH3-only* protein, NOXA, svojim vezivanjem inaktivira antiapoptotske pripadnike Bcl2 familije što vodi aktivaciji kaspaze-9 (Oda et al., 2000). Proteine PUMA i NOXA aktivira p53 protein čime oni verovatno doprinose apoptozi pokrenutoj noksama koje oštećuju DNK ili aktivacijom onkogeno (Elmore, 2007).

Može se zaključiti da MPTP ima ključnu ulogu u unutrašnjem putu apoptoze. Smatra se, naime, da njeno otvaranje, nakon delovanja proapoptotskih stimulusa, prethodno objašnjenim mehanizmima, depolariše unutrašnju membranu mitohondrija i dovodi do oslobađanja dve grupe proapoptotskih proteina iz međumembranskog prostora u citosol (Saelens et al., 2004). Prvu grupu čine citohrom C, Smac-DIABLO i HtrA2-Omi (Cai et al., 1998; Du et al., 2000; van Loo et al., 2002; Garrido et al., 2006). Svi oni aktiviraju unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze koji je zavisen od kaspaza. Citohrom C se vezuje i

aktivira APAF1 i prokaspazu-9, obrazujući apoptozom (Hill et al., 2004), a Smac/DIABLO i HtrA2/Omi inhibiraju proteine inhibitore apoptoze (IAP) (Schimmer, 2004).

Drugu grupu proapoptotskih proteina iz međumembranskog prostora mitohondrija čine AIF, endonukleaza G i CAD. Faktor pokretač apoptoze (eng. *apoptosis-inducing factor*) AIF, odlazi iz citosola direktno u jedro i uzrokuje fragmentaciju jedarne DNK na odsečke dužine 50-300 kb i perinuklearnu kondenzaciju hromatina (Joza et al., 2001), što je događaj specifičan za kasnu apoptozu (Elmore, 2007). Endonukleaza G vrši oligonukleozomalnu fragmentaciju jedarne DNK nakon translokacije iz mitohondrija (Li et al., 2001). Endonukleaza G i AIF funkcionišu nezavisno od kaspaza (Elmore, 2007). Kaspazama aktiviranu deoksiribonukleazu, CAD, aktivira kaspaza-3, i ona započinje oligonukleozomalnu fragmentaciju jedarne DNK (Enari et al., 1998).

Redosled događaja u spoljašnjem i unutrašnjem putu apoptoze je uprošćeno prikazan na šemi 1.



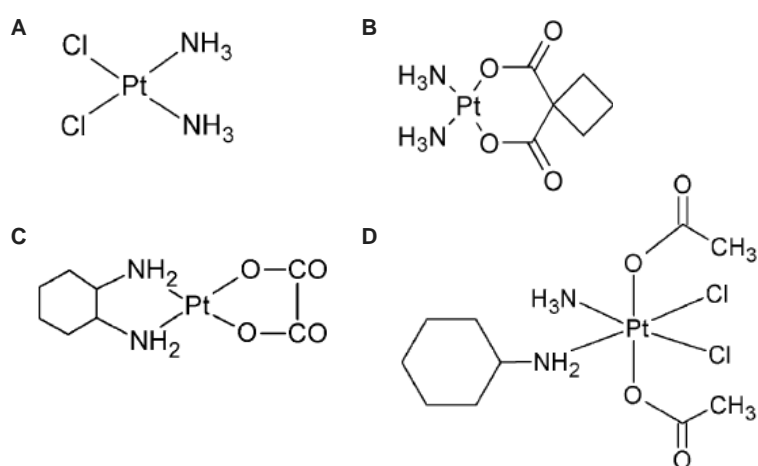
Šema 1. Uprošćen prikaz događaja u ćeliji nakon aktivacije spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze. MPTP= mitohondrijalna permeabilizaciona pora; Cyt= citohrom C; EndoG= endonukleaza G; AIF= faktor pokretač apoptoze; CAD= kaspazama aktivirana deoksiribonukleaza

1.4. Cisplatin i njegovi analozi kao polazni molekuli za sintezu novih jedinjenja sa antitumorskim dejstvom

Jedan od najvažnijih lekova u terapiji velikog broja solidnih tumora je cisplatin, diamin-dihlor-platina(II), koji je sedamdesetih godina prošlog veka ušao u široku kliničku praksu (Rosenberg et al., 1969). On se danas nalazi u 32 od ukupno 78 različitih terapijskih protokola za lečenje maligniteta testisa,

ovarijuma, mokraćne bešike, melanoma, karcinoma pluća, limfoma i mijeloma, i to u kombinaciji sa inhibitorima topoizomeraze II (doksorubicin i bleomicin), antimetabolitima (gemcitabin, 5-fluorouracil i metotreksat), i/ili sa taksolima (paklitaksel) (Harper, 2011). U cirkulaciji, joni hlora u sastavu cisplatina ostaju vezani za lek, u skladu sa visokim sadržajem hlorida u plazmi (oko 100 mM), mada se jedan deo hloridnih jona vezuje i za albumine (Kelland, 2007). Kada dođe do ćelija, cisplatin se u njih preuzima na jedan od tri načina: pasivnom difuzijom, preko transportera za bakar ili putem transportera za organske katjone (Puckett et al., 2010). U unutarćelijskom odeljku u kome je koncentracija hlorida znatno niža (4-20 mM), joni hlora (jedan ili oba) disosuju od cisplatina u zamenu za hidroksilnu grupu poreklom iz vode (Kelland, 2007). Samo hidratisan cisplatin može da se veže za N7 purinskog prstena u sastavu DNK obrazujući kovalentnu koordinativnu vezu. Na taj način dolazi do distorzije DNK lanaca tj. narušavanja sekundarne strukture DNK što dovodi do inhibicije replikacije i transkripcije, a to dalje uslovljava smrt ćelije pokretanjem mehanizma apoptoze (Kelland, 2007). Poznato je i da se cisplatin u izvesnoj meri vezuje i za molekule RNK i ometa njihovu obradu i sazrevanje u ćeliji što verovatno doprinosi opštem delovanju leka (Chapman and DeRose, 2010). Nažalost, cisplatin ima ozbiljna neželjena dejstva koja su mahom posledica intenzivnog preuzimanja leka u sve ćelije koje se brzo dele (npr. ćelije koštane srži), kao i njegove ekskrecije putem bubrega. Neželjena dejstva uključuju nefrotoksičnost, neurotoksičnost, ototoksičnost i mijelosupresivno dejstvo. Ozbiljna neželjena dejstva dovode do neophodnosti snižavanja terapijskih doza koje su za većinu tumora, npr. karcinom ovarijuma, niže od doze neophodne za postizanje citotoksičnog efekta. Zbog toga se razvija rezistencija na cisplatin, verovatno usled njegovog smanjenog preuzimanja u ćelije ili bržeg eliminisanja iz organizma putem urina. Moguće je i da se dejstvo cisplatina smanjuje unutar ćelija delovanjem tiolnih jedinjenja, npr. glutaciona, ili popravljanjem nastalih oštećenja na DNK molekulu (Wheate et al., 2010).

Toksična neželjena dejstva i rezistencija na cisplatin podstakli su sintezu velikog broja novih antitumorskih lekova po tipu platinskih kompleksa. Tridesetak godina nakon ulaska cisplatina u terapijske protokole za maligne bolesti u ljudskoj populaciji, još 23 nova platinska kompleksa su ušla u kliničke studije. Od tog broja, samo dva leka (karboplatin i oksaliplatin) su danas široko prihvaćeni, dok su tri leka (nedaplatin, lobaplatin i heptaplatin) prihvaćena samo u nekim zemljama. Satraplatin i pikoplatin se trenutno nalaze u različitim stadijumima kliničkih studija i prvi su metalokompleksi na bazi platine koji pokazuju antitumorsku aktivnost nakon peroralne administracije (Wheate et al., 2010). Struktura odabranih antitumorskih lekova na bazi platine prikazana je na šemi 2.



Šema 2. Prikaz antitumorskih lekova na bazi platine (Pt). Cisplatin (A), karboplatin (B), oksaliplatin (C) i satraplatin (D). Kompleksi A, B i C su po tipu Pt(II) a D je Pt(IV) kompleks.

Karboplatin je, kao i cisplatin, kompleks po tipu Pt(II), ali umesto dihloridnih liganada karboplatin ima 1,1-ciklobutan-dikarboksilat- ligand koji se u ćeliji zamenjuje vodom (hidroksilnom grupom) mnogo sporije (1000x) od jona hlorida kod cisplatina (Wheate et al., 2010). Zbog manje reaktivnosti, karboplatin se primenjuje u mnogo većim dozama od cisplatina (Harper, 2011). Nakon disocijacije cikličnog liganda, karboplatin daje isti aktivni oblik kao i

cisplatin, na isti način reaguje sa DNK pa je efikasan u lečenju istih tipova maligniteta. Danas je on lek izbora za karcinom ovarijuma, a ušao je fazu II kliničkih ispitivanja za karcinom pljuvačnih žlezda (Perren et al., 1993; Laurie et al., 2010; Ota et al., 2011).

Oksaliplatin je Pt(II) analog cisplatina i prvi je lek na bazi platine koji je uspeo da prevaziđe cisplatinsku rezistenciju. Dve amino grupe cisplatina zamenjene su jednim bidentatnim ligandom cikloheksan-1,2-diaminom (Kelland, 2007). Oksaliplatin se vezuje za pojedinačne DNK lance, a njegov hidrofobni ligand se umeće u veliki usek DNK molekula (Boulikas and Vougiouka, 2003), što spečava enzime za popravku da priđu molekulu DNK. Ovo stvara drugačiji tip interakcije sa naslednom osnovom, čime se verovatno može objasniti prevazilaženje cisplatinske rezistencije (Kasarkova et al., 2008). Oksaliplatin se danas koristi u terapiji kolorektalnog karcinoma, čak i uznapredovalih oblika sa metastazama (Harper, 2011), a u fazi kliničkih ispitivanja se nalazi njegova upotreba u terapiji gastričnih i ezofagealnih adenokarcinoma (Lordick et al., 2010). Od aprila 2010. godine se ispituje mogućnost njegove primene u terapiji karcinoma dojke, pluća, limfoma i akutne mijeloidne leukemije (Wheate et al., 2010).

Satraplatin je po tipu Pt(IV) platinski kompleks od koga se mnogo očekuje. Aktuelna su ispitivanja mogućnosti njegove primene u terapiji karcinoma pluća, cerviksa, ovarijuma i prostate (Kelland et al., 1993; Samimi and Howel, 2006; Choy et al., 2008). Nakon apsorpcije od strane intestinalne mukoze, u krvotoku se satraplatin redukuje dajući bar šest različitih platinskih Pt(II) kompleksa, od kojih je najefikasniji *cis*-amin-dihlor(cikloheksilamin) platin (II) kompleks (Fokkema et al., 2002). Nalazi se u kombinaciji sa drugim antitumorskim lekovima i/ili hormonima u fazama I, II ili III kliničkih ispitivanja terapije karcinoma prostate, pluća i uznapredovalih solidnih tumora ([http// www. Clinicaltrials.gov](http://www.Clinicaltrials.gov)).

Cisplatin, karboplatin, oksaliplatin i satraplatin svoje antitumorsko delovanje ostvaruju pokretanjem apoptoze i sekundarne nekroze tumorskih

ćelija (Ormerod et al., 1996; St Germain et al., 2010; Alcindor and Beauger, 2011; Kalimutho et al., 2011; Sue et al., 2011), mada se u slučaju oksaliplatina i cisplatina sve više razmatra i indukcija protektivne autofagije kojom se može objasniti razvijanje rezistencije tumora na ove lekove (Harhaji-Trajkovic et al., 2009; Ding et al., 2011; Xu et al., 2011; Du et al., 2012).

Logika sinteze novih platinskih kompleksa počiva na uočenoj vezi između efikasnosti cisplatina i prisustva amonijaka u *cis* položaju u njegovoj strukturi (Murray et al., 1998), što je pokrenulo ideju o sintezi bidentatnih aaminskih liganada etilendiamin (en) tipa, koji sadrže dva atoma preko kojih se vezuju za platinu gradeći Pt(II) komplekse. Tako karboplatin, analog cisplatina, ima manju nefrotoksičnost od cisplatina, a oksaliplatin pokazuje antitumorsko delovanje na ćelije rezistentne na cisplatin (Rixe et al., 1996). Pored ovih veoma reaktivnih Pt(II) kompleksa, koji uglavnom pokazuju aktivnost kada su aaminski ligandi u *cis* položaju, sintetisani su i Pt(IV) kompleksi. Oni imaju oktaedarsku geometriju, dva dodatna vezna mesta za ligande i veću hemijsku inertnost koja uslovljava manju reaktivnost, a samim tim i manje toksične neželjene efekte (Schilder et al., 1994; Kwon et al., 2003; Hall et al., 2004). Danas se veliki broj kompleksa po tipu Pt(IV) nalazi u različitim fazama ispitivanja (Trask et al., 1991; Choy et al., 2008). U tom smislu, treba izdvojiti satraplatin, platinski kompleks od koga se mnogo očekuje, a koji je upravo prošao fazu III kliničkih ispitivanja.

Međutim, bez obzira na uočenu veću lipofilnost Pt(IV) u odnosu na Pt(II) komplekse, danas se pretpostavlja da je tip kompleksa koji se vezuje za biomolekule (naročito za DNK) Pt(II) kompleks, zbog čega se smatra da nakon unosa Pt(IV) kompleksa u organizam, dolazi prvo do njegove redukcije u Pt(II) kompleks (Hall et al., 2004).

1.4.1. Estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline kao potencijalni antitumorski agensi

Našu istraživačku pažnju su privukli Pt(IV) kompleksi osmišljeni i sintetisani od strane tima istraživača sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Lazić et al., 2010). Organska osnova ovih kompleksa je bila ili (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina ili pak njeni estri i to: metil-, etil-, propil- ili butil- estar. Ovi platinski kompleksi su pokazali dobru antitumorsku aktivnost prema ćelijskim linijama humanog (U251) i glioma pacova (C6), mišjeg fibrosarkoma (L929) i melanoma (B16). Njihova citotoksičnost je bila posredovana drugačijim molekularnim mehanizmima u odnosu na cisplatin. Naime, dok je cisplatin na analiziranim ćelijskim linijama pokretao apoptozu zavisnu od kaspaza, novi Pt(IV) kompleksi su indukovali oksidativni stres, praćen masivnom vakuolizacijom citoplazme, narušavanjem integriteta ćelijske membrane i izostajanjem kaspazne aktivacije i protektivne autofagije (Lazić et al., 2010).

Kao neočekivan a veoma zanimljiv se pokazao citotoksičan efekat organske osnove ovih kompleksa u odsustvu platine. Naime, ova organska jedinjenja estarske prirode i sa dve cikloheksilne grupe imala su dobar citotoksičan efekat na svim ispitivanim ćelijskim linijama dovodeći do značajne redukcije broja živih ćelija. Ipak, molekularni mehanizam kojim je ova citotoksičnost posredovana nije ispitivan. Shodno zastupljenosti leukemija u morbiditetu i mortalitetu svetske populacije, a zbog nepostojanja dovoljno efikasne terapije za potpuno izlečenje obolelog od leukemije, nastala je potreba da se baš na leukemijskim ćelijama ispita molekularni mehanizam citotoksičnog delovanja cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje citotoksičnog efekta estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na humanim leukemijskim ćelijskim linijama.
2. Utvrđivanje povezanosti hemijske strukture estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline i njihove antitumorske efikasnosti.
3. Ispitivanje molekularnih mehanizama citotoksičnog delovanja estra cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na ćelije humanih leukemijskih ćelijskih linija.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Čelijske kulture i reagensi

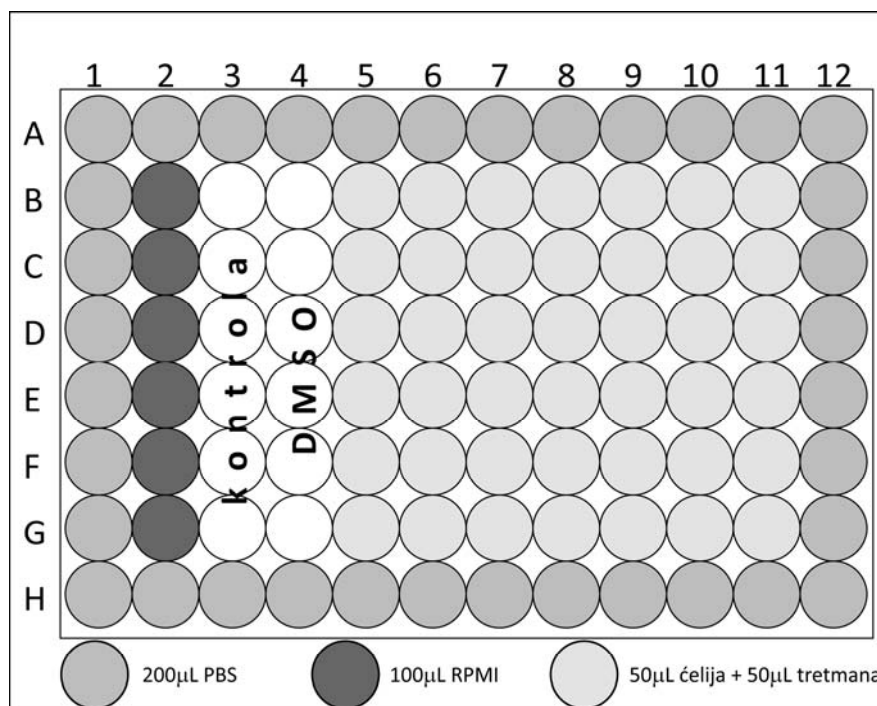
Ispitivanje citotoksičnog delovanja (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline i njenih estara (metil, etil, propil i butil) vršeno je na humanim leukemijskim čelijskim linijama i mononuklearnim čelijama izolovanim iz uzoraka periferne krvi zdravih dobrovoljaca i obolelih od leukemija. U eksperimentima su korišćene sledeće komercijalne leukemijske čelijske linije: promijelocitna (HL-60), limfocitna (REH), mijelogena eritroleukemija (K562), akutna mijelogena (KG-1), akutna limfoblastna (MOLT-4) i B- promijelocitna (JVM-2), koje su nabavljene od Evropske kolekcije čelijskih kultura (eng. *European Collection of Cell Cultures*, ECACC; Salisbury, United Kingdom). Ove humane leukemijske čelijske kulture su odabrane u skladu sa velikom heterogenošću leukemija, u pokušaju da se obuhvati što je moguće veći dijapazon različitih tipova leukemija: hroničnih i akutnih, mijeloidnih i limfatičnih.

Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNPK) su izolovane iz uzoraka periferne krvi dobijene venepunkcijom 9 pacijenata sa leukemijom (4 sa *de novo* dijagnostikovanom hroničnom mijeloidnom leukemijom, 2 u akutnoj mijeloidnoj transformaciji hronične mijeloidne leukemije i 3 sa akutnom mijeloidnom leukemijom; prosečna starost $41,0 \pm 12,0$ godina), čija je bolest dijagnostikovana na Klinici za hematologiju u sastavu Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Dijagnostikovanje je izvršeno u skladu sa kriterijumima za klasifikaciju tumora hematopoetskog i limfogenog tkiva (Vardiman et al., 2009). Kontrolnu grupu su činili uzorci MNPK 11 zdravih dobrovoljaca usklađenih sa grupom obolelih po polu i uzrastu (prosečna starost $32,0 \pm 6,7$ godina). Istraživanje je sprovedeno u skladu sa principima dobre kliničke prakse i saradnje predkliničkih i kliničkih disciplina, na osnovu odobrenja Etičkog

komiteta Kliničkog centra Srbije. Oboleli i zdravi dobrovoljci su nakon upoznavanja sa procedurom, rizicima i svrhom ispitivanja u pisanoj formi dali svoj pristanak za vađenje krvi. Iz uzoraka heparinizirane krvi MNPK su izolovani uz pomoć gustinskog gradijenta nizom centrifugiranja uz pomoć LymphoPrep™ (Axis Shield, Oslo, Norway).

Leukemijske ćelijske linije i MNPK su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, na temperaturi od 37 °C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM L-glutamina i 1% rastvora antibiotik/antimikotik (sve od PAA, Pasching, Austria). Od trenutka odmrzavanja, ćelijske linije su pasažirane u toku deset dana i tek po isteku tog perioda korišćene za eksperimente. Maksimalna starost ćelijskih linija koje su korišćene u eksperimentima iznosila je 23 pasaže.

U cilju ispitivanja vijabiliteta tj. određivanja broja živih ćelija u tretmanima, ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunara (3x10⁴ ćelija/bunaru za ćelijske linije ili 1,5x10⁵ ćelija/bunaru za MNPK). Za analize na protočnom citometru, ćelije su zasejavane u ploče sa 24 bunara, i to 2,5x10⁵ ćelija/bunaru za ćelijske linije odnosno 5x10⁵ ćelija/bunaru, za MNPK. Ploče sa bunarima su nabavljene od Sarstedt, Nümbrecht, Germany. Ćelije su tretirane unutar 2 h od zasejavanja (šema 3).



Šema 3. Prikaz ploče sa 96 bunara. U kolonama 5-11 se nalaze ćelije tretirane dvostruko opadajućim koncentracijama odabranog estra cikloheksil analoga etilendiamin dipropanske kiseline (ukupan volumen 100 µl), tako da je svaka kolona jedan tretman u šestplikatu. U koloni 2 se nalazi 100 µl medijuma/bunaru. U bunarima kolone 3 se nalaze ćelije u medijumu (netretirane-kontrolne) a u bunarima kolone 4 ćelije u medijumu koji sadrži DMSO (rastvarač ispitivanih jedinjenja) u finalnoj koncentraciji od 0,5%. U bunarima po rubu ploče se nalazi po 200 µl puferizovanog fiziološkog rastvora (PBS)

Metil-, etil-, propil- i butil-estar (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline, kao i sama kiselina, sintetisani su na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Njihova sinteza je okarakterisana i publikovana (Lazić et al., 2010). Svi su rastvarani u dimetil sulfoksidu (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u skladu sa svojom rastvorljivošću. Etil-estar je imao najveću solubilnost u DMSO (~ 10 mg/ml na 25 °C) u poređenju sa ostalim estrima, čija je rastvorljivost iznosila ~ 5-6 mg/ml na 35-45 °C. Osnovni rastvori su čuvani zaštićeni od svetlosti na sobnoj temperaturi ne duže od 14 dana. Cisplatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) je takođe rastvaran u DMSO i to

neposredno pre eksperimenta. Ciklosporin A (CsA) je nabavljen od Novartisa (Basel, Switzerland) a pankaspazni inhibitor zVAD-fmk od R&D Systems (Minneapolis, MN).

Za svaki eksperiment su urađene dve kontrole: netretirane ćelije i ćelije tretirane DMSO-om kao korišćenim rastvaračem čija finalna koncentracija nikada nije bila veća od 0,5%. Ni u jednom od eksperimenata nije pokazana statistički značajna razlika između vrednosti dobijenih za ove dve kontrole, tako da su u cilju jasnijeg prikaza i bolje preglednosti rezultata, kao kontrolne vrednosti prezentovane samo one dobijene za netretirane ćelije.

