

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Branka S. Kolundžija

**ISPITIVANJE MEHANIZMA  
ANTITUMORSKOG DELOVANJA  
DERIVATA ANTRAHINONA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Branka S. Kolundžija

***AN IN VITRO* INVESTIGATION OF THE  
MECHANISM OF ANTITUMOR  
ACTIVITY OF ANTHRAQUINONE  
DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

## **MENTORI:**

dr Dušanka Savić-Pavićević  
vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Tatjana Stanojković  
naučni saradnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

## **ČLAN KOMISIJE:**

dr Milan Joksović  
vanredni profesor Instituta za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta  
Univerziteta u Kragujevcu

**Datum odbrane:**

Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja broj 175011, pod nazivom „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“. Ovaj projekat je pod rukovodstvom dr Zorice Juranić, i svi eksperimenti su urađeni u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije. Dizajn i sinteza jedinjenja ispitivanih u ovom radu izvršeni su pod vodstvom dr Milana Joksovića, u Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, u okviru projekta broj 172016.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Tatjani Stanojković, koja se postarala da moj put od samih početaka u nauci do završetka rada na doktorskoj tezi prođe bez problema i što je lepše moguće, i koja je podržavala sve ideje i želje za profesionalnim usavršavanjem koje sam imala u prethodne tri godine (a nije ih bilo malo). Takođe, zahvaljujem se dr Dušanki Savić-Pavićević i dr Milanu Joksoviću na svim pruženim savetima, pomoći i vremenu koje su odvajali prilikom izrade moje doktorske disertacije. Rukovodicu laboratorije, dr Zorici Juranić, želim da izrazim zahvalnost na ukazanoj prilici i podršci koju je pružila.

Svim kolegama iz Laboratorije za modifikatore biološkog odgovora – Ivani, Mariji, Ani, Nađi, Irini, Željku – zahvaljujem na trenucima koje smo proveli zajedno, na svakom trenutku kada mi je neko od vas pružao pomoć kad mi je bila neophodna, na svakoj zajedničkoj kafi koju smo popili da bismo ostali budni, i svim vašim hemijskim olovkama i upaljačima koji su (sasvim slučajno, naravno) završili kod mene. Ova izjava zahvalnosti ne bi bila moguća bez posebnog isticanja naše drage tehničarke Tanje – laboratorijske „mame“- koja me je naučila kako se radi u laboratoriji, koja je uvek znala gde se šta nalazi, i kojoj nikad nije bilo teško da pomogne u svemu što mi je trebalo. Tanja, hvala ti!

Svim mojim prijateljima i porodici, koji su imali strpljenja da satima slušaju o mojoj disertaciji, pogotovo u poslednjih nekoliko meseci, hvala vam i nadoknadicu vam sve to!

# **Ispitivanje mehanizma antitumorskog delovanja derivata antrahinona *in vitro***

## **Rezime**

Prirodni antrahinoni, važna klasa hinonskih jedinjenja, se mogu naći u velikom broju viših biljaka, mahovinama, lišajevima kao i drugim organizmima. Ova hinolna jedinjenja poseduju laksativno, antibiotičko, antiinflamatorno i antipiretičko kao i antiviralno dejstvo, a njihov potencijal u tretmanu kancera, i inhibiciji proliferacije i metastaziranja malignih ćelija ih čini jednom od najzanimljivijih grupa jedinjenja u razvoju novih terapeutika. Njihov mehanizam dejstva podrazumeva učešće u metaboličkim procesima, oksidativnoj fosforilaciji, interkalaciji u DNK i RNK molekule, inhibiciju telomerase i topoizomerase II. Najpoznatija podgrupa ove klase jedinjenja su antraciklini, antrahinonski antibiotici. Antraciklini kao što su doksorubicin i daunorubicin imaju izuzetno široku primenu u terapiji kancera, mada su izuzetno kardiotoksični.

Tiosemikarbazoni predstavljaju grupu iminskih derivata koji sadrže atom sumpora u svom molekulu, i odlikuje ih izuzetna sposobnost helacije jona metala. Odlikuje ih antiviralno, antibakterijsko, antifungalno, kao i citotoksično i antiproliferativno dejstvo.

Halkoni su prekursori flavonoida i izoflavonoida, grupa jedinjenja sa velikim terapijskim potencijalom, i prisutni su u prirodnim izvorima kao što su voće, začinsko bilje i čajevi. Za njih je utvrđeno da poseduju antioksidativni, antibakterijski, antimalarijski, antiviralni, antihiperглиkemijski i antitumorski efekat.

Cilj ovog projekta je ispitivanje grupe od trinaest novosintetisanih derivata antrahinona, i analiza njihovih molekularnih mehanizama. Ova jedinjenja su dizajnirana sa ciljem da im se poboljša aktivnost i specifičnost u odnosu na prirodne derivate koji su trenutno u upotrebi. Devet jedinjenja ove grupe predstavljaju antrahinonske tiosemikarbazone, dok su četiri halkonski antrahinoni.

Prvi korak u istraživanju je predstavljalo određivanje potencijalnog antitumorskog dejstva derivata antrahinona prema sedam malignih ćelijskih linija poreklom iz različitih

tipova kancera. Selektivnost u nivou toksičnog dejstva određena je uz pomoć eksperimenata na uspostavljenoj liniji normalnih humanih ćelija.

Dalje istraživanje se fokusiralo na rasvetljavanje molekularnih mehanizama delovanja ispitivanih supstanci. Morfološke promene na tretiranim ćelijama su posmatrane primenom fluorescentnog mikroskopa, uz pomoć akridin oranž/etidijum bromid smeše, i na ovaj način se određivao i tip ćelijske smrti (apoptoza i/ili nekroza) koju indukuju ova jedinjenja. Analizirana je distribucija malignih i normalnih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana ispitivanim supstancama uz pomoć protočne citometrije, određivane su ciljne kaspaze preko kojih ispitivana jedinjenja ostvaruju apoptotski efekat, a utvrđen je i antimetastatski potencijal ovih jedinjenja, odnosno da li antrahinonski derivati inhibiraju matriksne metaloproteinaze, korišćenjem želatinske zimografije. Anti-angiogenetski potencijal i anti-invazivni potencijal ispitivanih jedinjenja je bio određen uz pomoć *Tube formation assay* i *Wound-healing assay*.

Ispitivana grupa novosintetisanih derivata antrahinona pokazuje izuzetno dobro citotoksično, kao i antiproliferativno dejstvo prema malignim ćelijskim linijama, a ova jedinjenja su se pokazala i kao selektivna u odnosu na normalne transformisane ćelijske linije. Najveću citotoksičnost ova grupa jedinjenja ispoljava prema malignoj ćelijskoj liniji poreklom od mijeloidne leukemije, a najrezistentnije su ćelije izolovane iz metastatskih mesta poreklom od kancera dojke. Samo jedinjenje sa heksil grupom kao bočnim lancem pokazuje izuzetno dobro dejstvo prema ovoj ćelijskoj liniji. Mehanizam dejstva antrahinonskih halkona podrazumeva indukciju G2/M zastoja u ćelijskom ciklusu tretiranih ćelija, a pokazano je da sva ispitivana jedinjenja izazivaju apoptozu u malignim ćelijama *in vitro*.

Takođe, ispitivana jedinjenja su pokazala izuzetan potencijal sprečavanja metastaze, neoangiogeneze, kao i inhibitorno dejstvo na potencijal migracije tretiranih malignih ćelija.

Ova istraživanja su pokazala da članovi grupe antrahinonskih halkona predstavljaju veoma dobre kandidate za dalji razvoj i *in vivo* ispitivanja ovih jedinjenja u terapijske svrhe, dok se iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona posebno ističu jedinjenja 1 i 3, sa fenil i heksil supstituentima.

Dobijeni rezultati pružaju osnovu za dalja istraživanja ovih grupa jedinjenja kao potencijalnih hemoterapeutika sa veoma izraženim citotoksičnim, antimetastatskim kao i antineoangiogenetskim svojstvima.

**Ključne reči:** antrahinoni, tiosemikarbazoni, halkoni, maligne ćelije, citotoksičnost, invazivnost, angiogeneza, *in vitro*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Eksperimentalna onkologija

**UDK broj:** 615.015.11/.015.12 (043.3)

# **An *in vitro* investigation of the mechanism of antitumor activity of anthraquinone derivatives**

## **Summary**

Naturally occurring anthraquinones, an important class of quinone compounds, are numerous in plants, moss, lichen and other organisms. These quinone compounds possess laxative, antibiotic, antiinflammatory, antipyretic and antiviral properties, and their potential for cancer treatment and inhibition of proliferation and metastasis of malignant cells is what makes them one of the most interesting classes of compounds in cancer drug development field. Their mechanism of action includes involvement in the metabolic processes, oxidative phosphorylation, DNA and RNA intercalation and inhibition of telomerase and topoisomerase II. The most well-known compounds belonging to this class are anthracyclines, anthraquinone antibiotics. Anthracyclines, such as doxorubicin and daunorubicin, are widely used in treatment of cancer, even though they are highly cardiotoxic.

Thiosemicarbazones are a class of imine derivatives which possess in their molecule an atom of sulfur. They are characterized by an exceptional ability to chelate metal ions. They have antiviral, antibacterial, antifungal and cytotoxic and antiproliferative activities.

Chalcones are flavonoid and isoflavonoid precursors, a class of compounds with a significant therapeutic potential, and they can be found in natural sources like fruit, herbs and teas. It was previously determined that they can have anti-oxidative, antibacterial, antimalarial, antiviral, antihyperglycemic and antitumor effects.

The aim of this research is to investigate a group of thirteen newly synthesized anthraquinone derivatives, and to analyze their mechanisms of action. These compounds were designed in a way that aims for increased activity and specificity compared to the currently used natural derivatives. Nine of the thirteen compounds are anthraquinone-thiosemicarbazone derivatives, and another four belong to the subgroup of anthraquinone-chalcones.



First step in this research was to determine potential for antitumor activity of the tested anthraquinone derivatives on seven malignant cell lines, originated from different cancer types. Selectivity in levels of cytotoxicity was determined using an established line of normal human cells.

Further research was focused on determination of the molecular mechanisms of action of the investigated compounds. Changes in cell morphology after treatment with the compounds were followed using fluorescence microscopy and ethidium bromide double staining, and this helped to determine the cell death type (apoptosis and/or necrosis), that is induced by these compounds. The effects of the investigated compounds on cell cycle distribution of malignant and normal cells were determined using flow cytometry, which was also used to determine the activity of caspase-3, -8 and -9 in the treated cells. Antimetastatic potential, i.e. the potential to inhibit matrix metalloproteinases, of the investigated compounds was investigated using gelatin zymography. Antiangiogenic and anti/invasive potential of anthraquinone derivatives was determined using Tube formation assay and Wound-healing assay.

The investigated group of novel anthraquinone derivatives shows very good cytotoxic and antiproliferative activity toward malignant cell lines, but these compounds also show significant selectivity compared to normal transformed cell lines. The most sensitive cell line is malignant cell line originated from erythroleukemia, and the most resistant cells were isolated from brain metastasis of breast cancer. The only compound that had a significant effect on this cell line is a compound with hexyl group as a side chain in the molecule. Mechanism of action of anthraquinones with chalcone substituents includes inducement of G2/M arrest in the treated cells, and it was shown that all tested compounds induce apoptosis in the malignant cells *in vitro*.

Moreover, the investigated compounds demonstrated a significant effect on inhibition of metastasis and neoangiogenesis, and also inhibitory effects on migratory potential of the treated malignant cells.

This research showed that compounds that belong to the group of chalcone substituted anthraquinones represent very good candidates for further development and in

vivo investigations of these compounds for use in therapy, while in the anthraquinone-thiosemicarbazone group, compounds 1 and 3, containing phenyl and hexyl moieties, respectively, are particularly noteworthy.

The obtained results provide the basis for further investigations of these classes of compounds as potential therapeutics with a pronounced cytotoxic, antimetastatic and antineoangiogenic properties.

**Key words:** anthraquinones, thiosemicarbazones, chalcones, malignant cells, cytotoxicity, invasiveness, angiogenesis, in vitro

**Scientific Field:** Biology

**Scientific Topic:** Experimental Oncology

**UDC Number:** 615.015.11/.015.12 (043.3)

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kancer – opšti pregled .....	1
1.2. Razvoj antitumorskih lekova.....	6
1.2.1. Citotoksični hemoterapeutici .....	7
1.2.2. Hormonska terapija .....	10
1.2.3. Ciljana terapija .....	13
1.2.4. Problemi u razvoju antitumorskih lekova.....	16
1.3. Antrahinoni.....	18
1.3.1. Antraciklini – daunorubicin i doksorubicin.....	21
1.3.2. Mehanizmi dejstva antraciklina .....	22
1.3.3. Kardiotoksičnost antraciklina .....	24
1.3.4. Rezistencija na antraciklinsku terapiju.....	26
1.4. Tiosemikarbazoni .....	28
1.5. Halkoni.....	30
<b>2. Ciljevi istraživanja</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Materijal i metode</b> .....	<b>34</b>
3.1. Ispitivani derivati antrahinona.....	34
3.2. Čelijske kulture korišćene u eksperimentima.....	39
3.3. Održavanje i pasažiranje čelijskih kultura .....	41
3.4. Priprema ispitivanih supstanci.....	41
3.5. Određivanje stepena preživljavanja ćelija – MTT test .....	42
3.6. Morfološka analiza čelijske smrti.....	43

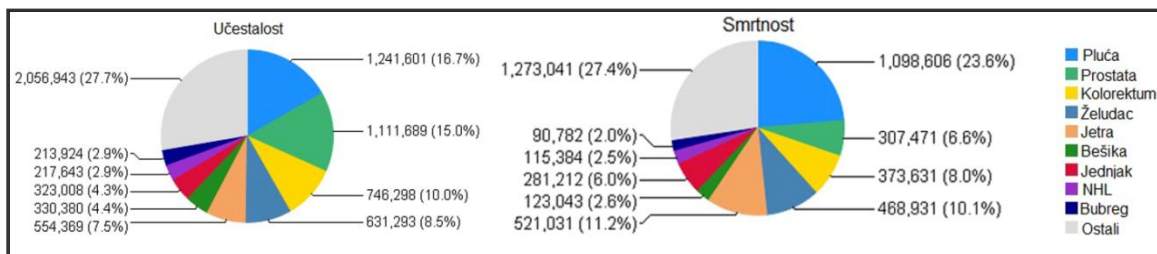
3.7. Analiza faza ćelijskog ciklusa .....	44
3.8. Određivanje ciljnih kaspaza .....	45
3.9. Želatinska zimografija .....	46
3.10. <i>Tube formation assay</i> .....	48
3.11. <i>Scratch (Wound-healing) Assay</i> .....	49
<b>4. Rezultati</b> .....	<b>51</b>
4.1. Određivanje stepena preživljavanja ćelija.....	51
4.1.1. MTT test .....	51
4.1.2. Koeficijent selektivnosti.....	58
4.2. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti .....	60
4.3. Analiza faza ćelijskog ciklusa .....	65
4.4. Određivanje ciljnih kaspaza .....	73
4.5. Želatinska zimografija .....	75
4.6. In vitro esej angiogeneze - <i>Tube formation assay</i> .....	77
4.7. <i>Wound healing assay</i> .....	79
<b>5. Diskusija</b> .....	<b>84</b>
<b>6. Zaključak</b> .....	<b>102</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>104</b>

## 1. Uvod

### 1.1. Kancer – opšti pregled

Kancer predstavlja grupu bolesti za koju su karakteristične nekontrolisane deobe ćelije u određenom delu organizma. Ova grupa bolesti je jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu, i prema podacima Svetske zdravstvene organizacije, samo u 2012. godini je od različitih tipova kancera umrlo 8,2 miliona ljudi, pri čemu je registrovano 14,1 miliona novih slučajeva kancera (GLOBOCAN, 2012). Prema ovoj studiji, globalno su najučestaliji tipovi kancera rak pluća i rak prostate kod muškaraca, kao i rak dojke kod žena (Slika 1.1.).

Smatra se da je najmanje 30% slučajeva kancera moguće sprečiti izbegavanjem određenih faktora rizika, među kojima je najznačajniji upotreba duvana (Peto et al., 1994). Neki od značajnih faktora rizika su takođe i gojaznost, za koju se smatra da je uzrok 15% kancera jednjaka, debelog creva, kancera bubrega kao i materice. Takođe, nezavisno od gojaznosti, nedostatak ili smanjena fizička aktivnost može uticati na pojavu raka dojke i kolona (Colditz et al., 2012). Drugi uzroci mogu uključivati različite infektivne agense (HPV – humani papiloma virus, *Helicobacter pylori*, virus hepatitisa B i C), upotrebu alkohola, različitih hormonskih preparata, i izloženost kancerogenim supstancama (Colditz et al., 2006).



**Slika 1.1.** Učestalost i smrtnost od različitih tipova kancera u svetu (Preuzeto sa izmenama iz GLOBOCAN 2012)

## *Uvod*

---

U svojim veoma uticajnim radovima iz 2000. a zatim iz 2011. godine, Hanahan i Weinberg navode skup karakteristika koje su zajedničke za sve maligne ćelije, i koje omogućavaju ćelijama kancera opstanak, rast i rasejavanje po organizmu (Hanahan i Weinberg, 2000; Hanahan i Weinberg 2011). U osnovi pojave ovih osobina malignih ćelija stoje genomska nestabilnost date ćelije koja omogućava nastanak različitih tipova mutacija, kao i inflamacija premalignih i malignih lezija, pri čemu neke od karakteristika inflamacije omogućuju ili pomažu nastanak ili propagaciju kancera.

Jedna od osnovnih karakteristika malignih ćelija je njihova sposobnost proliferacije, odnosno sticanje neograničenog replikativnog potencijala, što se još naziva i imortalizacija. Takođe, uz ovu karakteristiku treba dodati da maligne ćelije odlikuje i smanjivanje ili gubitak diferencijacije, odnosno gubljenje fenotipskih odlika tkiva iz kog su potekle, i ovo predstavlja primarnu razliku između malignih i benignih tumora (Floor et al., 2012). Ovaj proces je zasnovan pre svega na izbegavanju dve ključne prepreke neograničenoj proliferaciji, senescencije i apoptoze, kao i promenama u mašineriji koja reguliše progresiju ćelije kroz ćelijski ciklus, i to pre svega G0-G1 tranziciju ili tranziciju iz G1 faze u S fazu ćelijskog ciklusa (Deshpande et al., 2005). Različite mutacione inaktivacije tumor supresora, pre svega p53 i Rb gena, su jedan od osnovnih načina izbegavanja apoptoze malignih ćelija.

Nakon što maligne ćelije steknu sposobnost neograničene proliferacije i izbegavanja apoptoze, potrebno je da sve ćelije tumora imaju mogućnost pristupa dovoljnim količinama nutrijenata i kiseonika, da bi opstale i održale veliku sposobnost proliferacije. Takođe, moraju biti sposobne da odstrane i štetne supstance nastale u metaboličkim procesima, kao i ugljen dioksid. Da bi ovo bilo moguće, maligne ćelije moraju razviti sposobnost indukcije neoangiogeneze, i ovaj proces se naziva angiogenetski „prekidač“. Tumorska indukcija angiogeneze se veoma razlikuje od fiziološke angiogeneze, pre svega u vaskularnoj strukturi (zidovi krvnih sudova su nepravilnog oblika, prošireni, porozni), izmenjenim interakcijama pericita i endotelijalnih ćelija, takođe izmenjen je i protok krvi, koji je sporiji nego u normalnoj vaskulaturi, a može i da osciluje, povećanoj permeabilnosti zidova krvnih sudova, kao i odloženoj maturaciji ćelija zbog produženog vremena produkcije angiogenetskih faktora (Bergers i Benjamin, 2003; Weis i Chersesh, 2005).

Neoangiogeneza je proces u kome se mogu prepoznati četiri osnovna koraka. Prvi korak je lokalna lezija bazalne membrane, za kojom sledi migracija endotelijalnih ćelija aktiviranih angiogenetskim faktorima. Treći korak predstavlja proliferacija i stabilizacija endotelijalnih ćelija, a četvrti da angiogenetski faktori dalje deluju na maturaciju ćelija. Ovaj proces je regulisan uz pomoć aktivirajućih i inhibitornih faktora, kao i interakcijama sa različitim tipovima ćelija koje formiraju mikrosredinu tumora (Weis i Cheresch, 2011), a indukcija angiogeneze u tumorima zavisi od toga koliko je ravnoteža između pro- i anti-angiogenetskih faktora poremećena u korist indukcije angiogeneze (Nishida et al., 2006). Signalni molekul VEGF (vaskularni endotelijalni faktor rasta) ima ključnu ulogu u indukciji angiogeneze (Walti et al., 2013) i utvrđeno je da je familija ovih proteina i njihovih receptora prisutna u velikom broju kancera (Salven et al., 1998).

Diseminacija tumorskih ćelija po organizmu, van primarnog mesta tumora, odnosno sposobnost invazije okolnog tkiva i stvaranje distalnih metastaza, predstavlja još jednu karakteristiku maligne ćelije. Kod 90% pacijenata, smrt izazvana solidnim tumorom je direktna posledica metastaza. Klinička ispitivanja su pokazala da pojedini tumori imaju sklonost da metastaziraju u specifične organe, u zavisnosti od fenotipa tumora (Gupta et al., 2006; Talmadge i Fidler, 2010). Takođe, nemaju sve ćelije jednog solidnog tumora sposobnost da metastaziraju u distalna tkiva, i smatra se da kapacitet diseminacije može biti karakteristika koja zavisi od porekla ćelijske linije od koje je tumor nastao (Nguyen et al., 2009).

Proces metastaziranja je podeljen u nekoliko diskretnih koraka, gde u početku dolazi do gubitka ćelijske adhezije, lokalne invazije tumorskih ćelija u tkiva koja okružuju tumorsku masu, intravazacije u lumen krvnih sudova, gde je neophodno da tumorske ćelije prežive u cirkulaciji pre nego što dospeju do distalnog tkiva gde napuštaju lumen krvnog suda. Ako nakon ekstravazacije iz krvnog suda ove ćelije imaju sposobnost da se adaptiraju na novu sredinu i prežive u njoj, u cilnom organu će prvo formirati mikrometastaze, a zatim, nakon potpune adaptacije na uslove mikrosredine, ponovo dobijaju mogućnost neograničene proliferacije, čime se na mestu formiranih mikrometastaza sada stvaraju klinički uočljive makrometastaze. Ovaj poslednji korak se još naziva i metastatska kolonizacija (Gupta et al., 2006; Valastyan i Weinberg, 2011; Nguyen et al., 2009).

Geni i funkcije koje regulišu ove korake mogu biti podjeljeni na gene koji pripadaju fazi inicijacije metastaze, progresije metastaze i metastatske virulencije (geni koji omogućavaju metastatsku kolonizaciju i preživljavanje ćelija u distalnom organu). Promene do kojih mora da dođe uključuju smanjenu adhezivnost ćelija u odnosu na normalne ćelije, promene u citoskeletu, interakcije ćelija i ekstraćelijskog matriksa, lokalnu proteolizu, kao i druge (Nguyen et al., 2009; Gupta et al., 2006). Jedan od najbitnijih procesa kroz koji prolaze ćelije karcinoma je epitelijalno-mezenhimalna tranzicija (EMT), process kojim epitelijalne ćelije gube ćelijsku polarizaciju i stiču migratorna svojstva mezenhimalnih stem ćelija. EMT je regulisan grupom transkripcionih faktora, od kojih su neki Slug, Snail, Twist, ZEB, i oni dovode do smanjenja ekspresije epitelijalnih markera i povećanja ekspresije mezenhimalnih markera (Valastyan i Weinberg, 2011; Thiery et al., 2009). Takođe, ove ćelije moraju biti sposobne da proteolitički naruše bazalnu membranu, i ovo se događa uz pomoć ekstracelularnih proteinaza, kao što su matriksne metaloproteinaze (MMP). Ovo je familija cink-zavisnih endopeptidaza, koje su sposobne da degraduju različite komponente ekstracelularnog matriksa, i ključni korak u njihovoj aktivaciji je konverzija zimogena u aktivni proteolitički enzim. Želatinaze (MMP-2 i MMP-9) su proteolitički enzimi ove familije koji omogućuju ćelijama da razgrade želatin u gradivne blokove. MMP-2 je jedna od metaloproteinaza koje se najčešće koriste kao markeri malignog fenotipa (Gupta et al. 2006; Kessenbrock et al., 2010; Chaudhary et al., 2013).

U poslednjih nekoliko godina veliku pažnju u istraživanjima kancera zauzima jedna od novije otkrivenih karakteristika maligne ćelije, a to je reprogramiranje ćelijskog metabolizma (Hanahan i Weinberg 2011). Naime, primećeno je da u malignim ćelijama dolazi do povećanja glikolize, raste metabolizam amino kiselina i lipida, mitohondrijalna biogeneza se takođe uvećava, pentozno-fosfatni put je indukovan, i biosinteza makromolekula ja na mnogo višem nivou nego u normalnim ćelijama (Phan et al., 2014). Otkiće koje je prethodilo svim novijim su istraživanja *Otto Warburg*-a od pre nekoliko decenija, u kojima je otkriveno da maligne ćelije preferencijano koriste glikolizu kao način ćelijske respiracije, čak i kad je kiseonik dostupan u dovoljnim količinama (Warburg, 1956a i 1956b).



Kako je glikoliza mnogo manje efikasan proces od oksidativne respiracije, jedan od načina na koji maligne ćelije prevazilaze problem obezbeđivanja energije za metaboličke procese i povećanu biosintezu je i povećanjem broja glukoznih transportera, kao što su Glut1, Glut2, Glut3 i Glut4, kako bi veća količina molekula glukoze dospela u unutrašnjost ćelije (Phan et al., 2014). Smatra se da su poznati onkogeni, kao što su Ras, Myc i HIF-1 $\alpha$ , odgovorni za indukciju procesa glikolize u malignim ćelijama. Takođe, inhibicija ili inaktivacija tumor supresora igra veliku ulogu u reprogramiranju ćelijskog metabolizma. Zna se da tumor supresor p53 inhibira transkripciju glukoznih transportera Glut1 i Glut4, i suprimira ekspresiju Glut3 (Kawauchi et al., 2008). Nakon što je utvrđeno da je deregulacija miRNK jedna od osobina ćelija kancera, ispitana je i uloga ovih molekula u ćelijskom metabolizmu malignih ćelija, i po novijim istraživanjima, smatra se da miRNK učestvuju i u izmenjenom ćelijskom metabolizmu tako što regulišu ekspresiju proteina koji direktno ili indirektno učestvuju i utiču na metaboličku mašineriju (Tomasetti et al., 2014).

Promene u ćelijskom metabolizmu ćelija kancera, koje su značajne u odnosu na normalne ćelije, su iskorišćene za dizajn dijagnostičkih procedura, praćenja razvoja kancera, kao i odgovora kancera na terapiju (Kurhanewicz et al., 2011).

Druga karakteristika maligne ćelije koja privlači sve više pažnje u poslednjoj deceniji je aktivno izbegavanje imunskog odgovora od strane kancer ćelija, i to pre svega odgovora CD8<sup>+</sup> i NK ćelija. U ovom procesima se pretpostavlja da TGF- $\beta$  (transformišući faktor rasta  $\beta$ ) igra veoma bitnu ulogu, suprimirajući imuni sistem, i inhibirajući nadzor imunog sistema (Hanahan i Weinberg 2011; Yang et al., 2010).

### **1.2. Razvoj antitumorskih lekova**

U prethodnih nekoliko decenija, iako je došlo do poboljšanja u tretmanu kancera i mnogi novi terapeutici su razvijeni, prosečno preživljavanje pacijenata je samo neznatno povećano. Razvoj novih hemoterapeutika je i dalje veoma spor proces, kao i veoma skup, sa mnogo odbačenih projekata. U analizi urađenoj 2011.godine, pokazano je da se broj odbačenih jedinjenja u fazi II i fazi III kliničkih ispitivanja značajno povećao u poslednjoj deceniji, a u isto vreme, prosečno vreme potrebno za razvoj jednog terapeutika (od patentiranja do gotovog, komercijalnog proizvoda) je takođe produženo. Ovo je povezano sa povećanjem investicija farmaceutskih kompanija u produkte kod kojih je rizik za odbacivanjem u nekoj fazi razvoja visok, zbog nedovoljno razjašnjenih bioloških mehanizama (Pammolli et al., 2011).