3.2. Ispitivanje uticaja estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na vijabilitet ćelija

Citotoksičnost estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline je određivana kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti kisele fosfataze i laktat dehidrogenaze nakon 24 h tretmana leukemijskih ćelija dvostruko opadajućim koncentracijama ispitivanih jedinjenja (100 - 1,56 μ M).

Test merenja aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze je primenjen sa ciljem utvrđivanja broja živih ćelija po prethodno opisanoj proceduri (Yang et al., 1996). Princip testa je da u živim ćelijama kiselu fosfatazu hidrolizuje *p*-nitrofenil fosfat pri čemu nastaje *p*-nitrofenol. Ukratko, po isteku tretmana (24 h) u svaki bunar (osim u bunare u prvoj koloni) je dodavano po 50 μ l sveže pripremljenog supstrata za kiselu fosfatazu (10 mM *p*-nitrofenil fosfata u 0.3 M natrijum acetatu, pH 5.5, sa 0,3% Triton X-100). Nakon dvočasovne inkubacije na 37 °C, reakcija je prekidana dodavanjem 1,3 M NaOH, u količini od 50 μ l/bunaru. Apsorbance su merene na talasnoj dužini od 405 nm na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) i rezultati su predstavljeni u procentima (%) apsorbanci u odnosu na netretirane (kontrolne) ćelije čiji je

vijabilitet arbitarno preračunat na 100%. Pomoću računarskog programa GraphPad Prism izračunata je ona koncentracija koja je dovela do smanjenja broja živih ćelija za 50%, tzv. IC₅₀ vrednost, za svako od ispitivanih jedinjenja, na svim korišćenim ćelijskim linijama.

Intaktnost ćelijske membrane tj. narušavanje njenog integriteta kao pokazatelja ćelijske smrti po tipu nekroze, utvrdili smo primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u supernatantu ćelija u kulturi po prethodno opisanoj proceduri (Raicevic et al., 2005). Prilikom narušavanja integriteta ćelijske membrane, citosolni enzim LDH dospeva u vanćelijski odeljak, što u eksperimentalnim uslovima predstavlja medijum u kojem se ćelije nalaze. U ovom testu se zbog toga aktivnost LDH određuje u supernatantu (bez ćelija). U našem eksperimentalnom dizajnu ćelije su se nalazile u suspenziji, tako da je u cilju dobijanja čistog supernatanta bilo neophodno sakupiti sadržaj svih bunara ploče sa 96 bunara koji odgovaraju jednom tretmanu i prebaciti ga u plastične mikroepruvete sa zatvaračem. Nakon centrifugiranja na 500g/5min/22°C dobijeni supernatanti su u triplicatu razlivani u novu ploču sa 96 bunara čiji je dizajn odgovarao početnom dizajnu ploče. Za potrebe testa je bilo neophodno pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije) obezbediti i pozitivnu kontrolu (100% mrtve ćelije). Nju su činile ćelije lizirane nejonskim deterdžentom Triton X-100 (3%) koje usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj se laktat oksiduje u piruvat, pri čemu se NAD⁺ redukuje u NADH + H⁺. U narednoj reakciji fenazin-metosulfat posreduje u reoksidaciji NADH + H⁺ u NAD⁺ pri čemu se tetrazolijum hlorid redukuje u obojeni formazan. Protokol ovog testa podrazumeva dodavanje 100 µl supstrata za LDH na 100 µl supernatanta. Za pripremu supstrata za LDH korišćen je 54 mM L(+) laktat, 0,66 mM tetrazolijum hlorid, 0,28 mM fenazin-metosulfat i 1,3 mM NAD⁺ (sve od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), koji su rastvoreni u 0,2 M Tris-puferu pH 8,2. Po isteku 10 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbance su merene na talasnoj dužini od

570 nm na čitaču za mikrotitar ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Rezultati su predstavljeni u procentima (%) citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa Triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije) koja je izračunata pomoću prikazane formule:

$$\% C = [(E-S)/(M-S)] \times 100, \text{ gde je:}$$

E – apsorbanca tretiranih ćelija

S – apsorbanca kontrolnih (netretiranih) ćelija

M – apsorbanca mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa Triton X-100

C – citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

3.3. *Analiza parametara ćelijske smrti i produkcije superoksidnog anjona metodom protočne citometrije*

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citometrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Svaka analiza je obuhvatila 10 000 događaja tj. ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplicatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem kompjuterskog programa BD Cell Quest Pro.

Tip ćelijske smrti (apoptoza/nekroza) ispitivan je dvostrukim bojenjem sa *annexin V*-fluorescein izotiocijanatom (*annexin V*-FITC) i propidijum jodidom (PI). *Annexin V*-FITC je protein mase 35-36 kDa obeležen fluorescein izotiocijanatom (FITC) koji nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera FACSCalibur aparata (talasna dužina 488 nm) emituje zelenu fluorescencu (FL1). *Annexin V* ima veliki afinitet za vezivanje za fosfatidil-serin koji se nalazi u spoljašnjem delu fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane ćelija u ranoj apoptozi. PI je fluorescentna boja koja se umeće između nukleobaza dvolančane

DNK i po pobuđivanju laserskom svetlošću protočnog citometra emituje crvenu fluorescencu (FL2) koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu. Međutim, prilikom smrti ćelije dolazi do oštećenja ćelijske membrane tako da PI može da uđe u ćeliju i reaguje sa DNK. Zahvaljujući ovome, PI se koristi za razlikovanje živih (ne pokazuju fluorescencu u FL2) od mrtvih ćelija (pokazuju fluorescencu u FL2). Dvostrukim bojenjem, *AnnexinV-FITC* i PI, se tako mogu razlikovati četiri populacije ćelija koje se na tačkastom dijagramu prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: zdrave ćelije (*annexin⁻/PI⁻*); ćelije u ranoj apoptozi (*annexin⁺/PI⁻*); ćelije u kasnoj apoptozi (*annexin⁺/PI⁺*) i ćelije u nekrozi (*annexin⁻/PI⁺*). Ukratko, bojenje ćelija je sprovedeno prema instrukcijama proizvođača (BD Pharmingen, San Diego, CA). Po isteku inkubacije, ćelije su iz bunara ploče sa 24 bunara prebacivane u odgovarajuće FACS epruvete. Nakon centrifugiranja (500g/5min/22°C) i pranja (1 ml puferizovanog fiziološkog rastvora - PBS), talog ćelija je resuspendovan u 100 µl 10x razblaženog originalnog pufera (*Annexin*-vezujući pufer) u koji je dodato 10 µl PI i 0,2 µl *annexinV-FITC*. Po završetku inkubacije (30 min, 37 °C), u svaku epruvetu je dodato po 400 µl razblaženog pufera. Svaki uzorak je zatim analiziran na protočnom citometru. Rezultati su izraženi kao procenat (%) *annexin⁺* od ukupnog broja analiziranih ćelija.

Fragmentacija DNK je ispitivana protočnom citometrijom nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja propidijum jodidom (PI), po prethodno opisanom protokolu (Raicevic et al., 2005). Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK. Hipodiploidnost je posledica fragmentacije DNK do koje dolazi u uslovima oštećenja ćelije i može biti jedan od pokazatelja apoptoze. Ćelije sa hipodiploidnim sadržajem se nakon analize rezultata dobijenih protočnom citometrijom na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescence vide u sub-G₀ segmentu, koji prethodi G₀-G₁ fazi ćelijskog ciklusa. Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su 2x oprane u 1 ml PBS i

finalno resuspendovane u 300 μ l PBS i 700 μ l hladnog apsolutnog etanola. Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan a epruvete ostavljene na +4 °C najmanje preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800g/5min/22°C), oprane 1x1 ml PBS, a talog ćelija je finalno resuspendovan u 300 μ l PBS uz dodatak 0,1 % Triton X-100 i 1 mg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 15 min inkubacije na 37 °C, u svaku epruvetu je dodavano 0,05 mg/ml PI. Nakon 30 min inkubacije na 37 °C, usledila je analiza na protočnom citometru. Rezultati su izraženi u procentima (%) ćelija koje imaju fragmentisanu DNK (hipodiploidni sadržaj), tj. na histogramu se nalaze u sub-G₀ segmentu.

Aktivacija kaspaza, enzima odgovornih za pokretanje i/ili izvršavanje apoptotskog mehanizma ćelijske smrti ispitivana je merenjem porasta relativnog intenziteta zelene fluorescence (FL1) ćelija koje su inkubirane sa fluorescentno obeleženim pankaspaznim inhibitorom (ApoStat; R&D Systems, Minneapolis, MN), prema instrukcijama proizvođača. Ovaj inhibitor se specifično vezuje za aktivirane kaspaze. Ukratko, nakon centrifugiranja (500g/5min/22°C) i pranja ćelija prethodno tretiranih prema odgovarajućem protokolu, talog ćelija je resuspendovan u 300 μ l medijuma (RPMI 1640) koji je sadržao 3 μ l fluorescentno obeleženog (FITC) pan-kaspaznog inhibitora (čitavanje u FL1). Po isteku 30 min inkubacije na 37 °C, ćelije su oprane i finalno resuspendovane u 500 μ l PBS. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence, pri čemu pomeraj histogramskog zapisa udesno u odnosu na histogramski zapis kontrolnih (netretiranih) ćelija odgovara povećanju intenziteta fluorescence (FL1) tj. ukazuje na povećanu kaspaznu aktivnost izraženu kao povećanje broja ćelija (%) sa kaspaznom aktivacijom u određenom tretmanu.

Porast kiselog sadržaja u citoplazmi tretiranih ćelija koji bi mogao da ukaže na prisustvo autofagije odnosno povećanje broja lizozoma/autolizozoma, analiziran je protočnom citometrijom nakon bojenja akridin oranžom, koji je pH senzitivna boja. Naime, akridin oranž emituje

narandžasto-crvenu fluorescencu (FL3) u kontaktu sa kiselim sadržajem lizozoma/autolizozoma dok u neutralnom pH (citoplazma) emituje zelenu fluorescencu (FL1). Izračunavanjem relativnog odnosa intenziteta narandžasto-crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) u odnosu na njihov odnos u kontrolnim (netretiranim) ćelijama, koji je arbitrarno uzet za jediničan (FL3/FL1=1 u kontrolnim ćelijama) procenjuje se da li je došlo do povećanja FL3 fluorescence, a time i do povećanja broja autolizozoma. Ukratko, po isteku tretmana, ćelije su centrifugirane (500g/5min/22°C) i oprane 2x1 ml PBS. Finalni talog ćelija je resuspendovan u 300 µl medijuma (RPMI 1640) koji je sadržao 3 µl boje akridin-oranž (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Po isteku 30 min inkubacije na 37 °C ćelije su oprane, resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane protočnim citometrom.

Produkcija superoksidnih anjona u mitohondrijama tretiranih ćelija je analizirana protočnom citometrijom merenjem intenziteta crvene fluorescence (FL2) koju emituje fluorohrom dihidroetidijum, koji se specifično vezuje za superoksidni anjon (DHE; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Njime su ćelije bojene prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, DHE je po isteku tretmana dodavan ćelijama u finalnoj koncentraciji od 20 µM. Nakon 30 min inkubacije na 37 °C i prebacivanja u odgovarajuće epruvete, ćelije su 2x centrifugirane, 500g/5min/22°C, i između toga oprane 1x1 ml PBS da bi finalno bile resuspendovane u 500 µl PBS i analizirane na protočnom citometru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence, pri čemu pomeraj krive raspodele intenziteta fluorescence udesno u odnosu na krivu raspodele intenziteta fluorescence u kontrolnim (netretiranim) ćelijama, odgovara povećanju intenziteta crvene fluorescence (FL2) tj. indirektno ukazuje na povećanu produkciju superoksidnog anjona u određenom tretmanu za koga se DHE boja vezuje.

Potencijal mitohondrijalne membrane određivan je uz pomoć lipofilne katjonske boje DePsipher (R&D Systems, Minneapolis, MN), koja pri hiperpolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija stvara agregate

fluorescentne crvene boje (FL2). Međutim, pri depolarizaciji membrane mitohondrija ne dolazi do stvaranja agregata molekula boje i ona ostaje u svojoj fluorescentno zelenoj monomernoj formi (FL1). Dakle, pri analizi rezultata meren je intenzitet FL1 i FL2 fluorescenci tj. analiziran je njihov odnos (FL1/FL2). U tom smislu, ako tretman dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, dolazi do porasta odnosa zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2). Ukratko, ćelije su po isteku tretmana bojene u skladu sa instrukcijama proizvođača. Nakon centrifugiranja i pranja, talog ćelija je resuspendovan u 300 μ l 10x razblaženog pufera za DePsipher u koga je dodata boja (finalno razblaženje 1/1000). Nakon inkubacije (37°C, 30 min) ćelije su centrifugirane, oprane 1x1 ml PBS i finalno resuspendovane u 500 μ l PBS. Fluorescenca zelenih monomera ili crvenih agregata je merena protočnim citometrom i prezentovana kao odnos crvene i zelene fluorescence (FL2/FL1) koji korelira sa vrednošću potencijala mitohondrijalne membrane ($\Delta\Psi$).

3.4. Utvrđivanje internukleozomalne fragmentacije DNK primenom metode elektroforeze DNK

Metoda elektroforeze DNK na gelu od agaroze je korišćena sa ciljem utvrđivanja internukleozomalne fragmentacije DNK, tzv. DNK *ladder*-a, koja je nedvosmislen pokazatelj apoptotske smrti ćelija. Leukemijske ćelije (HL-60) su tretirane 8 h i 24 h sa tri odabrane koncentracije etil-estra (12,5 μ M; 25 μ M i 50 μ M). Po isteku tretmana, DNK je izolovana uz pomoć DNA-zola (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) prema instrukcijama proizvođača. Ukratko, po isteku tretmana, ćelije (6×10^6) su prebačane u mikroeprovete i centrifugirane na 4700 rpm/2 min. Na prethodno osušen pelet ćelija je dodato 500 μ l DNAzola i nakon 5 min 250 μ l 100 % etanola (korak precipitacije DNK). Izolovana nit DNK je nastavkom pipete zakačena za zid mikotube i prelivena sa 300 μ l 75 % etanola (korak pranja, 3x ponovljen). Nakon kratkog centrifugiranja, 5 sekundi,

maksimalno je aspiriran etanol, a talog DNK je ostavljen preko noći u 100 μ l 8 mM NaOH na +4 °C (korak DNK solubilizacije). Narednog dana u sve uzorke je dodato 5 μ l RNAze, a pH uzoraka je podešen na 8 dodavanjem 50 μ l HEPES (Sigma, Aldrich). Kvantifikacija izolovane DNK je izvršena spektrofotometrijski na aparatu Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Za elektroforetsko razdvajanje 5 μ g DNK izolovane iz svakog tretmana korišćen je 1,8% agarozni gel sa etidijum bromidom. Etidijum bromid se umeće u dvolančani DNK heliks i fluorescira nakon obasjavanja UV svetlošću. Kao marker je korišćen *ladder* standard (Fermentas, Vilnius, Lithuania) dužine 100 baznih parova (bp). Gelovi su fotografisani uz pomoć Gel Logic 200 sistema za ultravioletnu iluminaciju i snimanje (Eastman Kodak, Rochester, NY).

3.5. *Utvrđivanje morfoloških promena primenom elektronske mikroskopije*

U cilju analiziranja morfoloških promena na ćelijama nakon tretmana sa reprezentativnim etil-estrom cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline, korišćena je elektronska mikroskopija. Ukratko, ćelije su nakon višestrukog pranja u PBS, fiksirane u 3% glutaraldehidu i 25% natrijum kakodilatu (pH 7,3). 1% osmijum tetroksid je korišćen za postfiksaciju. Dehidracija je vršena u graduisanim rastvorima alkohola, nakon čega su uzorci kalupljeni u smolama Epon (Agar Scientific, Stansted, UK). Pravljeni su tanki i semitanki isecci. Tanki isecci su stavljani na bakarne mežice i bojeni uranil acetatom. Vizuelizacija je vršena na Morgagni 268D elektronskom mikroskopu (FEI, Hillsboro, OR).

3.6. Ispitivanje ekspresije faktora pokretača apoptoze (AIF) i kaspaze-3 kao markera apoptoze i beklina-1 i LC3-II proteina kao markera autofagije

Prisustvo faktora pokretača apoptoze (eng. *apoptosis inducing factor*; AIF) je verifikovano u jedarnoj i citoplazmatskoj ćelijskoj frakciji koje su izolovane uz pomoć *ProteoJet Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit*-a (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) sledeći uputstva proizvođača.

Aktivnost kaspaze-3, najznačajnije u nizu izvršnih kaspaza u mašineriji apoptoze, verifikovana je imunoblot tehnikom nakon 4 h i 8 h ekspozicije etil-estru (12,5; 25 i 50 μ M) u ukupnom ćelijskom lizatu. Sa druge strane, aktivnost proautofagnog proteina beklina-1 i konverzija lakog lanca proteina vezanog za mikrotubule (LC3-I) u njegovu formu LC3-II, koja ulazi u sastav autofagozoma, verifikovana je nakon 8 h i 16 h ekspozicije etil-estru. Ukratko, po isteku tretmana HL-60 ćelije su lizirane u odgovarajućem puferu (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF i 10 μ l proteaza inhibitornog koktela) (Sigma- Aldrich) na ledu, u trajanju od 30 min, centrifugirane na 14 000 g/15 min/+4°C, a supernatanti su izdvojeni za dalju analizu.

Sadržaj proteina u svakom uzorku (citoplazmatska i nuklearna frakcija i ukupni ćelijski lizat) utvrđen je metodom po Bradfordu. Princip ove metode je da proteini reaguju sa bojom *Coomassie Brilliant Blue* i prevode je u anjonski oblik, što uzrokuje promenu boje od smeđe-crvene u plavu. Apsorbanca je očitavana na čitaču za mikrotitarske ploče (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) na 570 nm. Intenzitet dobijene plave boje je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracije proteina u uzorcima određene su na osnovu standardne krive. Standardna kriva je konstruisana nakon očitavanja apsorbanci iz reakcije standardnih rastvora albumina iz seruma govečeta (eng. *bovine serum albumin*) u koncentracijama: 5, 10, 15 i 20 mg/ml sa molekulom boje.

Ista količina proteina iz svakog uzorka je razdvojena tehnikom denaturišuće gel elektroforeze (SDS-PAGE) na 10-12% gelu od poliakrilamida. Razdvojeni proteini su sa poliakrilamidnog gela prebačeni na nitroceluloznu

membranu (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Nakon inkubacije preko noći na +4 °C sa primarnim zečjim antitelima na humani tubulin (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA), kaspazu-3 (AnaSpec, Fremont, CA, USA), AIF (1:900), lamin A/C (1:2000), beklin-1 (1:3000), LC3 (1:900) i β - aktin (1:5000), i nakon 1,5 h inkubacije (+21 °C) sa HRP obeleženim anti-zečjim IgG antitelima (1:1000; sve od Cell Signaling Technology, Beverly, MA) trake izdvojenih proteina su vizuelizovane pomoću reagensa za pojačavanje hemiluminescence (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) na rendgenskom filmu (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK).

3.7. Ispitivanje uticaja etil-estra cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na diferencijaciju leukemijskih ćelija

U cilju procene diferencijacije ćelija humane promijelocitne leukemije, HL-60, analizirana je njihova morfologija i praćena promena u ekspresiji markera granulocitne diferencijacije – CD11b i CD15.

Promena morfologije jedra kao i prisustvo primarnih granula u citoplazmi leukemijskih ćelija analizirani su na isečcima debljine 1 μ m kao i na ultratankim isečcima ukalupljenim u Eponu-u (Agar Scientific). Isečci od 1 μ m su obojeni toluidin-plavim i analizirani uz pomoć 100x uveličavajućeg objektiva sa uljanom imerzijom na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX41TF) sa digitalnom kamerom (Olympus C5060). Ultratanki isečci su nakon stavljanja na bakarne mrežice bojeni uranil acetatom i analizirani na elektronskom mikroskopu Morgagni 268D (FEI).

Protočna citometrija je korišćena za analizu ekspresije CD11b i CD15, markera mijeloidne diferencijacije. Pri tome je CD11b karakterističan i za granulocitnu i za monocitnu diferencijaciju dok je CD15 karakterističan za granulocitnu lozu obzirom da se njegova ekspresija povećava tokom granulocitopoeze (uz umereno povećanje tokom mijelocitopoeze). Ukratko, HL-

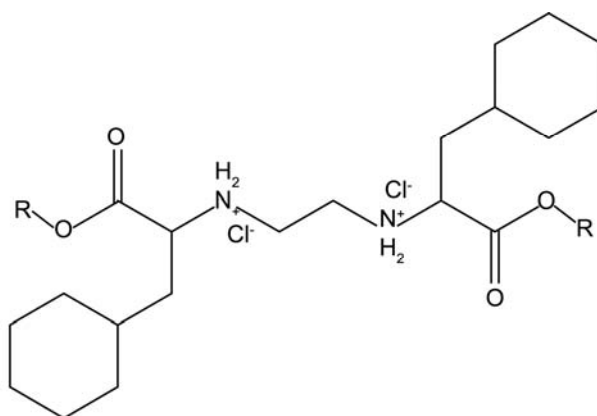
60 ćelije su nakon tretmana (48 h) sa 12,5 μ M etil-estra, obojene sa FITC-konjugovanim anti-humanim CD15 (emiter zelene fluorescence; FL1) i fiko eritriinom (PE)- konjugovanim anti-humanim CD11b antitelima (emiter crvene fluorescence; FL2), shodno uputstvima proizvođača. Korišćeno je anti-humano IgG1/IgG2 (FITC/PE) antitelo kao izotipska kontrola (sve od BD Pharmingen), koja je iskorišćena za verifikaciju specifičnosti vezivanja CD15 i CD11b antitela za odgovarajuće antigene. Promene u ekspresiji CD15 i CD11b su predstavljene histogramima na kojima je porast intenziteta fluorescence zabeležen kao pomak udesno u odnosu na njen intenzitet u kontrolnim, netretiranim ćelijama što ukazuje na povećanu ekspresiju CD11b i CD15 u tretiranim uzorcima u odnosu na kontrolu. Rezultati su dodatno izraženi i kao stepen porasta prosečnog intenziteta fluorescence (eng. *mean fluorescence*) u odnosu na jediničnu, arbitrarno uzetu, vrednost u kontroli.

3.8. *Statistička analiza*

U statističkoj obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Za procenu značajnosti razlike nezavisnih uzoraka korišćeni su parametarski test - Studentov t-test, i neparametarski test - Wilcoxon-ov test sume rangova. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. REZULTATI

Struktura cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline, čiji je molekularni mehanizam antileukemijskog delovanja ispitivan u ovom istraživanju, prikazana je na slici 1.