U skorije vreme je došlo i do mnogih otkrića na polju molekularne i ćelijske biologije kancera. Međutim, iako ova nova saznanja još uvek nisu dovela do konkretnih, terapijskih rezultata, smatra se da će njihovo razumevanje dovesti do razvoja terapija koje uspešno i specifično ciljaju samo maligne ćelije primarnog tumora i metastaza. Ali, da bi bilo moguće razvijati terapeutike koji ciljaju tačno određeni gen i njegove proizvode, neophodno je rasvetliti biološku ulogu tog gena i proizvoda gena u normalnoj i maligno izmenjenoj ćeliji (Patel et al., 2013). Najveći problem u dosadašnjoj terapiji kancera predstavlja to što većina hemoterapeutika ima efekat na ćelije koje su u mitozu, što znači da veliki broj ćelija kancera neće reagovati na njih. Osim toga, ovi lekovi nisu specifični za maligne ćelije, odnosno delovaće i na normalne ćelije, posebno one koje poseduju veliku sposobnost proliferacije, i samim tim će hemoterapeutici oštećivati i normalna tkiva organizma.

Terapeutske mete u razvoju antitumorskih lekova se mogu podeliti na nekoliko grupa. Terapeutskom metom se smatra bilo koja molekularna struktura koja specifično interaguje sa ispitivanom supstancom. Trenutno, za mnoge lekove je identifikovano više

terapeutskih meta, i iako terapeutske mete za najveći broj lekova nisu poznate, smatra se da su multiple za najveći broj supstanci (Imming et al., 2006). Postoje tri glavna tipa tretmana i lekova koji se koriste u terapiji kancera, a to su citotoksični hemoterapeutici, hormonska terapija i ciljana terapija.

### 1.2.1. Citotoksični hemoterapeutici

Citotoksični antikancer lekovi su prema svojim mehanizmima delovanja podeljeni u nekoliko kategorija (Nussbaumer et al., 2011). Jedna kategorija, koja postoji već dugo vremena su alkilujućim agensi, koji direktno oštećuju DNK, kovalentno vezujući alkil grupu za mesto na molekulu DNK koje je specifično za svaku supstancu. Ova grupa hemoterapeutika je dalje podeljena na azotne plikavce (kao što su hlorambucil i ciklofosfamid), zatim alkil sulfonate (busulfan), nitrozouree (karmustin), tetrazine (kao što su mitozolomid, temozolomid), i aziridine (mitomicin C). Antikancer agensi koji sadrže teške metale, kao što su supstance koje sadrže platinu, se ponekad svrstavaju u ovu grupu, pošto je njihov mehanizam delovanja sličan alkilujućim agensima. U ovu podgrupu spadaju karboplatina i cisplatina.

Drugu veliku klasu hemoterapeutskih lekova predstavljaju antimetaboliti. To su jedinjenja strukturno slična nukleotidima, amino kiselinama ili vitaminima, i mogu biti direktno ugrađena u DNK ili RNK ili ulaze u kompeticiju sa prirodnim supstratom za aktivno mesto enzima ili receptora (Cole et al., 2005). Postoji nekoliko glavnih klasa, kao što su antagonisti folne kiseline, analozi pirimidina i analozi purina.

Folati igraju ključnu ulogu u različitim sintetskim procesima u ćeliji, pre svega u *de novo* biosintezi purina i timidilata. Kako maligna ćelija ima uvećane potrebe za gradivnim komponentama, zbog ubrzanog rasta i proliferacije, antifolati, odnosno molekuli koji ulaze u kompeticiju sa folatima za aktivno mesto ključnih enzima, predstavljaju jednu od prvih linija odbrane u tretmanu različitih tipova kancera (Farber i Diamond 1948; Peters et al., 2005). Najpoznatiji lek iz ove klase je metotreksat, koji se koristi u terapiji leukemija, limfoma, osteosarkoma, i drugih tipova kancera.

Analozi pirimidina i purina predstavljaju molekule slične prirodnim pruinskim i pirimidinskim bazama i nukleotidima. Ovi molekuli mogu inhibirati enzime koji učestvuju u replikaciji DNK, ili se inkorporirati direktno u DNK molekul, i na taj način sprečiti sintezu DNK i izazvati ćelijsku smrt (Robak et al., 2009). Neki od pirimidinskih analoga korišćenih u terapiji su 5-fluorouracil, gemcitabin i citarabin, dok je jedan od purinskih analoga tioguanin.

Još jednu veoma značajnu grupu antineoplastičnih agenasa predstavlja grupa antitumorskih antibiotika, pri čemu postoje prirodni i polusintetski članovi ove klase lekova. Prirodni citotoksični antibiotici su uglavnom izolovani iz bakterija i gljiva.

Antraciklini, kojima pripada i doksorubicin, i o kojima će u daljem tekstu biti više reči, su DNK interkalirajući agensi. Bleomicini su grupa antitumorskih antibiotika sa veoma značajnom kliničkom ulogom, ali i ograničenom upotrebom zbog velike pulmonalne toksičnosti, koja može dovesti do fibroze pluća. To je grupa glikopeptida koji u prisustvu kofaktora ( $\text{Fe}^{2+}$  i kiseonika) izaziva jednolančane i dvolančane prekide DNK (Chen i Stubbe, 2004; Chen et al. 2008), pri čemu se smatra da je nemogućnost reparacije dvolančanih prekida najvažniji efekat ovih jedinjenja (Povirk, 1996). Zanimljivo je da je, zbog velike kompleksnosti i velikog broja potencijalnih meta, mehanizam dejstva većine antitumorskih antibiotika i dalje samo delimično rasvetljen, što pokazuje studija iz 2008. godine (Chen et al., 2008), u kojoj se, nakon decenija primene bleomicina u kliničkoj praksi za tretman limfoma, testikularnog kancera i tumora glave i vrata, predstavljaju rezultati u kojima se iznosi tek pretpostavljeni mehanizam dejstva bleomicina.

Još jedan predstavnik ove grupe citotoksičnih antibiotika je mitomicin C, koji je izolovan iz kulture *Streptomyces caespitosus* (Hata i Sugawara, 1956). Mitomicin C je prolek, čija aktivnost zavisi od njegove metaboličke aktivacije. Ovo je pre svega alkilujući agens, ali smatra se da njegovoj aktivnosti doprinose i brojni drugi mehanizmi kao što je na primer stvaranje slobodnih kiseoničnih vrsta. Takođe, smatra se da ovaj antitumorski agens izaziva apoptozu preko puta zavisnog od Fas receptora (Spanswick et al., 1998; Kang et al., 2006).

Grupa otrova deobnog vretena odnosno mitotskih otrova obuhvata dve podgrupe, vinka alkaloida i taksane. Predstavnicima ove grupe vezuju tubulin (monomere ili polimere) i time sprečavaju formiranje deobnog vretena. Samim tim dovode do zastoja u mitozu, što se smatra njihovim glavnim citotoksičnim efektom (Matson i Stukenberg, 2011; Wertz et al., 2011). Takođe, istraživanja su pokazala da su anti-apoptotski protein MCL1 i tumor-supresor FBW7 (deo kompleksa ubikvitin ligaze) ključni regulatori apoptoze pri delovanju otrova deobnog vretena (Wertz et al., 2011).

Vinka alkaloidi su izolovani iz madagaskarskog roda biljaka *Vinca*, i njihov mehanizam dejstva pre svega obuhvata interakciju sa monomerima tubulina i poremećaj dinamike građenja mikrotubula (Matson i Stukenberg 2011; Moudi et al., 2013; Jordan et al., 1992). Na taj način, ovi biljni molekuli mogu da dovedu do zastoja u metafazi čak i kod ćelija kod kojih je mitotsko vreteno već formirano (Jordan et al., 1992). Studije su pokazale da vinka alkaloidi, pri malim, netoksičnim dozama, mogu imati anti-angiogenetsko dejstvo (Vacca et al., 1999).

Vinka alkaloidi, čiji su najvažniji predstavnici vinblastin, vinorelbin, vinkristin i vindezin, se najčešće koriste u kombinovanim hemoterapijama. Njihov glavni neželjeni efekat je dozno-zavisna pojava neurotoksičnosti (Moudi et al., 2013).

Taksoidi su grupa otrova deobnog vretena izolovanih iz kore jedne vrste tise, *Taxus brevifolia*, kao i njihovih polusintetskih proizvoda (Wani et al., 1971; Pazdur et al., 1993). Njihov primarni mehanizam delovanja obuhvata vezivanje za  $\beta$ -subjedinicu tubulina, nakon čega utiču na formiranje i stabilizaciju mikrotubula, sprečavajući njihovu depolimerizaciju (Manfredi i Horwitz, 1984; Pazdur et al., 1993). Paklitaksel je prirodni kompleksni tetraciklični diterpen, dok je docetaksel semisintetski predstavnik ove grupe (Howat et al., 2014; Matson i Stukenberg, 2011). Paklitaksel se trenutno koristi u tretmanu raka jajnika, dojke kao i raka pluća. U početku primene taksoida u terapiji, problem su izazivale reakcije preosetljivosti koje su se javljale kod pacijenata, ali je taj problem prevaziđen razvijanjem poboljšanog protokola tretmana (Howat et al., 2014).

Inhibitori topoizomeraze su fazno-specifični antikancer lekovi, koji svoj efekat ostvaruju pre svega inhibicijom enzima topoizomeraze I ili II, i na osnovu ovoga se dele u

dve velike klase. Topoizomeraze razmotavaju molekul DNK prilikom reparacije DNK, transkripcije ili replikacije. Topoizomeraza I pravi reverzibilne prekide u jednom lancu DNK, dok topoizomeraza II to čini na oba lanca DNK (Berger et al., 1996; Stewart et al., 1998).

Inhibitori topoizomeraze I se koriste u tretmanu kancera jajnika, cerviksa, kolona, pluća, itd. Kamptotecin je polusintetski derivat biljnog alkaloida, izolovan iz drveta *Camptotheca acuminata* (Pommier, 2013) i za njegovu aktivnost je neohodan laktonski prsten. Veliki problem u primeni ovog leka je to što se na fiziološkom pH laktonski prsten otvara, a samim tim ovo jedinjenje gubi svoju aktivnost (Pommier, 2013; Topcu, 2001). Studijama čitavog genoma nakon tretmana kamptotecinom (Velošo et al., 2013), otkriveno je da kamptotecin dovodi do inhibicije ekspresije mnogih gena tako što blokira elongaciju transkripcije. Neželjene posledice kamptotecina i drugih pripadnika ove klase inhibitora topoizomeraze II obuhvataju mijelosupresiju i pojavu dijareje kod pacijenata (Pommier, 2013; Topcu, 2001).

Inhibitori topoizomeraze II su podeljeni u dve grupe – DNK interkalatori i supstance koje nisu interkalatori. Jedan od najbitnijih lekova ove grupe je etopozid, polusintetski derivat demetilepipodofilotoksina, koji se vezuje direktno za topoizomerazu II i inhibira ponovnu ligaciju molekula DNK. Ovo je trenutno najselektivniji inhibitor topoizomeraze II (Pommier, 2013; Topcu, 2001).

### **1.2.2. Hormonska terapija**

Ovaj vid terapije se primenjuje kod hormonski-zavisnih tipova kancera, poreklom od tkiva kod kojih kortikosteroidni ili polni hormoni izazivaju velike promene u ekspresiji gena. Inhibitori sinteze hormona, antagonisti receptora hormona i hormonalni suplementi su tri podgrupe ove vrste terapije.

Inhibitori sinteze hormona mogu biti aromatozni inhibitori, inhibitori gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH), kao i inhibitori 5- $\alpha$  reduktaze.

Dejstvo aromatoznih inhibitora je zasnovano na činjenici da kod postmenopauzalnih žena, koje su ciljna grupa ove vrste terapije, jajnici prestaju da proizvode estrogen, i tu ulogu preuzimaju brojna druga tkiva, i dejstvo tako proizvedenih estrogena nije više sistemsko nego deluju kao parakrini faktori. Sintezu estrogena iz C<sub>19</sub> steroida (testosterona i androstendiona) katalizuje enzim citohrom P450 aromataza (Simpson, 2003; Osborne i Tripathy, 2005). Specifičnosti aromatoznih inhibitora doprinose i podaci da je ekspresija i aktivnost citohrom P450 aromataze višestruko povećana u malignom tkivu (u ovoj studiji, konkretno, malignom tkivu dojke) u odnosu na normalno tkivo (Chetrite et al., 2000), kao i da se različiti promotori ovog gena nalaze u različitim tkivima, pri čemu su određeni tipovi promotora aromataze dovedeni u vezu sa neoplastičnim promenama (Agarwal et al., 1996). Trenutno je u kliničkoj upotrebi treća generacija aromatoznih inhibitora koju čine anastrozol, eksemestan i letrozol.

Gonadotropin-oslobađajući hormon se luči u hipofizi i utiče na oslobađanje gondotropina (LH – luteinizirajući hormon, FSH – folikulo-stimulišući hormon), koji dalje regulišu sintezu polnih hormona u gonadama (Seeburg et al., 1987; Limonta et al., 2012; Tammela, 2012). U tretmanima hormon-zavisnih tumora, kao što su kanceri dojke, jajnika, a posebno endometrijuma i prostate, bitnu ulogu igraju GnRH agonisti ili antagonisti (Limonta i Manea, 2013).

Agonisti GnRH, koji se razlikuju od prirodnog hormona po tome što im je poluživot u cirkulaciji produžen, i otporniji su na degradaciju, u početku tretmana dovode do povećane produkcije gonadotropnih hormona (Bublej, 2001), a zatim dolazi do desenzitizacije receptora, i dalje se inhibira produkcija steroidnih hormona u gonadama. Neki od lekova iz ove grupe su leuprorelin, buserelin i tritorelin (Limonta et al., 2012; Tammela, 2012).

Prilikom terapije antagonistima GnRH, u početku ne dolazi do povećanja lučenja gonadotropina, već se njihova produkcija odmah smanjuje. Ovi molekuli se vezuju za receptor GnRH ne aktivirajući ga. Lekovi iz ove grupe su ganireliks, abareliks, kao i degareliks koji ne dovodi do reakcije preosetljivosti prilikom primanja terapije, za razliku od prethodnih (Limonta i Manea, 2013; Limonta et al., 2012; Tammela, 2012).

U prostati se testosteron konvertuje u dihidrotestosteron (DHT) uz pomoć enzima 5- $\alpha$  reduktaze (Tammela, 2012; Tindall i Rittmaster, 2008). Postoje tri izozima ovog enzima, i pokazano je da je ekspresija tipa 1 povećana u kanceru prostate, a tipa 2 prilikom hiperplazije tkiva prostate (Thomas et al., 2005; Iehlé et al., 1999). Trenutno postoje dva odobrena leka iz grupe inhibitora 5- $\alpha$  reduktaze, finasterid i dutasterid, koji je efikasniji jer inhibira i tip 1 i tip 2 enzima, dok su brojni drugi potencijalni terapeutici ove grupe još u fazi ispitivanja (Tammela, 2012).

Antagonisti receptora hormona mogu biti selektivni modulatori estrogenskog receptora ili antiandrogeni. Estrogenski receptor postoji u dve forme,  $\alpha$  i  $\beta$ , s tim da je ER $\alpha$  pre svega ekspimiran u mlečnim žlezdama, jajnicima, materici, kostima, stromi prostate i adipoznom tkivu. Er $\beta$  se nalazi u epitelijumu prostate, bešici, kolonu, ali takođe i u jajnicima i adipoznom tkivu. Ova dva tipa receptora imaju različite fiziološke uloge. Estrogen ima ključnu ulogu u razvoju maligniteta u hormon-zavisnim tkivima, jer utiče na povećanu proliferaciju ćelija, što dovodi do povećanja mogućnosti za pojavu mutacija koje dovode do neoplastičnih promena u tkivu. Selektivni modulatori estrogenskog receptora (SERMs) su nesteroidna jedinjenja (osim steroidnog estradiola fulvestrana) i deluju kao agonisti ili antagonisti estrogenskog receptora, u zavisnosti od tkiva. U moždanom i tkivu dojke deluju kao antagonisti, a u uterusu kao parcijalni agonisti, što je najbitnije za njihovu ulogu u terapiji kancera dojke. Najpoznatiji lek ove grupe, kao i onaj koji se najduže primenjuje u kliničkoj praksi je tamoksifen, a tu su i raloksifen, sa donekle poboljšanim karakteristikama, kao i toremifen (Lewis i Jordan, 2005; Komm i Mirkin, 2014).

Antiandrogeni se vezuju za androgeni receptor, sprečavaju njegovu aktivaciju, i time inhibiraju ulazak receptora u nukleus ćelije, aktivaciju transkripcije, regrutovanje kofaktora, kao i ostale uloge ovog receptora. Mogu biti steroidni i nesteroidni, i najčešće se primenjuju u kombinaciji sa GnRH-agonistima, da bi sprečili inicijalno povećanje produkcije polnih hormona (Helsen et al., 2014; Tammela, 2012). Steroidni antiandrogeni, kao što su ciproteron acetat ili megestrol acetat, imaju veoma mnogo neželjenih efekata na kardiovaskularni sistem, seksualnu potenciju, i smatra se da je ovo zato što osim dejstva na androgeni receptor, imaju parcijalno dejstvo i na progesteronski, kao i glukokortikoidne receptore (Helsen et al., 2014). Nesteroidni receptori se trenutno češće primenjuju u



kliničkoj praksi, i obuhvataju jedinjenja prve generacije bikalutamid, flutamid, i nilutamid, dok je prvi antiandrogen druge generacije uveden u upotrebu pre samo nekoliko godina, i za sada se pokazao boljim u odnosu na bikalutamid (Tran et al., 2009).

Hormonski suplementi u terapiji kancera se koriste u nekim slučajevima, kada primena estrogena, progesterona ili androgenih hormona može dovesti do inhibicije rasta tumora. Dietilstilbestrol se dugo primenjivao u terapiji raka prostate, i to parentalno, pošto taj vid primene izaziva manje neželjenih efekata nego oralni način primene. Danas se primenjuje i poliestradiol fosfat (Tammela, 2012). Progestini su supstance slične progesteronu, kao što je medroksiprogesteron-acetat (MPA), koji je agonist androgenog receptora. Ova supstanca se primenjuje u terapiji karcinoma dojke, i to onih koji ekspimiraju androgeni receptor (Birrell et al., 1998). Androgeni se ponekad koriste u terapiji metastatskog kancera dojke.

### 1.2.3. Ciljana terapija

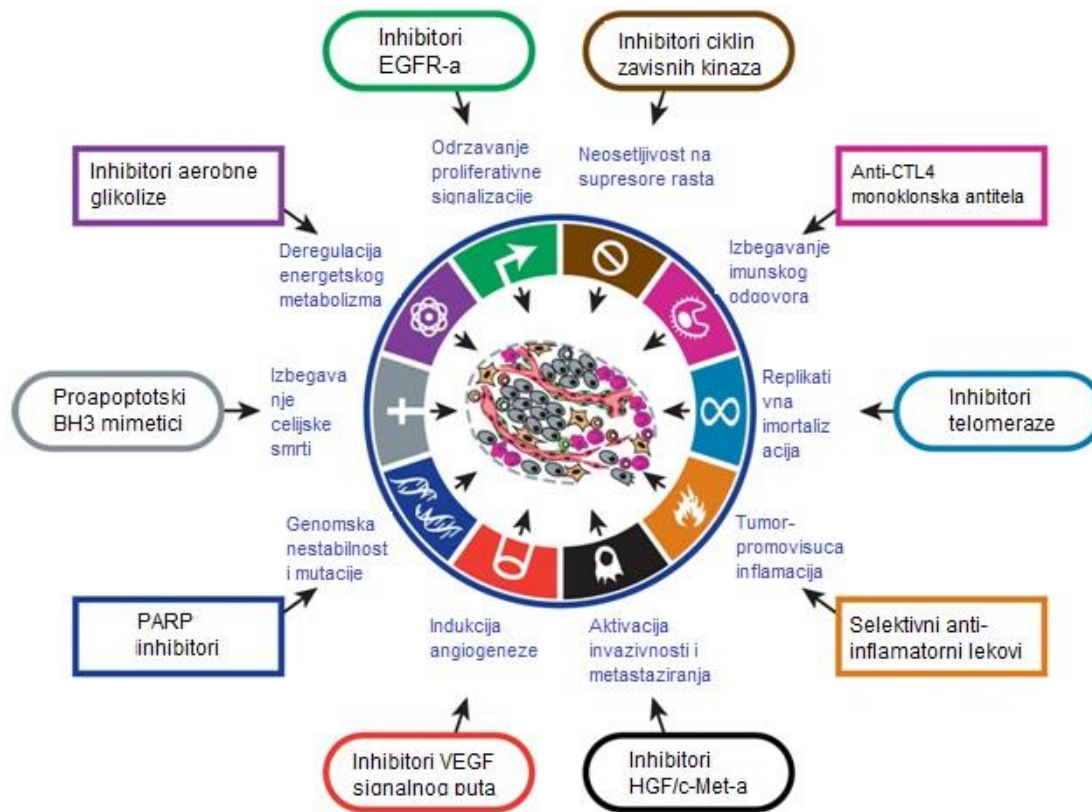
U ovoj vrsti terapije cilj je da se specifični signalni putevi, koji su neophodni za opstanak i rast malignih ćelija, blokiraju, i to inhibicijom receptora i enzima uključenih u signalnu kaskadu. Iako mnoge druge, ranije navedene, vrste terapija mogu da se podvedu pod ovu definiciju ciljane terapije, obično se u podgrupe ove vrste terapije svrstavaju mali molekuli (manje od 800 Da), i monoklonalna antitela. Mali molekuli su oni koji su sposobni da prođu kroz membranu ćelije i svoje efekte ispolje u njoj, dok se monoklonalna antitela vezuju za mete na površini ćelije (Joo et al., 2013).

Tokom prethodnih decenija otkriveno je da mnoge protein kinaze imaju ključnu ulogu u uspostavljanju i održavanju fenotipa maligne ćelije (Futreal 2004), što je ove enzime učinilo interesantnim kao mete ciljane terapije. Do sada je u kliničkim ispitivanjima testirano preko sto protein kinaza, čije dejstvo je takvo da ili sprečavaju autofosforilaciju kinaze ili fosforilaciju supstrata te kinaze (Grant, 2009). Postoje četiri tipa inhibitora, tip 1 inhibitori, koji prepoznaju aktivnu konformaciju kinaze, tip 2 inhibitori, koji prepoznaju neaktivnu konformaciju, zatim alosterični inhibitori, koji se vezuju van ATP-vezujućeg

mesta, i oni su i najspecifičniji, dok četvrta grupa, kovalentni inhibitori, se kovalentno vezuju za aktivno mesto kinaza (Zhang et al., 2009). Racionalni dizajn je bio veoma bitan u razvoju protein kinaznih inhibitora, a prvi odobreni lek iz ove grupe je bio imatinib (Savage i Antman, 2002; Grant, 2009), inhibitor BCR-ABL kinaze. Još jedna veoma bitna meta ciljane terapije je familija EGFR receptora (receptor epidermalnog faktora rasta), nađen u velikom broju kancera, pre svega NSLC (non-small cell lung cancer) karcinomima, kancerima glave i vrata, itd. Gefitinib i erlotinib su dva leka iz ove grupe, specifični za ErbB1 tip receptora (Arora i Scholar, 2005; Gaafar et al., 2011).

Intracelularna degradacija proteina je strogo regulisan proces koji se prvenstveno obavlja preko puta ubikvitin-proteazoma. U različitim studijama je utvrđeno da su maligne ćelije osetljivije na inhibiciju ubikvitinskog puta, pretpostavlja se zato što im je potrebna stroga kontrola antiapoptotskih puteva i metaboličkih ćelijskih puteva (Crawford et al., 2011). Zbog ovoga je razvijena relativno nova klasa inhibitora proteazoma, čiji članovi imaju plejotropne efekte unutar ćelije, između ostalog stabilisanjem proapoptotskih proteina, a degradacijom anti-apoptotskih, kao što je Bcl-2 na primer, dovode do značajnih efekata u terapiji kancera (Orlowski i Kuhn, 2008). Prvi odobreni lek iz ove grupe je bio bortezomib, reverzibilni peptidni boronatni inhibitor, odobren za refraktorne mijelome kao i limfome. Neželjeni efekti uključuju perifernu neuropatiju i pojavu rezistencije. Trenutno se još neki članovi ove klase lekova nalaze u fazi kliničkih ispitivanja (Adams et al., 1999; Orlowski i Kuhn, 2008; Crawford et al., 2011).

Kako je indukcija neoangiogeneze jedna od ključnih karakteristika maligno promenjene ćelije, već dugo se istražuju inhibitori angiogeneze kao potencijalni terapeutici u terapiji raka. U ljudskom organizmu postoji više supstanci koje mogu inhibirati angiogenezu, kao što su angiostatin, interferon, endostatin, itd. (Nishida et al., 2006). Glavna meta ciljane terapije inhibicije angiogeneze je familija VEGF (vaskularni endotelijalni faktor rasta) receptora. Dva najpoznatija kinazna inhibitora ovih receptora su sorafenib i sunitinib, odobreni za lečenje renalnog karcinoma. Glavni problem anti-angiogenetskih terapija razvijenih do sada je taj što je početni veoma dobar odgovor na terapiju praćen sticanjem rezistencije malignih ćelija i ubrzanom progresijom metastaza (Bergers i Hanahan, 2008).



**Slika 1.2.** Terapeutici kojima je meta određena karakteristika kancer ćelije (preuzeto sa izmenama iz Hanahan i Weinberg 2011.)

Primena monoklonalnih antitela u terapiji kancera je postala moguća onda kad su otkriveni i ispitani određeni antigeni na tumorskim ćelijama koji ih razlikuju od normalnih, neizmenjenih ćelija. Najuspešnije terapije su razvijene za antigene kao što su ERBB2 (član familije receptora epidermalnog faktora rasta, EGFR), VEGF i CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*). Do sada je odobreno dvanaest monoklonskih antitela za terapiju kancera, pri čemu većina ovih terapeutika ima mnogo slabije dejstvo nego klasični hemoterapeutici, odnosno citotoksični hemoterapeutici (Scott et al., 2012). Mehanizam dejstva monoklonskih antitela uključuje inhibiciju signalnih puteva, kao što su trastuzumab i cetuksimab (Hudis, 2007), zatim vezivanje za ligande određenih receptora, čime se sprečava njihovo dejstvo na taj receptor, kao što je bevacizumab (Bergers i Hanahan,

2008), kao i dejstvo putem ćelijski posredovane citotoksičnosti zavisne od antitela (ADCC), što je način na koji deluje rituksimab (Golay et al., 2000). Terapija monoklonskim antitelima je ograničena isključivo na pacijente kod kojih su specifični antigeni prisutni, što se određuje genetičkim analizama pre početka tretmana.

### 1.2.4. Problemi u razvoju antitumorskih lekova

I pored velike količine finansijskih sredstava i ljudskih resursa uloženi u istraživanje kancera i razvoj antitumorskih lekova, poražavajući podatak je da trenutno manje od 10% supstanci koje uđu u proces kliničkih ispitivanja budu i odobrene za korišćenje u kliničkoj praksi, kao i da je cena razvoja samo jednog leka preko jedne milijarde dolara.

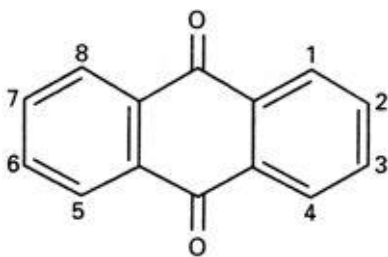
Razlozi ovakvih problema u lečenju tumora su brojni – nedovoljno poznavanje kompleksne fiziologije tumora i mikrosredine tumora, nedovoljno dobar farmakokinetički profil i isporuka na mesto dejstva čak i onih supstanci koje imaju odličnu efikasnost, kao i upotreba prekliničkih modela koji ne daju pravu sliku interakcije tumora i organizma, tako da ih je teško prevesti u kliničku upotrebu. Takođe, u pojedinim slučajevima je uloga specifičnih meta u patogenezi maligniteta nedovoljno dobro utvrđena, pa supstance koje su razvijane za ciljanu terapiju ovih terapeutskih meta ne pokazuju značajno dejstvo *in vivo*. Neka od rešenja za ove problem mogu biti razvijanje boljih *in vitro* prekliničkih modela, koji su sličniji realnim uslovima nastanka i progresije tumora, kao i uzimanje u obzir dinamike progresije određenih tipova tumora i prilagođavanje razvoja terapeutika svakom od različitih tipova. Jedna od strategija koja danas najviše uzima maha je razvoj lekova vođen prethodno otkrivenim i ispitanim biomarkerima (Adams, 2012). Takođe, stalno prisutni problem razvoja citotoksičnih hemoterapeutika je njihova sistemska toksičnost i neselektivnost, takva da deluju i na sve normalne ćelije organizma koje brzo proliferišu, što otežava, a ponekad i potpuno onemogućava njihovu primenu u terapiji.