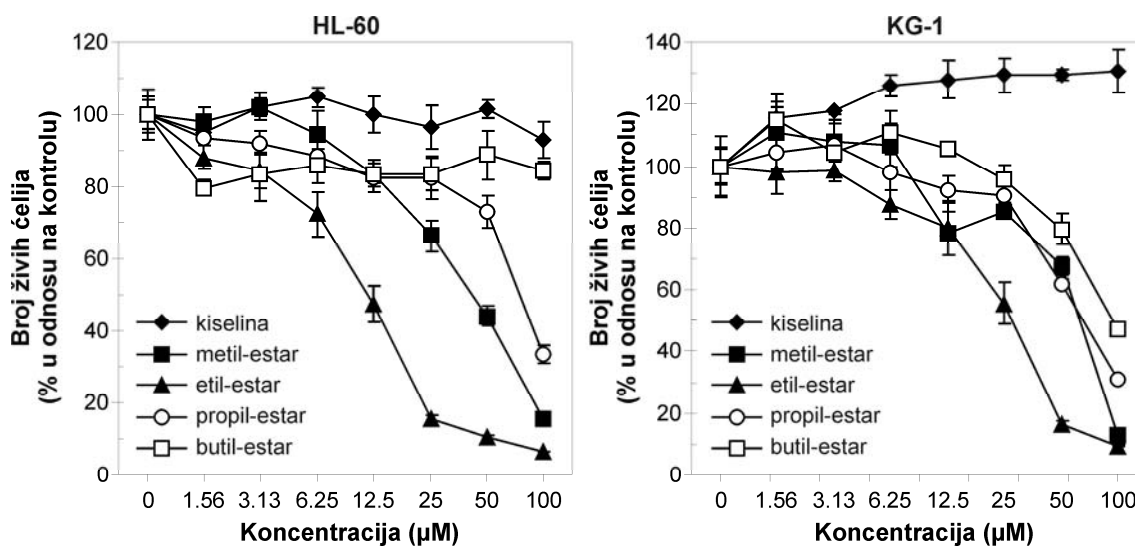
R= H; CH₃ (metil); C₂H₅ (etil); C₃H₇ (*n*-propil) C₄H₉ (*n*-butil)

Slika 1. Struktura (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline (R=H) i njenih estara: metil-, etil-, propil- i butil-estara.

Strukturna formula ukazuje da sva jedinjenja od interesa za ovo istraživanje imaju sličnu strukturu sa dva cikloheksil prstena i bočnim alkil lancem varijabilne, rastuće, dužine. Polazno jedinjenje je (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina čiji bočni lanac predstavlja atom vodonika (H). Njeni estri u bočnom lancu sadrže odgovarajuće grupe tako da metil-estar ima metil (CH₃) grupu, etil-estar sadrži etil grupu (C₂H₅), propil-estar ima *n*-propil (C₃H₇) grupu dok butil-estar u bočnom lancu ima *n*-butil (C₄H₉) grupu.

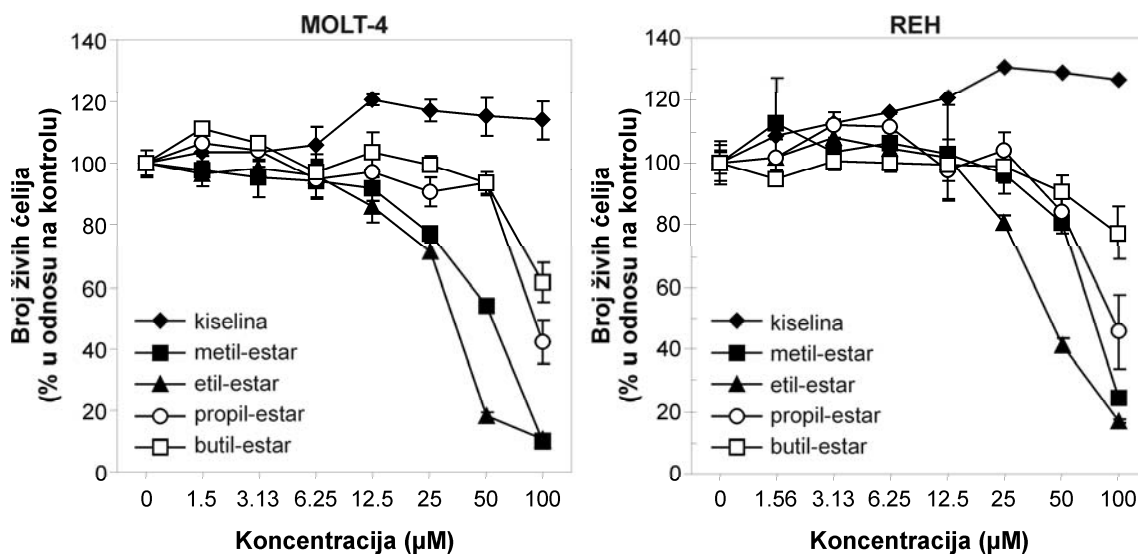
4.1. Estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline su toksični za lekemijske ćelijske linije

Rezultati testa određivanja aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze primenjenog sa ciljem utvrđivanja broja živih leukemijskih ćelija nakon tretmana svim ispitivanim jedinjenjima na humanim ćelijskim linijama promijelocitne (HL-60) i akutne mijelogene leukemije (KG-1), prikazani su na slici 2.



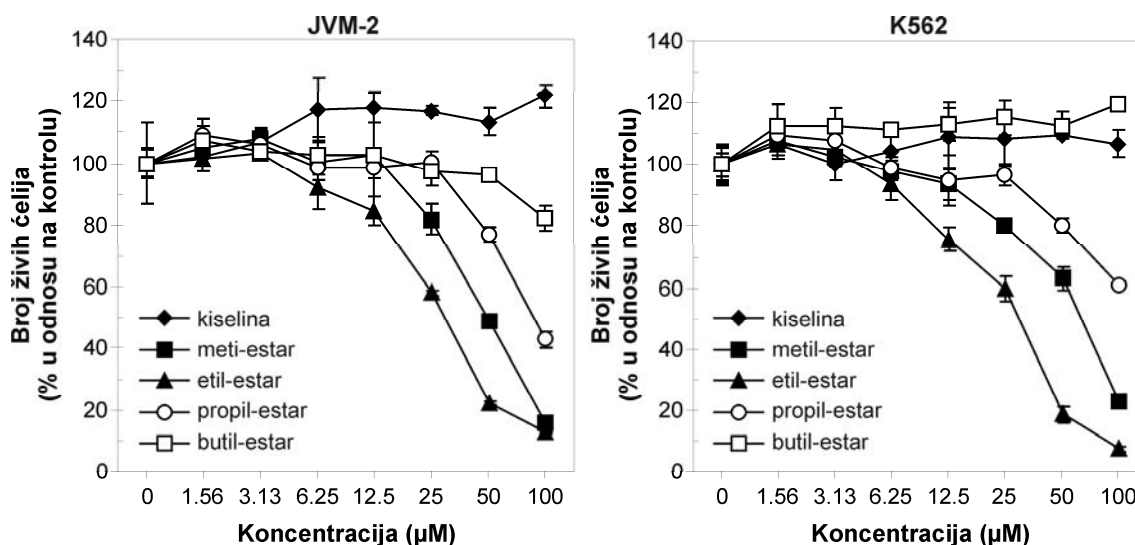
Slika 2. Citotoksičnost cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline prema humanim ćelijskim linijama HL-60 i KG-1. Ćelije su inkubirane sa dvostruko opadajućim koncentracijama svih ispitivanih jedinjenja u toku 24 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Dvadestčetvoročasovni tretman humanih ćelijskih linija akutne limfoblastne (MOLT-4) i limfocitne (REH) leukemije svim ispitivanim jedinjenjima je rezultovao aktivnošću lizozomalne kisele fosfataze koja je prikazana na slici 3.



Slika 3. Citotoksičnost cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline prema humanim ćelijskim linijama MOLT-4 i REH. Ćelije su inkubirane sa dvostruko opadajućim koncentracijama svih ispitivanih jedinjenja u toku 24 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze na humanim ćelijskim linijama B-promijelocitne (JVM-2) i mijelogene eritroleukemije (K562) nakon dvadesetčetvoročasovne ekspozicije delovanju cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline, prikazani su na slici 4.



Slika 4. Citotoksičnost cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline prema humanim ćelijskim linijama JVM-2 i K562. Ćelije su inkubirane sa dvostruko opadajćim koncentracijama svih ispitivanih jedinjenja u toku 24 h, a broj živih ćelija je određen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Rezultati testa aktivnosti kisele fosfataze, prikazani na slikama 2, 3 i 4, ukazuju da je na svim ispitivanim humanim leukemijskim ćelijskim linijama, HL-60, KG-1, MOLT-4, REH, JVM-2 i K562, cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra bio najefikasniji, tj. doveo je do najvećeg smanjenja broja živih ćelija. Po postignutoj efikasnosti sledili su ga metil-, propil- i butil-estar. Efikasnost butil-estra je bila istog reda veličine kao i ishodnog, roditeljskog, jedinjenja, tj. etilendiamindipropanske kiseline. U skladu sa tim, redosled citotoksične aktivnosti svih ispitivanih jedinjenja, može se prikazati kao: etil-estar > metil-estar > propil-estar > butil-estar = etilendiamindipropanska kiselina.

Prikaz izračunatih IC₅₀ vrednosti koje predstavljaju onu koncentraciju supstance koja je dovela do smanjenja broja živih ćelija na 50% u odnosu na netretirane (kontrolne ćelije) dat je u tabeli 1.

Tabela 1. *In vitro* citotoksična aktivnost cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline prema leukemijskim ćelijama

SUPSTANCE	IC ₅₀ (μ M)					
	ĆELIJSKE LINIJE					
	HL-60	MOLT-4	JVM2	KG-1	REH	K562
Kiselina	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Metil-estar	19.8 \pm 1.3	47.4 \pm 1.6	48.4 \pm 2.6	58.0 \pm 3.0	73.6 \pm 2.0	58.8 \pm 1.6
Etil-estar	10.7 \pm 1.4*	32.1 \pm 1.6*	28.9 \pm 0.5*	25.4 \pm 3.3*	45.4 \pm 1.0*	26.8 \pm 2.0*
Propil-estar	80.8 \pm 9.1	93.1 \pm 5.6	88.1 \pm 3.2	70.3 \pm 7.9	93.7 \pm 13.3	>100
Butil-estar	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Cisplatin	17.5 \pm 2.4	26.6 \pm 4.5	n.a.	37.7 \pm 6.2	17.1 \pm 1.6	24.0 \pm 3.7

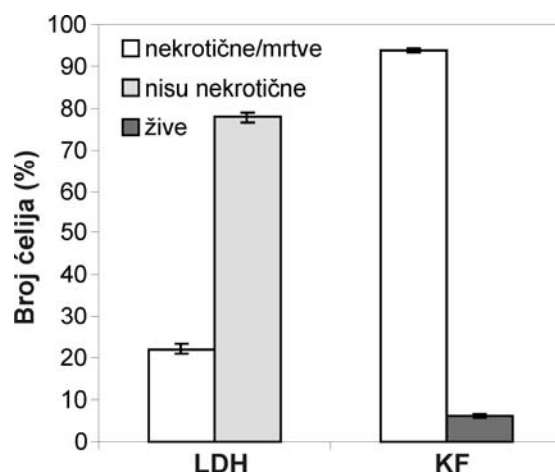
Vrednosti su predstavljene kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (IC₅₀; 24 h) iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$ predstavlja statistički značajno niže IC₅₀ vrednosti u odnosu na kiselinu, metil-, propil- i butil-estar; n.a.- nije analizirano).

Analiza dobijenih vrednosti je pokazala da etil-estar ima najnižu IC₅₀ vrednost na svim analiziranim humanim leukemijskim ćelijskim linijama. Ona se kretala od 10,7 \pm 1,4 μ M (na HL-60 ćelijama), do 45,4 \pm 1,0 μ M (na REH ćelijama) i bila je statistički značajno niža ($p < 0,05$) u poređenju sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za metil-, propil- i butil-estar. Interesantnim se nameće rezultat poređenja IC₅₀ vrednosti dobijenih za etil-estar sa odgovarajućim vrednostima dobijenim za cisplatin na svim ispitivanim leukemijskim ćelijskim linijama. Naime, citotoksičnost etil-estra je bila skoro istog reda veličine kao i citotoksičnost proapoptotskog leka cisplatina iako se u sastavu etil-estra ne nalazi metal tj. platina (Pt), koja se smatra nosiocem citotoksične aktivnosti cisplatin (Wang et al., 2005).

Na osnovu analiziranih IC₅₀ vrednosti dobijenih izvođenjem testa za merenje aktivnosti kisele fosfataze na svim ispitivanim ćelijskim linijama tretiranim jedinjenjima od interesa za ovo istraživanje, zaključeno je da je HL-60, akutna promijelocitna leukemijska ćelijska linija, najosetljivija na

citotoksično dejstvo svih ispitivanih jedinjenja. Takođe, zaključeno je i da cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra ima najnižu IC₅₀ vrednost na svim ispitivanim ćelijskim linijama tj. poseduje najefikasnije antileukemijsko dejstvo. Zato smo dalji tok istraživanja u smislu utvrđivanja molekularnih mehanizama delovanja estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline ispitivali na HL-60 ćelijskoj liniji koju smo u izlagali dejstvu etil-estra.

U tom smislu, želeli smo najpre da ispitamo da li je citotoksičnost etil-estara posledica narušavanja integriteta ćelijske membrane. Naime, permeabilizacija ćelijske membrane sa sledstvenim izlivanjem citoplazme u okolinu je događaj koji karakteriše nekrozu (Zong and Thompson, 2006). Oštećenje ćelijske membrane eksperimentalno se dokazuje porastom aktivnosti unutarćelijskog enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u medijumu u kome se ćelije nalaze (videti Materijal i Metode). Različitim koncentracijama etil-estra (1,56 - 100 µM) tretirali smo HL-60 ćelije u toku 24 h. U uslovima primene najviše koncentracije etil-estra (100 µM) koja je korišćena za ispitivanje citotoksičnog dejstva, procenat HL-60 ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane je iznosio $22,2 \pm 1,3\%$. Ovaj rezultat je ukazao da približno 77,8% HL-60 ćelija i nakon tretmana sa 100 µM etil-estra ima očuvan integritet ćelijske membrane. Sa druge strane, rezultat testa utvrđivanja aktivnosti lizozomalne kisele fosfataze pod istim eksperimentalnim uslovima (24 h; 100 µM) je iznosio $6,4 \pm 0,1\%$ (slika 2). Ovakav rezultat je ukazao da pri opisanim eksperimentalnim uslovima približno 93,6% ćelija ne pokazuje aktivnost kisele fosfataze tj. nema karakteristike vijabilnih (živih) ćelija. Dakle, pri 24 h ekspoziciji 100 µM koncentraciji etil-estra 93,6% ćelija je mrtvo, a od tog broja samo 22,2% je umrlo usled gubitka integriteta ćelijske membrane, najverovatnije nekrozom, dok je preostalih 71,4% umrlo nekim drugim mehanizmom ćelijske smrti. Uporedni prikaz rezultata ova dva testa (LDH test i test određivanja aktivnosti kisele fosfataze) dat je na slici 5.



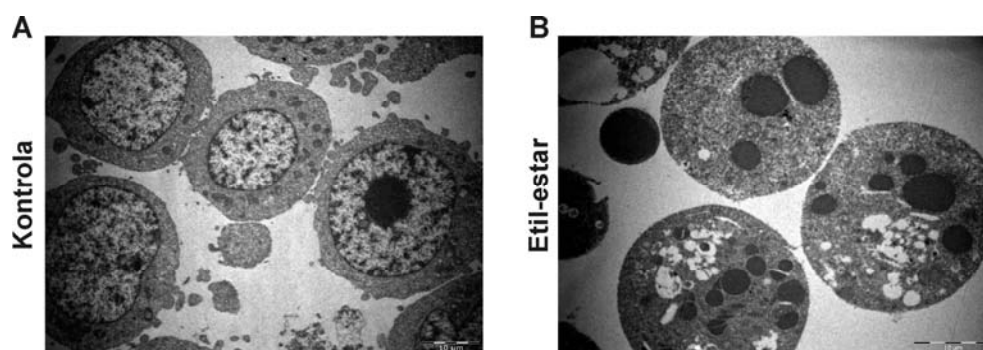
Slika 5. Citotoksičnost etil-estra prema HL-60 ćelijama predstavljena kao uporedni rezultat laktat dehidrogenaznog (LDH) testa i testa aktivnosti kisele fosfataze (KF). Ćelije su inkubirane sa 100 μ M etil-estra u toku 24 h. Rezultati iz dva nezavisna eksperimenta su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija, a svaki tretman je rađen najmanje u triplikatu.

Može se zaključiti da nekroza praćena gubitkom celovitosti ćelijske membrane, iako prisutna, nije dominantan mehanizam kojim etil-estar ostvaruje citotoksičan efekat prema HL-60 ćelijama.

4.2. Etil-estar dovodi do apoptoze HL-60 ćelija

U daljem toku istraživanja želeli smo da ispitamo koji tip ćelijske smrti je najviše zastupljen nakon tretiranja HL-60 ćelija etil-estrom. Naime, nekrozu karakteriše vakuolizacija citoplazme i ruptura ćelijske membrane sa izlivanjem citoplazme u okolinu, autofagiju formiranje dvomembranskih vezikula kiselog sadržaja, dok je apoptoza karakteristična po kondenzaciji hromatina i citoplazme, kao i internukleozomalnoj fragmentaciji DNK što može biti praćeno eksternalizacijom fosfatidil-serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj dvoslojne ćelijske membrane, čiji integritet ostaje u potpunosti očuvan (Edinger and Thompson, 2004).

Ultrastrukturna analiza morfologije HL-60 ćelija elektronskim mikroskopom prikazana je na slici 6.

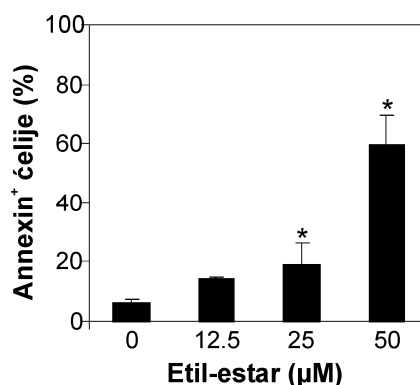


Slika 6. Reprezentativne elektronske mikrografije (A) kontrolnih HL-60 ćelija i (B) ćelija nakon tretmana (8 h; 50 µM) etil-estrom; skala za procenu veličine - 10 µm. Dok ćelije u kontroli imaju krupno euhromatično jedro sa velikim jedarcem, u tretmanu se zaokrugljuju, jedra su im fragmentisana ali je ćelijska membrana očuvanog integriteta, što sve govori u prilog apoptotske smrti ćelija u tretmanu.

Uočava se da kontrolne, netretirane, HL-60 ćelije imaju očuvanu ćelijsku membranu kao i membrane organela i jedro sa rastresitim euhromatinom i velikim jedarcem (slika 6A). Međutim, osmočasovni tretman etil-estrom (50 µM) doveo je do promena u ćelijskoj morfologiji, tipičnih za apoptozu (White and Cinti, 2004). Ćelije su se smanjile i zaoblile, a došlo je i do fragmentacije jedara (slika 6B). Ipak, na elektronskim mikrografijama se može zapaziti i da je membrana HL-60 ćelija nakon tretmana etil-estrom ostala očuvana što je bilo u skladu sa rezultatom LDH testa (slika 5).

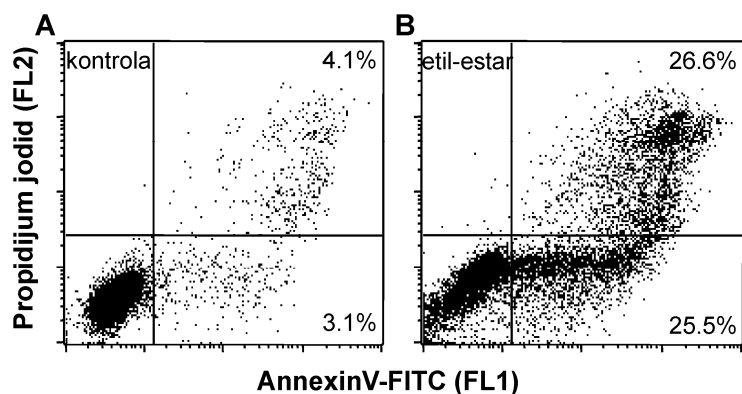
Analize na protočnom citometru dodatno su potvrdile da je apoptoza osnovni mehanizam citotoksičnog dejstva etil-estra prema HL-60 ćelijama. Naime, translokacija fosfatidil-serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj ćelijske membrane je jedan od pokazatelja rane (*annexin*⁺/*PI*⁻), tj. kasne (*annexin*⁺/*PI*⁺) apoptoze (Bossy-Wetzel and Green, 2000). U našim eksperimentima tretman etil-estrom (24 h) je doveo do dozno-zavisnog porasta procenta HL-60 ćelija kod kojih je došlo do pomeranja fosfatidil-serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj

lipidnog dvosloja ćelijske membrane (slika 7). Pri tome je najveći procenat ćelija sa *annexin*-pozitivnošću ($59,3 \pm 10,1\%$) dobijen nakon tretmana sa $50 \mu\text{M}$ etil-estra. Uz to, nakon tretmana sa $25 \mu\text{M}$ i $50 \mu\text{M}$ etil-estra procenat ćelija sa translokacijom fosfatidil-serina je bio statistički značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na njihov broj u kontroli (netretirane HL-60 ćelije).



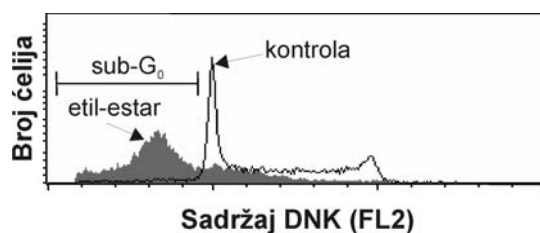
Slika 7. Etil-estar dovodi do dozno zavisne eksternalizacije fosfatidil-serina na ćelijskoj membrani HL-60 ćelija (24 h; 12,5; 25 i $50 \mu\text{M}$). Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija *annexin*V-FITC i propidijum jodidom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$).

Reprezentativni tačkasti dijagrami (slika 8) prikazuju kvadratnu distribuciju HL-60 ćelija, nakon dvostrukog bojenja (*annexin*V-FITC i PI). Naime, *annexin* se vezuje za fosfatidil-serin koji se kod ćelija u apoptozi nalazi u spljašnjem sloju lipidnog dvosloja ćelijske membrane. Sa druge strane, PI se nakon prolaska kroz oštećenu ćelijsku membranu umeće u dvostruki DNK heliks. Na taj način se nakon ovog dvostrukog bojenja mogu razlikovati četiri populacije ćelija: zdrave ćelije (*annexin*⁻/PI⁻); ćelije u ranoj apoptozi (*annexin*⁺/PI⁻); ćelije u kasnoj apoptozi (*annexin*⁺/PI⁺) i ćelije u nekrozi (*annexin*⁻/PI⁺). Nakon tretmana etil-estrom (etil-estar $50 \mu\text{M}$; 24h) *annexin*⁺ ćelije u ranoj apoptozi (*annexin*⁺/PI⁻; 25,5%) se raspoređuju u donjem desnom kvadrantu dok su *annexin*⁺ ćelije u kasnoj apoptozi (*annexin*⁺/PI⁺; 26,6%) smeštene u gornjem desnom kvadrantu.



Slika 8. Etil-estar dovodi do eksternalizacije fosfatidil-serina na ćelijskoj membrani HL-60 ćelija (24 h; 50 μ M). Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija *annexinV-FITC* i propidijum jodidom. Reprezentativni tačkasti dijagrami (A) kontrolnih i (B) i HL-60 ćelija nakon tretmana. Uočava se izrazit porast broja *annexin*⁺ HL-60 ćelija (52,1%) nakon tretmana.

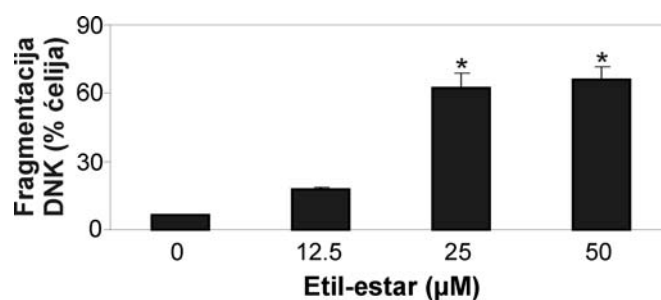
U toku apoptoze dolazi do aktivacije endonukleaza koje u jedru dovode do prekida tj. fragmentacije dvolančane DNK (Ashkenazi, 2008). U našim eksperimentima (slika 9), osmočasovni tretman sa etil-estrom (50 μ M) uzrokovao je fragmentaciju DNK u čak 72,3% ćelija (bojenje propidijum jodidom), što se na histogramu distribucije intenziteta FL2 fluorescencije uočava kao sub- G_0 segment (videti Materijal i Metode).



Slika 9. Etil-estar indukuje fragmentaciju DNK HL-60 ćelija (8 h; 50 μ M). Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija propidijum jodidom. Reprezentativni histogram pokazuje izrazit porast broja HL-60 ćelija (72,3%) sa fragmentacijom jedarne DNK (sub- G_0 segment histograma) nakon tretmana.

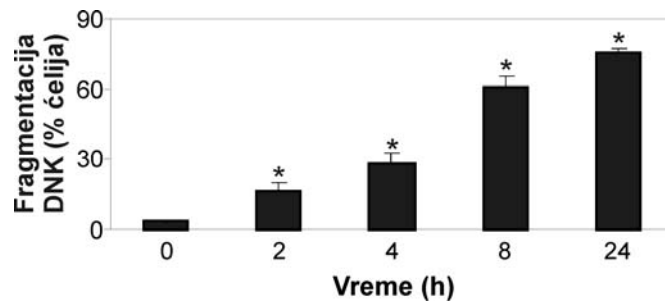
Dodatno, naši eksperimentalni rezultati svedoče o postojanju jasne dozne i vremenske zavisnosti broja ćelija sa fragmentisanom DNK i koncentracije etil-

estra tj. dužine trajanja tretmana. Rezultati ove analize prikazani su na slikama 10 i 11. Uočava se, naime, da i u slučaju ispitivanja dozne zavisnosti kao i u analzi vremenske zavisnosti, postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u procentu ćelija koje nakon tretmana imaju fragmentisanu jedarnu DNK u poređenju sa kontrolnim, netretiranim ćelijama. Tako, broj ćelija sa fragmentisanom DNK raste od $3,1 \pm 0,4\%$ u kontroli, do $65,9 \pm 5,4\%$ u tretmanu sa $50 \mu\text{M}$ etil-estra, nakon dvadesetčetvoročasovne ekspozicije (slika 10).



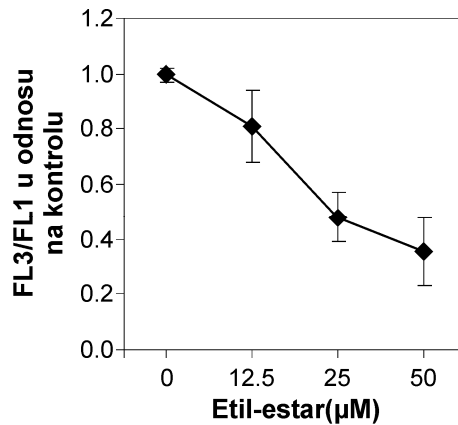
Slika 10. Etil-estar indukuje dozno zavisnu fragmentaciju DNK HL-60 ćelija nakon 24 h (12,5; 25 i $50 \mu\text{M}$). Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija propidijum jodidom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$).

Takođe, dok je u kontroli kod $3,2 \pm 0,7\%$ ćelija došlo do fragmentacije DNK, nakon osmočasovnog tretmana etil-estrom ($50 \mu\text{M}$) čak $61,2 \pm 3,8\%$ ćelija je pokazivalo fragmentaciju jedarne DNK, a njihov broj je rastao do $75,3 \pm 2,0\%$ nakon 24 h ekspozicije (slika 11).



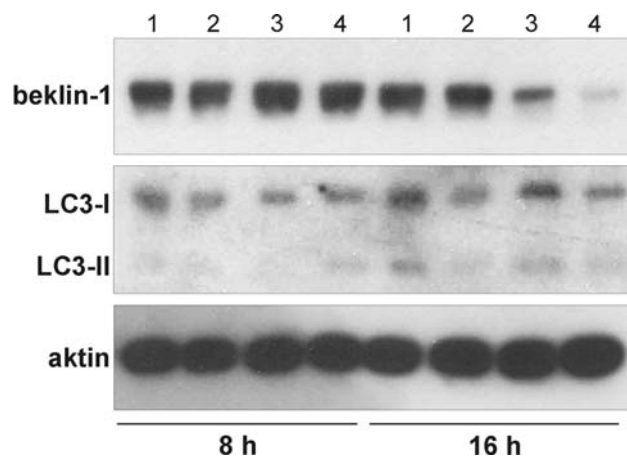
Slika 11. Etil-estar (50 μ M) indukuje vremenski zavisnu fragmentaciju DNK HL-60 ćelija (2, 4, 8 i 24 h). Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija propidijum jodidom. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija iz tri nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$).

Imajući u vidu da pored apoptoze i nekroze i autofagija može da ima ulogu u mehanizmu smrti ćelije, ispitivali smo i mogućnost da etil-estar indukuje autofagiju u HL-60 ćelijama. Autofagija, naime, može da bude ili mehanizam kojim ćelije pokušavaju da se odbrane od štetnih uticaja koji mogu da dovedu oštećenja a zatim i do smrti ćelije, ili pak alternativni mehanizam ćelijske smrti (Maiuri et al., 2007). U našim eksperimentima tretman etil-estrom nije doveo do porasta broja vezikula sa kiselim sadržajem (lizozomi i autolizozomi) u citoplazmi HL-60 ćelija (slika 12) što bi ukazalo na indukciju procesa autofagije u ćeliji.



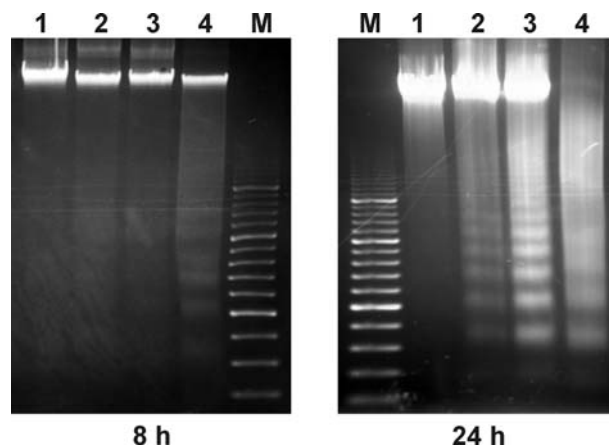
Slika 12. Etil-estar (12,5; 25 i 50 µM) ne dovodi do porasta kiselog sadržaja u citoplazmi HL-60 ćelija nakon dvadesetčetvoročasovnog delovanja. Analiza na protočnom citometru nakon bojenja ćelija akridin oranžom; Uočava se da odnos intenziteta FL3/FL1 fluorescence u tretmanima opada u odnosu na jediničnu vrednost u kontrolnim, netretiranim, ćelijama. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna varijacija iz dva nezavisna eksperimenta.

Takođe, imunoblot analizom je dokazano da tretman HL-60 ćelija različitim koncentracijama etil-estra, u dva vremena (8 h i 16 h), nije doveo do porasta ekspresije proautofagnog proteina beklina-1, kao ni do konverzije LC3-I proteina u LC3-II izoformu ovog proteina specifičnu za autofagozome (slika 13). Naime, beclin-1 je proizvod tumor supresorskog gena BECN/ATG6 čija ekspresija je jedan od osnovnih mehanizama za pokretanje autofagije (Klionsky, 2007). Sa druge strane, konjugacija solubilnog LC3-I proteina sa lipidima, pre svega fosfatidil-etanolaminom, dovodi do njegove konverzije u LC3-II formu koja se ugrađuje u membranu autofagozoma i predstavlja zbog toga specifičan marker autofagije (Maiuri et al, 2007).



Slika 13. Etil-estar ne dovodi do porasta nivoa proautofagnog proteina beklina-1 kao ni LC3-I proteina i autofagozom specifične LC3-II izoforme ovog proteina. Reprezentativna imunoblot analiza nakon 8 h i 16 h ekspozicije delovanju etil-estra (1- kontrola; 2- 12,5 μ M; 3- 25 μ M; 4- 50 μ M).

Činjenica da nekroza i autofagija nemaju značajnu ulogu kao mehanizmi smrti HL-60 ćelija u tretmanu cikloheksil analogom etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, izdvojio je apoptozu kao dominantan mehanizam ćelijske smrti u našim eksperimentima. Kondenzacija hromatina praćena njegovim isecanjem endonukleazama na internukleozomalne fragmente se smatra ključnim markerom apoptoze, jer u potpunosti onemogućava ćelijsku deobu i olakšava kasniju fagocitozu apoptotičnih ćelija (Taylor et al., 2008). U skladu sa tim, elektroforetsko razdvajanje DNK izolovane iz kontrolnih i ćelija tretiranih etil-estrom bilo je konačna potvrda da etil-estar indukuje apoptotsku smrt HL-60 ćelija u našim eksperimentima (slika 14). Uočava se, naime, da već nakon 8 h tretmana dolazi do internukleozomalne fragmentacije jedarne DNK u tretmanu sa 50 μ M etil-estra, dok je nakon 24 h tretmana ona uočljiva i pri znatno nižoj koncentraciji od 12,5 μ M.



Slika 14. Etil-estar indukuje internukleozomalnu fragmentaciju DNK HL-60 ćelija. Reprezentativne fotografije agaroznih gelova nakon elektroforeze izdvojene DNK (DNK *ladder*) posle 8 h i 24 h tretmana etil-estrom (1- netretirane ćelije; 2- 12,5 μM ; 3- 25 μM ; 4- 50 μM ; M je marker i odgovara dužini od 100 kb)

Elektroforeza DNK izolovane iz HL-60 ćelija tretiranih etil-estrom (8 h; 50 μM) pokazuje jasnu internukleozomalnu fragmentaciju jedarne DNK i ukazuje da se događaji u jedru posredovani etil-estrom dešavaju vrlo vrlo brzo po početku tretmana, te da ćelije rano pokazuju fenomen svojstven kasnoj apoptozi (Elmore, 2007). Takođe, nakon 24 h čak 4x niža koncentracija etil-estra (12,5 μM) dovodi do fragmentacije DNK.

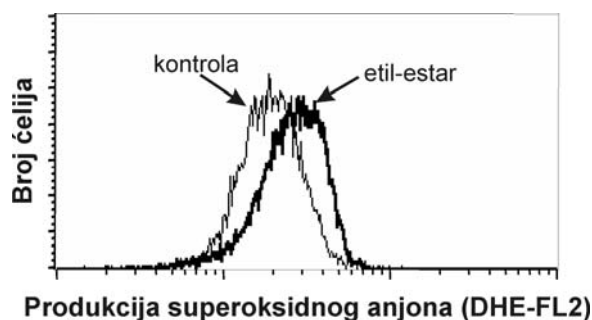
Svi ovi rezultati govore u prilog apoptotskog umiranja HL-60 ćelija u tretmanu sa etil-estrom.

4.3. Etil-estrom posredovana apoptoza je uzrokovana oksidativnim stresom, depolarizacijom unutrašnje membrane mitohondrija i translokacijom AIF iz mitohondrija u jedro

U cilju daljeg ispitivanja molekularnih mehanizama antileukemijskog delovanja cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, određivali smo produkciju superoksidnog anjona i potencijal unutrašnje membrane mitohondrija u njime tretiranim HL-60 ćelijama. Hiperprodukcija

superoksidnog anjona u mitohondrijama dovodi do (videti Uvod) formiranja i otvaranja mitohondrijalne permeabilizacione pore (eng. *mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), posledične depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, i sledstvenog oslobađanja proapoptotskih proteina citohroma C i faktora pokretača apoptoze (AIF) iz međumembranskog prostora u citoplazmu, što pokreće apoptozu koja može biti zavisna od kaspaza ili pak nezavisna od njihove aktivacije (Crompton, 1999; Susin et al., 1999; Elmore 2007).

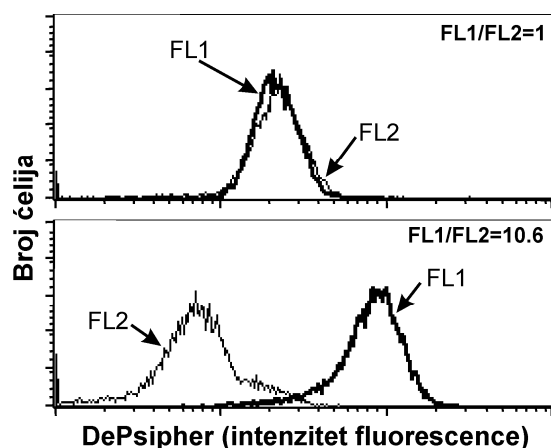
U našim eksperimentima je već nakon 1 h tretmana etil-estrom (50 μ M) došlo do porasta srednjeg intenziteta fluorescence poreklom od DHE (FL2) od 17,9 u kontroli na 22,3 u tretmanu (slika 15). Kako je DHE fluorescentna boja koja se oksiduje pod uticajem superoksidnog anjona, porast intenziteta fluorescence odražava porast produkcije superoksidnog anjona u tretiranim ćelijama. Ovaj porast je uočen kao pomak udesno na uporednom prikazu raspodele intenziteta DHE fluorescence u netretiranim, kontrolnim, i ćelijama tretiranim etil-estrom.



Slika 15. Etil-estar indukuje hiperprodukciju superoksidnog anjona u HL-60 ćelijama. Reprezentativan histogram analize protočnom citometrijom nakon bojenja dehidroetidijumom (DHE). Uočava se porast relativnog intenziteta fluorescence (FL2) od 17,9 u kontroli na 22,3 u tretmanu (1 h; 50 μ M).

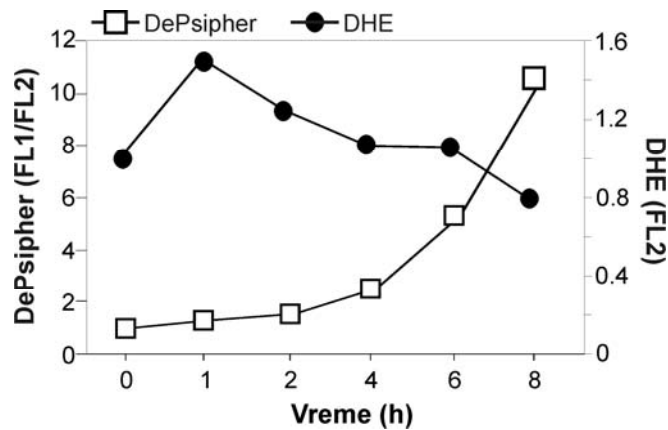
Takođe se na reprezentativnim histogramima (slika 16) može uočiti da etil-estar (50 μ M) dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija.

Naime, dok je odnos intenziteta FL1 i FL2 fluorescenci u netretiranim ćelijama uzet za jediničan, nakon tretmana etil-estrom, intenzitet FL1 fluorescence raste (pomak udesno) dok intenzitet FL2 fluorescence opada, (pomak ulevo) ukazujući da odnos relativnih intenziteta fluorescenci FL1/FL2 u tretmanu raste 10,6 puta (videti Materijal i Metode).



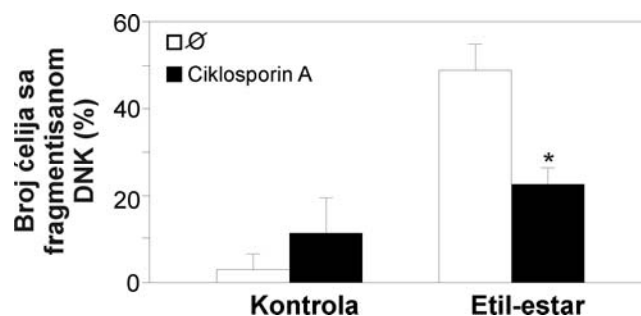
Slika 16. Etil-estar izaziva depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija HL-60 ćelija. Reprezentativan histogram analize protočnom citometrijom nakon specifičnog bojenja (DePshipher). Uočava se porast odnosa relativnih intenziteta fluorescenci (FL1/FL2) od 1 u kontroli na 10,6 u tretmanu (8 h; 50 μ M).

Uporedna analiza vremenske kinetike ova dva događaja, produkcije superoksidnog anjona sa jedne i depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija sa druge strane, pokazala je da maksimum produkcije superoksidnog anjona koji se dešava nakon 1 h tretmana (50 μ M) prethodi depolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija, koja započinje u drugom satu tretmana i raste postepeno dostižući maksimalnu vrednost nakon 8 h tretmana (slika 17).



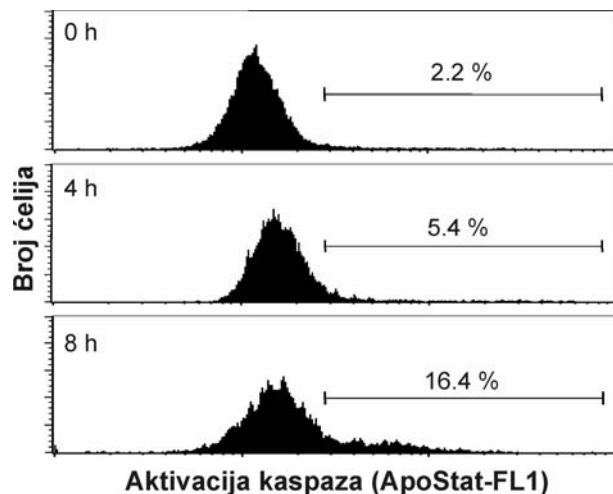
Slika 17. Etil-estrom izazvana hiperprodukcija superoksidnog anjona predhodi depolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija HL-60 ćelija. Dok je maksimalna produkcija superoksidnog anjona 1 h nakon tretmana (50 μ M), depolarizacija započinje nakon 2 h i dostiže maksimum nakon 8 h. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od dva izvedena eksperimenta.

Kako do ulaska AIF-a iz mitohondrija u citosol dolazi preko MPTP pore, primenili smo ciklosporin A (10 μ M), inhibitor formiranja i otvaranja MPTP pore (Loeffler and Kroemer, 2000). U tim uslovima došlo je do značajnog smanjenja etil-estrom (8h; 50 μ M) indukovane fragmentacije DNK (protočna citometrija, PI bojenje) u HL-60 ćelijama ($p < 0,05$) (slika 18). Ovo ukazuje na ulogu depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija u mehanizmu apoptoze HL-60 ćelija pod uticajem etil-estra.



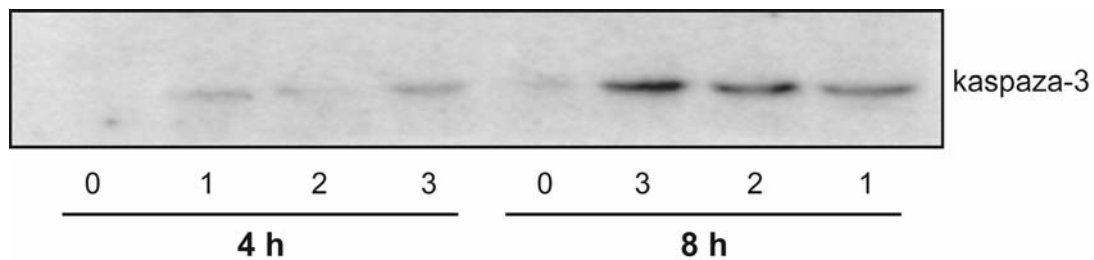
Slika 18. Ciklosporin A sprečava etil-estrom indukovanu fragmentaciju jedarne DNK. Analiza protočnom citometrijom (PI bojenje) po isteku tretmana etil-estrom (8h; 50 μ M) tj. ciklosporinom A (10 μ M). Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija iz dva nezavisna eksperimenta (* $p < 0,05$).

Istovremeno, vremenski zavisna aktivacija kaspaza, inicijatornih i izvršnih enzima apoptotske mašinerije (Philchenkov et al., 2004), primećena je nakon 8 h tretmana etil-estrom (50 μ M), kada je iznosila je 16,4 % u odnosu na 2,2 % u kontrolnim ćelijama (slika 19).



Slika 19. Etil-estrom (4 h i 8 h; 50 μ M) indukovana aktivacija kaspaza u HL-60 ćelijama. Reprezentativni histogrami analize na protočnom citometru nakon ApoStat bojenja. Uočava se vremenski zavisnan skok u aktivnosti kaspaza sa maksimumom aktivnosti nakon 8 h tretmana.

Aktivacija najvažnije egzekutivne kaspaze-3 u tretmanu različitim koncentracijama etil-estra potvrđena je dodatno tehnikom imunoblota, što prikazuje slika 20.

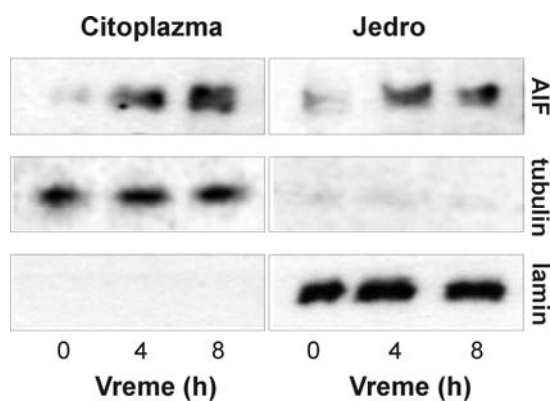


Slika 20. Etil-estar indukuje aktivaciju najvažnije izvršne kaspaze-3. Reprezentativni imunoblot nakon 4 h i 8 h tretmana HL-60 ćelija etil-estrom (0-netretirane ćelije; 1- 12,5 μ M; 2- 25 μ M; 3- 50 μ M). Uočava se dozno i vremenski zavisno povećanje aktivnosti kaspaze-3 u tretmanima.

Međutim, primena pankaspaznog inhibitora zVAD-fmk (20 μ M) nije dovela do smanjenja citotoksičnog efekta etil-estra. Naime, nakon 24 h tretmana etil-estrom (50 μ M) vijabiltet HL-60 je bio $33,5 \pm 7,2\%$, dok je u kombinovanom tretmanu (etil-estar 50 μ M + zVAD-fmk 20 μ M) iznosio $35,1 \pm 6,9\%$ ($p > 0,05$). Uzimajući u obzir da u identičnim eksperimentalnim okolnostima (8 h; 50 μ M) etil-estar dovodi do fragmentacije jedarne DNK (slika 11), ovakav rezultat ukazuje da pokretanje mašinerije kaspazne aktivacije verovatno nema značajniju ulogu u indukciji apoptoze HL-60 ćelija izazvane delovanjem etil-estra.