Što se tiče ciljane terapije kancera, koja je mnogo selektivnija i manje toksična za normalne ćelije organizma, glavni problem ove vrste terapije je pojava stečene rezistencije

(Huang et al., 2014). Iako se pacijenti koji se tretiraju određenim lekom biraju po prisustvu specifičnih biomarkera, često prvobitni efekat leka na smanjenje stepena ili zaustavljanje proliferacije tumora veoma kratko traje (Gore i Larkin, 2011; Huang et al., 2014). Ovo se objašnjava heterogenošću ćelija tumora, kao i multiplim mutacijama unutar jednog klona ćelija, kada molekul koji je meta terapije nije “noseća” mutacija kancera. Primer toga je cetuksimab, monoklonsko antitelo za EGF receptor, koje, da bi imalo dejstvo kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom, ti pacijenti moraju da ispunjavaju dva uslova – da imaju povišenu ekspresiju EGFR-a, ali i prisustvo *wild type* KRas GTPaze (Adams, 2012; Huang et al., 2014). Jedna mogućnost za rešenje ovih problema je definisanje boljih biomarkera, a druga razvoj kombinacionih terapija.

## 1.3. Antrahinoni

Sam antrahinon (9,10 – dioksoantracen) je aromatično organsko jedinjenje, slabo rastvorljivo u vodi, ali znatno bolje rastvorljivo u većini organskih rastvarača. Koristi se pre svega za proizvodnju boja, ali i kao pesticid. Derivati antrahinona predstavljaju važnu klasu hinonskih jedinjenja koja se mogu naći u prirodi, i to u biljkama (na primer, biljke iz roda *Aloe*, *Senna*, kao i *Rheum*), gljivama, lišajevima, mahovinama, kao i nekim insektima i morskim organizmima (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012). Biljni ekstrakti koji sadrže antrahinone se koriste u kozmetičkoj industriji, ishrani kao i u farmaceutskim proizvodima. Antrahinoni poseduju dve keto-grupe na pozicijama C9 i C10 (Slika 1.3.), a odlikuje ih velika strukturna i funkcionalna raznovrsnost.



**Slika 1.3.** Antrahinon

Neki od derivata antrahinona kao što su dantron, emodin, kao i neki od glikozida izolovanih iz roda *Senna* imaju laksativno dejstvo, i to, smatra se, tako što povećavaju transport elektrolita i tečnosti u debelom crevu, kao i pokretljivost kolona. Direktnim dejstvom na CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) hloridni kanal na apikalnoj strani enterocita (Yang et al., 2011) antrahinoni stimulišu sekreciju hloridnih jona u mukozi creva, a samim tim inhibiraju apsorpciju i indukuju sekreciju tečnosti u lumen creva, što doprinosi laksativnom dejstvu (Hietala et al., 1987; Yang et al., 2011).

Antibiotičko dejstvo antrahinona je dobro opisano u literaturi, pri čemu jedinjenja imaju antibakterijsko dejstvo u mikromolarnim koncentracijama (Wang et al., 2010), posebno prema gram-pozitivnim bakterijama. Kineska biljka iz roda *Rheum* sadrži nekoliko ovakvih jedinjenja, među kojima su hrizofanol, rein, emodin, i aloe-emodin.

Ova biljka, i derivati antrahinona koji se mogu izolovati iz njenog korena takođe imaju i dobro antiinflamatorno i antipiretičko dejstvo, i istraživanja pokazuju da se ovakav efekat ostvaruje inhibicijom produkcije azot monoksida (NO), signalnog molekula koji utiče na vazodilataciju krvnih sudova prilikom inflamacije, a koji može i da aktivira NF- $\kappa$ B, ključni transkripcioni faktor u regulaciji inflamacije. Takođe, emodin i drugi antrahinoni inhibiraju ekspresiju enzima azot-monoksid sintazu, produkciju prostanglandina u makrofagima (Choi et al., 2013), utiču na smanjenje produkcije citokina od strane T-ćelija, a istraživanja su pokazala i direktan efekat na inhibiciju NF- $\kappa$ B, sprečavanjem degradacije inhibitorne subjediničice (I $\kappa$ B) ovog molekula (Kumar et al., 1998).

Za derivate antrahinona je pokazano da imaju i antiviralno dejstvo, pri čemu najbolji efekat ostvaruju na virusima sa lipoproteinskim omotačem, kao što su herpes simpleks, varicela zoster virus, virus influence i drugi, i to narušavanjem virusnog omotača (Sydiskis et al., 1991). Emodin, alizarin i hinalizarin su pokazali antiviralno dejstvo i prema citomegalovirusu (CMV). Iako je većina studija pokazala da veći broj antrahinona ne deluje na viruse bez lipoproteinskog omotača, Semple i saradnici su pokazali dobru *in vitro* antiviralnu aktivnost hrizofanola prema poliovirusu (Semple et al., 2001).

Jedan od najbitnijih efekata antrahinona, zbog kojeg izazivaju veoma mnogo interesovanja u farmaceutskoj industriji je i njihov potencijal u tretmanu kancera, i inhibiciji proliferacije i metastaziranja malignih ćelija. Pored najpoznatije i najčešće korišćene grupe antraciklina, antrahinonskih antibiotika, u upotrebi je i 1,4-diaminoantrahinonski derivat, mitoksantron, koji se razlikuje od antraciklina po odsustvu jednog supstituisanog cikloheksanskog prstena. Ovo jedinjenje se koristi već nekoliko decenija u terapiji leukemija, limfoma, a i kao druga linija terapije u tretmanu određenih metastatskih kancera, u kombinaciji sa drugim lekovima (Patel et al., 2013).

Mitoksantron se takođe koristi i u terapiji multiple skleroze, i to kao jedini odobreni lek za sekundarnu progresivnu multiplu sklerozu, kod pacijenata kod kojih dolazi do neuroloških pogoršanja i između perioda akutnih napada. Efekti ovog leka su usporena progresija bolesti, kao i stabilizacija neuroloških funkcija, a pretpostavlja se da mehanizam

dejstva obuhvata imunosupresivna svojstva prilikom patogeneze multiple skleroze (Wundes et al., 2010).

Mehanizam dejstva antrahinona podrazumeva njihovo učešće u brojnim procesima unutar ćelije, kao što su proces oksidativne fosforilacije, proces ćelijske deobe, i drugi, kao i formiranje kompleksa sa DNK i RNK molekulima.

Postoji nekoliko načina na koje kompleksni molekuli mogu da se vezuju za DNK, i to su formiranje elektrostatičkih interakcija sa pentozno-fosfatnom okosnicom molekula, interakcijom sa velikim ili malim žljebom DNK ili interkalacijom između baza DNK. Antrahinoni, koji poseduju planarnu strukturu, sa tri povezana prstena, pripadaju grupi farmakofora koje imaju sposobnost interkalacije molekula DNK. Interkalacija se smatra nizom hidrofobnih interakcija, gde je to što aromatični molekul interkalira između baza DNK posledica hidrofилne ćelijske sredine. Interkalacijom ovi molekuli menjaju konformaciju DNK molekula (Strekowski i Wilson, 2007). Antrahinoni se mogu vezivati i preko malog žljeba DNK, a pokazano je i da 1,4-antrahinoni preferencijalno interkaliraju u dvolančanu DNK, a 2,6-antrahinoni i 2,7-antrahinoni u trostruke i četverostruke strukture DNK (Strekowski i Wilson, 2007; Zagotto et al., 2008).

Upravo se ova sposobnost interakcije sa kvadrupleksima nukleinskih kiselina smatra osnovom još jednog potencijalnog mehanizma dejstva antrahinona, a to je inhibicija telomeraze. Četvorolančane strukture DNK su sekvence nukleinske kiseline koje su bogate guaninom, i to su delovi molekula DNK koji mogu formirati takozvane G-tetrade. Humani telomerni regioni se sastoje od niza ponovaka (sekvence GGTTAG) i formiranje G-tetrada u ovim regionima dovodi do inhibicije aktivnosti telomeraze, enzima odgovornog za elongaciju telomera, a čija je ekspresija povećana u preko 85% slučajeva kancera (Hanahan i Weinberg, 2011). Planarna struktura antrahinona je ključna za stabilizaciju G-kvadrupleksa, i ova jedinjenja su jedna od prvih za koje je bilo pokazano da mogu da dovedu do inhibicije telomeraze na ovaj način (Sun et al., 1997; Zagotto et al., 2011).

Ova grupa jedinjenja je takođe uključena i u redoks procese u ćeliji. Kako pripadaju velikoj grupi hinona, antrahinoni su dobri akceptori elektrona, što im omogućuje da interaguju sa molekulima kiseonika unutar ćelije i dovode do stvaranja reaktivnih

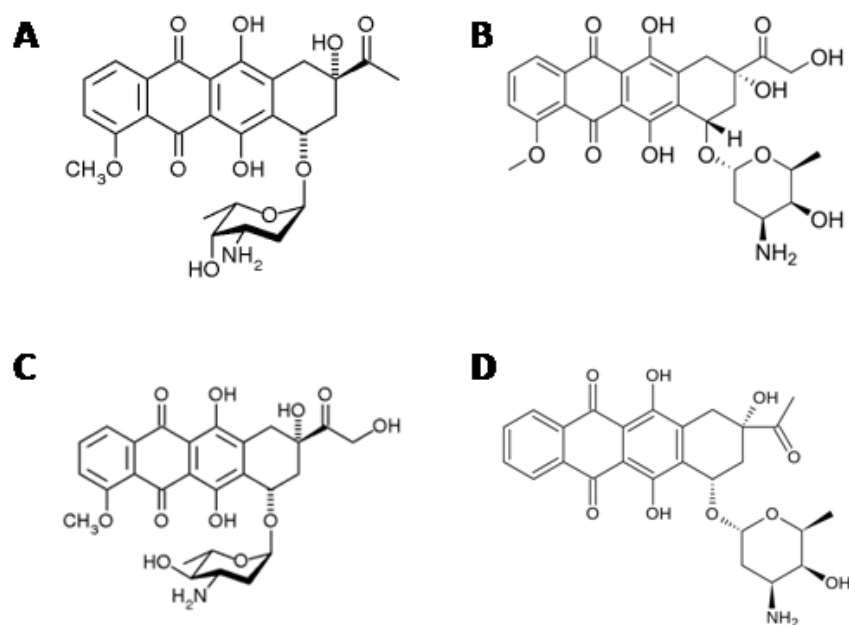


kiseoničnih vrsta. Istraživanja su pokazala da hrizofanol takođe dovodi i do smanjivanja mitohondrijalnog membranskog potencijala, kao i da emodin izaziva apoptozu kroz povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), praćeno smanjivanjem ekspresije Bcl-2 i povećanjem ekspresije proapoptotskog Bax proteina. U kancer ćelijama, sa prekomernim povećanjem produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta dolazi i do smanjenja proliferacije ovih ćelija, jer se indukuje G2/M zastoj u ćelijskom ciklusu, a ovi molekuli mogu dovesti i do direktne aktivacije spoljašnjeg ili unutrašnjeg apoptotskog puta (Huang et al., 1992; Yen et al., 2000; Lai et al., 2009; Su et al., 2005).

### 1.3.1. Antraciklini – daunorubicin i doksorubicin

Antraciklini su grupa jedinjenja izolovanih šezdesetih godina dvadesetog veka iz bakterije *Streptomyces peucetius*. Prvo je izolovan daunoubicin, a zatim i doksorubicin, i utvrđeno je da poseduju veliki potencijal za primenu u terapijske svrhe. Doksorubicin se od daunorubicina razlikuje po strukturi bočnog lanca cikloheksanskog prstena. Nakon mnogih istraživanja, i uvođenja ovih jedinjenja u terapiju različitih vrsta kancera, razvijeno je i nekoliko dodatnih polusintetičkih članova grupe antraciklina, kao što su epirubicin, epimer doksorubicina, koji se od njega razlikuje po orijentaciji tercijarne hidroksilne grupe, i iako zadržava antitumorsku aktivnost doksorubicina, manje je toksičan od njega, pretpostavlja se zbog brže eliminacije iz organizma. Idarubicin je još jedan član ove grupe, analog doksorubicina, koji ne sadrži metoksi grupu na aromatičnom prstenu, što dovodi do promene polarnosti molekula u odnosu na ostale antracikline, odnosno povećava se lipofilnost molekula (Slika 1.4.)(Cortés-Funes i Coronado, 2007).

Doksorubicin je jedan od najčešće upotrebljivanih hemoterapeutika, i koristi se u lečenju karcinoma dojke, pedijatrijskih tumora, sarkoma i limfoma. Daunorubicin je godinama upotrebljavan u različitim protokolima terapije kancera, ali je, nakon razvoja boljih lekova, njegova upotreba trenutno ograničena na tretman akutnih limfoblatičnih i mijeloblastičnih leukemija.



**Slika 1.4.** Strukture daunorubicina (A), doksorubicina (B), epirubicina (C) i idarubicina (D)

Epirubicin se koristi pre svega u terapiji kancera dojke i jajnika, kao i limfoma, i to najčešće u kombinaciji sa drugim terapeutcima. Idarubicin se primenjuje kao deo primarne indukciono terapije kod akutne mijeloidne leukemije.

### 1.3.2. Mehanizmi dejstva antraciklina

Mehanizmi dejstva prirodnih i polusintetičkih antraciklina su plejotropni, i još uvek nisu potpuno istraženi. Pretpostavlja se da obuhvataju, u zavisnosti od jedinjenja, sve ili neke od sledećih mehanizama: alkilovanje DNK molekula, interkalaciju molekula DNK i inhibiciju sinteze makromolekula, unakrsno povezivanje molekula DNK, stabilizaciju kompleksa DNK-topoizomeraza II, što indukuje apoptozu, ometanje dejstva helikaza, kao i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, dovodeći do oštećenja molekula DNK ili lipidne peroksidacije. Takođe, pošto antraciklini ulaze u ćeliju pasivnom difuzijom kroz ćelijsku

membranu, moguće je i da deluju direktno na membranu (Cortés-Funes i Coronado, 2007; Press et al., 2011).

Stabilizacija kompleksa DNK molekula i topoizomeraze II se u literaturi navodi kao najznačajniji mehanizam delovanja antraciklinskih antibiotika. Topoizomeraza II je enzim odgovaran za uvođenje dvolančanih prekida u molekulu DNK sečenjem fosfodiesteraskih veza, razmotavanje molekula, nakon čega ovaj enzim ponovo spaja krajeve molekula. Aktivnost topoizomeraza je strogo regulisana u ćeliji u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa, pošto igra ključnu ulogu u transkripciji, replikaciji i organizaciji hromatina u ćelijskom nukleusu. Za njegovu katalitičku aktivnost su neophodni ATP i  $Mg^{2+}$  joni.

Antraciklini zaustavljaju ovu reakciju u trenutku kada je molekul DNK vezan za tirozinski ostatak topoizomeraze II, sprečavajući ponovnu ligaciju krajeva DNK. Daunorubicin i doksorubicin se vezuju preko malog žljeba DNK, pri čemu se prstenovi B i C planarnog sistema prstenova preklapaju sa susednim bazama, dok prsten D prolazi kroz mesto interkalacije (Patel, 1981). Drugi ostaci molekula, uključujući i prsten A, koji ne interkalira, verovatno imaju ulogu u stabilizaciji čitavog kompleksa. Ovako izazvane lezije molekula DNK dovode do zastoja u G1 i G2 fazi ćelijskog ciklusa, i indukciji apoptoze (Gruber et al., 2005).

Iako antraciklini imaju širok spektar primene u terapijama kancera, primećeno je da samo određeni broj pacijenata ima dobar odgovor na terapiju. Zbog ovoga je jedan deo istraživanja usmeren na traženje biomarkera za primenu antraciklina, i jedno od prvih zapažanja je bilo da samo oni kanceri dojke koji su HER2 pozitivni, odnosno imaju povišenu ekspresiju HER2 receptora, imaju korist od antraciklinske terapije. Daljim istraživanjima je utvrđeno da amplifikacija HER2 nije sama po sebi ključna za senzitivnost na ovaj vid terapije, već je gen za topoizomerazu II $\alpha$  lociran na hromozomu 17, u neposrednoj blizini *her2* gena, tako da dolazi do koamplifikacije oba gena. Ovi podaci kao i podaci da HER2-pozitivni kanceri kod kojih nije nađena amplifikacija gena za topoizomerazu II ne reaguju na terapiju antraciklinima, zajedno potvrđuju da interakcija sa topoizomerazom II predstavlja bar jedan vid mehanizma dejstva ovih jedinjenja (Press et al., 2011; Almeida et al., 2014).

Međutim, jedan deo istraživanja je pokazao i da citotoksičnost antraciklina nije zavisna isključivo, a možda ni u najvećoj meri, od stabilizacije topoizomeraze II, i da se apoptoza može indukovati antraciklinima čak i kad njihova interakcija sa topoizomerazom II nije moguća. Smatra se da ovaj mehanizam zavisi od tipa malignih ćelija, odnosno tipa kancera na koji jedinjenja deluju, kao i da može zavisiti od lokusa na kome se dešava ova interakcija (Gruber et al., 2005; Almeida et al., 2014).

Drugi veoma bitan mehanizam dejstva antraciklina, najviše proučavan na doksorubicinu, je uz pomoć produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Doksorubicin može biti oksidovan do semihinona, i to je proces u kome učestvuju NAD(P)H-oksidoreduktaze. Stvoreni semihinon je veoma reaktivan, i vrlo brzo može stupiti u reakciju sa kiseonikom, formirajući superoksidni jon i vodonik-peroksid kao produkt reakcije (Gammella et al., 2014; Carvalho et al., 2014). Osim što se stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta smatra mehanizmom citotoksičnog dejstva na maligne ćelije, takođe se smatra i osnovom velike kardiotoksičnosti doksorubicina.

### 1.3.3. Kardiotoksičnost antraciklina

Karakteristično je da se kardiotoksičnost može razviti i godinama nakon prestanka terapije ovim lekom. Međutim, iako se u početku smatralo da navedene reakcije direktno izazivaju oksidativne lezije DNK, studije su pokazale da do stvaranja fiziološki značajnijih količina ovih produkata dolazi samo nakon primene doksorubicina u koncentracijama većim nego što se primenjuju u klinici (maksimalna početna koncentracija u plazmi je 5  $\mu\text{M}$ , dok kumulativna doza uglavnom ne prelazi 500  $\text{mg}/\text{m}^2$ , a kardiotoksičnost najčešće nastaje kod pacijenata kod kojih je kumulativna doza iznosila između 450 – 600  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) (Zhang et al., 2012; Carvalho et al., 2014).

Istraživanja su pokazala da antioksidanti, kao na primer vitamin E, nisu u stanju da spreče kardiotoksičnost izazvanu doksorubicinom, zbog čega su se dalje studije usmerila na druge moguće mehanizme kardiotoksičnosti (Zhang et al., 2012; Octavia et al., 2012; Gammella et al., 2014). Jedna od mogućih reakcija je redukcija karbonilne grupe

doksorubicina, čime se on pretvara u polarniji alkohol, koji se može akumulirati u većoj količini u kardiomiocitima (Gammella et al., 2014).

Zapaženo je da je jedna od prvih karakteristika kardiomiopatije izazvane doksorubicinom abnormalna morfologija mitohondrija. Pokazano je da doksorubicin može da interkalira ne samo u nuklearnu DNK, već i u mitohondrijsku, i to pri koncentracijama primenjivanim u terapiji (Ashley i Poulton, 2009). Takođe, ovaj hemoterapeutik se vezuje za fosfolipid unutrašnje membrane mitohondrija, kardiolipin, i sprečava njegovo učešće u procesu ćelijske respiracije (Carvalho et al., 2014). Epirubicin, antraciklinski antibiotik koji je mnogo manje kardioksičan od doksorubicina, se akumulira u lizozomima i endozomima, a ne u mitohondrijama. Ova istraživanja, kao i morfološke i funkcionalne promene mitohondrija u kardiomiocitima upućuju na zaključak da je produkcija reaktivnih kiseoničnih vrste pre posledica promene ekspresije mitohondrijalnih gena, nego redukcija ili oksidacija doksorubicina (Zhang et al., 2012; Gammella et al., 2014).

Uloga gvožđa u indukciji oštećenja kardiomiocita je takođe dobro proučena i utvrđena. Jedini odobreni lek za prevenciju kardioksičnosti izazvane primenom doksorubicina je deksrazoksan, molekul koji je helator jona gvožđa (Gammella et al., 2014). Mehanizam kojim doksorubicin dovodi do poremećaja homeostaze gvožđa u ćeliji podrazumeva ne direktnu interakciju doksorubicina i jonagvožđa, već interakciju ovog molekula ili njegovih metabolita (pre svega, doksorubicinola), sa regulatornim proteinima gvožđa (*Iron Regulatory Proteins*, IRP-1 i IRP-2) (Octavia et al., 2012; Gammella et al., 2014). IRP-1 i IRP-2 su protein ključni za metabolizam gvožđa u ćeliji, pošto mogu vezivati specifične sekvence u informacionoj RNK feritina i receptora transferina (*iron responsive elements*, IRE). Feritin je odgovoran za vezivanje jona gvožđa u ćeliji, dok je receptor transferina odgovoran za unos tih jona u ćeliju. IRE elementi se nalaze regionima informacione RNK koji se ne translatiraju, i to su sekvence od 30 nukleotida, koje formiraju strukturu ukosnice. Ovakva terciarna struktura omogućava antraciklinima da se specifično vežu u ovim regionima (Canzoneri i Oyelere, 2008).

Vezivanje antraciklina za ove regione RNK može dovesti do smanjivanja IRP-1, a samim tim i do stabilizacije transferina, kao i smanjivanja količine IRP-2, što dovodi do

smanjivanja produkcije gvožđe-vezujućih proteina. Proizvod ovih kompleksnih reakcija je višestruko povećana količina slobodnih jona gvožđa u ćeliji, a samim tim i višestruko povećana produkcija kardiotoksičnih reaktivnih kiseonočnih vrsta (Octavia et al., 2012; Zhang et al., 2012; Gammella et al., 2014).

### 1.3.4. Rezistencija na antraciklinsku terapiju

Pored neželjenih efekata do kojih dolazi nakon primene antraciklinskih antibiotika u terapiji kancera, veliki problem predstavlja i rezistencija na hemoterapiju. Rezistencija može biti primarna ili stečena, nakon početnog odgovora na terapiju. Mehanizmi rezistencije se dele na one koji ometaju isporuku hemoterapeutika do tumorskih ćelija, kao i oni mehanizmi, najčešće genetske i epigenetske promene, koji dovode do smanjenja osetljivosti samih tumorskih ćelija na primenjeni hemoterapeutik (Gottesman et al., 2002; Perez, 2009).

Jedan od mehanizama je povećana ekspresija transportera koji učestvuju u efluksu različitih supstanci iz ćelije. Ovi proteini pripadaju porodici ATP-vezujućih transportera (ABC), od kojih je za rezistenciju u kancer ćelijama najbitniji ABCB1 (MDR-1 ili P-gp) transporter, ABCC1 (MRP-1) i ABCG2 (BCRP, *Breast Cancer Resistance Protein*). P-gp je efluks transporter čija uloga je najbolje okarakterisana u indukciji rezistencije na hemoterapeutike, i posebno na doksorubicin. Ovo je transmembranski protein veličine 170 kDa, sa dvanaest transmembranskih domena, sa dva ATP-vezujuća domena. Pokušano je da se klinički primeni kombinatorna terapija antraciklina sa dva blokatora ovog kanala, verapamilom, i imunosupresivnim jedinjenjem, ciklosporinom A, međutim, ova vrsta terapije nije dala zadovoljavajuće rezultate. Novija istraživanja su pokazala da je deregulacija određenih mikro RNK odgovorna za povećanje ekspresije P-gp, pa je se i to razmatra kao mogući mehanizam poboljšavanja terapije, odnosno smanjivanja rezistencije na antracikline (Gottesman et al., 2002; Perez, 2009; Bao et al., 2012).

Ćelije tumora koje steknu rezistenciju na hemoterapeutike su često one koje su razvile sposobnost prelaska na anaerobni vid ćelijske respiracije, odnosno prilagodile se na

hipoksične uslove. Pokazano je da je hipoksija u tumorskom tkivu loš prognostički parameter, i hipoksični tumori su uglavnom agresivniji i invazivniji (Song et al., 2006;Perez, 2009).

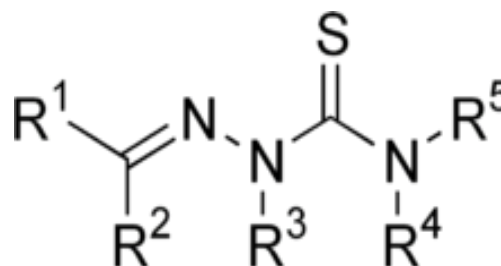
Mehanizam koji dovodi do razvoja rezistencije na antracikline uključuje povećanu ekspresiju HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible transcription factor*), koji reguliše ekspresiju velikog broja gena. Jedna od posledica povećane ekspresije HIF-1 $\alpha$  je i efikasnija reparacija lezija DNK, što sprečava maligne ćelije da uđu u proces apoptoze. Kombinovana terapija antraciklinima sa nekim jedinjenjem koje bi uticalo na HIF-1 $\alpha$  signalni put je moguće rešenje ovog vida rezistencije (Song et al., 2006; Sullivan et al., 2008; Broxterman et al., 2009).

## 1.4. Tiosemikarbazoni

Tiosemikarbazoni (slika 1.5.) predstavljaju grupu farmakofora, iminskih derivata, koji sadrže atom sumpora, i njihova sinteza uključuje reakciju aldehida ili ketona sa tiosemikarbazidima. Istraživanja njihovih bioloških aktivnosti su započeta još pedesetih godina prošlog veka, kada je ispitivana njihova potencijalna primena u tretmanu tuberkuloze i lepre (Pelosi, 2010). Ova grupa jedinjenja je pokazala dobru aktivnost kao antiviralni agensi, pošto imaju sposobnost inhibicije virusnih ribonukleotid reduktaza, i to u manjim dozama nego što je potrebno za inhibiciju sisarskog enzima, a takođe je i pokazano da u kombinaciji sa aciklovirom poboljšavaju njegovo dejstvo prema herpes virusu (Wnuk i Robins, 2006). Oni takođe poseduju i antibakterijsko dejstvo, opisano za veliki broj članova ove grupe (Cocco et al., 2002; El-Sharief et al., 2013), kao i antifungalno dejstvo (Opletalová et al., 2008). Ono što čini ove farmakofore izuzetno zanimljivim za istraživanja je njihovo izraženo citotoksično i antiproliferativno dejstvo.

Jedno jedinjenje iz ove grupe, 3-aminopiridin-2-karboksaldehid tiosemikarbazon, je trenutno u fazi kliničkih ispitivanja kao novi lek u terapiji nekoliko tipova kancera (Nutting et al., 2009). Antitumorska aktivnost ovih jedinjenja je raznolika, i zavisi od tipa malignih ćelija na kojima se ispituju, što govori u prilog dobroj selektivnosti jedinjenja. Osnovni mehanizmi dejstva opisani u dosadašnjoj literaturi obuhvataju inhibiciju ribonukleotid reduktaze, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, inhibiciju topoizomerase II, kao i inhibiciju efluks transportera, P-glikoproteina (P-gp, MDR-1) (Pelosi, 2010).

Najbitnija osobina tiosemikarbazona je njihova sposobnost helacije jona metala, pre svega jona gvožđa. Ribonukleotid reduktaza je enzim sastavljen iz dve subjedinice, R1 i R2. R1 sadrži



Slika 1.5. Tiosemikarbazon.