Činjenica da citotoksično dejstvo etil-estra nije moglo da se spreči inhibicijom kaspaza ukazala je na moguću ulogu proapoptotskih mitohondrijalnih proteina nezavisnih od kaspaza u indukciji smrti leukemijskih ćelija. Naime, iako je kaspaza-3 enzim izvršne faze apoptoze, on nema sposobnost raskidanja fosfodiestarskih veza unutar lanca DNK. Za razliku od kaspaze 3, mitohondrijalni protein AIF može da, u eksperimentalnim uslovima, u izolovanim ćelijskim jedrima, za samo 1 min izazove hidrolizu DNK na fragmente dužine 50 kb. Pritom se fragmentacija jedarne DNK indukovana AIF-om ne može inhibirati pankaspaznim inhibitorom zVAD-fmk (Susin et al., 1999). Naši eksperimentalni rezultati dobijeni tehnikom imunoblota potvrđuju prisustvo AIF-a, mitohondrijalnog međumembranskog flavoproteina (Daugas

et al., 2000), u jedarnoj frakciji HL-60 ćelija (slika 21) tretiranih etil estrom (50 μ M, 4 h i 8 h). Jasno se uočava da pre je početka tretmana ekspresija AIF u citoplazmi i jedru minimalna, a da u tretmanu dolazi do vremenski-zavisnog porasta nivoa AIF-a u jedru i citoplazmi, kao rezultat izlaska AIF-a iz međumembranskog prostora mitohondrija.



Slika 21. Etil-estrar indukuje translokaciju faktora pokretača apoptoze (AIF) iz mitohondrija u jedro. Reprezentativni imunoblotovi identifikuju prisustvo AIF-a u citoplazmi i jedru HL-60 ćelija u tretmanu (4 h i 8 h; 50 μ M). Koncentracija citoplazmatskog proteina tubulina i jedarnog proteina lamina ispitana je u cilju potvrde čistoće izolovanih ćelijskih frakcija.

Ovaj rezultat je u potpunosti u skladu sa rezultatom gel-elektroforeze izdvojene DNK (DNK-ladder; slika 14) i naglašava ulogu AIF-a u internukleozomalnoj fragmentaciji jedarne DNK koja čini osnovu molekularnog mehanizma antileukemijskog dejstva etil-estra.

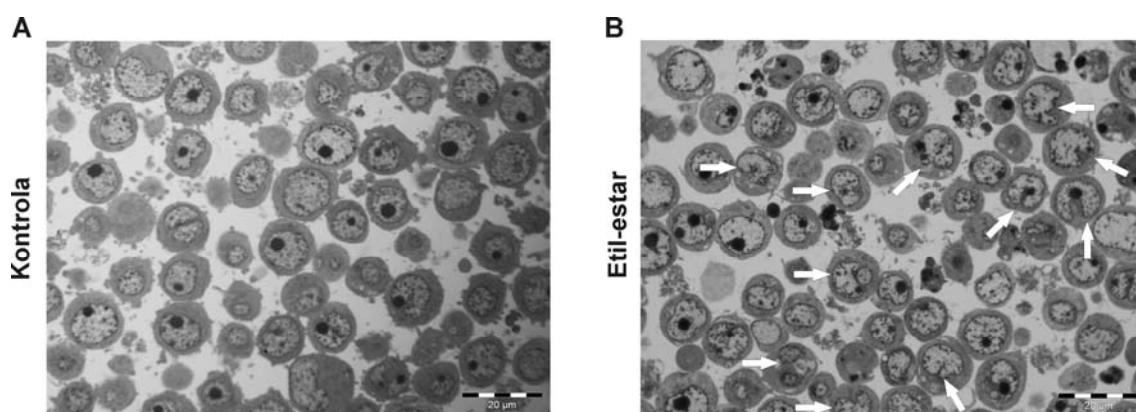
4.4. Etil-estar podstiče diferencijaciju HL-60 ćelija

Pored indukcije smrti leukemijskih ćelija, podsticanje njihove diferencijacije je efikasna strategija implementirana u terapijski protokol za lečenje akutne promijelocitne leukemije all-trans retinoičnom kiselinom (Tallman, 1996; Sanz et al., 2009). Humana promijelocitna leukemijska ćelijska

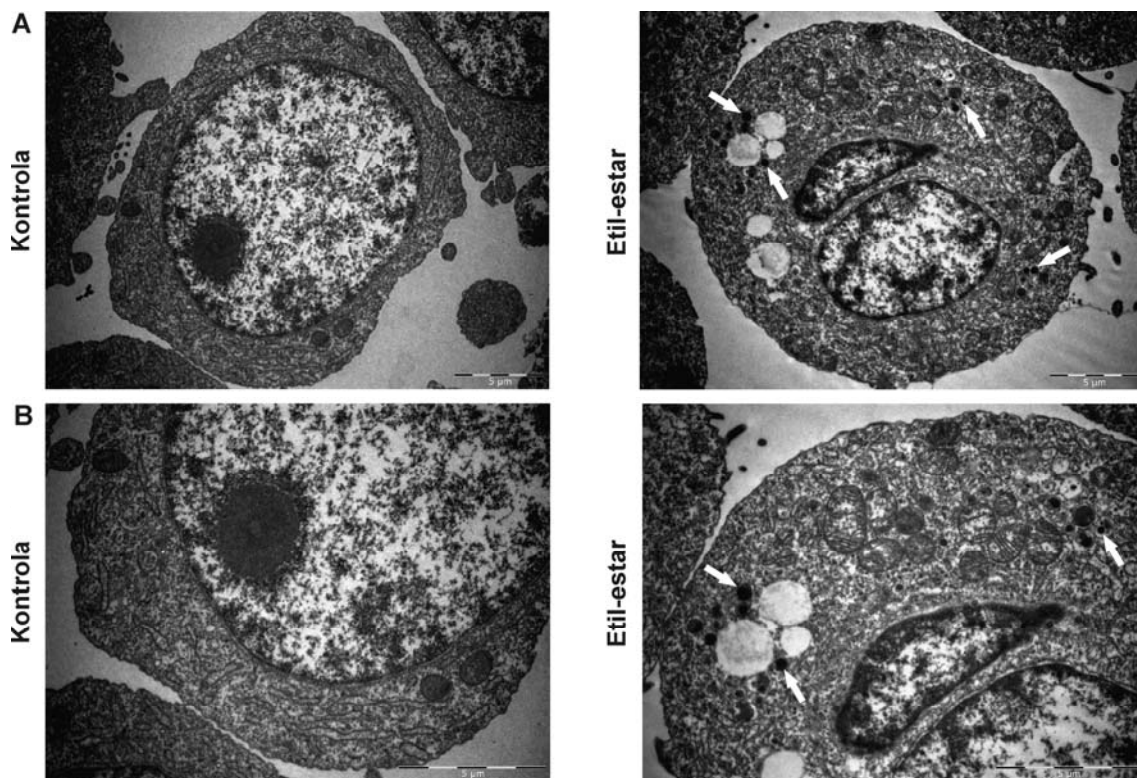
linija HL-60 se u eksperimentalnim uslovima vrlo lako diferentuje *all-trans* retinoičnom kiselinom (Congleton et al., 2011), pa se smatra pogodnim modelom za proučavanje granulocitne diferencijacije.

U skladu sa tim, u ovom segmentu istraživanja, želeli smo da ispitamo da li cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra pored citotoksičnog efekta prema HL-60 ćelijama, može, primenjen u nižim koncentracijama (12,5 μ M), indukovati njihovu diferencijaciju.

Analiza morfoloških promena HL-60 ćelija tretiranih etil-estrom (48 h; 12,5 μ M) svetlosnom (slika 22) i elektronskom mikroskopijom (slika 23), ukazala je na promene u skladu sa diferencijacijom prema granulocitnom fenotipu (Baxter et al., 2009). Naime, na mikrografijama dobijenim svetlosnom mikroskopijom isečaka debljine 1 μ m obojenih toluidin plavim (slika 22), u tretmanu se uočavaju mnogobrojne HL-60 ćelije sa višestrukim ulegnućima na jedru, što odgovara segmentiranom jedru granulocita.



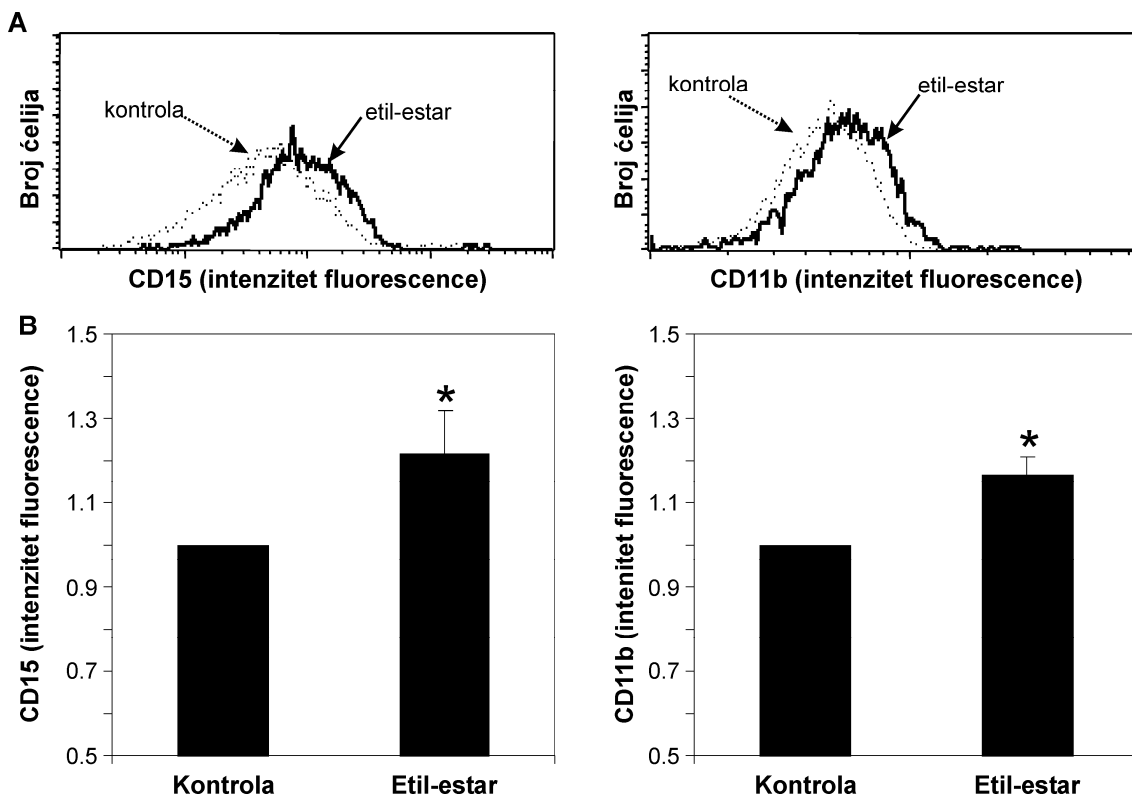
Slika 22. Etil-estar indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija prema granulocitnom fenotipu stimulišući segmentaciju jedra. Reprezentativne mikrografije dobijene svetlosnom mikroskopijom toluidin plavim obojenih 1 μ m isečaka. U tretmanu (48 h; 12,5 μ M) se uočavaju mnogobrojne HL-60 sa impresijama na jedru (označene strelicama) što odgovara 2D prikazu segmentiranog jedra i govori u prilog diferencijacije u granulocitni fenotip.



Slika 23. Etil-estrar indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija utičući na obrazovanje primarnih granula u citoplazmi. (A) Prikaz preseka cele ćelije, (B) Prikaz detalja. Reprezentativne mikrografije dobijene elektronskom mikroskopijom ultratankih isečaka (skala za veličinu 5 μm). U citoplazmi tretiranih (48 h; 12,5 μM) HL-60 ćelija se uočavaju mnogobrojne primarne granule (označene strelicama) što govori u prilog diferencijacije u granulocitni fenotip. Takođe se može primetiti da je jedro tretiranih ćelija segmentirano što se ne uočava u kontrolnim, netretiranim, ćelijama.

Pored morfoloških promena, tretman etil-estrom je doveo i do funkcionalnih promena HL-60 ćelija (slika 24). One su se ogledale u porastu ekspresije markera granulocitne diferencijacije CD15 i CD11b što je potvrđeno metodom protočne citometrije i prikazano histogramima kao porast srednjeg intenziteta odgovarajućih fluorescenci (CD15-FL1; CD11b-FL2) po isteku tretmana, što se na histogramu uočava kao pomak udesno (slika 24A). Takođe, poređenjem intenziteta odgovarajuće fluorescence, koji korelira sa količinom eksprimiranih markera granulocitne diferencijacije na ćelijskoj membrani, sa fluorescencom izmerenom u kontrolnim, netretiranim ćelijama, dobijena je

statistički značajna ($p < 0,05$) razlika za oba ispitivana markera CD15 i CD11b (klika 24B). Ovaj rezultat u funkcionalnom smislu potvrđuje sposobnost etil-estra da stimuliše diferencijaciju HL-60 ćelija u smeru granulocitnog fenotipa.



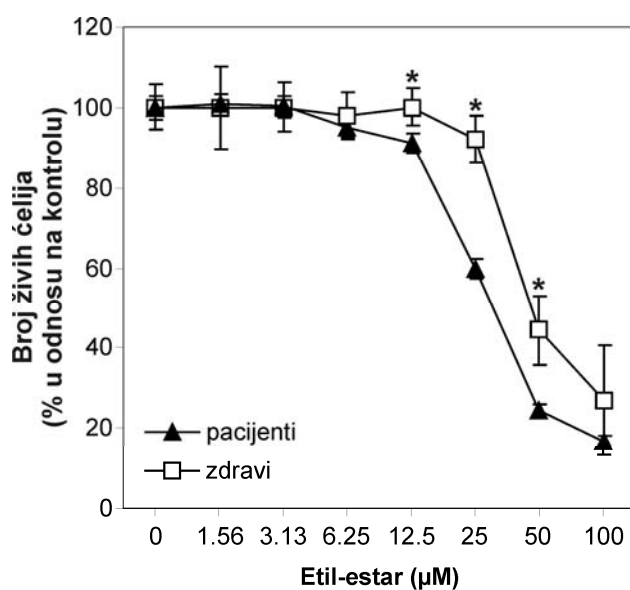
Slika 24. Etil-estrar indukuje diferencijaciju HL-60 ćelija podsticanjem ekspresije CD15 i CD11b markera granulocitne diferencijacije. Reprezentativni histogrami (A) dobijeni su protočnom citometrijom nakon 48 h tretmana ($12,5 \mu\text{M}$). (B) Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija intenziteta fluorescence iz tri nezavisna eksperimenta, a svaki tretman je rađen u triplikatu (* $p < 0,05$).

U zaključku, etil-estar pored izrazitog citotoksičnog dejstva prema HL-60 ćelijama, može, primenjen u dužem vremenskom periodu (48 h) i pri nižim, subtoksičnim, koncentracijama ($12,5 \mu\text{M}$) da indukuje diferencijaciju ovih ćelija u granulocitni fenotip, što verovatno doprinosi efikasnosti njegovog antileukemijskog delovanja.

4.5. Etil-estar indukuje apoptozu leukemijskih ćelija izolovanih iz uzoraka periferne krvi pacijenata obolelih od leukemija

U poslednjem segmentu ovog istraživanja želeli smo da ispitamo selektivnost citotoksičnog delovanja cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, odnosno da uporedimo citotoksično dejstvo prema mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNPK) osoba obolelih od leukemije, u odnosu na ćelije uzete od zdravih dobrovoljaca.

Test aktivnosti kisele fosfataze je ukazao na značajno veću citotoksičnost etil-estra prema MNPK pacijenata sa leukemijama u odnosu na iste ćelije zdravih dobrovoljaca (slika 25).

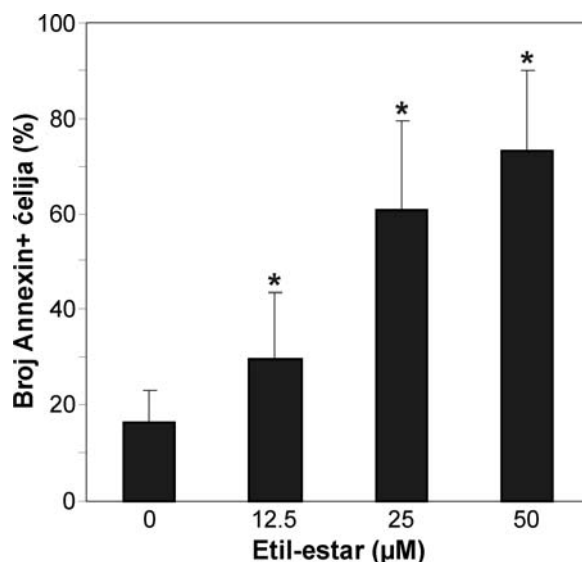


Slika 25. Etil-estar ispoljava veći citotoksičan efekat prema MNPK leukemijskih pacijenata u poređenju sa MNPK zdravih dobrovoljaca. Različite koncentracije etil-estra su korišćene za tretiranje MNPK. Broj živih ćelija je procenjen testom aktivnosti kisele fosfataze. Rezultati su predstavljeni kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija dobijena iz rezultata analize uzoraka 9 pacijenata sa leukemijom i 11 zdravih kontrola (* $p < 0,05$).

Naime, koncentracija etil-estra koja je dovela do redukcije broja živih MNPK na 50% u odnosu na, netretirane, ćelije (IC_{50} vrednost), iznosila je $31,5 \pm$

8,3 μM za MNPK obolelih od leukemija, odnosno $54,7 \pm 23,6 \mu\text{M}$ za MNPK zdravih dobrovoljaca. Poređenjem ovih vrednosti je uočena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u osetljivosti MNPK leukemijskih pacijenata u odnosu na MNPK zdravih u pojedinačnim tretmanima sa 12,5; 25 i 50 μM etil-estra.

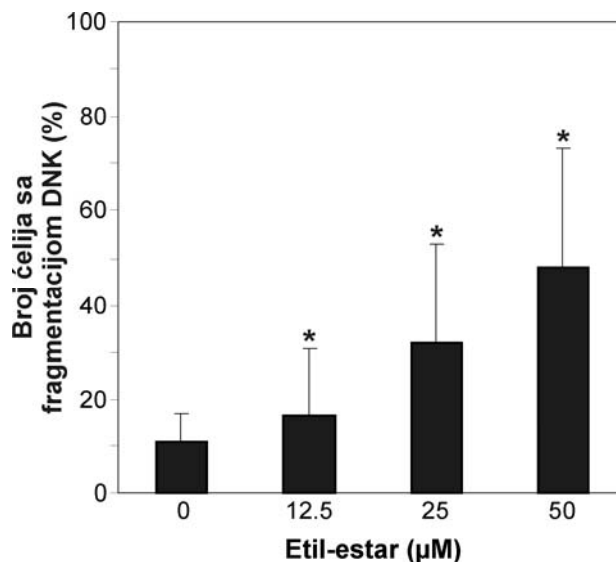
Ispitivanje da li tretman etil-estrom dovodi do promene pokazatelja apoptoze u MNPK je pokazalo da je kod MNPK pacijenata obolelih od leukemija procenat ćelija sa eksternalizacijom fosfatidil-serina rastao sa porastom koncentracije etil-estra i bio statistički značajno veći ($p < 0,05$) u poređenju sa netretiranim leukemijskim ćelijama pacijenata (slika 26).



Slika 26. Etil-estar dovodi do eksternalizacije fosfatidil-serina na MNPK leukemijskih pacijenata (24h; 12,5; 25 i 50 μM). Rezultati su dobijeni analizom na protočnom citometru nakon bojenja sa AnnexinV- FITC i PI. Broj MNPK sa eksternalizacijom fosfatidil-serina (*Annexin+*) pri različitim tretmanima je predstavljen kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija dobijena iz rezultata analize uzoraka 9 pacijenata (* $p < 0,05$).

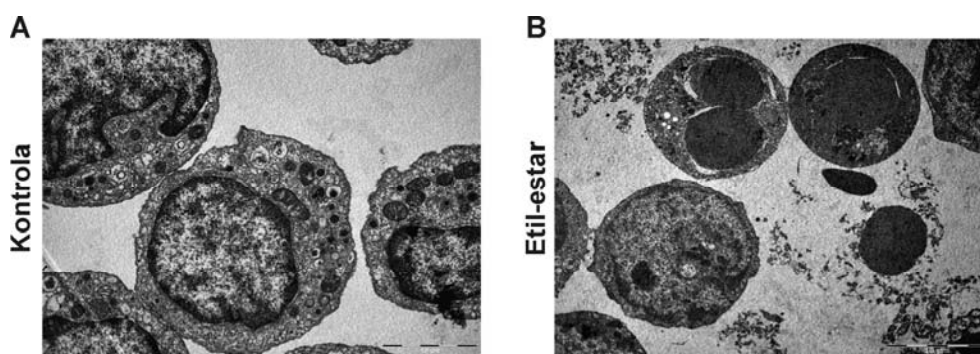
Pored toga, ispitivanje zastupljenosti fragmentacije DNK u tretmanu etil-estrom je pokazalo da je procenat MNPK sa fragmentacijom DNK rastao dozno-zavisno u toku 24-časovnog tretmana različitim koncentracijama etil-

estra, i to povećanje je bilo statistički značajno ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim, netretiranim, MNPK obolelih od leukemija (slika 27).



Slika 27. Etil-estar dovodi do fragmentacije DNK u MNPK leukemijskih pacijenata (24h; 12,5; 25 i 50 μM). Rezultati su dobijeni protočnom citometrijom nakon bojenja sa PI. Predstavljeni su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija broja MNPK sa fragmentacijom DNK, dobijenih analiziranjem podataka za 9 pacijenata (* $p < 0,05$).

Analiza morfologije mononukleara periferne krvi pacijenata sa leukemijom nakon tretmana etil-estrom (24 h; 25 μM) je ukazala na morfološke promene karakteristične za apoptozu. Naime, MNPK obolelih od leukemija su nakon tretmana postajali manji, sferični, sa fragmentisanim jedrom i očuvanom ćelijskom membranom (slika 28B), dok ni jedna od ovih karakteristika nije uočena na kontrolnim, netretiranim MNPK ćelijama pacijenata sa leukemijom (slika 28A).



Slika 28. Etil-estar dovodi do apoptoze MNPK leukemijskih pacijenata (24h; 25 μM). Reprezentativne mikrografije dobijene elektronskom mikroskopijom (skala za veličinu 10 μm). U tretmanu MNPK postaju sferične i smanjuju se, imaju intaktnu ćelijsku membranu i fragmentisano jedro.

Veća osetljivost MNPK leukemijskih pacijenata u odnosu na MNPK zdravih kontrola (slika 25), uz pokazatelje koji ukazuju na apoptozu kao najverovatniji mehanizam citotoksičnog dejstva etil-estra cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline (slike 26, 27 i 28) čini ovo jedinjenje zanimljivim kandidatom za dalja ispitivanja mogućnosti njegove terapijske primene.

5. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da cikloheksil analozi etilendiamindipropanske kiseline imaju dobro antileukemijsko dejstvo. U tom smislu, najefikasniji je bio etil-estar (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline, dok je HL-60 ćelijska linija akutne promijelocitne leukemije bila najosetljivija od svih ispitivanih ćelijskih linija. U osnovi molekularnog mehanizma citotoksičnog dejstva ovog jedinjenja se nalazi hiperprodukcija superoksidnog anjona i sledstveni oksidativni stres, koji dovodi do depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija, otvaranja permeabilizacione pore i translokacije faktora pokretača apoptoze (AIF) iz međumembranskog prostora mitohondrija u jedro. Ovo je za posledicu imalo fragmentaciju jedarne DNK tj. pokretanje apoptotske mašinerije nezavisne od kaspaza. Pored toga, cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, primenjen duže vreme u manjim koncentracijama, indukovao je diferencijaciju HL-60 ćelija prema granulocitnom fenotipu. Dodatno, mononuklearne ćelije izolovane iz uzoraka periferne krvi obolelih od leukemija su bile osetljivije na dejstvo etil-estra od mononuklearnih ćelija zdravih dobrovoljaca. Najverovatniji mehanizam antileukemijskog dejstva cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra je i u ovom slučaju bila apoptoza, na koju su ukazali fragmentacija jedarne DNK, translokacija fosfatidil-serina u spoljašnji sloj lipidnog dvosloja ćelijske membrane i karakteristične morfološke promene ćelija vizuelizovane elektronskom mikroskopijom.

5.1. *Cikloheksil analozi etilendiamindipropanske kiseline su toksični za leukemijske ćelijske linije. Povezanost hemijske strukture ovih jedinjenja i njihove antitumorske efikasnosti*

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su estri (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline u većoj ili manjoj meri toksični za sve ispitivane humane leukemijske ćelijske linije (tabela 1). Leukemijske ćelijske linije na kojima je ovo istraživanje sprovedeno, odabrane su u skladu sa velikom heterogenošću leukemija, u pokušaju da se obuhvati što je moguće veći dijapazon različitih tipova leukemija: hroničnih i akutnih, mijeloidnih i limfatičnih.

Rezultati testa aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze, prikazani na slikama 2, 3 i 4, pokazuju da je na analiziranim humanim leukemijskim ćelijskim linijama, HL-60, KG-1, MOLT-4, REH, JVM-2 i K562, cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra bio najefikasniji, tj. doveo je do najvećeg smanjenja broja živih ćelija. IC₅₀ vrednosti dobijene za etil-estar su bile u opsegu od $10,7 \pm 1,4 \mu\text{M}$ (HL-60 ćelije) do $45,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (REH ćelije). Po redosledu citotoksičnosti, etil-estar su sledili metil-, propil- i butil-estar. Efikasnost butil-estra je bila istog reda veličine kao i ishodnog jedinjenja, etilendiamindipropanske kiseline. U skladu sa tim, redosled citotoksične aktivnosti svih ispitivanih supstanci, može se prikazati kao etil-estar > metil-estar > propil-estar > butil-estar = etilendiamindipropanska kiselina. Sa druge strane, ishodno jedinjenje- (S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanska kiselina, u ispitivanim koncentracijama ($\leq 100 \mu\text{M}$) nije imala citotoksičnu aktivnost ni na jednoj analiziranoj ćelijskoj liniji (tabela 1). Nedostatak citotoksičnosti etilendiamindipropanske kiseline ukazuje da je esterifikacija najverovatnije neophodna za postizanje citotoksičnog efekta. Rezultati, takođe, pokazuju i da ne postoji direktna veza između citotoksičnog potencijala i dužine bočnog alkilnog niza ispitivanih jedinjenja. Naime, porast dužine bočnog alkilnog niza od atoma vodonika, preko metil grupe do etil

grupe je doprineo većem citotoksičnom potencijalu. Dalji porast dužine bočnog ugljovodoničnog niza uvođenjem *n*-propil i *n*-butil grupe uzrokovao je potpuni izostanak citotoksične aktivnosti kod butil-estra ($IC_{50} > 100 \mu M$). Uzimajući u obzir i da je etil-estar imao najveću rastvorljivost u DMSO ($\sim 10 \text{ mg/ml}$ na $25^\circ C$) u poređenju sa ostalim jedinjenjima ($\sim 5\text{-}6 \text{ mg/ml}$ na $35\text{-}45^\circ C$), moguće je pretpostaviti da je veća citotoksičnost etil-estra posledica činjenice da on u vodenom rastvoru obrazuje čestice manjeg prečnika, koje prilikom tretmana ćelija u medijumu imaju srazmerno veći odnos između površine i zapremine, što može imati za posledicu bolje citotoksično delovanje.

Sa druge strane, podaci iz literature su pokazali da su Pt(IV) kompleksi izvedeni iz organskih jedinjenja analiziranih u ovom istraživanju, imali sledeći redosled citotoksične efikasnosti (poređenje IC_{50} vrednosti) na U251 ćelijama glioma: kompleks sa metil-estrom = kompleks sa etil-estrom = kompleks sa propil-estrom > kompleks sa butil-estrom > kompleks sa kiselinom. Uz to, IC_{50} vrednost je i za kompleks sa kiselinom i za samu kiselinu bila $> 100 \mu M$ što je, baš kao i naši eksperimentalni rezultati, potvrdilo da je esterifikacija neophodan preduslov za ispoljavanje citotoksičnog efekta i organske osnove i iz nje izvedenih Pt(IV) kompleksa (Lazić et al., 2010). I u slučaju Pt(IV) kompleksa sa butil-estrom, porast dužine bočnog alkilnog lanca je smanjio njegovu antitumorsku aktivnost, u poređenju sa kompleksima sa metil-, etil- i propil-estrom. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima naših eksperimenata u kojima je butil-estar čak podjednako neefikasan kao i kiselina od koje je izveden. Dodatno, Pt(IV) kompleksi izvedeni iz cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline i njenih estara su imali na ćelijskim linijama humanog glioma (U251), glioma pacova (C6), mišjeg fibrosarkoma (L929) i mišjeg melanoma (B16) čak niže IC_{50} vrednosti od cisplatina, što je bilo posebno izraženo na B16 ćelijskoj liniji. Takođe, *in vitro* ispitivanja antitumorske aktivnosti dva Pt(IV) kompleksa sa bidentatnim dibutil- [PtCl₄(Bu₂eddp)] i dipetil-estrima [PtCl₄(Pe₂eddp)] po tipu *eddp* liganada, na ćelijama fibrosarkoma miša (L929) i humanog glioma (U251), pokazala su da ovi

kompleksi takođe indukuju ćelijsku smrt brže od cisplatina (Kaludjerović et al., 2005b). U našim eksperimentima, etil-estar je nakon 24 h pokazao antileukemijsko delovanje istog reda veličine kao cisplatin, što ima veliki značaj obzirom da se u njegovom sastavu ne nalazi metal tj. platina (Pt), koja se smatra nosiocem citotoksične aktivnosti cisplatina (Wang et al., 2005).

Struktura cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline čiji je molekularni mehanizam antileukemijskog delovanja ispitivan u ovom istraživanju (slika 1), uključuje etilendiaminsku grupu ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) i dva cikloheksilna prstena. Matematičko modelovanje doprinosa uvođenja različitih funkcionalnih grupa u svojstvu liganada organo-metalnih kompleksa ukazalo je, naime, da se etilendiaminska grupa po svom značaju nalazi među pet najznačajnijih funkcionalnih grupa po pozitivnom doprinosu antitumorskoj aktivnosti jedinjenja (Estrada et al., 2000). U tom smislu, aktivnost različitih Pt(II) kompleksa sa etilendiamindiacetatnim ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 2 CH_3COOH) tipom liganada (*edda*) je do danas ispitivana kako *in vitro* tako i *in vivo* (Inagaki et al., 1980; Kageyama et al., 1998; Sabo et al., 2002). Dobijeni rezultati ukazuju da njihova citotoksičnost umnogome zavisi od tipa helacije i vrste liganada koji mogu da disosuju. Takođe, estri etilendiamin-N,N'-di-3-propanske kiseline (H_2eddp) uvođeni su u strukturu liganada Pt(IV) kompleksa pod pretpostavkom da duži alkilni niz kod propanskih liganda, u odnosu na acetatne, može uticati i na povećanje biološke aktivnosti (Sabo et al., 2004). Tako su *eddp* ligandi prvobitno bili korišćeni kao organska komponenta u kompleksima sa kobaltom(III) (Grguric and Sabo, 1999; Kaluđerović and Sabo, 2002; Sabo et al., 2002) da bi zatim bili ispitivani i Pt(IV) kompleksi sa *eddp* ligandima (Kaluđerović et al., 2009) u kombinaciji sa lako disosujućim ligandima hlora, *trans*-[Pt(*eddp*)Cl₂], (Kaluđerović et al., 2002) ili broma, *trans*-[Pt(*eddp*)Br₂] (Sabo et al., 2004). Ovi kompleksi su, nažalost, pokazali vrlo slabu citotoksičnu aktivnost prema ćelijama ovarijalnog karcinoma *in vitro*, u poređenju sa odgovarajućim kompleksima sa *edda* ligandima. Ipak, istraživanja Pt(II) i Pt(IV) kompleksa sa estarskim ligandima *eddp* tipa su pokazala da, u *in*

vitro uslovima, na ćelije humanog adenocarcinoma (HeLa) i mijelogene leukemije (K562) najbolje citotoksično dejstvo imaju tetrahlor-Pt(IV) kompleksi *eddp* tipa koji indukuju apoptozu u ovim ćelijama (Kaludjerović et al., 2005a).

Pored etilendiamin grupe, važna komponena cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline su dve cikloheksil grupe. Cikloheksil grupa ulazi u sastav Pt(II) kompleksa – oksaliplatina i Pt(IV) kompleksa – satraplatina, a njeno uvođenje je verovatno doprinelo poboljšanju efikasnosti i smanjenju toksičnih efekata ovih lekova u poređenju sa cisplatinom (Wheate et al., 2010). U slučaju jedinjenja čiji smo mehanizam molekularnog delovanja ispitivali, uvođenje dve cikloheksil grupe u strukturu je verovatno doprinelo povećanju lipofilnog karaktera i samim tim olakšanom ulasku u ćelije, s obzirom da se Pt(IV) kompleksi izvedeni od ovih jedinjenja (kompleksi sa metil-, etil- i propil-estrom) efikasno preuzimaju u ćelije U251 humanog glioma (Lazić et al., 2010).

Relativno mali broj studija se do danas bavio ispitivanjem antileukemijskog efekta platinskih kompleksa. Tako su, Malinowska i saradnici (2009) ispitivali antineoplastičnu aktivnost novih Pt(II) i Pd(II) kompleksa na L1210 kulturi mišje leukemije, kao i na P388 ćelijskoj liniji limfatične leukemije miša. Dobijeni rezultati su pokazali slabu *in vitro* antineoplastičnu aktivnost, koja je, interesantno, bila praćena dobrom *in vivo* aktivnošću na modelu P388 mišje leukemije. Antileukemijska aktivnost je bila objašnjena *trans* konfiguracijom organskih liganada, hlormetil substituentima, kao i premošćavanjem lanaca DNK nakon ulaska ovih kompleksa u jedro, gde hlormetil substituenti olakšavaju alkilaciju u molekulu DNK na poziciji N7 guanina, koja je meta napada svih Pt kompleksa. S tim u vezi, naša veoma dobra *in vitro* antileukemijska aktivnost još više dobija na značaju posebno ako se uzme u obzir nepostojanje metala u strukturi ispitivanih estara.

Cisplatin, kao ni drugi platinski kompleksi, nije deo standardnih terapijskih protokola za leukemije (Harper, 2011). Međutim, preliminarni rezultati faze 1 kliničkog ispitivanja cisplatina i temozolomida, alkilirajućeg agensa koji se koristi u terapiji tumora CNS-a i melanoma, na pacijentima sa

relapsnom/refraktarnom akutnom leukemijom ukazali su da cisplatin uzrokuje povećanje osetljivosti leukemijskih ćelija prema temozolomidu i da dovodi do redukcije broja blasta (Seiter et al., 2009). Potvrđeno je i da cisplatin dovodi do apoptoze HL-60 ćelija dovodeći do ekspresije novog gena značajnog za apoptozu - BCL2L12 (Floros et al., 2003). Danas se takođe diskutuje i o dobrom sinergističkom antileukemijskom *in vitro* efektu niskih doza cisplatina (1/10 LD₅₀), u kombinaciji sa novim Pt(IV)-nitroksil kompleksom VS118, u odsustvu sinergizma u toksičnim efektima ovih supstanci (Goncharova et al., 2011). Uz to, nov Pt(IV) kompleks sa metil triazol pirimidin ligandom pokazuje čak bolju citotoksičnost *in vitro* na HL-60 humanoj akutnoj promijelocitnoj leukemijskoj ćelijskoj liniji od cisplatina (Łakomska et al., 2011). Sve ovo govori u prilog velikog interesovanja naučnog mnjenja ne samo za pronalaženje boljeg terapijskog rešenja za leukemije već i o porastu interesovanja za upotrebu metalo-kompleksa u tom smislu. Iako inicijalno sintetisan sa ciljem kompleksiranja sa platinom tj. sinteze Pt(IV) kompleksa, cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra ispitivan u ovom istraživanju je pokazao dobro antileukemijsko dejstvo.

5.2. *Etil-estar izaziva apoptozu leukemijskih ćelija*

Rezultati testa aktivnosti unutarćelijskog (citosolnog) enzima laktat dehidrogenaze (LDH), nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama etil-estra (1,56 - 100 μ M) ukazali su da etil-estar, iako izrazito citotoksičan, ne dovodi do značajnog oštećenja ćelijske membrane, što ukazuje na odsustvo značajnijeg stepena nekroze kod HL-60 ćelija (slika 5). Sa druge strane, ispitivanje antitumorskog delovanja odgovarajućeg Pt(IV) kompleksa (izvedenog iz cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra) na ćelijskoj liniji humanog glioma (U251) pokazalo je da ovaj kompleks (5 μ M) pri četvoročasovnom tretmanu dovodi do četvorostrukog povećanja LDH

aktivnosti, dok osmočasovni tretman uzrokuje petostruko povećanje LDH aktivnosti u poređenju sa proapoptotskim lekom cisplatinom (Lazić et al., 2010). Ovaj rezultat ukazuje da, za razliku od etil-estra, njegov odgovarajući Pt(IV) kompleks uzrokuje brzo oštećenje ćelijske membrane gliomskih U251 ćelija (Lazić et al., 2010), što je karakteristika nekroze (Edinger and Thompson, 2004).

Apoptoza, programirana ćelijska smrt, karakteriše se kondenzacijom hromatina sa internukleozomalnom fragmentacijom DNK, kao i prebacivanjem fosfatidil-serina iz unutrašnjeg u spoljašnji sloj dvoslojne ćelijske mebrane, čiji integritet ostaje očuvan (Edinger and Thompson, 2004). Analiza morfoloških promena HL-60 ćelija nakon 8 h tretmana etil-estrom (50 μ M) ukazala je na promene u ćelijskoj morfologiji koje su bile svojstvene apoptozi (White and Cinti, 2004). Naime, elektronske mikrografije su pokazale da su se nakon tretmana HL-60 ćelije smanjile i zaoblile, a nukleusi su bili fragmentisani (slika 6B). Ipak, membrana ćelija je i u tretmanu ostala očuvana, što je bilo u skladu sa rezultatom ispitivanja aktivnosti LDH. Nasuprot tome, pokazano je da odgovarajući Pt(IV) kompleks (24h; 5 μ M) dovodi do povećanja veličine U251 ćelija, koje su pod svetlosnim mikroskopom bile krupne, poligonalne sa velikim vakuolama koje su zauzimale skoro celu citoplazmu (Lazić et al., 2010). Različit karakter morfoloških promena zajedno sa rezultatom LDH testa, ukazuje, na različit mehanizam citotoksičnosti Pt(IV) kompleksa u poređenju sa njegovom organskom komponentom. To potvrđuje i nalaz da su pod uticajem etil-estra (24h, 20 μ M), i ćelije humanog glioma (U251) postajale manje i oblije (Lazić et al., 2010) što je bilo u skladu sa našim rezultatima dobijenim na HL-60 ćelijama.

Analize na protočnom citometru dodatno su potvrdile da etil-estar indukuje apoptozu HL-60 ćelija. Naime, u našim eksperimentima dvadesetčetvoročasovni tretman je doveo do porasta procenta HL-60 ćelija kod kojih je došlo do eksternalizacije fosfatidil-serina (slike 7 i 8), pri čemu je porast bio dozno-zavisan i pri koncentracijama od 25 i 50 μ M etil-estra bio statistički značajno veći (slika 7) u odnosu na kontrolu (netretirane HL-60 ćelije). Takođe, osmočasovni tretman etil-estrom (50 μ M) je uzrokovao fragmentaciju DNK čak

kod 72,3% ćelija (slika 9). Uočili smo, dalje, da procenat ćelija sa fragmentisanom jedarnom DNK zavisi i od primenjene koncentracije etil-estra i od dužine trajanja tretmana (slike 10 i 11). Oba događaja, eksternalizacija fosfatidil-serina i fragmentacija jedarne DNK, su karakteristična za apoptozu (Elmore, 2007). Nasuprot cikloheksil analogu etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, odgovarajući Pt(IV) kompleks je kod U251 ćelija, nakon 18 h (5 μ M), dovodio do zastoja u kontrolnoj tački na prelazu iz S u G₂ fazu ćelijskog ciklusa ne uzrokujući pritom porast u broju ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK (sub-G₀ segment na histogramu) što bi odgovaralo njenoj fragmentaciji (Lazić et al., 2010). Podaci iz literature pokazuju da cisplatin (18 h; 20 μ M), pod istim uslovima, dovodi do bloka u S fazi ćelijskog ciklusa, što nije praćeno fragmentacijom jedarne DNK (Lazić et al., 2010). Iz svega ovoga možemo zaključiti da cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra i njegov odgovarajući Pt(IV) kompleks imaju sasvim različit mehanizam delovanja što se verovatno može pripisati uvođenju metalnog jona tj. platine u strukturu kompleksa.

Zaobilaženje apoptotske mašinerije omogućava duže preživljavanje leukemijskih progenitora, a aktivacija antiapoptotskih članova Bcl-2 familije doprinosi rezistenciji na komercijalne hemioterapeutike (Campos et al., 1993). Činjenica da etil-estar indukuje apoptozu HL-60 ćelija stoga ima izuzetan značaj.

Autofagija predstavlja proces autodigestije unutarćelijskih proteina i organela, koja se obavlja u kiseloj sredini autolizozoma i može se imati ulogu alternativnog puta ćelijske smrti ili pak kompenzatornog mehanizma zaštite od različitih štetnih stimulusa koji ćeliju uvode u apoptozu ili nekrozu (Edinger and Thompson, 2004; Periyasamy-Thandavan et al., 2008; Yang et al., 2008). Tako se poslednjih godina sve više razmatra protektivna uloga autofagije u apoptozi indukovanoj cisplatinom (Harhaji-Trajkovic et al., 2009), a novija istraživanja ukazuju da je u osnovi mehanizma rezistencije ćelija hepatocelularnog karcinoma na oksaliplatin takođe autofagija (Du et al., 2012).

U našim eksperimentima, analiza ćelija protočnom citometrijom, nakon bojenja akridin oranž bojom, je pokazala da nijedan tretman etil-estrom nije doveo do porasta broja vezikula kiselog sadržaja u HL-60 ćelijama (slika 12), koji bi mogao ukazati na prisustvo autofagije. Uz to, imunoblot analiza je pokazala da tretman HL-60 ćelija različitim koncentracijama etil-estra nije doveo do porasta ekspresije proautofagnog proteina beklina-1, koji ima važnu ulogu u formiranju autofagozoma, kao ni do povećanja konverzije LC3-I proteina u LC3-II izoformu ovog proteina, specifičnu za autofagozome (slika 13). Ovi rezultati navode da zaključak da u molekularnom mehanizmu citotoksičnosti etil-estra ne dolazi do indukcije autofagije. Nasuprot tome, u tretmanu cisplatinom (18h; 20 μ M) dolazi do indukcije protektivne autofagije kod U251 ćelija humanog glioma (Lazić et al., 2010). Cisplatin je, naime, kod ovih ćelija indukovao apoptozu, ali su inhibitori autofagije bafilomicin A1 i vortmanin potencirali antitumorsko delovanje cisplatina dovodeći do statistički značajnog smanjenja broja živih ćelija (Lazić et al., 2010). Sa druge strane, Pt(IV) kompleks sa etil-estarskom organskom osnovom, nije indukovao autofagiju u gliomskim ćelijama (U251), i inhibitori autofagije nisu uticali na antigliomski efekat ovog kompleksa (Lazić et al., 2010). Dakle, može se zaključiti da autofagija ne učestvuje u mehanizmu antitumorskog delovanja etil-estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline, kao ni odgovarajućeg Pt(IV) kompleksa.

Jedan od ključnih pokazatelja apoptotske smrti ćelije je kondenzacija hromatina, koja je praćena njegovim isecanjem pod dejstvom endonukleaza, na internukleozomalne fragmente. Ovakve promene u naslednoj osnovi ćelije dovode do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, sprečavanja ćelijske deobe i olakšavaju kasniju fagocitozu apoptotičnih ćelija (Taylor et al., 2008). Fragmenti DNK različitih dužina se mogu razdvojiti elektroforezom na gelu od agaroze, dajući karakterističnu sliku diskontinuiranih fragmenata DNK, tzv. DNK *ladder*. Upotreba markera određene dužine omogućava pri tome procenu dužine izdvojenih DNK fragmenata. Fragmentacija DNK je prisutna i u nekrozi, ali se dešava nasumično, pa fragmenti DNK nisu umnošci fragmenata DNK koji ulazi

u sastav nukleozoma, i nakon elektroforeze daju razmrljane i nejasne elektroforetske trake (Festjens et al., 2006). Rezultati naših eksperimenata ukazuju da već nakon 8 h tretmana etil-estrom (50 μM) dolazi do internukleozomalne fragmentacije DNK HL-60 ćelija (slika 14), koja je inače fenomen svojstven kasnoj fazi apoptoze (Elmore, 2007). Nakon 24 h tretmana različitim koncentracijama etil-estra (12,5; 25 i 50 μM), internukleozomalna fragmentacija je bila uočljiva i pri tretmanu koncentracijom (12,5 μM) koja je bila približno istog reda veličine kao IC_{50} vrednost za etil-estar na humanoj promijelocitnoj leukemijskoj ćelijskoj liniji. Rezultat elektroforeze DNK nedvosmisleno ukazuje da cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra indukuje apoptozu HL-60 ćelija.