R - različiti supstituenti



politiole, a R2 jon gvožđa i slobodni tirozil-radikal. Obe subjedinice formiraju aktivno mesto enzima, i njegova aktivnost zavisi od jona gvožđa. Funkcija ovog enzima je redukcija riboze u dezoksiribozu uz pomoć tirozil-radikala. Inhibicija ribonukleotid reduktaze dovodi do zaustavljanja ili usporavanja sinteze DNK, i samim tim zaustavljanje ćelijskog ciklusa u S fazi. Iako i samo helacija jona gvožđa iz ćelijske sredine može sprečiti nekontrolisane deobe ćelije, tiosemikarbazoni inhibiraju ovaj enzim i produkcijom slobodnih kiseoničnih vrsta (ROS), koje zatim stupaju u interakciju sa tirozinskim ostatkom ribonukleotid reduktaze i nhibiraju njeno dejstvo. Produkcija ROS-a je takođe posledica formiranja gvožđe-tiosemikarbazon kompleksa, i njegove redukcije (Pelosi, 2010; Nutting et al., 2009; Dilworth i Hueting, 2012).

Kao i antrahinoni, i tiosemikarbazoni poseduju planarnu strukturu, koja im omogućava interkalaciju u molekul DNK, kao i interakciju sa kompleksom topoizomeraze II, i pokazano je da inhibitorna aktivnost različitih derivata tiosemikarbazona u pozitivnoj korelaciji sa antiproliferativnim potencijalom tih jedinjenja na malignim ćelijskim linijama (Huang et al., 2010). Postoje dve kategorije inhibitora topoizomeraze II – TopII otrovi i katalitički inhibitori. I dok otrovi topoizomeraze II, u koju grupu spadaju antrahinoni, stabilizuju kompleks DNK i enzima, time sprečavajući ponovnu ligaciju DNK, katalitički inhibitori mogu biti uključeni u bilo koji korak katalitičkog ciklusa ovog enzima. Podaci iz literature pokazuju da u zavisnosti od tipa ispitivanog derivata kao i od tipa maligne ćelije odnosno kancera na kome se vrši ispitivanje, tiosemikarbazoni mogu ili da stabilizuju kompleks DNK i topoizomeraze II (Chen et al., 2004), ili da direktno interaguju sa ATPaznim domenom enzima, što dovodi do zaustavljanja hidrolize ATP-a, koja je neophodna za funkciju topoizomeraze II (Huang et al., 2010). Bez obzira na specifičnosti dejstva pojedinačnih derivata, inhibicija topoizomeraze II tiosemikarbazonima dovodi do blokade prolaska kroz ćelijski ciklus maligne ćelije, što za posledicu ima apoptozu tih ćelija (Nutting et al., 2009;Pelosi, 2010).

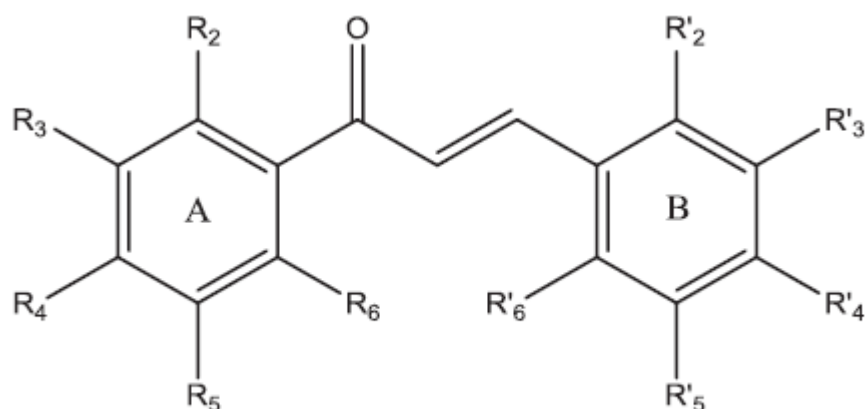
MDR-1 (*multidrug resistance protein*) je efluks transporter je član ABC familije transportera, najčešće opisivani u literaturi kao odgovoran za rezistenciju malignih ćelija na širok spektar hemoterapeutika. Tiosemikarbazoni imaju sposobnost inhibicije ovog proteina, i pokazano je da je citotoksičnost prema malignim ćelijama u direktnoj korelaciji sa

stepenom ekspresije MDR-1. Ova grupa jedinjenja utiče na smanjenje ekspresije MDR-1, tako da i ćelije koje su prethodno stekle rezistenciju mogu ponovo postati osetljive na hemoterapeutike (Ludwig et al., 2006; Huang et al., 2010).

Tiosemikarbazoni takođe imaju sposobnost da sa dodatnim farmakoforama daju tautomerne forme. Tautomeri su izomeri jednog jedinjenja koji se razlikuju po poziciji protona i elektrona. Tautomerni oblik zavisi od pH sredine, temperature i solventa. Ovo je značajno zato što je poznato da se zbog izmenjenog metabolizma pH vrednost unutar kancer ćelije razlikuje od normalne ćelije, a i moguće je da postojanje tautomernih oblika doprinosi poboljšanju antitumorskog efekta nekog jedinjenja (Sitzmann et al., 2010; Marković et al., 2013).

### 1.5. Halkoni

Halkoni su grupa jedinjenja prisutnih u biljkama, voću, začinskom bilju, i čajevima i predstavljaju prekursore flavonoida i izoflavonoida (Slika 1.6.). Sastoje se od otvorenog lanca flavonoida gde su dva aromatična prstena povezana preko  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog sistema (1,3-difenil propenon). Halkoni mogu biti prirodni ili sintetički, i pokazano je da poseduju različite biološke efekte, i to antioksidativni, antibakterijski, antimalarijski, antiviralni, antihiperглиkemijski i antitumorski efekat. Smatra se za je antibakterijski efekat odgovorno prisustvo reaktivnog  $\alpha,\beta$ -nezasićenog karbonilnog fragmenta u molekulu halkona, i u zavisnosti od vrste i pozicije supstituenata na aromatičnom prstenu, stepen antibakterijske aktivnosti može biti izmenjen (Gafner et al., 1996). Značajno antimalarijsko dejstvo *in vitro* i *in vivo* je pokazano kod halkona izolovanog iz korena kineskog sladića. Ovo jedinjenje, kao i njegovi derivati, pokazuju snažnu inhibitornu aktivnost prema *Plasmodium falciparum*, slabu toksičnost za organizam, i selektivnost prema parazitima koji su razvili rezistenciju na druge terapeutike (Chen et al., 1997; Tadigoppula et al., 2013).



**Slika 1.6.** Halkoni. R, R' - supstituenti

Lišmanija je teška bolest koju izaziva protozoa iz roda *Leishmania*, a prenosi se preko komaraca, često na pse a zatim i na ljude. Nekoliko halkonskih derivata je pokazalo odlično dejstvo protiv uzročnika ove bolesti, i smatra se da mehanizam dejstva uključuje inhibiciju fumarat reduktaze, koja je prisutna u mitohondrijama protozoa. Hidrofilni halkoni, kao i oni kod kojih je kao supstituent uvođen hinolinski prsten, su pokazali najznačajniju aktivnost (Liu et al., 2003). Halkoni su se pokazali i kao dobri antiinflamatorni agensi. Ksantohumol izolovan iz hmelja i njegovi derivati inhibira aktivaciju NF-κB i sprečava aktivaciju nizvodne signalne kaskade. Pokazano je takođe i da male strukturne promene mogu dovesti do značajnih razlika u efektu derivata halkona, kao i da supstance koje imaju dobar antiinflamatorni efekat, često imaju slabiji citotoksični efekat na malignim ćelijama, i obrnuto (Vogel et al., 2010). Ispitivanje antiviralne aktivnosti derivata halkona sa različitim supstituentima je davalo raznolike rezultate, međutim smatra se da halkoni koji poseduju hidroksi ili metoksi grupu, i to pogotovo prstenu B ili na C4 poziciji prstena A, pokazuju bolje antiviralno dejstvo prema nizu virusa. Derivat ksantohumola je pokazao aktivnost čak i prema HIV-1 soju virusa (Nowakowska, 2007).

Antitumorsko dejstvo brojnih derivata halkona je dobro opisano u literaturi, a mehanizmi dejstva na maligne ćelije su brojni, i zavise pre svega od od broja i pozicije hidroksi i metoksi grupa na A i B prstenu halkona. Neki od osnovnih mehanizama su indukcija apoptoze i interakcija sa mitohondrijskom membranom koja dovodi do promene potencijala te membrane (Boumendjel et al, 2008). Drugi mehanizmi uključuju sprečavanje polimerizacije tubulina, inhibiciju kinaza, i indukciju autofagije ili nekroze.

Poznato je i da bazni halkoni najviše, ali i jedan broj ostalih članova ove grupe, poseduju potencijal modifikacije aktivnosti ABC transportera. Ovo se pre svega odnosi na sposobnost inhibicije P-gp i BCRP proteina. Stepem lipofilnosti određenog jedinjenja, odnosno veličina hidrofobne površine molekula, smatra se, određuje i stepen interakcije sa P-gp transporterom. Ovo govori u prilog tome da hidrofobne površine direktno učestvuju u ovoj interakciji. Halkoni poseduju ovo dejstvo već u nanomolarnim koncentracijama (Liu et al., 2008; Parveen et al., 2014).

Neki halkoni mogu delovati kao inhibitori MDM2-p53 interakcije, dovoditi do zastoja u G2/M fazi ćeliskog ciklusa i posledično do apoptoze malignih ćelija. Pokazano je da mogu uticati na povećanje ekspresije p21 i p27, kao i na inhibiciju ekspresije ciklina A, B i Cdc2. Detaljan mehanizam ovih koji dovodi do ovih efekata nije poznat (Hsu et al., 2006).

Više istraživanja je pokazalo i da halkoni i flavonoidi mogu uticati na inhibiciju angiogeneze. Jedno od ovih jedinjenja je i ksantohumol, koji u mikromolarnim koncentracijama dovodi do redukcije neoangiogeneze. Ovo i druga jedinjenja inhibiraju NF- $\kappa$ B i Ant signalne puteve, smanjuju produkciju VEGF (vaskularni endotelijalni faktor rasta), kao i produkciju matriksnih metaloproteinaza, a samim tim i migraciju i invaziju malignih ćelija u okolna tkiva. Zbog širokog spektra pokazanih i mogućih efekata halkona na maligne ćelije, ova grupa jedinjenja se smatra izuzetno obećavajućom za razvoj i primenu u klinici (Boumendjel et al, 2008; Mojzis et al., 2008).

### **2. Ciljevi istraživanja**

Osnovni cilj ove teze je ispitivanje antitumorskog dejstva i molekularnih mehanizama grupe od trinaest jedinjenja, derivata antrahinona, dizajniranih tako da im se poboljša aktivnost i specifičnost u odnosu na prirodne i polusintetičke derivate. Devet jedinjenja ove serije predstavljaju antrahinonske tiosemikarbazone, dok su preostala četiri antrahinonski derivati koji sadrže halkonski i imino fragment. Ciljevi ove doktorske disertacije obuhvataju:

- Određivanje *in vitro* citotoksičnog dejstva derivata antrahinona prema sedam malignih ćelijskih linija poreklom iz različitih tipova kancera, kao i određivanje selektivnost u nivou toksičnog dejstva uz pomoć eksperimenata na uspostavljenoj liniji normalnih humanih ćelija.
- Određivanje tipa ćelijske smrti tretiranih malignih ćelija morfološkim analizama, odnosno bojenjem fluorescentnim bojama, pošto je veoma bitno da jedinjenja koja će potencijalno biti korišćena u kliničkoj praksi izazivaju apoptozu kod ciljnih ćelija.
- Analizu distribucije malignih i normalnih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana ispitivanim supstancama, radi razumevanja mehanizama dejstva derivata antrahinona.
- Određivanje ciljnih kaspaza, da bi se utvrdilo preko kog signalnog puta se indukuje apoptoza u ciljnim ćelijama.
- Provera potencijala sprečavanja metastaziranja, bitne sposobnosti antitumorskih agenasa, uz pomoć želatinske zimografije.
- Ispitivanje uticaja derivata antrahinona na neoangiogenezu i invazivnost malignih ćelija korišćenjem *Tube formation assay*-a i *Wound healing assay*-a.

### **3. Materijal i metode**

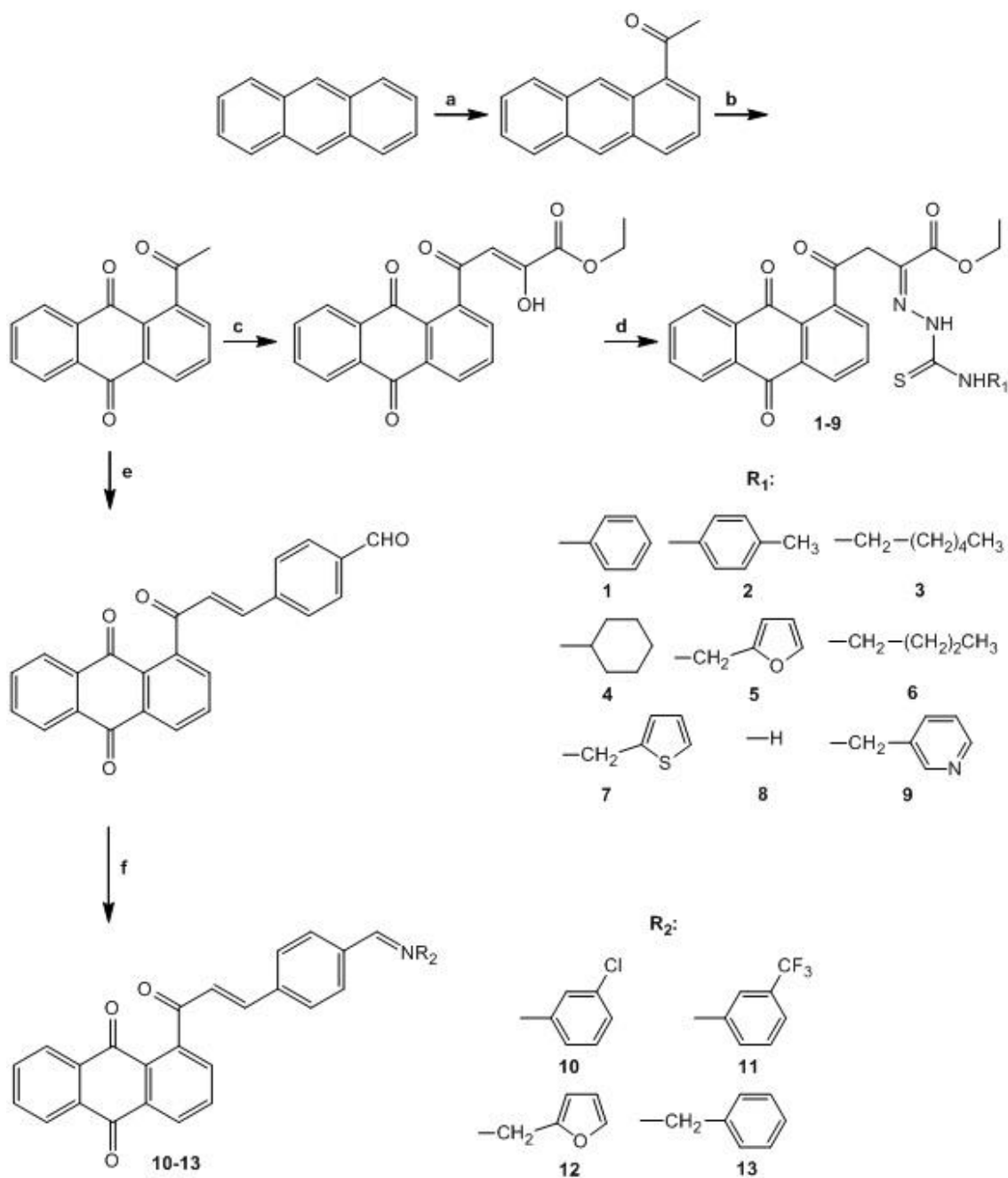
#### **3.1. Ispitivani derivati antrahinona**

Seriya navedenih derivata antrahinona ispitivana u ovom radu, dizajnirana je i sintetisana na Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Proces sinteze antrahinonskih derivata započet je acetilovanjem komercijano dostupnog antracena, i u prvoj fazi se pomoću acetyl-hlorida dobija 1-acetilantracen, koji se zatim oksiduje do 1-acetilanttrahinona hrom(IV) oksidom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Daljom serijom reakcija, dobijen je, sa jedne strane, antrahinonski estar, koji je korišćen prilikom sinteze serije antrahinonskih tiosemikarbazona, a paralelnim sintetičkim putem, kondenzacijom 1-acetilanttrahinona sa tereftalaldehidom, a zatim i reakcijom sa serijom različitih amina, se došlo do sinteze grupe antrahinonskih halkona koji sadrže imino-grupu (Slika 3.1.) .

Detaljne eksperimentalne procedure sinteze ispitivanih jedinjenja su publikovane u dva naučna rada (Marković et al., 2013; Kolundžija et al., 2014). U tabeli 3.1. su prikazani hemijski nazivi i strukturne formule ispitivanih jedinjenja.

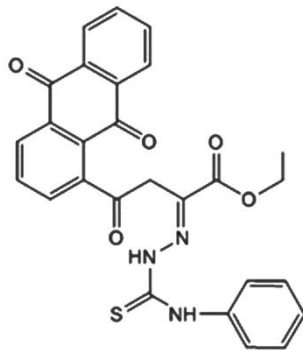
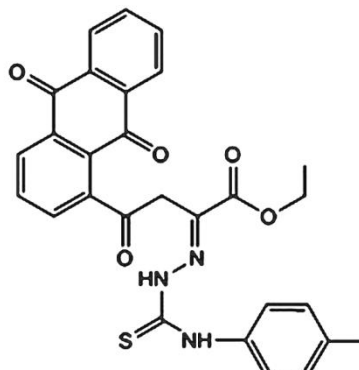
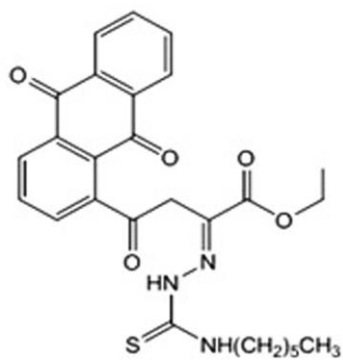
## Materijal i metode



**Slika 3.1.** Reagensi i uslovi: a)  $\text{CH}_3\text{COCl}$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 h,  $0^\circ\text{C}$ , 5 M HCl; b)  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 5 min refluks,  $\text{H}_2\text{O}$ ; c)  $(\text{COOEt})_2$ , NaOEt, dioksan, 1 h, mešanje, s.t., 2M HCl; d)  $\text{H}_2\text{NHNC}(=\text{S})\text{NHR}_1$ , EtOH, 4 h, refluks; e) tereftalaldehid, NaOH, MeOH, refluks 5 sati; f) primarni amin,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , dioksan, refluks 12-48 sati.

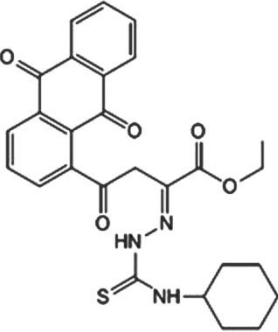
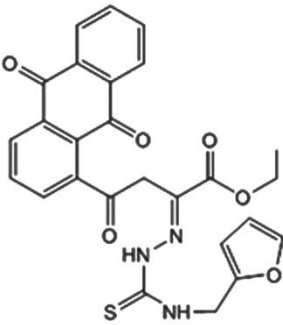
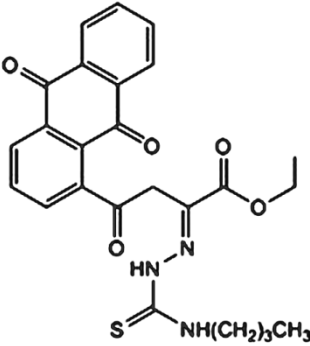
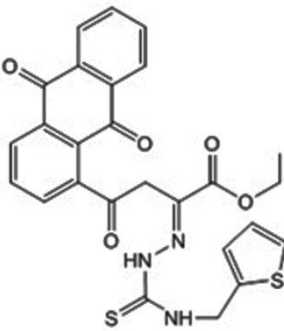
## Materijal i metode

Tabela 3.1. Oznake, nazivi i hemijske strukture ispitivanih jedinjenja

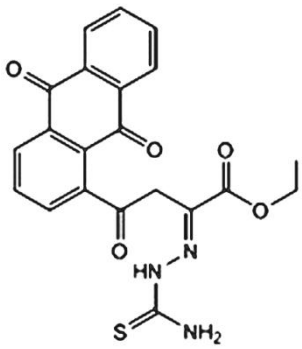
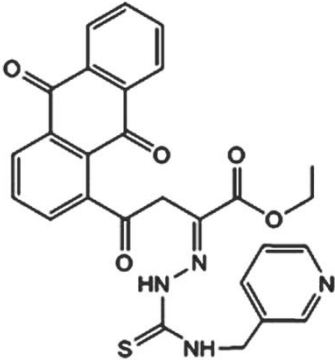
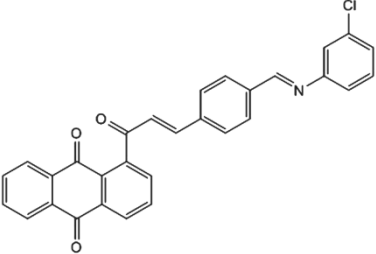
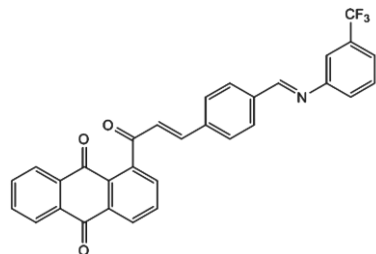
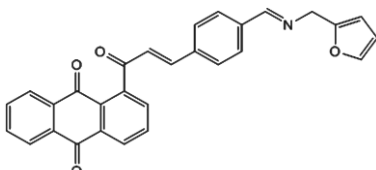
Oznaka jedinjenja	Hemijski naziv jedinjenja	Strukturna formula jedinjenja
1	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(fenilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	
2	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(p-tolilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	
3	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(heksilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	



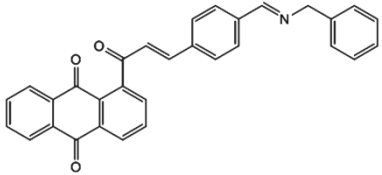
## Materijal i metode

4	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(cikloheksilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	 <p>The structure shows a 9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene core. At the 1-position, there is a butanoate chain. The 4-position of the butanoate is substituted with an ethyl ester group (-COOEt). The 2-position of the butanoate is substituted with a hydrazono group (-NH-NH-), which is further substituted with a cyclohexylamino group (-NH-C6H11).</p>
5	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(2-furanilmetilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	 <p>The structure is similar to compound 4, but the cyclohexylamino group is replaced by a 2-furylmethylamino group (-NH-CH2-C4H3O).</p>
6	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(butilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	 <p>The structure is similar to compound 4, but the cyclohexylamino group is replaced by a butylamino group (-NH-(CH2)3CH3).</p>
7	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-yl)-4-okso-2-(2-(tiofen-2-ilmetilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	 <p>The structure is similar to compound 4, but the cyclohexylamino group is replaced by a 2-thienylmethylamino group (-NH-CH2-C4H3S).</p>

## Materijal i metode

<b>8</b>	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-karbamotioilhidrazono)-butanoat	
<b>9</b>	Etil 4-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-1-il)-4-okso-2-(2-(piridin-3-ilmetilkarbamotioil)hidrazono)-butanoat	
<b>10</b>	1-((E)-3-(4-((3-hlorofenilimino)metil)fenil)akril oil)antracen-9,10-dion	
<b>11</b>	1-((E)-3-(4-((3-trifluorometil)fenilimino)metil)fenil)akril oil)antracen-9,10-dion	
<b>12</b>	1-((E)-3-(4-((2-furanil-metilimino)metil)fenil)akril oil)antracen-9,10-dion	

## Materijal i metode

13	1-((E)-3-(4-((benzilimino)metil)fenil)akriloi l)antracen-9,10-dion	
----	---	--

### 3.2. Čelijske kulture korišćene u eksperimentima

Eksperimetni su vršeni na nizu malignih ćelijskih linija, HeLa, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, K562, A549, i LS174, kao i na nemalignim ćelijskim linijama, MRC-5 i EA.hy926 ćelijama.

HeLa ćelije su izolovane 1951. godine od uzoraka tkiva dobijenog biopsijom vidljive lezije grlića materice pacijentkinje koja ja болоvala od adenokarcinoma cerviksa. Ovo je jedna od najčešće korišćenih malignih linija, pošto je njihova proliferacija izuzetno brza. Ove ćelije su adherentne i u vidu monosloja. HeLa ćelije poseduju niz numeričkih hromozomskih aberacija, sekvencu humanog papiloma 18 (HPV 18), koja je rezultat horizontalnog genskog transfera, kao i aktivnu telomerazu (Macville et al., 1999; Landrz et al., 2013).

MDA-MB-361 i MDA-MB-453 su ćelije poreklom iz adenokarcinoma dojke. MDA-MB-361 je izolovana iz metastatskih mesta u mozgu 40-godišnje pacijentkinje. Broj pojedinačnih autozomnih hromozoma je različit, pri čemu hormozomi 11 i 17 nisu prisutni, dok se hromozomi 2, 8, 9 i 15 nalaze u jednoj kopiji. Povišena je ekspresija Her-2/neu receptora. MDA-MB-453 ćelije eksprimiraju androgeni receptor, dok su u isto vreme ne eksprimiraju estrogenski receptor, receptor za progesteron, kao i Her-2/neu receptor. U ovim ćelijama je takođe povećana ekspresija faktora rasta fibroblasta (FGF)(Hall et al., 1994).

## *Materijal i metode*

---

K562 ćelije su multipotentne, hematopojetske maligne ćelije, poreklom od pacijentkinje obolele od hronične mijeloidne leukemije. Ove ćelije nisu adherentne u kulturi, i pripadaju granulocitnoj seriji.

A549 je ćelijska linija poreklom od adenokarcinoma pluća 58-godišnjeg muškarca. U kulturi formiraju monosloj, i ne zadržavaju strukturne ni funkcionalne karakteristike tkiva iz kog su poreklom. Sintetišu lecitin i sadrže visok nivo nezasićenih masnih kiselina (Balis et al., 1984). U širokoj su upotrebi kao model za ispitivanje metabolizma lekova.

LS-174 ćelije su izolovane iz invazivnog adenokarcinoma kolona. Ove ćelije su adhezivne u kulturi, eksprimiraju c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, Myb, i fos onkogene. Osim toga, negativne su na ekspresiju p53 antigena, ali postoji informaciona RNK ovog gena u ćelijama (Tom et al., 1976).

MRC-5 su ćelije poreklom od normalnog tkiva pluća muškog fetusa starog 14 nedelja, izolovane 1966. godine. Ova ćelijska linija se koristi najčešće u procesu razvoja vakcina, u virologiji kao ciljna ćelija u transfekciji, kao i za *in vitro* testiranje citotoksičnosti supstanci (Jacobs et al., 1970). MRC-5 ćelije su adherentne u kulturi, i morfološki su slične fibroblastima. Sposobne su da prođu kroz 42 do 46 dupliranja populacije pre pojave senescencije.

EA.hy926 ćelijska linija je uspostavljena fuzionisanjem primarnih ćelija izolovanih iz umbilikalne vene i tioguanin-rezistentih A549 ćelija (Edgell et al., 1983). Ove ćelije su izuzetno često korišćene kao model za ispitivanje invazivnosti i potencijala ćelijske migracije.

Sve ćelijske linije su nabavljene direktno od *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države).

### **3.3. Održavanje i pasažiranje ćelijskih kultura**

Kulture ćelijskih linija se održavaju i gaje u inkubatoru na temperaturi od 37°C, u atmosferi koja je obogaćena sa 5% CO<sub>2</sub> i zasićena vodenom parom. Kultura se održava u vidu monosloja (za adherentne ćelijske linije), u polietilenskim sudovima, u hranljivom medijumu (RPMI 1640 ili DMEM). Hranljiva podloga se rastvara u destilovanoj vodi (102 g/ml), uz mešanje na temperaturi 15-20°C. U ove hranljive podloge je pre upotrebe dodato 3mM L-glutamin, 100 mg/ml streptomicina, 100 IU/ml penicilina, 10% goveđeg fetalnog seruma (FCS), inaktivisanog na 56°C, i 25 mM organskog pufera, HEPES. pH vrednost medijuma je podešavana na 7,2 uz pomoć 1N HCl i 1N NaOH.

Sterilizacija hranljive podloge se vrši upotrebom membranskog filtera promera 0,22 mikrona. Pasažiranje, odnosno prenošenje ćelija u svež medijum, se vrši svakih četiri do pet dana, u sterilnim uslovima, da bi se ćelije održale u vidu monosloja. HeLa, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, K562, A549, LS174 i MRC-5 ćelije su gajene u RPMI-1640 potpunom medijumu, dok su EA.hy926 ćelije gajene u DMEM podlozi.

Reagensi za održavanje ćelijskih kultura su nabavljeni od Sigma Chemicals (St. Louis, SAD) a antibiotici koji su dodavani u medijum su proizvodi kompanije Galenika a.d. (Beograd, Srbija).

### **3.4. Priprema ispitivanih supstanci**

Štokovi ispitivanih supstanci su napravljeni na početku istraživanja, zbog izuzetne stabilnosti jedinjenja. Supstance su rastvorene u dimetil-sulfoksidu (DMSO) u koncentracijama od 10 mM ili 2 mM, u zavisnosti od rastvorljivosti supstance. Pre svake postavke eksperimenta, pravljene su sveži radni rastvori supstanci, u kompletnom RPMI

hranljivom medijumu, (RPMI-1640, sa ili bez fenol crvenog), ili u *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM).

### **3.5. Određivanje stepena preživljavanja ćelija – MTT test**

Ispitivane ćelije su zasejavane u ploče sa 96 bunarčića, u finalnom volumenu od 100  $\mu$ l, a u hranljivoj RPMI-1640 podlozi. Za svaku ispitivanu supstancu, eksperimenti su postavljani tri puta, u triplikatu. Broj zasejavanih ćelija je bio 2000 ćelija po bunarčiću za HeLa ćelije, 3000 ćelija po bunarčiću za MDA-MB-453, zatim po 5000 ćelija po bunarčiću za K562, A549 i MRC5 ćelijske linije, a za LS174 i MDA-MB-361 ćelijske linije ovaj broj je iznosio 7000 ćelija po bunarčiću.

24 časa nakon zasejavanja, odnosno nakon omogućavanja ćelijama dovoljno vremena da se zalepe za dno bunarčića (osim u slučaju K562 ćelija koje nisu adherentne), različite koncentracije ispitivanih jedinjenja su dodavane u bunarčiće, osim u ćelije u kontroli, kojima je dodavana samo hranljiva podloga. K562 ćelijama su razblaženja ispitivanih supstanci dodavana 2 sata nakon zasejavanja. Finalne koncentracije ispitivanih jedinjenja u bunarčićima su iznosile 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, i 100  $\mu$ M. Hranljiva podloga sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanih supstanci, ali bez zasejanih ćelija, je korišćena kao blank u ovom eksperimentu. I odgovarajući blank je uvek bio postavljan u triplikatu.

Ovako postavljene ploče su inkubirane 72 sata, nakon čega je efekat jedinjenja ispitivan uz pomoć *microculture tetrazolium test-a* (MTT), u skladu sa prethodno uspostavljenom metodom (Mosmann 1983; Ohno i Abe, 1991). 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid je žuta tetrazolijumska so, rastvorljiva u vodi, koja prolazi kroz ćelijske i mitohondrijalne membrane. 20  $\mu$ l rastvora ove soli (5 mg/ml u PBS-u) je, nakon 72 sata inkubacije ćelija sa odgovarajućim jedinjenjima, dodavano po jednom bunarčiću ploče. Uzorci su zatim vraćani na dodatnu inkubaciju na 37°C sledeća četiri sata.

## *Materijal i metode*

---

Nakon ovoga, dodavano je 100  $\mu$ l 100g/l natrijum dodecil sulfata (10% SDS), da bi se rastvorio formazan koji stvaraju žive ćelije u procesu konverzije MTT boje. Broj vijabilnih ćelija u svakom bunarčiću je proporcionalan intenzitetu apsorpcije, koji se utvrđivao uz pomoć ELISA čitača (ELISA plate reader), na talasnoj dužini od 570 nm. MTT i SDS su nabavljeni od kompanije Sigma Aldrich (St. Louis, SAD).

Ćelijsko preživljavanje (%) se izračunava tako što se apsorbance uzoraka sa slepom probom, ( $A_s$ ), oduzima od apsorbance uzoraka sa tretiranim ćelijama ( $A_t$ ), pomnoži sa sto, i zatim podeli sa apsorbancom kontrole, ( $A_K - A_s$ ).

$$S (\%) = (A_t - A_s) \times 100 / (A_K - A_s)$$

IC<sub>50</sub> je definisana kao koncentracija ispitivanog agensa koja dovodi do 50% inhibicije preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu. Kao pozitivne kontrole su korišćeni cis-diaminodihloroplatina (u daljem tekstu: cisplatina), citostatik koji je u upotrebi za tretman velikog broja različitih tipova kancera, i doksorubicin, iz grupe antrahinona, koji je takođe u širokoj upotrebi kao citostatik.

### **3.6. Morfološka analiza ćelijske smrti**

Akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) bojenje je metoda kojom je moguće na fluorescentnom mikroskopu razlikovati žive od apoptotskih i nekrotičnih ćelija.

Akridin oranž (AO) je katjonska boja koja boji žive i rano apoptotske ćelije, odnosno sve ćelije kod kojih je očuvan integritet membrane. Ona interaguje sa DNK i RNK pseudointerkalacijom i elektrostatičkim privlačenjima, i ulazi u kisele odeljke ćelije gde postaje protonizovana, i na ovaj način boji nukleus u zelenu boju. Žive ćelije i ćelije u ranoj fazi apoptoze se razlikuju po tome što se kod ćelija u ranoj fazi apoptoze može uočiti karakteristična kondenzacija hromatina, i promena oblika nukleusa. Sledeću fazu odlikuje

fragmentacija nukleusa i stvaranje ispupčenja na površini membrane, a finalno dolazi do fragmentacije ćelije i nastanka apoptotskih tela.

Etidijum bromid (EB) boji ćelije čiji je membranski integritet narušen, to jest kasno apoptotske i nekrotične ćelije. Ovo je interkalirajući agens, aromatično jedinjenje, koje ne može da prođe kroz membranu živih ćelija. Iako je ovo jedinjenje fluorescentno i njegovu fluorescenciju je uvek moguće uočiti nakon izlaganja ultraljubičastom svetlu, njegova fluorescencija se povećava skoro dvadeset puta nakon vezivanja za molekul DNK. Etidijum bromid može bojiti jedino ćelije čiji je integritet membrane narušen, što znači ćelije kod kojih dolazi do primarne ili sekundarne nekroze. Nekrotične ćelije u ovom eksperimentu odlikuje postojanje dobro očuvanog nukleusa, koji je narandžasto obojen, i tek u kasnijim fazama nekroze dolazi do njegove dezitengracije i ispuštanja sadržaja.

HeLa ćelije su zasejavane na pokrovne pločice u ploči sa 6 bunarčića, u gustini od 50000 ćelija po bunarčiću. Nakon 24 sata dodavane su ispitivane supstance, i to u  $IC_{50}$  i  $2xIC_{50}$  koncentracijama svake supstance. Ove koncentracije su izračunate iz rezultata dobijenih MTT testom. Nakon narednih 24 h inkubacije na  $37^{\circ}C$ , mikroskopske pločice su bojene smešom akridin oranža (finalna koncentracija  $1,5 \mu g/ml$ ) i etidijum bromida ( $5 \mu g/ml$ ) i fotografisane na Carl Zeiss PALM MicroBeam sa Axio Observer.Z1 fluorescentnom mikroskopu, uz korišćenje AxioCam MRm (filters Alexa Fluor 489 and Alexa Fluor 546).

### **3.7. Analiza faza ćelijskog ciklusa**

Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je određivana uz pomoć protočne citofluorimetrije, korišćenjem propidijum jodida (metoda prilagođena iz Kalejta et al., 1997). Ćelije su zasejavane u 6-well ploče, i to po  $2,5 \times 10^5$  ćelija po bunarčiću, i inkubirane sa ili bez ispitivaih supstanci, u  $IC_{50}$  i  $2xIC_{50}$  koncentracijama ispitivanih jedinjenja, tokom 24, 48 ili 72 sata. U kontrolne uzorke dodavan je kompletni RPMI medijum. Nakon tretmana, ćelije su sakupljane tripsinizacijom, i fiksirane u hladnom 70%



## *Materijal i metode*

---

etanolu. Nakon najmanje nedelju dana inkubacije na  $-20^{\circ}\text{C}$ , uzorci su centrifugirani na 2000 rpm 10 minuta, ispirani PBS-om, a zatim tretirani RNazom A ( $100\ \mu\text{g/ml}$ ) na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 minuta. Neophodno je uzorke tretirati ovim enzimom, pošto se fluorescentna boja, propidijum jodid, može vezati i za RNK molekule. Nakon toga je dodavan propidijum jodid ( $40\ \mu\text{g/ml}$ ), i uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi najmanje 30 minuta. Propidijum jodid je fluorescentna boja koja interkalira u molekul DNK.

Sadržaj DNK u uzorcima, kao i distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je ispitivan uz pomoć Becton Dickinson FACSCalibur protočnog citometra, pri čemu je propidijum jodid ekscitovan na 488 nm, a intenzitet fluorescencije je detektovan argon-jonskim laserom na FL2 kanalu.

Analiza dobijenih rezultata je vršena uz pomoć softvera CellQuestR (Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD), na najmanje 10,000 ćelija po uzorku.

Ribonukleaza A i propidijum jodid su proizvodi Sigma Aldrich (St. Louis, SAD).

### **3.8. Određivanje ciljnih kaspaza**

Da bi se ispitali signalni putevi odnosno kaspaze koje su uključene u apoptozu izazvanu tretmanom ispitivanim supstancama, određivan je procenat HeLa ćelija u sub-G1 fazi, nakon inkubacije sa inhibitorima kaspaza i određenim jedinjenjem, po metodi Schrantz et al., 1999.

Upotrebljeni su sledeći inhibitori kaspaza: Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze 3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze 8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze 9). Svi ovi inhibitori su nabavljeni od R&D Systems (Mineapolis, SAD), rastvoreni u dimetil-sulfoksidu (DMSO), u koncentraciji od 10mM, i čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. Ovi inhibitori su peptidi koji imaju mogućnost prolaska kroz ćelijsku membranu, i ireverzibilno se vezuju za katalitički centar kaspaza. Na ovaj način se efikasno inhibira apoptoza u ciljnim ćelijama.

## *Materijal i metode*

---

HeLa ćelije su na početku eksperimenta bile inkubirane 2 sata sa specifičnim inhibitorima kaspaza, i to u finalnim koncentracijama od 40  $\mu$ M. Za ispitivanje svake supstance je postavljeno po četiri uzorka, to jest jedan blank i po jedan uzorak za svaki pojedinačni inhibitor kaspaza, kao i kontrolni uzorci. Ćelije su zasejane i inkubirane 24 sata na 37°C.

Posle 24h, ćelijski medijum je zamenjen sa po 1,5 ml svežeg kompletnog RPMI medijuma, sa ili bez specifičnih inhibitora kaspaza, i uzorci su inkubirani naredna dva sata. Nakon početne inkubacije sa inhibitorima kaspaza, u uzorke ćelija je dodavano po 0,5 ml pripremljenih rastvora ispitivanih supstanci, tako da su finalne koncentracije predstavljale 2xIC<sub>50</sub>. Sve koncentracije korišćene u ovom testu su preuzete iz rezultata dobijenih MTT testom. Netretirane HeLa ćelije, bez ili sa inhibitorima kaspaza, su predstavljale kontrole u ovom eksperimentu. Nakon 24 h inkubacije sa ispitivanim supstancama, ćelije su sakupljane tripsinizacijom, i fiksirane u hladnom 70% etanolu. Ovako fiksirane ćelije su inkubirane na -20°C najmanje nedelju dana, a zatim centrifugirane 10 minuta na 2000 rpm, ispirane PBS-om, inkubirane sa RNazom A 30 minuta na 37°C, i na kraju bojene propidijum jodidom, u finalnoj koncentraciji 40  $\mu$ g/ml.

Procenat ćelija u sub-G1 fazi je određivan uz pomoć FACSCalibur protočnog citofluorimetra, a podaci su analizirani korišćenjem CellQuest softvera.

### **3.9. Želatinska zimografija**

Radi ispitivanja dejstva ispitivanih supstanci na ekspresiju matriksnih metaloproteinaza, odnosno potencijala malignih ćelija da metastaziraju, u prvom koraku je određena IC<sub>20</sub> koncentracija (koncentracija supstance koja dovodi do inhibicije preživljavanja za 20%) MTT testom za ispitivane supstance, na 24 sata (Tabela 3.2.). Nakon toga, HeLa ćelije su zasejavane u *6-well* ploče, po 600 000 ćelija po bunarčiću, s tim da je za svaku ispitivanu supstancu zasejavano po dva uzorka. Nakon 24 sata, RPMI-1640 hranjivi medijum je zamenjivan istim medijumom ali bez dodatka FCS-a, i ćelije su dalje

## Materijal i metode

inkubirane sledeća 4 sata. Sledeći korak je bilo dodavanje po 500  $\mu$ l po bunarčiću IC<sub>20</sub> ispitivanih supstanci u RPMI-1640 bez FCS-a. Nakon 24 sata, ćelije su prikupljane mehanički iz bunarčića uz pomoć špatule, da bi se izbeglo oštećenje ćelija izazvano tripsinizacijom, i, zajedno sa supernatantom, uzorci centrifugirani na 2000 rpm 10 minuta. Nakon ovog koraka, talog je odbacivan, a supernatant prikupljan i dalje održavan na -20°C.

**Tabela 3.2.** Koncentracija koja dovodi do inhibicije preživljavanja HeLa ćelija za 20% na 24 sata

Supstanca	IC <sub>20</sub> ( $\mu$ M)	Supstanca	IC <sub>20</sub> ( $\mu$ M)
<b>1</b>	2,3	<b>9</b>	2,2
<b>2</b>	7	<b>10</b>	0,78
<b>3</b>	5	<b>11</b>	0,58
<b>4</b>	3,1	<b>12</b>	0,73
<b>5</b>	3,7	<b>13</b>	2,14
<b>6</b>	5,9		
<b>7</b>	4,5	<b>Cisplatina</b>	11,2
<b>8</b>	12,5	<b>Doksorubicin</b>	0,1

Poliakrilamidni gel (SDS-PAGE) je pravljen uz dodatak želatina, tako da mu je finalna koncentracija u 8% gelu za razdvajanje iznosila 2 mg/ml. Štok želatina je iznosio 20 mg želatina na 1 ml vode sa dodatkom SDS-a finalne koncentracije 1%. Nakon razdvajanja, gelovi su inkubirani u puferu za razvijanje (finalne koncentracije: 50 mM Tris-baza, 50 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, i 0,05% NaN<sub>3</sub> u destilovanoj vodi) na 37°C tokom 48 sati. Dalje su gelovi bojani Coomassie Brilliant Blue bojom i zatim obezbojavani u smeši metanola i 96% sirćetne kiseline (metod adaptiran iz Davies et al., 1993; Woessner 1995)

Sve supstance su nabavljene od kompanije Sigma Aldrich (St. Louis, SAD).

### 3.10. Tube formation assay

Sposobnost ispitivanih supstanci da smanje metastatski potencijal malignih ćelija ispitivana je uz pomoć ove metode, na EA.hy926 ćelijama, za koje je karakteristično da na površini supstanci koje imitiraju ekstracelularni matriks, mogu formirati izdužene tubule, kojima mogu da se povezuju i stvaraju kompleksne mreže.

Za eksperimente je korišćen Matrigel matriksa (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Ovo je smeša proteina koja je izolovana iz EHS mišijeg sarcoma (Engelbreth-Holm-Swarm). Glavne komponente ove smeše su strukturni proteini i faktori rasta. Glavni tip strukturnih proteina koji se mogu naći u Matrigel-u su laminin, enaktin, i kolagen, kao i brojni drugi protein u manjim količinama, zbog čega postoje male varijacije u koncentracijama različitih proteina među serijama proizvoda (Hughes et al., 2010).

**Tabela 3.3.** Koncentracija koja dovodi do inhibicije preživljavanja EA.hy926 ćelija za 20% na 24 sata

Supstanca	IC <sub>20</sub> (µM)	Supstanca	IC <sub>20</sub> (µM)
1	9	8	15
2	10	9	5
3	2	10	5,5
4	10	11	5
5	2	12	4,9
6	5	13	5
7	6		

## *Materijal i metode*

---

Metoda je prilagođena iz Kubota et al., 1988. Dan pre izvođenja eksperimenta, Matrigel je ostavljen da se istopi na ledu preko noći. Nakon ovoga, Matrigel je dodat u bunarčice 24-well ploče, i to po 180  $\mu$ l Matrigel-a po bunarčiću. Ovako naliven Matrigel je inkubiran do 2 h na 37°C da bi se dozvolilo formiranje gela. Nakon inkubacije, suspenzija EA.hy926 ćelija je dodavana, tako da je u svaki bunarčić dodato po  $6 \times 10^4$  ćelija. Nakon kratke inkubacije na 37°C, ispitivana jedinjenja su dodavana tako da su njihove finalne koncentracije odgovarale IC<sub>20</sub> vrednostima za ove ćelije, što je prethodno utvrđeno MTT testom (Tabela 3.3.).

Nakon 24 sata inkubacije, ćelije su fotografisane.

### **3.11. *Scratch (Wound-healing) Assay***

Da bi se utvrdila sposobnost ispitivanih supstanci da inhibišu invazivnost i migratorni potencijal malignih ćelija, ovaj eksperiment je urađen uz pomoć EA.hy926 ćelija. U ovoj metodi, opisanoj u Liang et al. (2007), iskorišćeno je zapažanje da, ako se u konfluentnom monosloju ćelija stvori takozvana „rana“, odnosno prorez, ćelije na ivicama proreza će migrirati i deliti se dok ta „rana“ ne bude zatvorena, i dok se ponovo ne formira monosloj. Ovo je jedna od najjednostavnijih metoda za proučavanje invazivnosti i efekta ispitivanih supstanci na invazivnost *in vitro*, ali koja donekle verno imitira migraciju ćelija *in vivo*, i zato je jedna od prvih tehnika koje se koriste prilikom testiranja i razvoja novih terapijskih jedinjenja.

Ćelije su prvi dan zasejavane u bunarčice 24-well ploče, i to po 70 000 ćelija po bunarčiću, u DMEM medijumu. Kada su ćelije dostigle 80% konfluentnosti, pravljen je rez u sloju ćelija po sredini bunarčića, svaki bunarčić je ispiran sa po 1 ml DMEM-a, a zatim je dodavano po 1 ml razblaženja odgovarajućih ispitivanih supstanci u subletalnim koncentracijama (IC<sub>20</sub>, prethodno određene MTT testom, tabela 2.2.). Ćelije su slikane, uvek isto vidno polje, nakon 0, 24 i 48 sati. Vodilo se računa da dato vidno polje obuhvata napravljeni rez i njegovu okolinu, da bi se pratilo sužavanje ovog reza, odnosno invazivnost

## *Materijal i metode*

---

ćelija. Smanjivanje širine reza je mereno na fotomikrografijama, a zatim je izračunat procenat smanjenja u odnosu na početnu vrednost.

### 4. Rezultati

#### 4.1. Određivanje stepena preživljavanja ćelija

##### 4.1.1. MTT test

Citotoksičnost antrahinonskih derivata je bila ispitivana na 6 malignih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, K562, A549, i LS174 ćelijama), i jednoj normalnoj transformisanoj ćelijskoj liniji (MRC5). Rezultati MTT testa su prikazani kao vrednost  $IC_{50}$ , odnosno koncentracije ( $\mu M$ ) ispitivanih jedinjenja koje dovode do inhibicije preživljavanja ćelija za 50% u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak. Pored novosintetisanih jedinjenja, kao pozitivne kontrole su korišćeni doksorubicin i cisplatina. (Slike 4.1. do 4.7. i Tabela 4.1.).

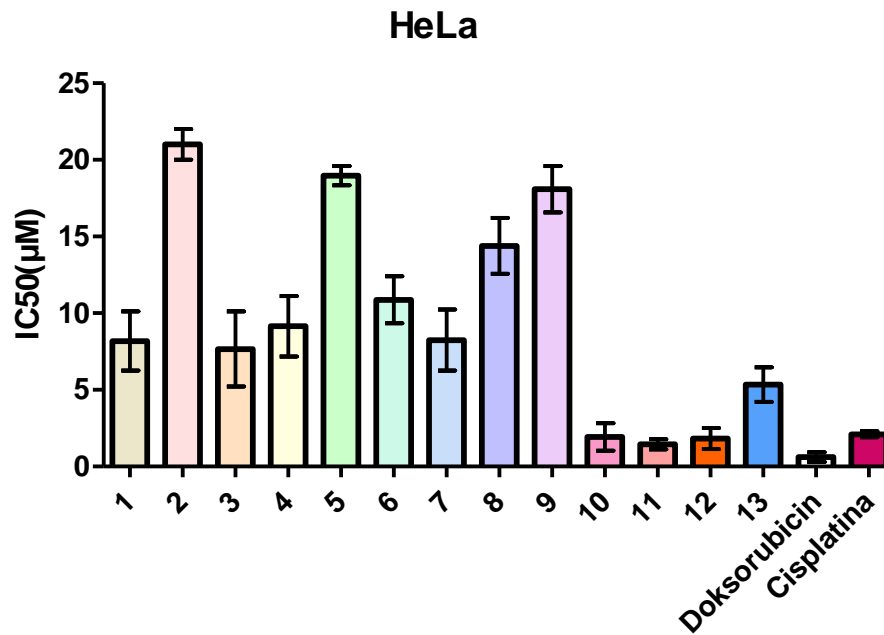
Najjače dejstvo na HeLa ćelijskoj liniji su pokazala jedinjenja **10**, **11** i **12**, (Slika 4.1.), pri čemu su vrednosti  $IC_{50}$  ovih jedinjenja uporedive sa  $IC_{50}$  vrednostima cisplatine. Osim jedinjenja **2**, **5**, **8** i **9**, sve ostale ispitivane supstance na HeLa ćelijama imaju vrednosti  $IC_{50}$  manje od 10  $\mu M$ , što se smatra na osnovu opšte prihvaćenih kriterijuma ustanovljenih od strane Američkog nacionalnog instituta za rak (*National Cancer Institute* (NCI)), izuzetno dobrom aktivnošću.

U poređenju sa HeLa ćelijama, uočena je značajno slabija citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja prema MDA-MB-361 ćelijama, sa izuzetkom jedinjenja **1** i **3**, koje pokazuju citotoksičnu aktivnost dva do tri puta jaču u odnosu na cisplatinu, (Slika 4.2), a neznatno slabiju od aktivnosti doksorubicina. Vrednosti  $IC_{50}$  za **10**, **12** i **13** su takođe uporedive sa vrednostima dobijenim za aktivnost cisplatine na datim ćelijama.

Međutim, na ćelijama drugog tipa kancera dojke, MDA-MB-453, ispitivana jedinjenja su pokazala mnogo bolje dejstvo. Za devet od ispitivanih 13 supstanci,

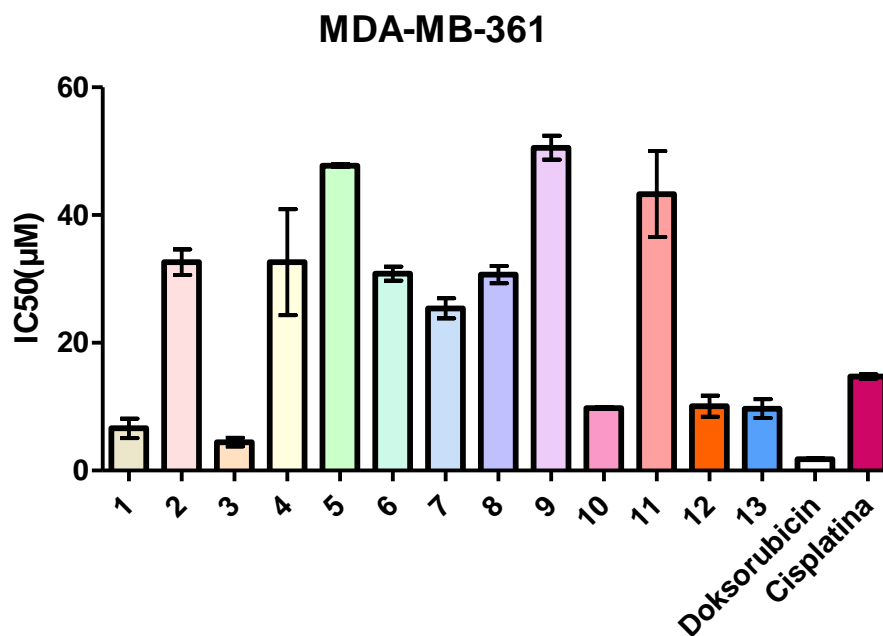
## Rezultati

koncentracija koja dovodi do inhibicije preživljavanja 50% ćelija je manja od te vrednosti za cisplatinu, dok supstance **1**, **4** i **10** imaju  $IC_{50}$  vrednosti manje od 10  $\mu M$ . Za ostala jedinjenja,  $IC_{50}$  vrednosti su u opsegu od 10-20 $\mu M$  (Slika 4.3).

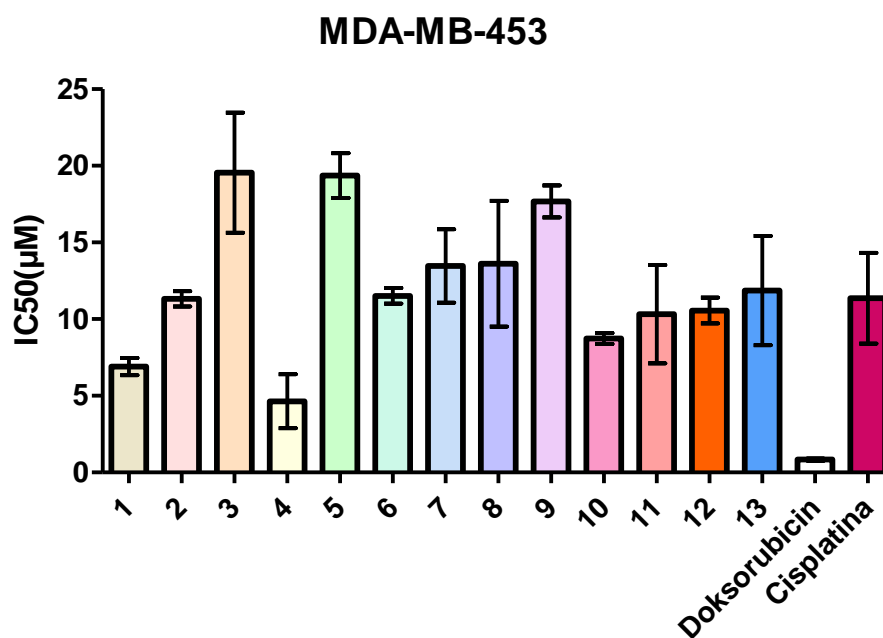


**Slika 4.1.** Vrednosti  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) ispitivanih jedinjenja na HeLa ćelijama

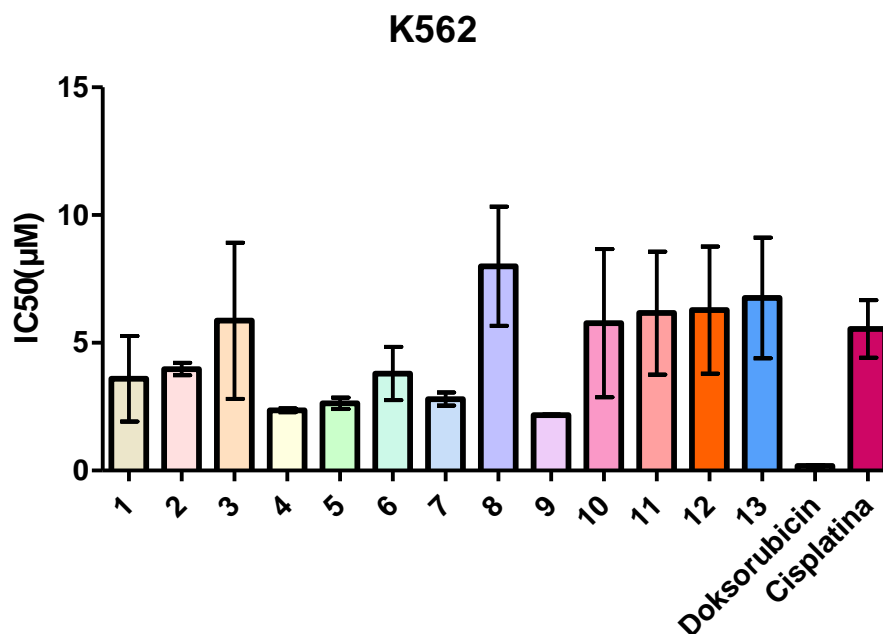




Slika 4.2. Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na MDA-MB-361 ćelijama

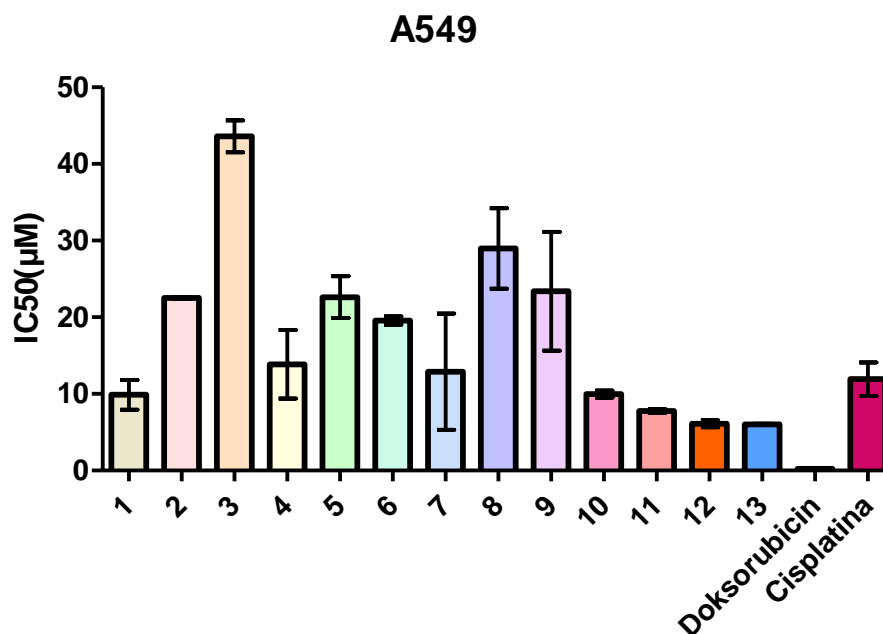


Slika 4.3. Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na MDA-MB-453 ćelijama



**Slika 4.4.** Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na K562 ćelijama

IC<sub>50</sub> vrednosti dobijene na K562, ćelijama mijeloidne leukemije, koje se od ostalih razlikuju po tome što nisu adherentne, se kreću od 2,17 µM do 7,99 µM (Slika 4.4.). Generalni trend je da je najsenzitivnija maligna ćelijska linija je K562, zatim slede HeLa i MDA-MB-453 ćelijske linije. Rezistentnije od njih su A549 i LS174 ćelije, dok je ćelijska linija poreklom iz metastaza kancera dojke, MDA-MB-361, najrezistentija.