5.3. Apoptoza indukovana etil-estrom je udružena sa oksidativnim stresom, depolarizacijom mitohondrija i translokacijom AIF u jedro

Apoptoza je dobro organizovan, energetski zavisian proces, koji uključuje aktivaciju enzima klase cistein proteaza, kaspaza, koje koordinišu kompleksnu kaskadu događaja u ćeliji, što rezultuje njenom smrću (Elmore, 2007). Postoje dva glavna puta pokretanja apoptoze: spoljašnji, preko receptora smrti na ćelijskoj membrani, i unutrašnji tj. mitohondrijalni put (Degterev and Yuan, 2008). Oba puta se susreću u tzv. egzekutivnoj, izvršnoj, fazi koja započinje aktivacijom kaspaze-3 (Adrain and Martin, 2001; Creagh et al., 2003). Ova kaspaza, između ostalog, aktivira tzv. kaspazama-aktiviranu DNA-azu (CAD), koja vrši oligonukleozomalnu fragmenataciju jedarne DNK (Enari et al., 1998) u završnoj fazi apoptoze, koju takođe prati i razgradnja jedarnih i citoskeletnih proteina, formiranje apoptotskih tela i ekspresija različitih markera na ćelijskoj membrani (npr. fosfatidil-serina), koji omogućavaju da fagociti prepoznaju ćelije u apoptozi (Elmore, 2007).

Indukcija oksidativnog stresa je u osnovi antitumorskog delovanja mnogih hemioterapeutika, uključujući i pojedine Pt(IV) komplekse sa *eddp*-tipom liganda (Kaludjerovic et al., 2005b). Takođe, i većina drugih metalo-kompleksa, uključujući i sam cisplatin, dovodi do smrti ćelija oštećujući njihovu naslednu osnovu i pokrećući oksidativni stres praćen disfunkcijom mitohondrija i apoptozom zavisnom od kaspaza (Cullen et al., 2007; Martins et al., 2008; Wheate et al., 2010).

Rezultati naših eksperimenata ukazuju da već nakon jednočasovnog tretmana etil-estrom (50 μ M), u čijoj se strukturi ne nalazi platina, dolazi do hiperprodukcije superoksidnog anjona (slika 15). Ovakav rezultat je bio u skladu sa dobijenim rezultatom hiperprodukcije slobodnih kiseoničnih radikala u U251 ćelijama humanog glioma nakon 3 h tretmana sa 20 μ M koncentracijom etil-estra (Lazić et al., 2010). Sa druge strane, dvostruko niža koncentracija odgovarajućeg Pt(IV) kompleksa, sa etil-estrom u organskoj osnovi, izazvala je mnogostruko veću produkciju slobodnih kiseoničnih radikala u U251 ćelijama u odnosu na sam etil-estar, ali i cisplatin, naglašavajući ulogu oksidativnog stresa u mehanizmu antitumorskog delovanja i etil-estra i njegovog odgovarajućeg Pt(IV) kompleksa (Lazić et al., 2010).

Posebno treba istaći da je hiperprodukcija superoksidnog anjona, u našim eksperimentima, vremenski prethodila depolarizaciji unutrašnje membrane mitohondrija HL-60 ćelija (slika 16), koja je dostizala najviši nivo nakon osmočasovnog tretmana (slika 17).

U *in vitro* uslovima, oksidativni stres, porast koncentracije jona kalcijuma, te niska koncentracija ATP-a uzrokuju otvaranje mitohondrijalne permeabilizacione pore (MPTP), čija je uloga u ćelijskoj smrti poznata više od decenije. Ova pora se, naime, formira od voltažno-zavisnog anjonskog kanala (VDAC), adenin-nukleotid translokaze i ciklofilina D, na mestu kontakta unutrašnje i spoljašnje mitohondrijalne membrane. Njenim otvaranjem proteini iz mitohondrijalnog međumembranskog prostora, kao što su prokaspaze, citohrom C i AIF, napuštaju mitohondrije i učestvuju u pokretanju

programirane ćelijske smrti tj. apoptoze (Crompton, 1999). U našim eksperimentima, primena ciklosporina A, inhibitora formiranja i otvaranja MPTP (Loeffler and Kroemer, 2000), dovela je do značajnog smanjenja broja HL-60 ćelija sa fragmentacijom jedarne DNK u tretmanu (8 h; 50 μ M) etil-estrom (slika 18), potvrđujući značaj mitohondrijalnih događaja u mehanizmu apoptoze HL-60 ćelija pokrenute etil-estrom.

Sa druge strane, aktivnost kaspazne mašinerije (slike 19 i 20) u vremenskoj dinamici se nije podudarala sa promenama koje su se uočavale u jedru tretiranih HL-60 ćelija (fragmentacija DNK). Pored toga primena pankaspaznog inhibitora z-VAD-fmk nije uspela da spreči citotoksični efekat etil-estra. Ovi rezultati navode na zaključak da kaspaze nemaju značajniju ulogu u mehanizmu smrti HL-60 ćelija indukovanom etil-estrom. Slično dobijenim rezultatima, podaci dobijeni na U251 ćelijskoj liniji su pokazali da odgovarajući Pt(IV) kompleks sa etil-estarskom organskom osnovom ne stimuliše pankaspaznu aktivnost i da primena zVAD-fmk, kao i u našim eksperimentima, ne sprečava ćelijsku smrt (Lazić et al., 2010). Dakle, možemo zaključiti da cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline to tipu etil-estra svoje antileukemijsko delovanje ostvaruje stimulacijom hiperprodukcije superoksidnog anjona i sledstvenom depolarizacijom mitohondrija koja dalje pokreće apoptozu. Za razliku od njega, odgovarajući Pt(IV) kompleks, uprkos izazivanju hiperprodukcije slobodnih kiseoničnih radikala, uzrokuje zastoj u ćelijskom ciklusu i ne-apoptotsku smrt gliomskih ćelija koju prati oštećenje ćelijske membrane (Lazić et al., 2010).

Brza vremenska dinamika oksidativnog stresa, depolarizacije unutrašnje membrane mitohondrija i otvaranja MPTP, koji su u osnovi molekularnog mehanizma citotoksičnosti etil-estra prema HL-60 ćelijama, nametnuli su ispitivanje uloge AIF-a u apoptozi ovih ćelija. Naime, ovaj flavoprotein, lokalizovan u međumembranskom prostoru mitohondrija, predstavlja, na molekularnom nivou, direktnu vezu između mitohondrija i jedra u procesu apoptoze koja ne zavisi od kaspaza (Susin et al., 1999; Daugas et al., 2000).

Protein prekursor AIF-a se isecanjem signalne sekvence na amino kraju, koja je signal za upućivanje u mitohondrije, prevodi u zreo protein. Otvaranjem MPTP, funkcionalni AIF dospeva u citoplazmu, a njegov izlazak iz međumembranskog prostora mitohondrija može se sprečiti ciklosporinom A (Susin et al., 1999). U eksperimentalnim uslovima, primena rekombinantnog AIF-a uzrokuje kondenzaciju hromatina i fragmentaciju DNK u izolovanim jedrima, kao i oslobađanje apoptogenih proteina, citohroma C i prokaspaze-9, iz mitohondrija (Susin et al., 1999). Uz to, mikroinjektovanje AIF-a u citoplazmu intaktnih ćelija indukuje kondenzaciju hromatina, narušavanje potencijala unutrašnje membrane mitohondrija tj. njenu depolarizaciju i eksternalizaciju fosfatidil-serina u ćelijskoj membrani. Kaspaza-3, iako spada u enzime izvršne faze apoptoze, nema endonukleaznu sposobnost, a jedino je AIF sposoban da izazove fragmentaciju izolovanih ćelijskih jedara, koja se ne može inhibirati pankaspaznim inhibitorom zVAD-fmk, što čini AIF mitohondrijalnim efektorom apoptotske smrti ćelije (Susin et al., 1999). U našim eksperimentima, nakon liziranja ćelija i razdvajanja subćelijskih frakcija, tehnikom imunoblota smo potvrdili prisustvo AIF-a u nuklearnoj frakciji HL-60 ćelija (slika 21) tretiranih etil-estrom (50 μ M, 4 i 8 h). S obzirom da nakon 8 h tretmana etil-estrom (50 μ M) HL-60 ćelije pokazuju jasnu internukleozomalnu fragmentaciju DNK (slika 14), i da se primenom ciklosporina A smanjuje intenzitet ovog procesa, (slika 18), možemo zaključiti da su promene u jedru HL-60 ćelija u tretmanu etil-estrom posledica translokacije AIF-a iz mitohondrija u jedro.

5.4. *Etil-estar stimuliše diferencijaciju HL-60 ćelija*

Akutna promijelocitna leukemija (APL), je jedan od oblika akutne mijelogene leukemije (Vardiman et al., 2009), u kome čak ~ 95 % obolelih poseduje balansiranu recipročnu translokaciju t(15;17)(q22;q12), koja dovodi do fuzije tumor-supresorskog gena promijelocitne leukemije (PML) i gena za

receptor za retinoičnu kiselinu α (RAR α). Na ovaj način nastaje hibridni protein, PML/RAR α , koji onemogućava normalnu diferencijaciju hematopoeznih progenitora (Lo-Coco and Ammatuna, 2006; Wang and Chen, 2008). Naime, RAR α je član familije inducibilnih transkripcionih faktora, koje reguliše retinoična kiselina (RA) (Lo-Coco and Ammatuna, 2006), i koji u njenom odsustvu gradi heterodimer sa receptorom za retinoid X (RXR), koji potom regrutuje korepresorski kompleks sa histon-deacetilazom (HDAC), što za posledicu ima kondenzaciju hromatina i gensku represiju. U malim koncentracijama (1×10^{-9} M) RA je u stanju da dovede do otpuštanja korepresora sa kompleksa RAR α /RXR i do regrutovanja koaktivatorskog kompleksa sa histon acetil-transferazom (HAT), što za posledicu ima aktivaciju specifičnog promotorskog regiona (RARE) za koji se vezuje RAR α (Dilworth and Chambon, 2000; Glass and Rosenfeld, 2000) i sledstvenu gensku ekspresiju.

Danas se u standardnim terapijskim protokolima za lečenje APL koristi *all-trans*-retinoična kiselina (ATRA), kao agens koji indukuje diferencijaciju leukemijskih ćelija, nakon čega one postaju podložnije dejstvu hemioterapeutika (Sanz et al., 2009; Sassano et al., 2009). Do uvođenja ATRA u terapijski protokol, APL je imala lošu prognozu, zbog ozbiljnih krvarenja i prolongiranog odgovora na primenjene hemioterapeutike, što je dovodilo do smrtnog ishoda u roku od par nedelja (Wang and Chen, 2008).

Humana promijelocitna leukemijska ćelijska linija HL-60 se u eksperimentalnim uslovima često koristi za proučavanje granulocitne diferencijacije koja se, između ostalog, može postići i upotrebom ATRA (Gao et al., 2011; Wu et al., 2011). Naime, gen čija je transkripcija regulisana ATRA-om u HL-60 ćelijama se označava kao Asb-2. Njegov produkt je protein koji učestvuje u formiranju E3 kompleksa ubikvitin ligaze (zajedno sa još nekim proteinima: Cul5, elongin B i C), koji se smatra odgovornim za ATRA-om indukovanu granulocitnu diferencijaciju ovih ćelija (Baxter et al., 2009). Danas se zna i da geni miR-15a i miR-16-1, koji učestvuju u regulaciji apoptoze, ćelijskog ciklusa i hemiosenzitivnosti tumorskih ćelija imaju važnu ulogu u

ATRA-om indukovanoj diferencijaciji leukemiskih ćelija (Gao et al., 2011). U eksperimentalnim uslovima, diferencijacija HL-60 ćelija uz pomoć ATRA se najčešće procenjuje analizom morfologije jedra i merenjem promena u ekspresiji antigena CD11b, CD13 i CD15 na ćelijskoj membrani (Baxter et al., 2009; Oka et al., 2009; Sassano et al., 2009).

U našim eksperimentima, analiza isečaka HL-60 ćelija tretiranih etil-estrom (48 h; 12,5 μ M) (slika 22), koji su obojeni toluidin plavim, pod svetlosnim mikroskopom, ukazala je na promene u skladu sa diferencijacijom ka granulocitnom fenotipu. Naime, nakon tretmana HL-60 ćelije ispoljavaju izraženu segmentiranost jedra, a na elektronskoj mikrografiji ultratankih isečaka mogle su se uočiti i mnogobrojne primarne granule koje su takođe jedan od pokazatelja granulocitne diferencijacije. Osim toga, ekspresija CD15 i CD11b markera granulocitne diferencijacije je bila statistički značajno veća u odnosu na netretirane ćelije (slika 23) ukazujući da etil-estar, primenjen u nižim koncentracijama, u dužem vremenskom intervalu (12,5 μ M; 48 h), indukuje morfološke ali i funkcionalne promene na HL-60 ćelijama koje upućuju na granulocitnu diferencijaciju. Sa druge strane, ATRA (1 μ M) dovodi do statistički značajnog povećanja srednjeg intenziteta fluorescencije za CD11b marker granulocitne diferencijacije na primarnim APL ćelijama i to već nakon 18 h (Cunha De Santis et al., 2007). Uzevši u obzir da u našim eksperimentima do statistički značajnog povećanja ekspresije CD11b markera granulocitne diferencijacije dolazi tek pri produženom tretmanu (48 h), i primenom većih koncentracija etil-estra (12,5 μ M), može se zaključiti da je ATRA, ipak, efikasnija u indukciji diferencijacije od etil-estra ispitivanog u ovom istraživanju.

Činjenica da ispitivani cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra može da dovede i do stimulacije diferencijacije HL-60 ćelija, pored indukcije AIF-om posredovane, apoptoze nezavisne od kaspaza, verovatno doprinosi ukupnom antileukemijskom delovanju ovog jedinjenja.

5.5. Mononuklearne ćelije periferne krvi leukemijskih pacijenata su osetljivije na dejstvo etil-estra od istih ćelija zdravih dobrovoljaca

Dobra antitumorska aktivnost na ćelijskim linijama ne znači nužno i dobru efikasnost na primarnim kulturama maligno transformisanih ćelija dobijenih od pacijenata. Zbog toga smo želeli da aktivnost cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra ispitamo i na kulturama mononuklearnih ćelija dobijenih iz periferne krvi (MNPK) osoba sa leukemijom. U tom smislu, naše istraživanje je obuhvatilo 9 pacijenata sa leukemijom (novo-dijagnostikovanom, hroničnom ili akutnom mijeloidnom leukemijom pre terapije, ili u akutnoj transformaciji mijeloidne hronične leukemije) i 11 zdravih dobrovoljaca koji su bili usklađeni po kriterijumima starosti i pola sa grupom obolelih.

Test aktivnosti kisele fosfataze je ukazao na značajno veću citotoksičnost etil-estra prema MNPK leukemijskih pacijenata u odnosu na ćelije zdravih dobrovoljaca (slika 25). Naime, IC_{50} vrednosti su iznosile $31,5 \pm 8,3 \mu M$ za obolele od leukemija, odnosno $54,7 \pm 23,6 \mu M$ za zdrave dobrovoljce. Istovremeno, kultura humane promijelocitne leukemije (HL-60) bila je najosetljivija na delovanje etil-estra sa IC_{50} vrednošću od $10,7 \pm 1,4 \mu M$ (tabela 1). Dakle, gradacija osetljivosti na dejstvo etil-estra je bila HL-60 > MNPK obolelih od leukemije > MNPK zdravih dobrovoljaca, što je u eksperimentalnom smislu povoljan rezultat, koji ukazuje na relativno dobru selektivnost delovanja cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra.

Naši istraživački rezultati su pokazali i da tretman leukemijskih MNPK etil-estrom dovodi do translokacije fosfatidil-serina u spoljašnji sloj ćelijske membrane (slika 26), fragmentacije jedarne DNK (slika 27) i uzrokuje morfološke promene karakteristične za apoptozu (slika 28). Dakle, cikloheksil analog etilendiamidipropanske kiseline po tipu etil-estra ne samo da indukuje apoptozu HL-60 ćelija i njihovu diferencijaciju u granulocitni fenotip, već

verovatno indukuje isti tip programirane ćelijske smrti u leukemijskim ćelijama dobijenih od pacijenata sa leukemijom.

Nažalost, danas se platinskim metalokompleksima primenjenim u tretmanu maligniteta tkiva različitih od hematopoeznog, pripisuje još jedno ozbiljno neželjeno dejstvo – indukcija leukemije. U prilog tome govore slučajevi pojave mijeloidne leukemije kod pacijentkinja koje su primale platinske analoge u terapiji ovarijalnog karcinoma (Sprance et al., 1992; Shimura et al., 2001). S tim u vezi, rezultati ovog istraživanja dodatno dobijaju na značaju. Naime, estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline čiji je molekularni mehanizam dejstva bio predmet ovog istraživanja nemaju u svom sastavu metal tj. platinu koja se okrivljuje za većinu toksičnih neželjenih efekata Pt kompleksa (Wang et al., 2005). Ipak, ova jedinjenja su se pokazala vrlo efikasnim u *in vitro* indukciji apoptoze ne samo leukemijskih ćelijskih linija već i mononukleara periferne krvi pacijenata obolelih od leukemije, što ih izdvaja kao potencijalne kandidate za dalja ispitivanja, koja za krajnji cilj imaju analizu mogućnosti ulaska ovih jedinjenja u buduća klinička istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja upućuju na sledeće zaključke:

1. Estri cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline su toksični prema humanim leukemijskim ćelijskim linijama. U tom smislu, najizraženije antileukemijsko dejstvo ima cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, dok je na njegovo delovanje najosetljivija humana promijelocitna leukemijska ćelijska linija (HL-60). Hemijska struktura ispitivanih estara utiče na njihovu antileukemijsku efikasnost pa je etil-estar efikasniji od metil-, propil- i butil-estra, kao i od ishodnog jedinjenja etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)propanske kiseline. Povećanje dužine bočnog alkilnog lanca od atoma vodonika do etil grupe je poboljšalo citotoksični potencijal, dok dalje povećanje dužine niza nije doprinelo efikasnosti ovih jedinjenja. Sama kiselina nije imala antileukemijsko dejstvo, pa je esterifikacija verovatno preduslov za ostvarivanje citotoksičnog efekta.
2. Modalitet smrti leukemijskih ćelija u tretmanu sa cikloheksil analogom etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra je apoptoza nezavisna od kaspaza. Molekularni mehanizmi apoptoze leukemijskih ćelija uključuju indukciju oksidativnog stresa usled hiperprodukcije superoksidnih anjona, sa sledstvenom depolarizacijom unutrašnje membrane mitohondrija koju prati translokacija faktora pokretača apoptoze (AIF) iz mitohondrija u jedro i posledična fragmentacija jedarne DNK. Uz to, cikloheksil analog etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra, primenjen u subtoksičnim dozama, stimuliše diferencijaciju HL-60 ćelija.

3. Mononukleari periferne krvi osoba obolelih od leukemija pod uticajem cikloheksil anloga etilendiamindipropanske kiseline po tipu etil-estra umiru najverovatnije apoptozom i osetljiviji su na njegovo delovanje od istih ćelija zdravih dobrovoljaca.

7. LITERATURA:

1. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(6):390-7.
2. Albitar M, Manshouri T, Shen Y, Liu D, Beran M, Kantarjian HM, Rogers A, Jilani I, Lin CW, Pierce S, Freireich EJ, Estey EH. Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". *Blood.* 2002;100(3):791-8.
3. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol.* 2011;18(1):18-25.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983-8.
5. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305-8.
6. Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):1001-12.
7. Baleyrier F, Domenech C, Thomas X. Novel conventional therapies in onco-hemathology. *Bull Cancer.* 2011;98(8):901-13.
8. Baxter SS, Carlson LA, Mayer AM, Hall ML, Fay MJ. Granulocytic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells is associated with increased expression of Cul5. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009;45(5-6):264-74.
9. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-7.
10. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1995;5(1):21-6.
11. Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by Annexin V labeling. *Methods Enzymol.* 2000;322:15-8.

12. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep.* 2003;10(6):1663-82.
13. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem.* 1997;272(42):26159-65.
14. Buick RN, Pollak MN. Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells, and oncogenes. *Cancer Res.* 1984;44(11):4909-18.
15. Buss EC, Ho AD. Leukemia stem cells. *Int J Cancer.* 2011;129(10):2328-36.
16. Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1-2):139-49.
17. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(9):2999-3004.
18. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, Archimbaud E, Magaud JP, Guyotat D. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* 1993;81(11):3091-6.
19. Cashman J, Bockhold K, Hogge DE, Eaves AC, Eaves CJ. Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood. *Br J Haematol.* 1997;98(4):1026-36.
20. Chapman EG, DeRose VJ. Enzymatic processing of platinated RNAs. *J Am Chem Soc.* 2010;132(6):1946-52.
21. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I, Browning JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32401-10.

22. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004;303(5660):1010-4.
23. Choy H, Park C, Yao M. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1633-8.
24. Congleton J, Jiang H, Malavasi F, Lin H, Yen A. ATRA-induced HL-60 myeloid leukemia cell differentiation depends on the CD38 cytosolic tail needed for membrane localization, but CD38 enzymatic activity is unnecessary. *Exp Cell Res*. 2011;317(7):910-9.
25. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647-56.
26. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(7):501-7.
27. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*. 2003;193:10-21.
28. Cripe LD. Adult acute leukemia. *Curr Probl Cancer*. 1997;21(1):1-64.
29. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 2):233-49.
30. Cullen KJ, Yang Z, Schumaker L, Guo Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(1):43-50.
31. Cunha De Santis G, Tamarozzi MB, Sousa RB, Moreno SE, Secco D, Garcia AB, Lima AS, Faccioli LH, Falcão RP, Cunha FQ, Rego EM. Adhesion molecules and Differentiation Syndrome: phenotypic and functional analysis of the effect of ATRA, As₂O₃, phenylbutyrate, and G-CSF in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2007;92(12):1615-22.
32. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*. 2000;476(3):118-23.

33. Davis RE, Greenberg PL. Bcl-2 expression by myeloid precursors in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk Res.* 1998;22(9):767-77.
34. DeAngelo DJ, Stone RM, Heaney ML, Nimer SD, Paquette RL, Klisovic RB, Caligiuri MA, Cooper MR, Lecerf JM, Karol MD, Sheng S, Holford N, Curtin PT, Druker BJ, Heinrich MC. Phase 1 clinical results with tandutinib (MLN518), a novel FLT3 antagonist, in patients with acute myelogenous leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Blood.* 2006;108(12):3674-81.
35. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(5):378-90.
36. Deng R, Yang F, Chang SH, Tang J, Qin J, Feng GK, Ding K, Zhu XF. DC120, a novel and potent inhibitor of AKT kinase, induces tumor cells apoptosis and suppresses tumor growth. *Mol Pharmacol.* 2012. [Epub ahead of print]
37. Dick JE. Stem cells: Self-renewal writ in blood. *Nature.* 2003;423(6937):231-3.
38. Dilworth FJ, Chambon P. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene.* 2000;20:3047-54.
39. Ding ZB, Hui B, Shi YH, Zhou J, Peng YF, Gu CY, Yang H, Shi GM, Ke AW, Wang XY, Song K, Dai Z, Shen YH, Fan J. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6229-38.
40. Drakaki A, Iliopoulos D. MicroRNA gene networks in oncogenesis. *Curr Genomics.* 2009;10(1):35-41.
41. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33-42.