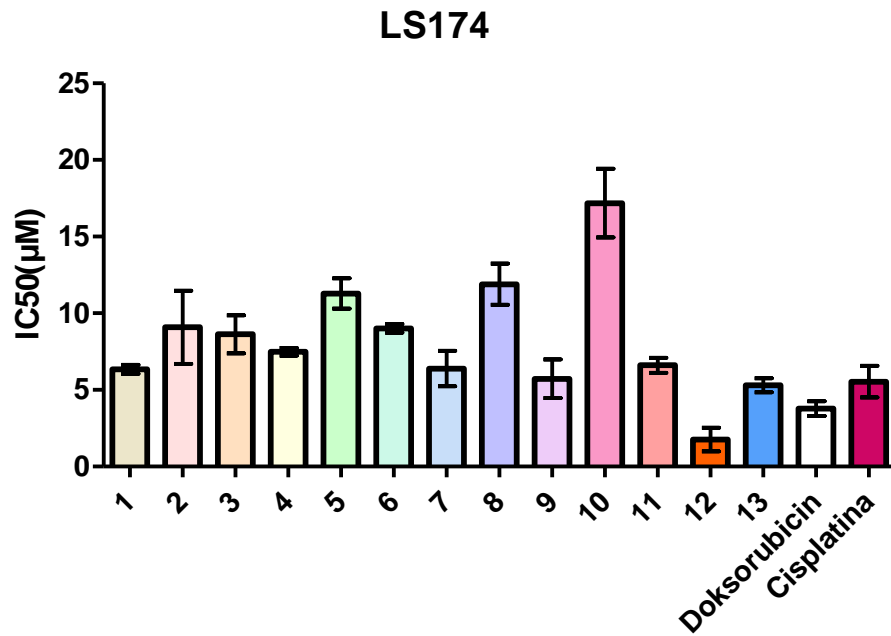


**Slika 4.5.** Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na A549 ćelijama

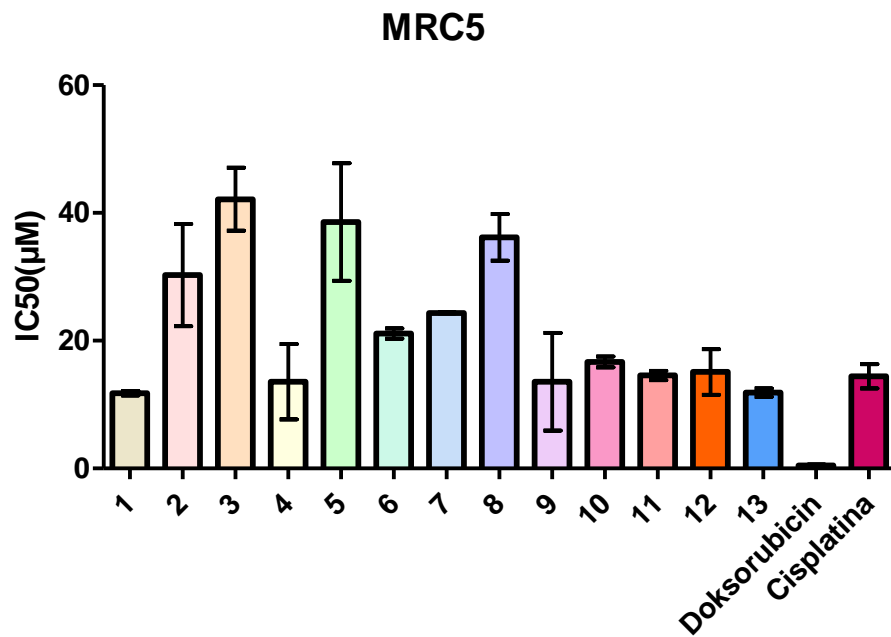
Ispitivana jedinjenja su pokazala umereno citotoksično dejstvo prema A549 ćelijama adenokarcinoma pluća. IC<sub>50</sub> vrednosti za A549 ćelije su u opsegu od 6,01 µM do 43,62 µM. Ipak, najjači citotoksični efekat imala su jedinjenja sa halkonskim ostatkom - **10**, **11**, **12** i **13**, čije su IC<sub>50</sub> vrednosti manje od 10 µM i uporedive sa IC<sub>50</sub> cisplatinе (tabela 4.1., slika 4.5.).

Izuzetno dobro citotoksično dejstvo pokazala su ispitivana jedinjenja prema LS174 ćelijama. Dobijene IC<sub>50</sub> variraju od 1,76 µM do 17,18 µM, a deset od trinaest testiranih jedinjenja imaju IC<sub>50</sub> vrednost manju od 10 µM (Slika 4.6.). Jedinjenje broj **12**, čija vrednost IC<sub>50</sub> iznosi 1,76 µM, je višestruko aktivnija i od cisplatinе, i čak od doksorubicinа.

## Rezultati



Slika 4.6. Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na LS174 ćelijama



Slika 4.7. Vrednosti IC<sub>50</sub> (µM) ispitivanih jedinjenja na MRC5 ćelijama

## Rezultati

**Tabela 4.1.** IC<sub>50</sub> vrednosti (μM) ispitivanih jedinjenja kao i cisplatine i doksorubicina na ćelijskim linijama (Xav±SD, iz najmanje tri nezavisna eksperimenta)

	<b>HeLa</b>	<b>361</b>	<b>453</b>	<b>K562</b>	<b>A549</b>	<b>LS174</b>	<b>MRC5</b>
	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD	IC <sub>50</sub> ± SD
<b>1</b>	8,19 ± 1,93	6,61 ± 1,52	6,91 ± 0,56	3,59 ± 1,67	9,89 ± 1,94	6,34 ± 0,28	11,79 ± 0,36
<b>2</b>	21,01 ± 1,01	32,61 ± 2,00	11,31 ± 0,50	3,97 ± 0,24	22,51 ± 0,09	9,08 ± 2,38	30,27 ± 7,99
<b>3</b>	7,66 ± 2,45	4,45 ± 0,68	19,55 ± 3,92	5,86 ± 3,06	43,62 ± 2,08	8,63 ± 1,24	42,13 ± 4,93
<b>4</b>	9,15 ± 1,97	32,63 ± 8,31	4,65 ± 1,77	2,35 ± 0,08	13,87 ± 4,49	7,49 ± 0,25	13,60 ± 5,90
<b>5</b>	18,96 ± 0,62	47,75 ± 0,21	19,36 ± 1,45	2,63 ± 0,23	22,62 ± 2,74	11,29 ± 0,98	38,57 ± 9,19
<b>6</b>	10,87 ± 1,53	30,83 ± 1,11	11,52 ± 0,51	3,80 ± 1,04	19,56 ± 0,56	9,02 ± 0,28	21,14 ± 0,80
<b>7</b>	8,25 ± 1,99	25,39 ± 1,58	13,47 ± 2,39	2,80 ± 0,26	12,88 ± 7,58	6,40 ± 1,15	24,35 ± 0,05
<b>8</b>	14,40 ± 1,82	30,66 ± 1,36	13,61 ± 4,10	8,00 ± 2,33	28,97 ± 5,26	11,90 ± 1,34	36,19 ± 3,66
<b>9</b>	18,09 ± 1,51	50,54 ± 1,87	17,68 ± 1,03	2,17 ± 0,02	23,39 ± 7,74	5,73 ± 1,26	13,60 ± 7,65
<b>10</b>	1,93 ± 0,89	9,78 ± 0,12	8,74 ± 0,35	5,77 ± 2,90	9,99 ± 0,46	17,18 ± 2,24	16,69 ± 0,85
<b>11</b>	1,45 ± 0,34	43,29 ± 6,71	10,33 ± 3,21	6,17 ± 2,41	7,78 ± 0,26	6,61 ± 0,49	14,55 ± 0,72
<b>12</b>	1,82 ± 0,68	10,07 ± 1,64	10,56 ± 0,85	6,28 ± 2,49	6,11 ± 0,45	1,76 ± 0,78	15,11 ± 3,56
<b>13</b>	5,34 ± 1,13	9,70 ± 1,50	11,86 ± 3,57	6,75 ± 2,36	6,01 ± 0,09	5,30 ± 0,45	11,87 ± 0,65
<b>Cisplatina</b>	2,10 ± 0,20	14,74 ± 0,36	11,37 ± 2,96	5,54 ± 1,13	11,92 ± 2,20	5,54 ± 1,03	14,44 ± 1,90
<b>Doksorubicin</b>	0,62 ± 0,30	1,79 ± 0,11	0,84 ± 0,07	0,18 ± 0,04	0,24 ± 0,02	3,78 ± 0,49	0,46 ± 0,18

Na ne-malignim humanim ćelijama, dobijene vrednosti IC<sub>50</sub> se kreću između 11,87 μM i 42,13 μM (Slika 4.7.). Stepenn aktivnosti ispitivanih jedinjenja na MRC5 ćelijama je dosta slabiji nego na ispitivanim malignim ćelijama, što može ukazati na to da su ove supstance *in vivo* mogu biti manje toksične za normalna tkiva nego za maligno promenjena tkiva.

## Rezultati

### 4.1.2. Koeficijent selektivnosti

**Tabela 4.2.** Koeficijent selektivnosti u antitumorskom dejstvu

Ćelijske linije	MRC5/HeLa	MRC5/MDA- MB-361	MRC5/MDA- MB-453	MRC5/K562	MRC5/A549	MRC5/LS1 74
1	1,44	1,78	1,71	3,28	1,19	1,86
2	1,44	0,93	2,68	7,63	1,35	3,33
3	5,5	9,47	2,16	7,19	0,97	4,88
4	1,49	0,45	2,93	5,78	0,98	1,81
5	2,03	0,81	1,99	14,67	1,7	3,42
6	1,95	0,69	1,84	5,56	1,08	2,35
7	2,95	0,96	1,81	8,7	1,89	3,81
8	2,52	1,18	2,66	4,52	1,25	3,04
9	0,75	0,27	0,77	6,27	0,58	2,37
10	8,65	1,71	1,91	2,89	1,67	0,97
11	9,96	0,34	1,41	2,36	1,87	2,2
12	8,3	1,5	1,43	2,41	2,48	8,59
13	2,23	1,22	1	1,78	1,98	2,24
Cisplatina	6,88	1,03	1,27	2,61	1,21	2,61
Doksorubicin	0,74	0,46	0,55	2,55	1,91	0,21

## *Rezultati*

---

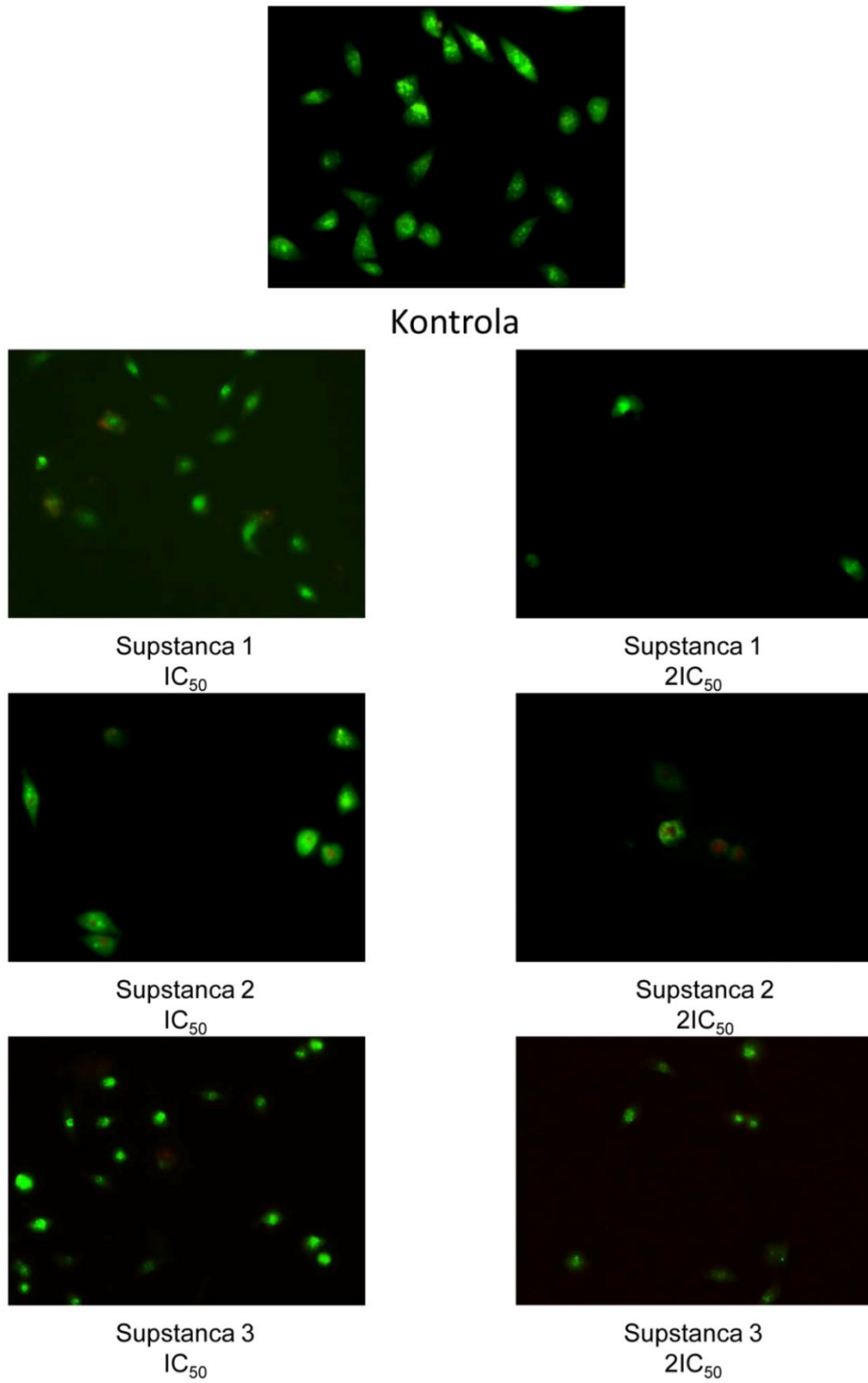
Koeficijent selektivnosti predstavlja odnos koncentracije nekog jedinjenja koja smanjuje preživljavanje normalnih ćelija za 50% i koncentracije istog jedinjenja koja smanjuje preživljavanje ćelija određene maligne ćelijske linije za 50%. U praksi se generalno uzima da ako je ovaj koeficijent veći od 2,5, ispitivana supstanca je dobar kandidat za dalja *in vivo* ispitivanja. U tabeli 4.2. su predstavljeni koeficijenti selektivnosti ispitivanih jedinjenja za sve maligne ćelijske linije. Za mnoge od ovih ćelijskih linija, koeficijenti selektivnosti zaista jesu veći od 2,5. Najmanji stepen selektivnosti se zapaža kod MDA-MB-361 ćelija, kao i kod A549 ćelija. Posebno se ističu jedinjenja **3, 8 i 12**, čiji je koeficijent selektivnosti za četiri od šest ispitivanih malignih ćelijskih linija veći od 2,5.

### 4.2. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti

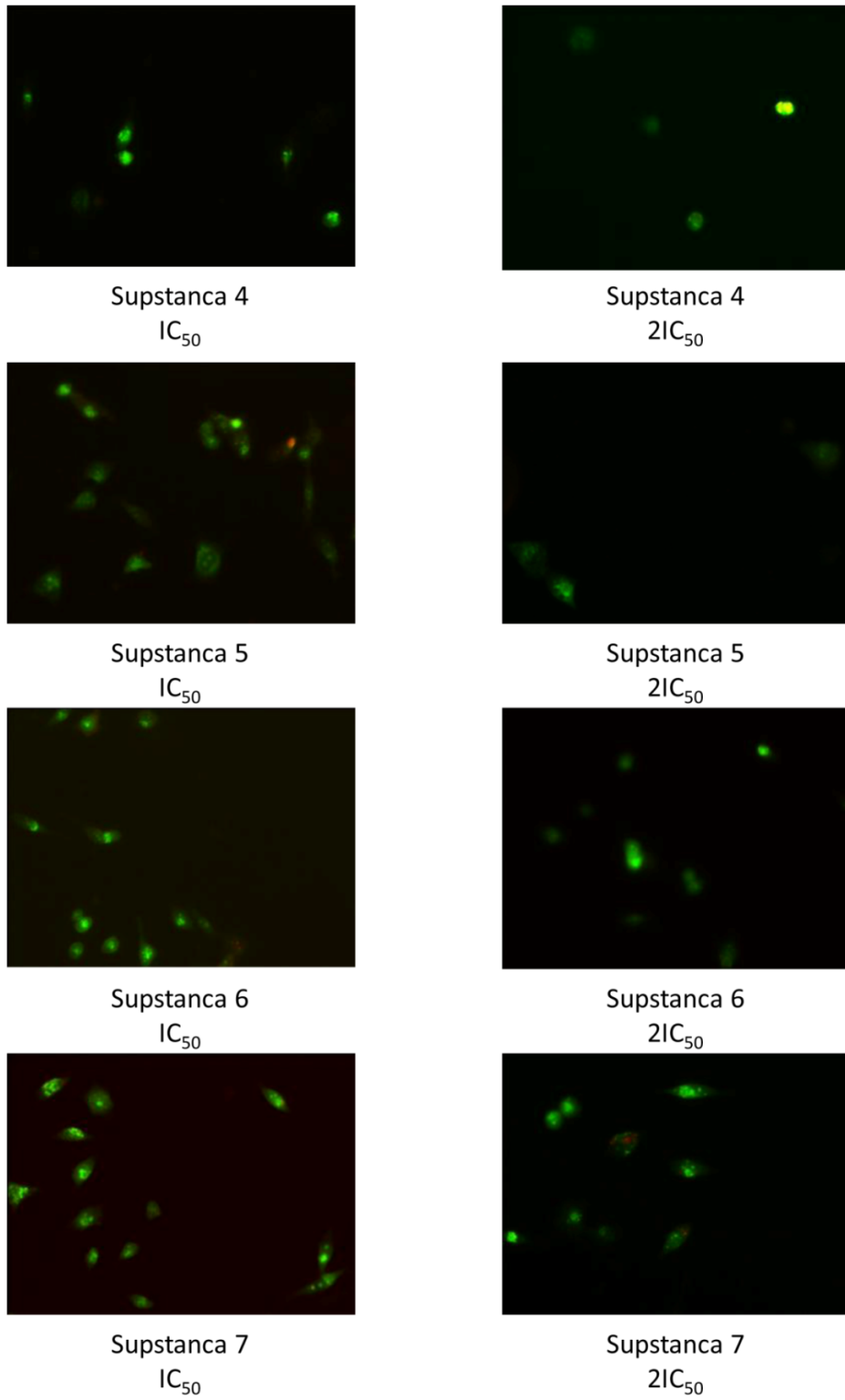
Morfološki dokazi o proapoptotskom dejstvu ispitivanih supstanci su dobijeni fluorescentnom mikroskopijom. U ovom eksperimentu, HeLa ćelije su inkubirane 24 h u prisustvu  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracija ispitivanih jedinjenja (odgovarajuće koncentracije su prethodno utvrđene MTT testom), obojene mešavinom etidijum bromida i akridin oranža, i analizirane fluorescentnim mikroskopom.

Na slikama 4.8., 4.9., 4.10. i 4.11. mogu se videti karakteristični morfološki znaci apoptoze u tretiranim ćelijama u odnosu na ćelije u kontroli, kao što su kondenzacija nukleusa i smanjivanje i fragmentacija ćelije. Na pojedinim slikama, kao na primer za supstance **2**, **7** i **12**, pri koncentraciji od  $2IC_{50}$ , može se primetiti i pojava narušavanja integriteta membrane, odnosno pojava sekundarne nekroze, kao i apoptotskih tela. Očekvano,  $2IC_{50}$  koncentracije supstanci su pokazale značajno jače apoptotsko dejstvo na HeLa ćelije.

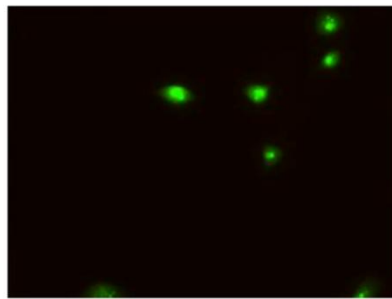




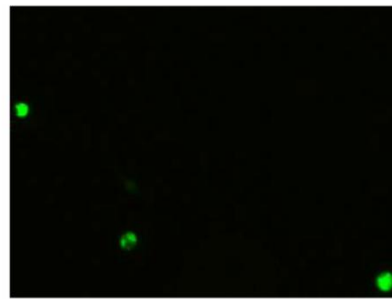
**Slika 4.8.** Fotomikrografije akridin oranž/etidijum bromid obojenih HeLa ćelija nakon 24 h tretmana  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracijama supstanci **1-3**, kao i ćelija u kontroli.



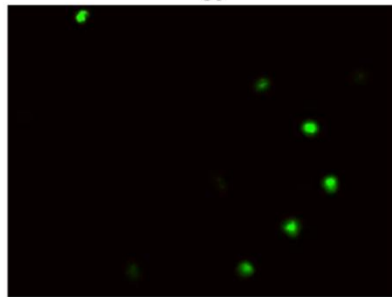
**Slika 4.9.** Fotomikrografije akridin oranž/etidijum bromid obojenih HeLa ćelija nakon 24 h tretmana  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracijama supstanci **4-7**



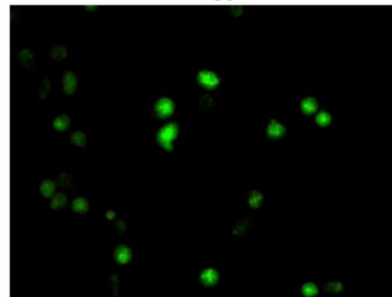
Supstanca 8  
 $IC_{50}$



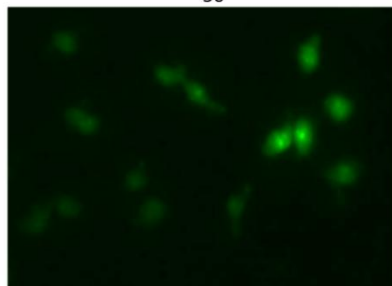
Supstanca 8  
 $2IC_{50}$



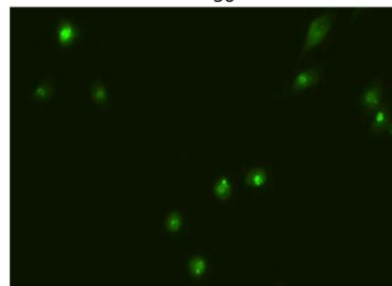
Supstanca 9  
 $IC_{50}$



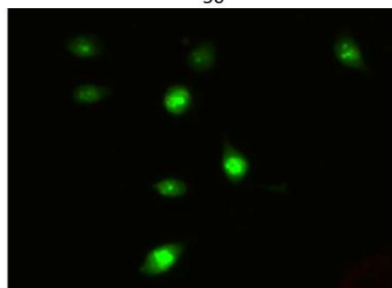
Supstanca 9  
 $2IC_{50}$



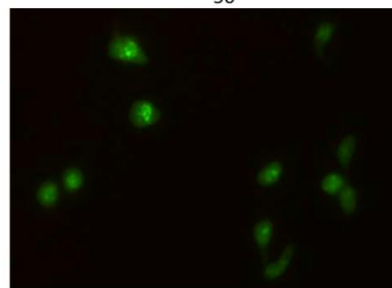
Supstanca 10  
 $IC_{50}$



Supstanca 10  
 $2IC_{50}$

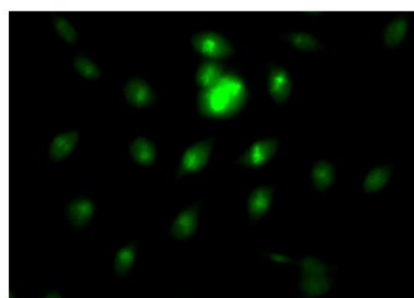


Supstanca 11  
 $IC_{50}$

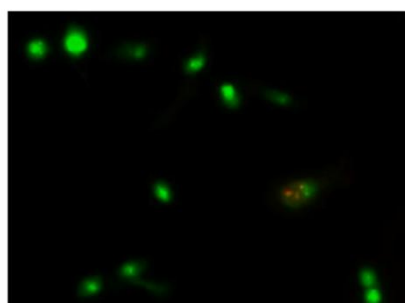


Supstanca 11  
 $2IC_{50}$

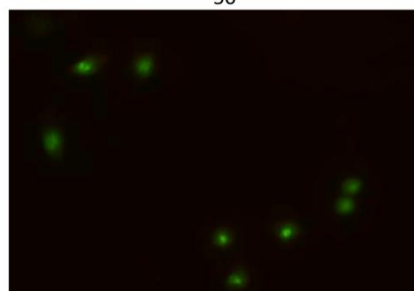
**Slika 4.10.** Fotomikrografije akridin oranž/etidijum bromid obojenih HeLa ćelija nakon 24 h tretmana  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracijama supstanci **8-11**



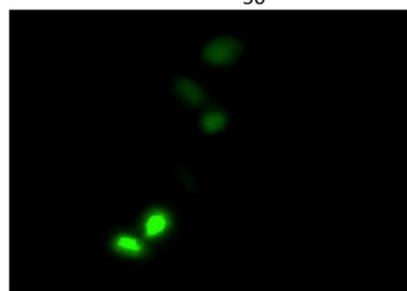
Supstanca 12  
 $IC_{50}$



Supstanca 12  
 $2IC_{50}$



Supstanca 13  
 $IC_{50}$



Supstanca 13  
 $2IC_{50}$

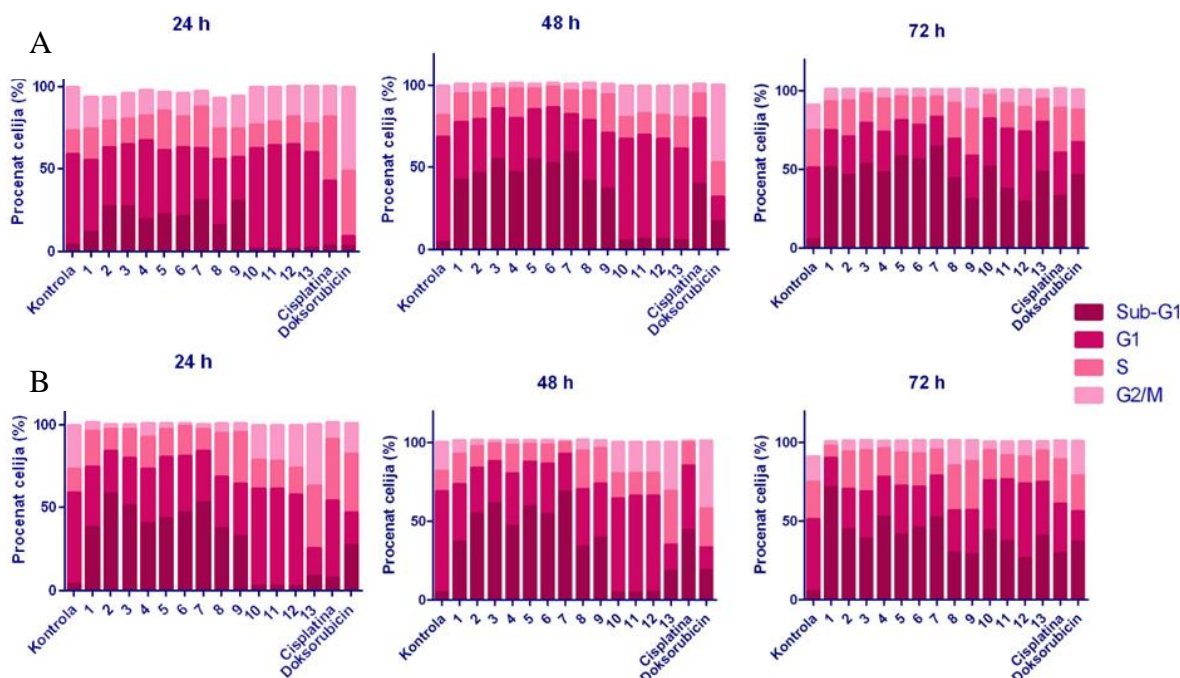
**Slika 4.11.** Fotomikrografije akridin oranž/etidijum bromid obojenih HeLa ćelija nakon 24 h tretmana  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracijama supstanci **12** i **13**

### 4.3. Analiza faza ćelijskog ciklusa

Da bi se dalje ispitali mehanizmi citotoksičnog delovanja ispitivanih jedinjenja, odnosno kako ova jedinjenja deluju na ćelijski ciklus malignih ćelija, analizirana je distribucija HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, K562, A549, LS174 i MRC5 malignih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Primenjivane su koncentracije koje su odgovarale  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$  koncentracijama supstanci na odgovarajućim ćelijama.

Na slikama 4.12. – 4.18. prikazana je distribucija tretiranih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Prikazani rezultati pokazuju da ispitivane supstance najčešće dovode do vremenski i dozno zavisnog povećanja procenta ćelija u sub-G1 fazi, odnosno do apoptoze tretiranih ćelija. Grupa halkonskih derivate antrahinona na najvećem broju ćelija, a to je najizraženije kod A549, LS174 i MDA-MB-453 ćelija, dovode do privremenog zastoja u G2/M fazi.

## Rezultati

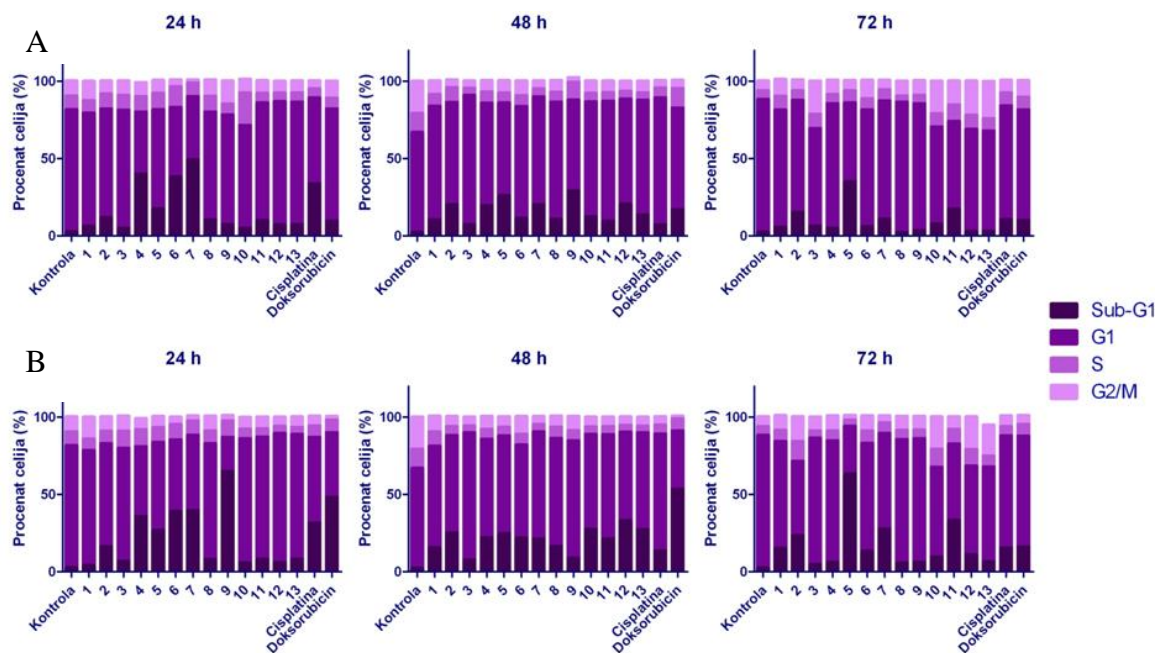


**Slika 4.12.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doksorubicina, na distribuciju HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama  $IC_{50}$  (A) i  $2IC_{50}$  (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

Kod HeLa ćelija je primetno pre svega vremenski zavisno povećanje procenta ćelija u sub-G1 fazi u odnosu na kontrolu, i to kod svih ispitivanih supstanci. Jedinjenje **13**, za razliku od ostalih jedinjenja iz iste grupe, dovodi prvo do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi, ali nakon dužeg tretmana, aktivnost i ovog jedinjenja dovodi do povećanja procenta ćelija u sub-G1 fazi.

Ispitivana jedinjenja ne pokazuju toliko izražen efekat prema MDA-MB-361 ćelijama kao prema HeLa ćelijama. I ovde dolazi do uglavnom blagog povećanja procenta ćelija u sub-G1 fazi. Takođe, jedinjenja **2** i **3**, kao i grupa jedinjenja **10-13** mogu dovesti do zastoja u G2/M fazi.

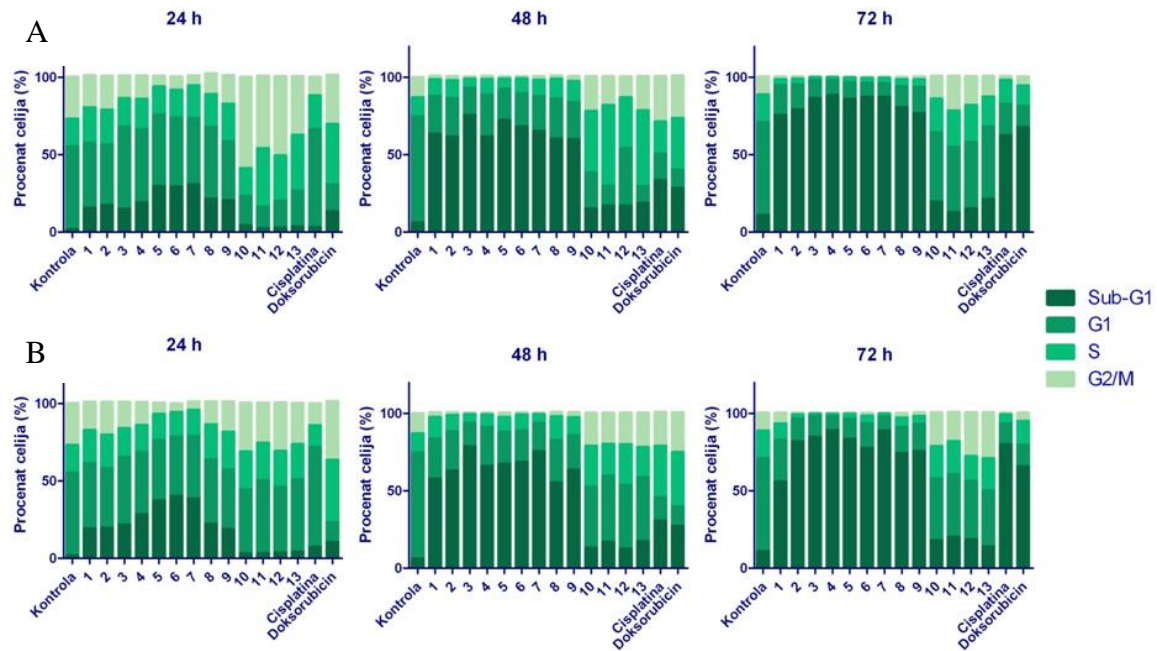
## Rezultati



**Slika 4.13.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doksorubicina, na distribuciju MDA-MB-361 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama IC<sub>50</sub> (A) i 2IC<sub>50</sub> (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

Na drugoj malignoj ćelijskoj liniji poreklom iz kancera dojke dejstvo ispitivanih supstanci je mnogo izraženije. Tako je lako pratiti dozno i vremenski zavisno povećanje procenta MDA-MB-453 u sub-G1 fazi prilikom tretmana jedinjenjima iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona. Što se tiče druge grupe, koju predstavljaju jedinjenja **10-13**, njihov uticaj na zastoj ovih ćelija u G2/M fazi je veoma izražen pri manjim vremenima inkubacije, da bi nakon toga bio zamenjen skokom procenta ćelija u sub-G1 fazi.

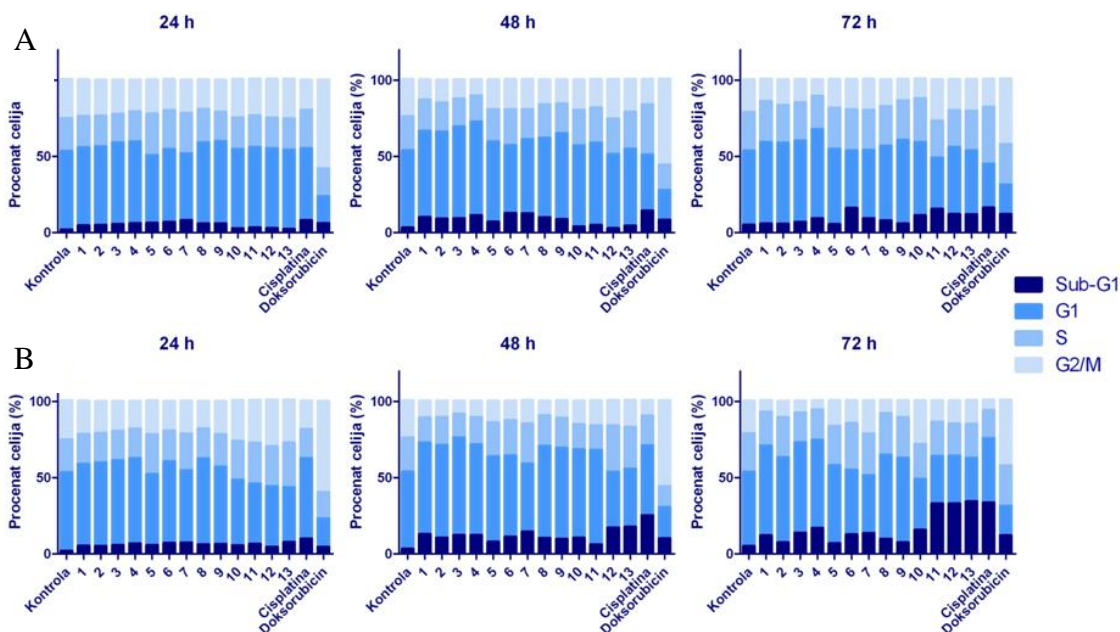
## Rezultati



**Slika 4.14.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doxorubicina, na distribuciju MDA-MB-453 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama  $IC_{50}$  (A) i  $2IC_{50}$  (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.



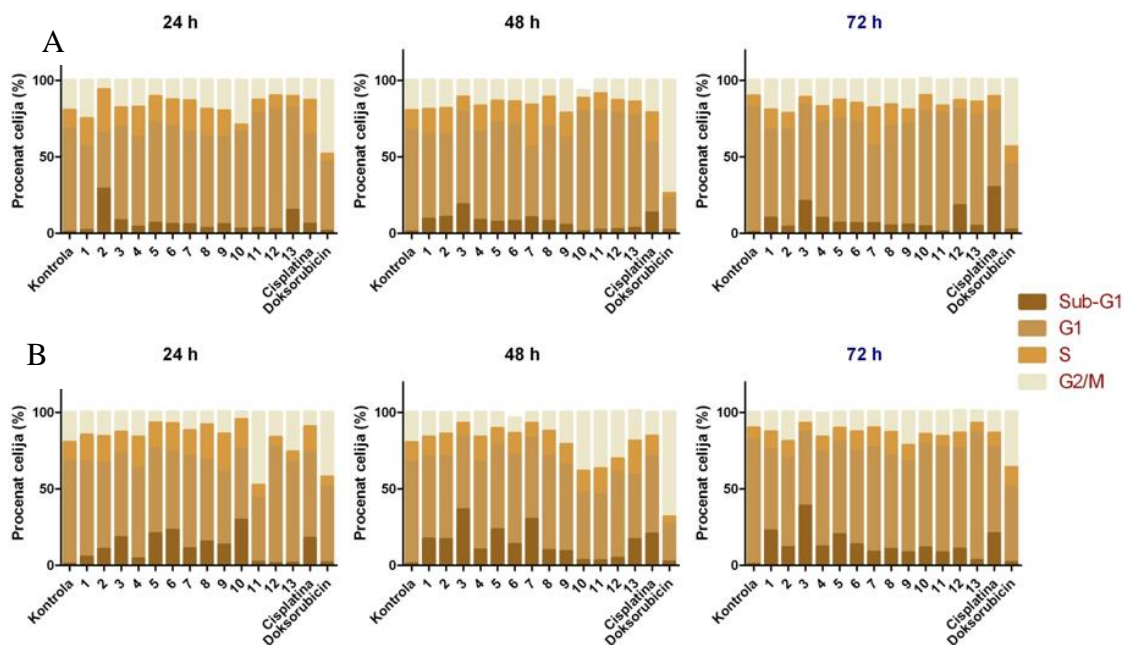
## Rezultati



**Slika 4.15.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doxorubicina, na distribuciju K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama IC<sub>50</sub> (A) i 2IC<sub>50</sub> (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

Tretman K562 ćelija ispitivanim supstancama takođe dovodi do porasta procenta ćelija u sub-G1fazi koje je zavisno od vremena inkubacije, kao i primenjene doze. Jedinjenja **10-13** se posebno ističu po porastu broja ćelija u ovoj fazi.

## Rezultati

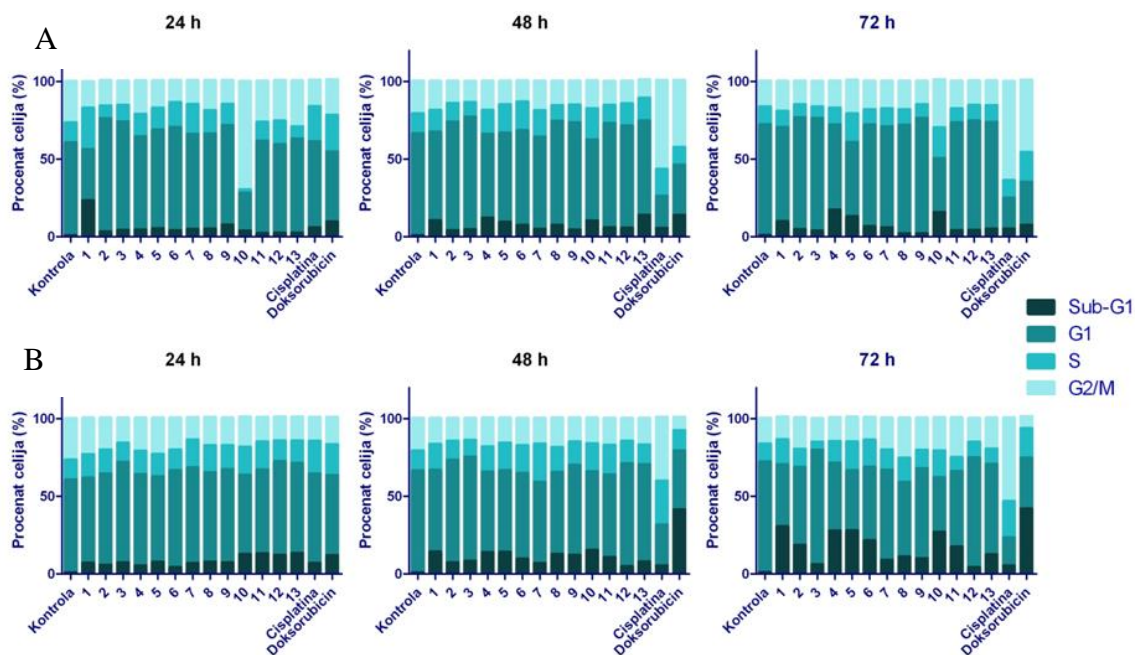


**Slika 4.16.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatin i doxorubicina, na distribuciju A549 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama IC<sub>50</sub> (A) i 2IC<sub>50</sub> (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

Na A549 ćelijskoj liniji, jedinjenje **3** izaziva izraženo i jasno vremenski i dozno zavisno povećanje broja ćelija u sub-G1 fazi. Takođe, jedinjenja **10-13**, pogotovo pri većim koncentracijama, izazivaju G2/M zastoj.

Slične efekte jedinjenja ostvaruju i prema LS174 ćelijama, kod kojih takođe dolazi do blagog povećanja procenta ćelija u sub-G1 fazi nakon tretmana, i ovo je posebno izraženo kod jedinjenja **1, 4 i 5**. Jedinjenje **10**, kao i ostala jedinjenja iz grupe halkonskih antrahinona, pri manjim koncentracijama i kraće vremenu inkubacije izazivaju zastoj u G2/M fazi.

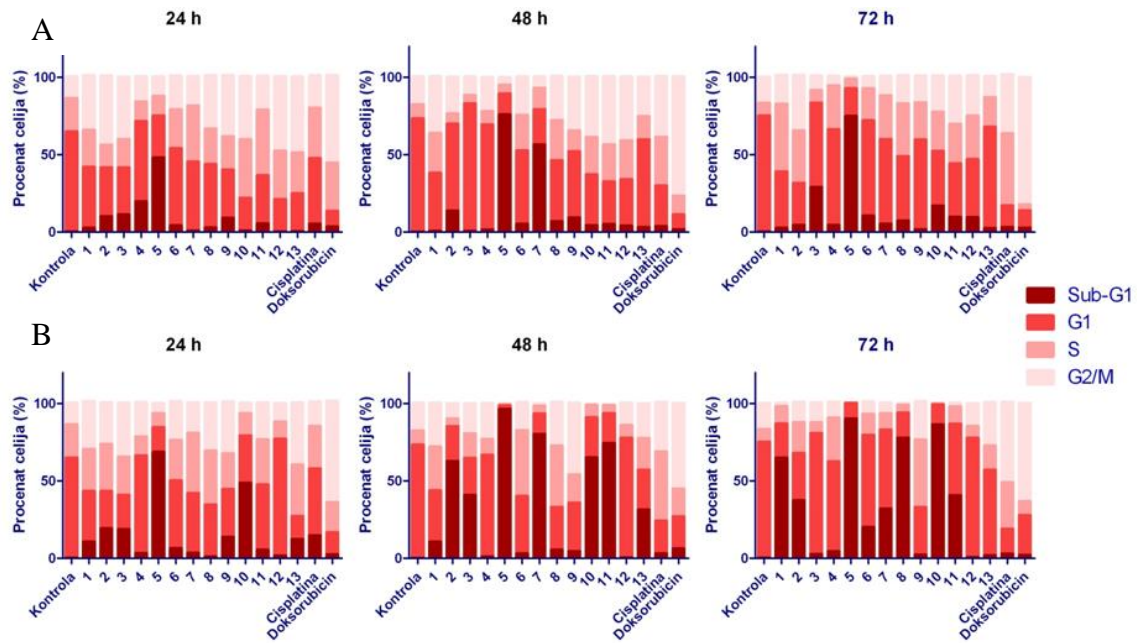
## Rezultati



**Slika 4.17** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doksorubicina, na distribuciju LS174 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama IC<sub>50</sub> (A) i 2IC<sub>50</sub> (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

Na MRC5 ćelijskoj liniji, ispitivana jedinjenja su pokazala raznolike efekte, pri čemu se najviše ističe jedinjenje **5**, koje dovodi do naglog i izraženog skoka u procentu ćelija u sub-G1 fazi.

## Rezultati



**Slika 4.18.** Uticaj ispitivanih supstanci, kao i cisplatine i doksorubicina, na distribuciju MRC5 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, pri koncentracijama  $IC_{50}$  (A) i  $2IC_{50}$  (B), nakon 24, 48 i 72 h tretmana.

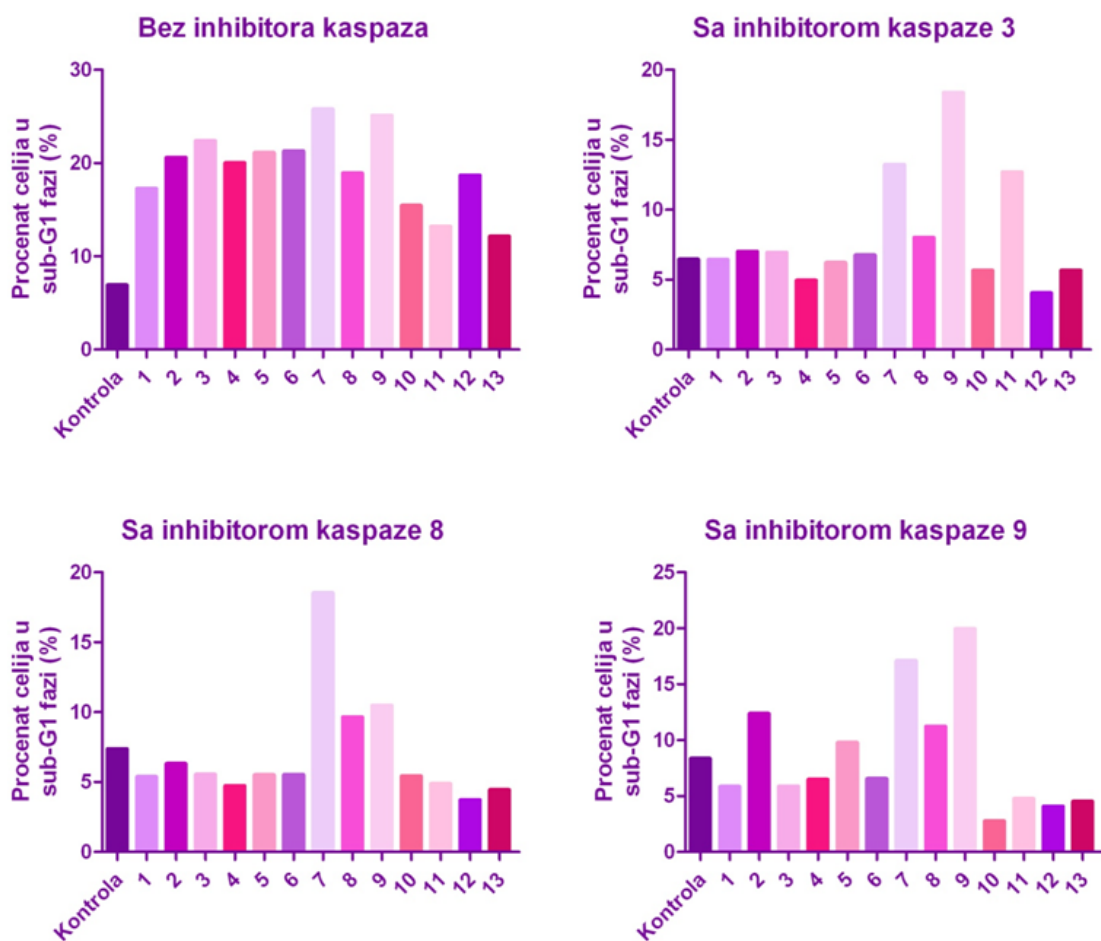
### 4.4. Određivanje ciljnih kaspaza

Da bi se rasvetlio mehanizam kojim ispitivana jedinjenja izazivaju apoptozu ciljnih ćelija, HeLa ćelije su tretirane inhibitorima kaspaza-3 (Z-DEVD-FMK), 8 (Z-IETD-FMK) ili 9 (Z-LEHD-FMK), i to pre tretmana odgovarajućim ispitivanim jedinjenjima tokom 24 h. Primenjivana koncentracija je odgovarala  $IC_{90}$  vrednosti, prethodno utvrđenoj MTT testom na HeLa ćelijama.  $IC_{90}$  je koncentracija koja dovodi do inhibicije preživljavanja za 90% u odnosu na kontrolu. Korišćenjem protočne citofluorimetrije praćena je distribucija ovako tretiranih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

Na slici 4.19. prikazani su rezultati dobijeni ovim eksperimentom, i pokazano je da specifični inhibitori kaspaza povećavaju preživljavanje HeLa ćelija, odnosno smanjuju procenat ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa.

Prilikom tretmana ćelija specifičnim inhibitorom kaspaze-3, pokazano je da on ne povećava preživljavanje ćelija nakon tretmana supstancom **9**, a dovodi samo do malog poboljšanja u preživljavanju nakon tretmana jedinjenjima **7** i **11**.

## Rezultati



**Slika 4.19.** Efekat specifičnih inhibitora kaspaza na procenat ćelija u sub-G1 fazi nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima.

Što se tiče inhibitora kaspaze-8, ovaj inhibitor dovodi do smanjenja procenta ćelija u sub-G1 fazi prilikom tretmana svim supstancama osim supstance **7**.

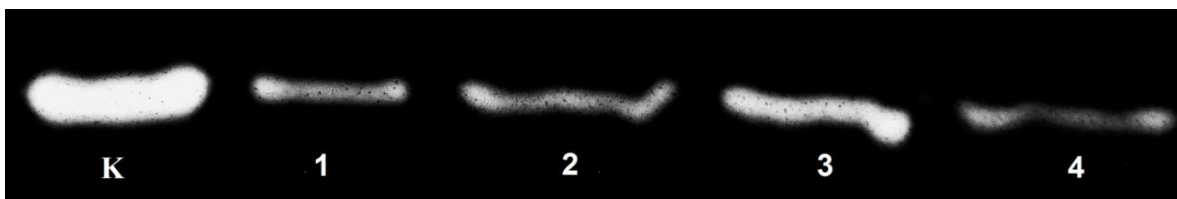
Inhibitor kaspaze-9 takođe nema velikog uticaja na povećanje preživljavanja ćelije, sem za jedinjenja broj **7** i **9**.

### 4.5. Želatinska zimografija

Želatinska zimografija je metoda koja je korišćena za utvrđivanje efekta ispitivanih jedinjenja na aktivnost matriksnih metaloproteinaza, odnosno njihovu sposobnost razgrađivanja želatina. HeLa ćelije su tretirane supstancama **1-13**, kao i pozitivnim kontrolama cisplatinom i doksorubicinom u subletalnim koncentracijama.