42. Du H, Yang W, Chen L, Shi M, Seewoo V, Wang J, Lin A, Liu Z, Qiu W. Role of autophagy in resistance to oxaliplatin in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012;27(1):143-50.
43. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):663-9.
44. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
45. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 1998;391(6662):43-50.
46. Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood.* 1997;90(1):182-93.
47. Esposti MD. The roles of Bid. *Apoptosis.* 2002;7(5):433-40.
48. Estrada E, Uriarte E, Montero A, Teijeira M, Santana L, De Clercq E. A novel approach for the virtual screening and rational design of anticancer compounds. *J Med Chem.* 2000;43(10):1975-85.
49. Faderl S, Pal A, Bornmann W, Albitar M, Maxwell D, Van Q, Peng Z, Harris D, Liu Z, Hazan-Halevy I, Kantarjian HM, Estrov Z. Kit inhibitor APcK110 induces apoptosis and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Res.* 2009;69(9):3910-7.
50. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR; International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* 2009;10(3):223-32.
51. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators

- and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1371-87.
52. Fiedler W, Mesters R, Tinnefeld H, Loges S, Staib P, Duhrsen U, Flasshove M, Ottmann OG, Jung W, Cavalli F, Kuse R, Thomalla J, Serve H, O'Farrell AM, Jacobs M, Brega NM, Scigalla P, Hossfeld DK, Berdel WE. A phase 2 clinical study of SU5416 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2003;102(8):2763-7.
53. Fiedler W, Serve H, Döhner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM, Bello CL, Allred R, Manning WC, Cherrington JM, Louie SG, Hong W, Brega NM, Massimini G, Scigalla P, Berdel WE, Hossfeld DK. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 2005;105(3):986-93.
54. Filippi AR, Franco P, Marinone C, Tarella C, Ricardi U. Treatment options in skeletal localizations of hairy cell leukemia: a systematic review on the role of radiation therapy. *Am J Hematol*. 2007;82(11):1017-21.
55. Floros KV, Thomadaki H, Lallas G, Katsaros N, Talieri M, Scorilas A. Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:153-8.
56. Fokkema E, Groen HJ, Helder MN, de Vries EG, Meijer C. JM216-, JM118-, and cisplatin-induced cytotoxicity in relation to platinum-DNA adduct formation, glutathione levels and p53 status in human tumour cell lines with different sensitivities to cisplatin. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(11):1989-96.
57. Gao SM, Yang J, Chen C, Zhang S, Xing CY, Li H, Wu J, Jiang L. miR-15a/16-1 enhances retinoic acid-mediated differentiation of leukemic cells and is up-regulated by retinoic acid. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(12):2365-71.

58. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* 2006;13(9):1423-33.
59. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):775-89.
60. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell.* 2002;1(5):417-20.
61. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14:121-41.
62. Goncharova SA, Raevskaia TA, Iakushchenko TN, Blokhina SV, Konovalova NP, Sen' VD. Antileukemic activity and development of resistance to cisplatin (CPT) and platinum (IV)-nitroxyl complex VS118. *Vopr Onkol.* 2011;57(3):355-8.
63. Gozzini A, Santini V. Butyrates and decitabine cooperate to induce histone acetylation and granulocytic maturation of t(8;21) acute myeloid leukemia blasts. *Ann Hematol.* 2005;84 Suppl 1:54-60.
64. Grguric SR, Sabo TJ. Synthesis and characterization of sym-cis- and unsym-cis-(ethylenediamine-N,N'-Di-3-propionato)cobalt(III) complexes with symmetrical N, N'-substituted diamines. *Synth React Inorg Met-Organ Chem.* 1999;29(9):1567-78.
65. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J.* 2002;368(Pt 2):377-96.
66. Grignani F, Valtieri M, Gabbianelli M, Gelmetti V, Botta R, Luchetti L, Masella B, Morsilli O, Pelosi E, Samoggia P, Pelicci PG, Peschle C. PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood.* 2000;96(4):1531-7.

67. Guan Y, Hogge DE. Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML). *Leukemia*. 2000;14(12):2135-41.
68. Guthridge MA, Barry EF, Felquer FA, McClure BJ, Stomski FC, Ramshaw H, Lopez AF. The phosphoserine-585-dependent pathway of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors mediates hematopoietic cell survival through activation of NF-kappaB and induction of bcl-2. *Blood*. 2004;103(3):820-7.
69. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*. 2001;98(8):2301-7.
70. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):5-17.
71. Hall MD, Dolman RC, Hambley TW. Platinum(IV) anticancer complexes. *Met Ions Biol Syst*. 2004;42:297-322.
72. Han LN, Zhou J, Schuringa JJ, Vellenga E. Treatment strategies in acute myeloid leukemia. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(9):1409-21.
73. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
74. Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V, Trajkovic V. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9B):3644-54.
75. Harper ML. *Martindale: The Complete Drug Reference, 37th Edition* (October). *Ann Pharmacother*. 2011. [Epub ahead of print]
76. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62(11):1180-90.
77. Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood*. 2000;96(3):925-32.

78. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(25):15178-83.
79. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
80. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 1984;44(6):2259-65.
81. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J*. 2004;23(10):2134-45.
82. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. 2004;5(7):738-43.
83. Horn S, Bergholz U, Jücker M, McCubrey JA, Trümper L, Stocking C, Bäsecke J. Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene*. 2008;27(29):4096-106.
84. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem*. 1998;273(45):29648-53.
85. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.
86. Inagaki K, Kidani Y, Suzuki K, Tashiro T. Platinum complexes of diamminocarboxylates and their ethyl ester derivatives: antitumor activity and interaction with deoxyribonucleic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1980;28(8):2286-91.
87. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-92.
88. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-54.

89. Kageyama Y, Yamazaki Y, Okuno H. Novel approaches to prodrugs of anticancer diaminodichloroplatinum(II) complexes activated by stereoselective enzymatic ester hydrolysis. *J Inorg Biochem.* 1998;70(1):25-32.
90. Kalimutho M, Minutolo A, Grelli S, Federici G, Bernardini S. Platinum-(IV)-derivative satraplatin induced G(2)/M cell cycle perturbation via p53-p21(waf1/cip1)-independent pathway in human colorectal cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(11):1387-96.
91. Kaluderovic GN, Kommera H, Schwieger S, Paethanom A, Kunze M, Schmidt H, Paschke R, Steinborn D. Synthesis, characterization, in vitro antitumoral investigations and interaction with plasmid pBR322 DNA of R2eddp-platinum(IV) complexes (R = Et, n-Pr). *Dalton Trans.* 2009;(48):10720-6.
92. Kaludjerović GN, Dinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ. Activity of some platinum(II/IV) complexes with O,O-n-butyl-and O,O-n-pentyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoate and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC *J Inorg Biochem.* 2005a;99(2):488-96.
93. Kaludjerović GN, Miljković Dj, Momcilović M, Djinović VM, Mostarica Stojković M, Sabo TJ, Trajković V. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer.* 2005b; 116(3): 479-86.
94. Kaluđerović G, Bogdanović G, Sabo T. Synthesis and crystal structure of trans-dichloro(ethylenediamine--N,N'-DI-3-propionato)Platinum(IV) monohydrate. *J Coordin Chem.* 2002;55(7):817-22.
95. Kaluđerović GN, Sabo TJ. Synthesis and characterization of the cobalt(III) complexes with ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoate ligand and its esters. *Polyhedron.* 2002;21(22):2277-82.
96. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1115-25.

97. Karp JE, Smith BD, Gojo I, Lancet JE, Greer J, Klein M, Morris L, Levis MJ, Gore SD, Wright JJ, Garrett-Mayer E. Phase II trial of tipifarnib as maintenance therapy in first complete remission in adults with acute myelogenous leukemia and poor-risk features. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):3077-82.
98. Kasparikova J, Vojtiskova M, Natile G, Brabec V. Unique properties of DNA interstrand cross-links of antitumor oxaliplatin and the effect of chirality of the carrier ligand. *Chemistry.* 2008;14(4):1330-41.
99. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
100. Kelland LR, Abel G, McKeage MJ, Jones M, Goddard PM, Valenti M, Murrer BA, Harrap KR. Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res.* 1993;53(11):2581-6.
101. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-57.
102. Kim D, Dan HC, Park S, Yang L, Liu Q, Kaneko S, Ning J, He L, Yang H, Sun M, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front Biosci.* 2005;10:975-87.
103. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):931-7.
104. Knapper S, Burnett AK, Littlewood T, Kell WJ, Agrawal S, Chopra R, Clark R, Levis MJ, Small D. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy. *Blood.* 2006;108(10):3262-70.

- 105.Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285(5):1150-4.
- 106.Kroon E, Kros J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J.* 1998;17(13):3714-25.
- 107.Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171(9):4672-9.
- 108.Kwon YE, Whang KJ, Park YJ, Kim KH. Synthesis, characterization and antitumor activity of novel octahedral Pt(IV) complexes. *Bioorg Med Chem.* 2003;11(8):1669-76.
- 109.Łakomska I, Fandzloch M, Wojtczak A, Szłyk E. Platinum(IV) coordination compounds containing 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one as nonleaving ligand. Molecular and cytotoxicity in vitro characterization. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011;79(3):497-501.
- 110.Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-8.
- 111.Laurie SA, Siu LL, Winqvist E, Maksymiuk A, Harnett EL, Walsh W, Tu D, Parulekar WR. A phase 2 study of platinum and gemcitabine in patients with advanced salivary gland cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *Cancer.* 2010;116(2):362-8.
- 112.Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem.* 2010;5(6):881-9.

- 113.Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 2001;412(6842):95-9.
- 114.Liu FT, Newland AC, Jia L. Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):956-62.
- 115.Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
- 116.Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;514:156-61.
- 117.Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*. 2000;256(1):19-26.
- 118.Lordick F, Lubber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Wöll E, Decker T, Endlicher E, Röthling N, Schuster T, Keller G, Fend F, Peschel C. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer*. 2010;102(3):500-5.
- 119.Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst*. 1983;70(1):9-16.
- 120.Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):741-52.
- 121.Malinowska K, Modranka R, Kubiak K, Mrowicka M, Klimczak A, Kedziora J, Rutkowski M. Testing antineoplastic activity of new platinum(II) and palladium(II) complex compounds. *Pol Merkur Lekarski*. 2009;26(151):57-61.
- 122.Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.

123. Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC, Cataland SR, Fisher DB, Lucas D, Chan KK, Porcu P, Lin ZP, Farag SF, Frankel SR, Zwiebel JA, Kraut EH, Balcerzak SP, Bloomfield CD, Grever MR, Caligiuri MA. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood*. 2003;101(2):425-32.
124. Martelli AM, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Cappellini A, Billi AM, Cocco L. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway in the resistance to therapeutic treatments of human leukemias. *Histol Histopathol*. 2005;20(1):239-52.
125. Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol*. 2008;28(3):337-44.
126. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355-70.
127. Mimeault M, Batra SK. New advances on critical implications of tumor- and metastasis-initiating cells in cancer progression, treatment resistance and disease recurrence. *Histol Histopathol*. 2010; 25(8):1057-73
128. Murray V, Whittaker J, McFadyen WD. DNA sequence selectivity of cisplatin analogues in intact human cells. *Chem Biol Interact*. 1998;110(1-2):27-37.
129. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103.
130. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14681-6.

131. Naughton R, Quiney C, Turner SD, Cotter TG. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia*. 2009;23(8):1432-40.
132. Nemes Z Jr, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol*. 1996;70(2):125-33.
133. Norsworthy K, Luznik L, Gojo I. New Treatment Approaches in Acute Myeloid Leukemia: Review of Recent Clinical Studies. *Rev Recent Clin Trials*. 2012. [Epub ahead of print]
134. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*. 2000;288(5468):1053-8.
135. Odenike OM, Alkan S, Sher D, Godwin JE, Huo D, Brandt SJ, Green M, Xie J, Zhang Y, Vesole DH, Stiff P, Wright J, Larson RA, Stock W. Histone deacetylase inhibitor romidepsin has differential activity in core binding factor acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):7095-101.
136. Ohyashiki JH, Sashida G, Tauchi T, Ohyashiki K. Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene*. 2002;21(4):680-7.
137. Oka S, Nagatsuka Y, Kikuchi J, Yokote T, Hirabayashi Y, Hanafusa T, Ozawa K, Muroi K. Preferential expression of phosphatidylglucoside along neutrophil differentiation pathway. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(7):1190-7.
138. Ormerod MG, Orr RM, O'Neill CF, Chwalinski T, Titley JC, Kelland LR, Harrap KR. The cytotoxic action of four ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates: a flow cytometric study. *Br J Cancer*. 1996;74(12):1935-43.
139. Ota T, Takeshima N, Takizawa K. Second-line chemotherapy for carboplatin/paclitaxel-refractory ovarian cancer: are multi-agent chemotherapies of little value truly? *Eur J Gynaecol Oncol*. 2011;32(5):471-5.

140. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Wei Q, Smith R, Yin XM, Dong Z. Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2008;74(5):631-40.
141. Perl AE, Kasner MT, Tsai DE, Vogl DT, Loren AW, Schuster SJ, Porter DL, Stadtmauer EA, Goldstein SC, Frey NV, Nasta SD, Hexner EO, Dierov JK, Swider CR, Bagg A, Gewirtz AM, Carroll M, Luger SM. A phase I study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus and MEC chemotherapy in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2009;15(21):6732-9.
142. Perren TJ, Wiltshaw E, Harper P, Slevin M, Stein R, Tan S, Gore M, Fryatt IJ, Blake PR. A randomised study of carboplatin vs sequential ifosfamide/carboplatin for patients with FIGO stage III epithelial ovarian carcinoma. The London Gynaecologic Oncology Group. *Br J Cancer.* 1993;68(6):1190-4.
143. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(5):545-51.
144. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Exp Oncol.* 2004;26(2):82-97.
145. Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, Rao N, Arowojolu O, Stine A, Shiotsu Y, Shudo A, Akinaga S, Small D, Karp JE, Levis M. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood.* 2009;113(17):3938-46.
146. Puckett CA, Ernst RJ, Barton JK. Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans.* 2010;39(5):1159-70.
147. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4(3):138-44.
148. Raicevic N, Mladenovic A, Perovic M, Harhaji L, Miljkovic D, Trajkovic V. Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology.* 2005;48(5):720-31.

149. Reilly JT. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev.* 2003;17(4):241-8.
150. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(12):1855-65.
151. Rodriguez TE, Stiff PJ. Current treatment results of allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid and lymphoid leukemia. *Curr Hematol Rep.* 2003;2(4):295-301.
152. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969;222(5191):385-6.
153. Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood.* 2005;106(9):3214-22.
154. Rufer N, Brümmendorf TH, Chapuis B, Helg C, Lansdorp PM, Roosnek E. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97(2):575-7.
155. Rufer N, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med.* 1999;190(2):157-67.
156. Rushworth SA, Murray MY, Barrera LN, Heasman SA, Zaitseva L, Macewan DJ. Understanding the role of miRNA in regulating NF- κ B in blood cancer. *Am J Cancer Res.* 2012;2(1):65-74.

- 157.Sabo TJ, Grgurić-Šipka SR, Trifunović SR. Transition metal complexes with edda-type ligands. *Synth React Inorg Met-Org Chem.* 2002;32(9):1661-717.
- 158.Sabo TJ, Kaluderović GN, Poleti D, Karanović L, Boccarelli A, Cannito F, Natile G. Cytotoxicity of some platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N,N'-di-3-propionato ligand. *J Inorg Biochem.* 2004;98(8):1378-84.
- 159.Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23(16):2861-74.
- 160.Safaian NN, Czibere A, Bruns I, Fenk R, Reinecke P, Dienst A, Haas R, Kobbe G. Sorafenib (Nexavar) induces molecular remission and regression of extramedullary disease in a patient with FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2009;33(2):348-50.
- 161.Samimi G, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of JM118, the major metabolite of satraplatin, by copper influx and efflux transporters. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57(6):781-8.
- 162.Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, Naoe T, Lengfelder E, Büchner T, Döhner H, Burnett AK, Lo-Coco F. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2009;113(9):1875-91.
- 163.Sassano A, Lo Iacono M, Antico G, Jordan A, Uddin S, Calogero RA, Plataniias LC. Regulation of leukemic cell differentiation and retinoid-induced gene expression by statins. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(3):615-25.
- 164.Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407(6805):784-8.
- 165.Schilder RJ, LaCreta FP, Perez RP, Johnson SW, Brennan JM, Rogatko A, Nash S, McAleer C, Hamilton TC, Roby D, et al Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812)

- administered on a day 1 and day 8 schedule. *Cancer Res.* 1994;54(3):709-17.
- 166.Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004;64(20):7183-90.
- 167.Seiter K, Katragadda S, Ponce D, Rasul M, Ahmed N. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. *J Hematol Oncol.* 2009;2:21.
- 168.Shimura K, Shimazaki C, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A, Takahashi R, Hirai H, Sumikuma T, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Yasuda J, Nakagawa M. Therapy-related myeloid leukemia following platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. *Rinsho Ketsueki.* 2001;42(2):99-103.
- 169.Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-36.
- 170.Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Stey E, Lowenberg B, Dombret H. Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol.* 2004;22:1087-94.
- 171.Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-8.
- 172.Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutré S, Dahlberg S, Ellison R, Warrell RP Jr. United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Clin Oncol.* 2001;19(18):3852-60.
- 173.Sprance HE, Hempling RE, Piver MS. Leukemia following cisplatin-based chemotherapy for ovarian carcinoma at Roswell Park. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1992;13(2):131-7.

174. St Germain C, Niknejad N, Ma L, Garbuio K, Hai T, Dimitroulakos J. Cisplatin induces cytotoxicity through the mitogen-activated protein kinase pathways and activating transcription factor 3. *Neoplasia*. 2010;12(7):527-38.
175. Stone RM, DeAngelo DJ, Klimek V, Galinsky I, Estey E, Nimer SD, Grandin W, Lebwohl D, Wang Y, Cohen P, Fox EA, Neuberg D, Clark J, Gilliland DG, Griffin JD. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*. 2005;105(1):54-60.
176. Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:98-117.
177. Sue YM, Cheng CF, Chou Y, Chang CC, Lee PS, Juan SH. Ectopic overexpression of haem oxygenase-1 protects kidneys from carboplatin-mediated apoptosis. *Br J Pharmacol*. 2011;162(8):1716-30.
178. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*. 2001;20(17):2122-33.
179. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebbersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441-6.
180. Tallman MS. Differentiating therapy in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(8):1262-8.
181. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.
182. Terpstra W, Ploemacher RE, Prins A, van Lom K, Pouwels K, Wognum AW, Wagemaker G, Löwenberg B, Wielenga JJ. Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood*. 1996;88(6):1944-50.

183. Testa U, Riccioni R, Diverio D, Rossini A, Lo Coco F, Peschle C. Interleukin-3 receptor in acute leukemia. *Leukemia*. 2004;18(2):219-26.
184. Trask C, Silverstone A, Ash CM, Earl H, Irwin C, Bakker A, Tobias JS, Souhami RL. A randomized trial of carboplatin versus iproplatin in untreated advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 1991;9(7):1131-7.
185. Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou SA. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacol Ther*. 2009;122(3):264-80.
186. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 family of apoptosis regulator proteins in acute and chronic leukemias. *Adv Hematol*. 2012;2012:524308.
187. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenameele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*. 2002;9(10):1031-42.
188. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
189. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*. 2002;296(5573):1635-6.
190. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.
191. Wang JM, Lai MZ, Yang-Yen HF. Interleukin-3 stimulation of mcl-1 gene transcription involves activation of the PU.1 transcription factor through a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Mol Cell Biol*. 2003;23(6):1896-909.
192. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008;111(5):2505-15.

193. Wantzin GL, Killmann SA. Nuclear labelling of leukaemic blast cells with tritiated thymidine triphosphate after daunomycin. *Eur J Cancer*. 1977;13(7):647-55.
194. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 2004;23(43):7164-77.
195. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*. 2010;39(35):8113-27.
196. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol*. 2004;285:105-11.
197. Wu Y, Li XF, Yang JH, Liao XY, Huang HF, Chen YZ. Expression pattern of myeloid differentiation-related transcription factor mRNA in differentiation of NB4 and HL-60 cells induced by all-trans retinoic acid. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011;19(4):874-8.
198. Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ, Zhang Y. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer*. 2011;30(7):490-6.
199. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003;102(3):972-80.
200. Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(4):F777-87.
201. Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem*. 1996;241(1):103-8.
202. Yui J, Chiu CP, Lansdorp PM. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*. 1998;91(9):3255-62.
203. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*. 1996;87(4):619-28.

204.Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*
2006;20(1):1-15.

Biografija

Dr Sonja Misirlić Denčić je rođena u Beogradu, aprila 1975. Diplomirala je 2000. na Medicinskom fakultetu u Beogradu sa prosečnom ocenom 9,86. Magistrirala je septembra 2004. pod mentorstvom doc. dr Zorana Redžića sa tezom "Transport prekursora nukleinskih kiselina iz krvi u likvor: studija na modelu epitela horoidnog pleksusa ovce *in vitro*". Specijalistički ispit iz kliničke biohemije je položila sa odlikom, maja 2006.

Na Institutu za medicinsku i kliničku biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu radi od 2002, trenutno u zvanju asistenta i sekretara Katedre za specijalističku nastavu iz kliničke biohemije. Dr Misirlić Denčić je koautor dva priručnika za nastavu biohemije i jednog editorijala u časopisu studenata medicine „Medicinski Podmaladak“. Mentor je većeg broja studentskih radova prezentovanih u zemlji i inostranstvu.

Trenutno je angažovana na dva integrativna projekta (41025 i 45016) pri Ministarstvu prosvete i nauke Republike Srbije. Takođe je 2004-2005 bila istraživač na međunarodnom projektu "Pavle Savić" pri istom Ministarstvu a u saradnji sa Ministarstvom za nauku Francuske.

Dr Misirlić Denčić je bila na jednomesečnom usavršavanju u Londonu, St. Thomas Hospital, Kings College, 2002. radi učenja tehnike uspostavljanja primarne kulture epitelnih ćelija horoidnog pleksusa ovce. Bila je dobitnik stipendije i učesnik na međunarodnom skupu "ICGEB theoretical Course: Mouse Genetics; Models for Human Diseases", Trst, Italija, februar 2011.

U toku poslednjih pet godina, dr Misirlić Denčić je publikovala ukupno šest radova u časopisima indeksiranim u CC/SCI (4), SCI Expanded (1) i Medline (1). Odabrane rezultate prezentovala je u vidu šesnaest izvoda na međunarodnim skupovima i šest izvoda na nacionalnim skupovima.

Dr Misirlić Denčić je udata i majka je dvoje dece.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Sonja Mirsirlić Denčić

Broj upisa _____

Izjavljujem


Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na leukemijske ćelije *in vitro*“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.06.2012



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Sonja Misirlić Denčić.

Broj upisa _____.

Studijski program _____.

Naslov rada „Molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na leukemijske ćelije *in vitro*“.

Mentor: prof. dr Ivanka Marković.

Komentor: prof. dr Tibor Sabo.

Potpisani Sonja Misirlić Denčić.

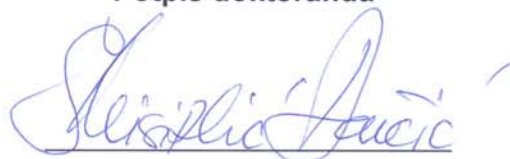
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.06.2012.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Molekularni mehanizmi citotoksičnog dejstva estara cikloheksil analoga etilendiamindipropanske kiseline na leukemijske ćelije *in vitro*“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, _____ 21.06.2012 _____.

Potpis doktoranda