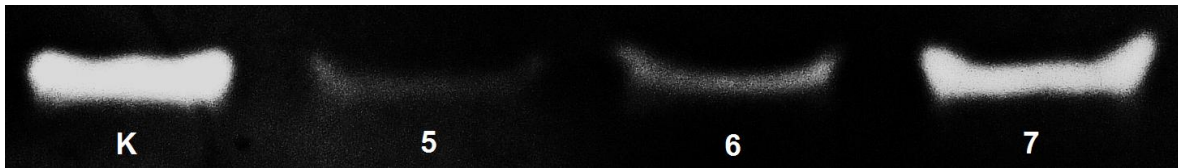
Na slikama 4.20., 4.21., 4.22, i 4.23. može se videti efekat ovih supstanci specifično na aktivnost MMP-2, u odnosu na kontrolu. Sva ispitivana jedinjenja, osim supstance **7**, imaju izraženo inhibitorno dejstvo na produkciju i/ili aktivnost matriksnih metaloproteinaza, kao i mnogo bolju aktivnost od cisplatine, ili doksorubicina, čija se aktivnost nije mnogo razlikovala od kontrole.

Jedinjenja **5** i **8** su pokazale ubedljivo najveće dejstvo na aktivnost MMP-2.

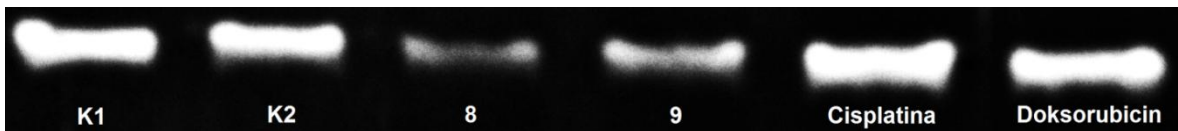


**Slika 4.20.** Tretman HeLa ćelija subtoksičnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja tokom 24 h dovodi do smanjenja ekskrecije MMP-2. K – kontrola; 1 – 4 – tretman jedinjenjima **1- 4**.

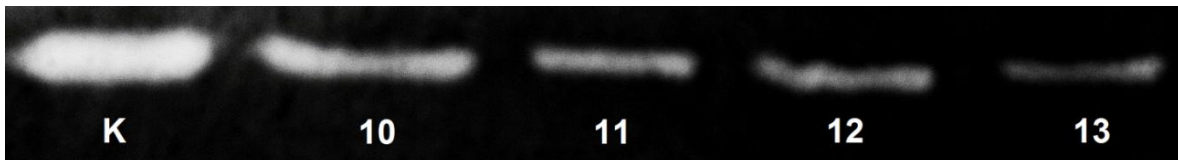
## Rezultati



**Slika 4.21.** Tretman HeLa ćelija subtoksičnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja tokom 24 h dovodi do smanjenja ekskrecije MMP-2. K – kontrola; 5 – 7 – tretman jedinjenjima 5-7.



**Slika 4.22.** Tretman HeLa ćelija subtoksičnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja, kao i cisplatinom i doksorubicinom tokom 24 h dovodi do smanjenja ekskrecije MMP-2. K1, K2 – kontrole; 8, 9 – tretman jedinjenjima 8 i 9.



**Slika 4.23.** Tretman HeLa ćelija subtoksičnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja tokom 24 h dovodi do smanjenja ekskrecije MMP-2. K – kontrola; 10 - 13 – tretman jedinjenjima 10 – 13.



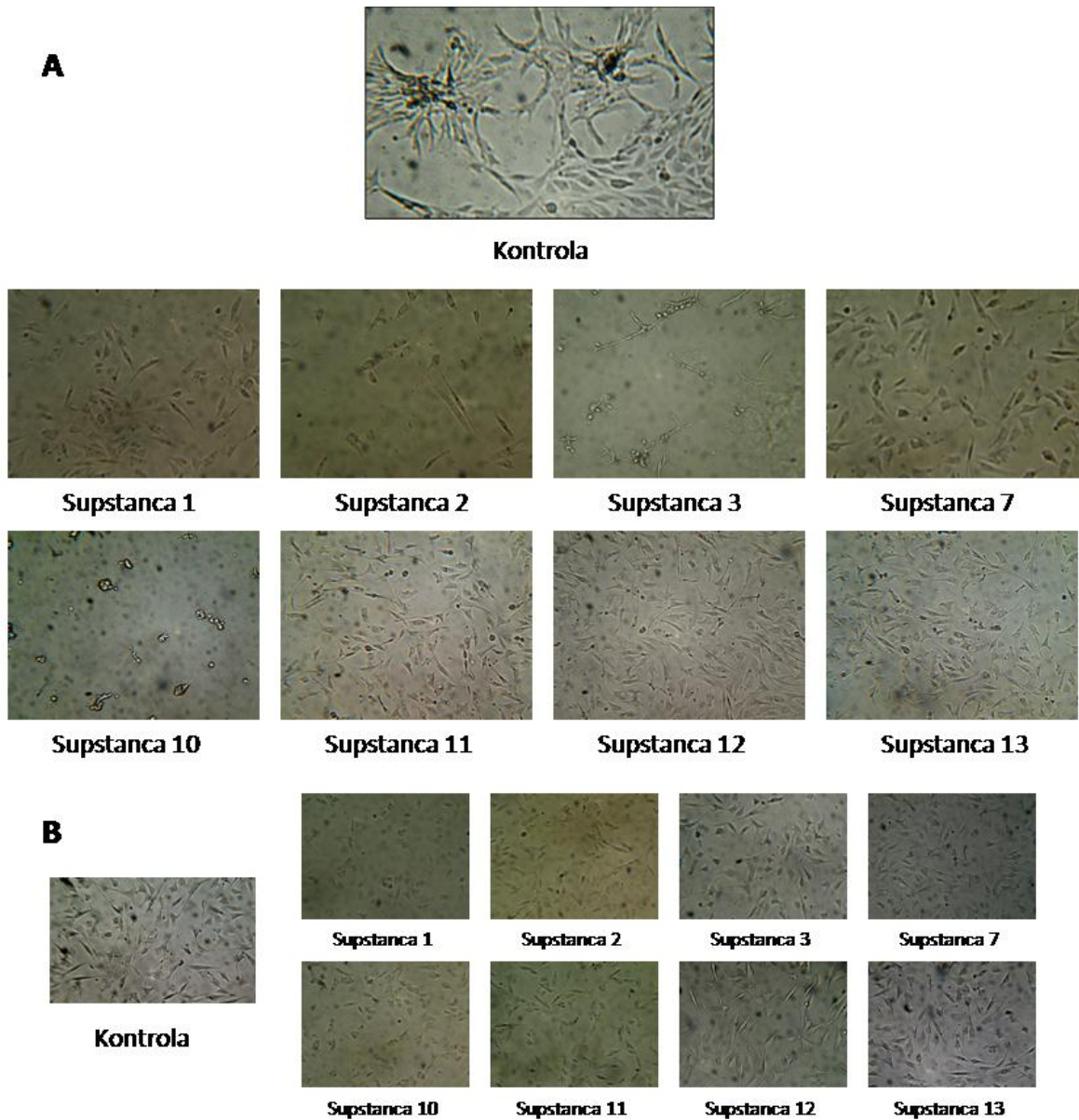
### 4.6. *In vitro* esej angiogeneze - *Tube formation assay*

Sposobnost sprečavanja neoangiogeneze je veoma bitno pitanje pri razvoju novih antiumorskih jedinjenja i *Tube formation assay* je *in vitro* metoda koja omogućava preliminarno sagledavanje sposobnosti ispitivanih jedinjenja da inhibišu neoangiogenezu.

Na slici 4.24. predstavljeni su rezultati dobijeni ovom metodom, nakon tretmana EA.hy926 subtoksičnim koncentracijama jedinjenja **1, 2, 3, 7, 10, 11, 12** i **13**. Ove supstance su izabrane da njihov antiangiogenetski potencijal bude ispitan pošto su pokazale najveću aktivnost u drugim esperimentima, uključujući citotoksičnost prema malignim ćelijskim linijama, uticaj jedinjenja na inhibitore kaspaza, kao i njihov uticaj na metastaziranje i invazivnost.

Na reprezentativnim fotomikrografijama predstavljenim na slici 4.24. (A) može se videti da tretman IC<sub>20</sub> koncentracijama ispitivanih jedinjenja EA.hy926 ćelija zasejanih na Matrigelu dovodi do smanjivanja formiranja tubula na ovim ćelijama, dok je formiranje tubula veoma izraženo kod netretiranih ćelija zasejanih na Matrigelu. Posebno jako dejstvo su pokazali jedinjenje **3** i jedinjenje **10**.

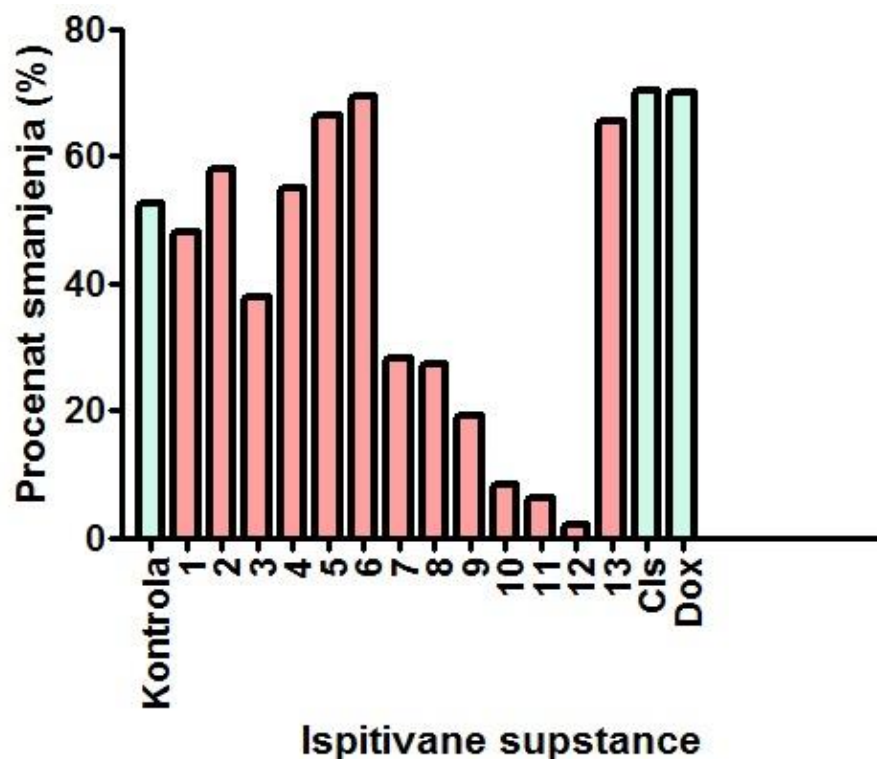
Na slici 4.24. (B) su predstavljene fotomikrofije koje prikazuju direktni efekat subtoksičnih koncentracija ispitivanih jedinjenja na EA.hy926 ćelije koje nisu bile zasejavane na Matrigelu, (nisu rasle na podlozi koja pogoduje formiranju tubula). Ova dva eksperimenta (Slika 4.24. A i B) su rađena uporedo.



**Slika 4.24.** (A) Efekat subtoksičnih koncentracija ispitivanih jedinjenj na formiranje tubula na EA.hy926 ćelijama na Matrigelu. (B) Efekat subtoksičnih koncentracija ispitivanih jedinjenja na formiranje tubula na EA.hy926 ćelijama bez Matrigela.

### 4.7. Wound healing assay

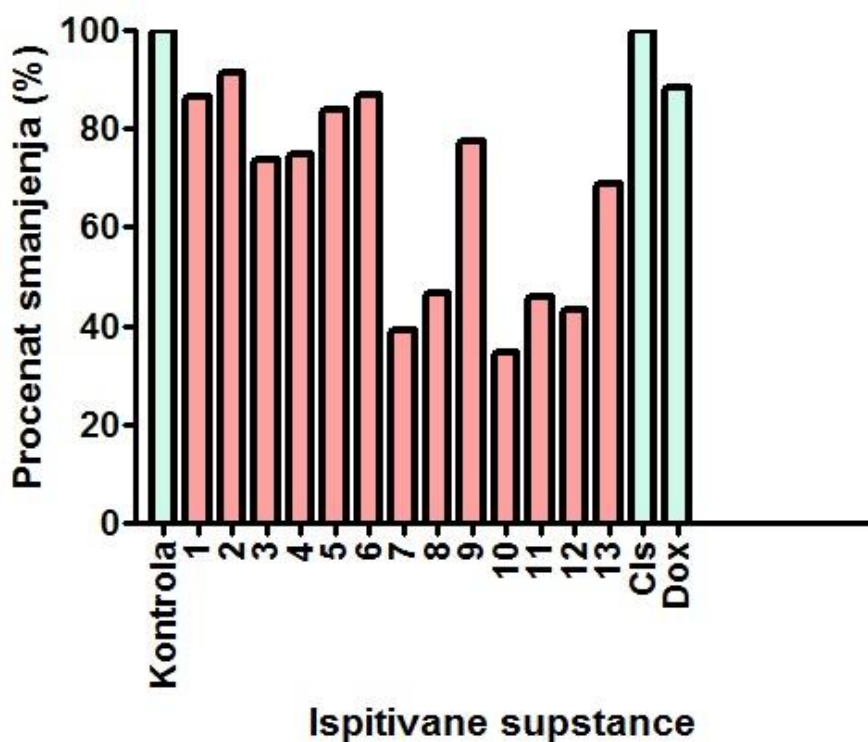
Efekat ispitivanih jedinjenja na migraciju EA.hy926 humanih transformisanih endotelijalnih ćelija umbilikalne vene je ispitivan primenom *Wound healing* ili *Scratch* eseja. Na slikama 4.25. i 4.26. su prikazani procenti smanjenja rane napravljene u prethodno formiranom monosloju ćelija, nakon 24 h i 48 h. Ovi rezultati su u korelaciji sa brzinom rasta i deobe ovih ćelija, netretiranih, i ćelija tretiranih ispitivanim supstancama i pozitivnim kontrolama, cisplatinom i doksorubicinom.



**Slika 4.25.** Procenat smanjivanja proreza napravljenog u monosloju EA.hy926 ćelija nakon inkubacije sa ispitivanim supstancama tokom 24 h.

## Rezultati

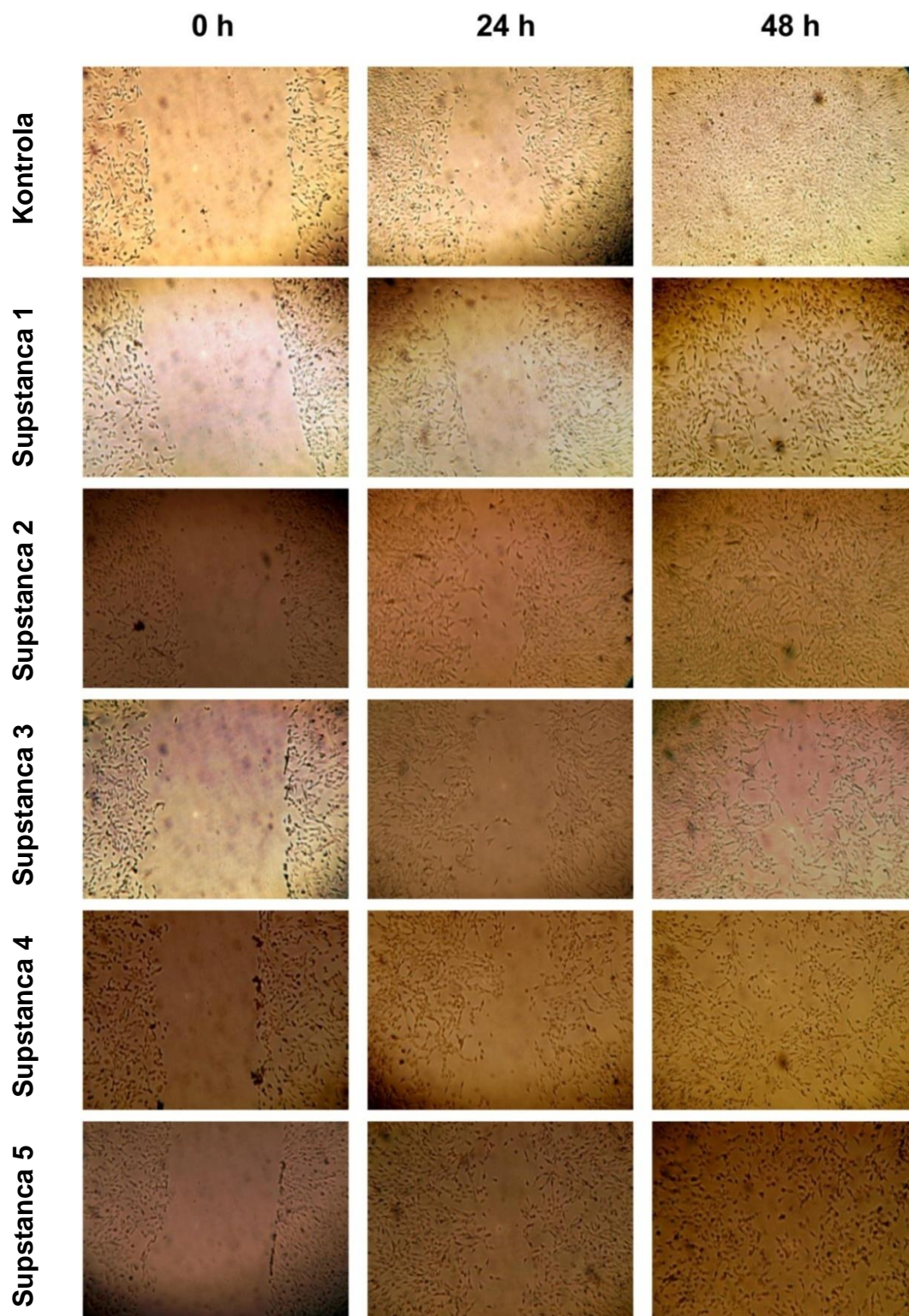
Može se odmah primetiti da jedinjenje **12** najviše utiče na smanjenje potencijala migracije EA.hy926 ćelija, a takođe i supstance **7, 8, 9, 10** i **11** ispoljavaju snažno inhibitorno dejstvo na migraciju EA.hy926 ćelija. Značajno je da i ova jedinjenja pokazuju izuzetno pojačano dejstvo u odnosu na supstance koje se primenjuju u klinici, odnosno na cisplatinu i doksorubicin.



**Slika 4.26.** Procenat smanjivanja proreza napravljenog u monosloju EA.hy926 ćelija nakon inkubacije sa ispitivanim supstancama tokom 48 h.

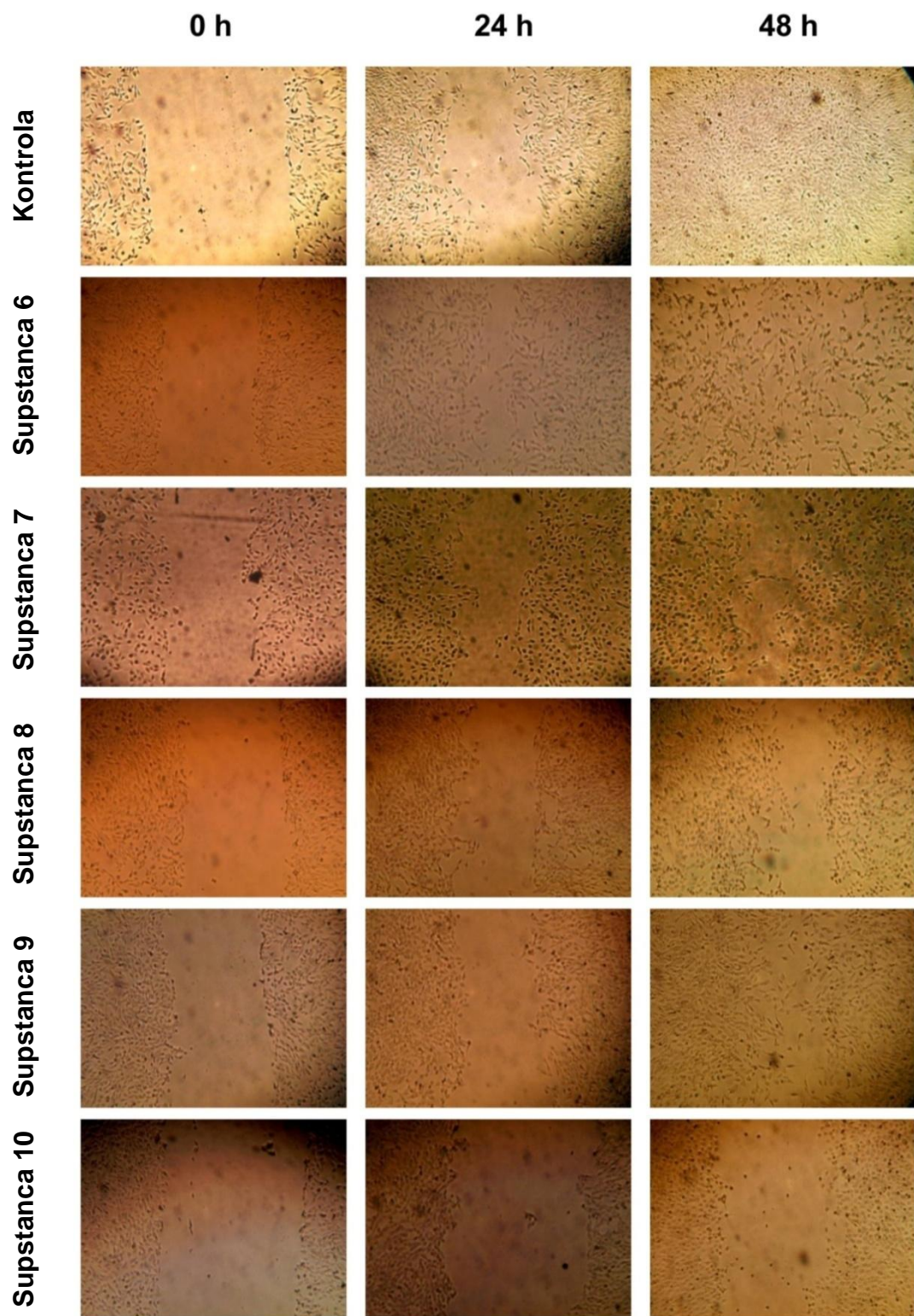
Na slikama 4.27., 4.28. i 4.29. su predstavljene fotomikrografije napravljene neposredno nakon početka tretmana ispitivnim jedinjenjima, zatim nakon 24 sata, kao i nakon 48 sati. Na ovim fotomikrografijama je primetno da je efekat koji jedinjenja imaju na migraciju tretiranih ćelija, u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije, veoma izražen.

## Rezultati



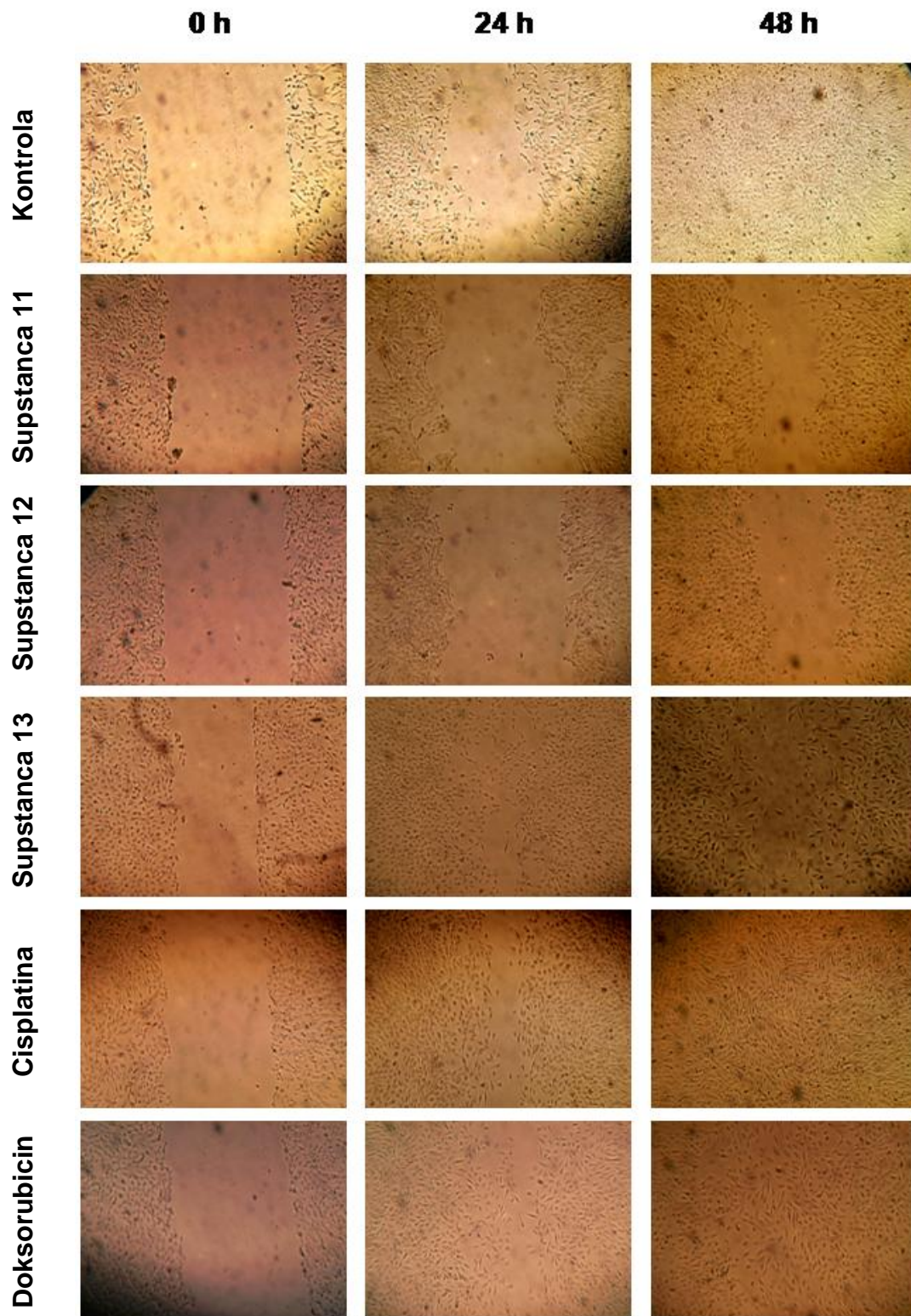
**Slika 4.27.** Efekat tretmana EA.hy926 ćelija subtoksičnim koncentracijama supstanci **1 - 5** na migraciju tih ćelija tokom 48 h.

## Rezultati



**Slika 4.28.** Efekat tretmana EA.hy926 ćelija subtoksičnim koncentracijama supstanci **6-10** na migraciju tih ćelija tokom 48 h.

## Rezultati



Slika 4.29. Efekat tretmana EA.hy926 ćelija subtoksičnim koncentracijama supstanci 11-13, cisplatine i doksorubicina na migraciju tih ćelija tokom 48 h.

### **5. Diskusija**

Po podacima američkog Nacionalnog instituta za zdravlje, od sedamdesetih godina prošlog veka istraživanja molekularnih osnova kancera i razvoj novih terapeutika je doprineo tome da petogodišnje preživljavanje svih pacijenata obolelih od raka poraste sa 50% na 68%. Međutim, ako se pogledaju pojedinačni tipovi raka, može se primetiti da ovom poboljšanju preživljavanja doprinosi samo nekoliko tipova kancera, kao i da je to posledica uglavnom ranijeg detektovanja i tretmana kancera, zbog poboljšanih dijagnostičkih metoda.

Terapija različitih vrsta kancera je i dalje u mnogim slučajevima neefikasna, ili sa velikim brojem neželjenih dejstava. Hemoterapeutici mogu imati ili široki spektar dejstva, i njihov mehanizam je najčešće nepotpuno utvrđen, ili mogu ciljati tačno određenu metu, specifičnu za tip kancera. Poželjno je da dejstva hemoterapeutika obuhvataju inhibiciju ili izmenu jednog ili više molekula koji kontrolišu neka od osnovnih svojstava malignih ćelija. Ova svojstva obuhvataju neograničeni replikativni potencijal, nezavisnost od signala koji regulišu rast ćelije, izbegavanje apoptoze, indukciju angiogeneze, kao i invaziju okolnog tkiva i sposobnost metastaziranja. Ovim osnovnim svojstvima su nedavno priključene još dve osobine za koje se smatra da takođe odlikuju svaku malignu ćeliju, a to su izbegavanje imunskog odgovora organizma, kao i reprogramiranje energetskeg metabolizma maligne ćelije (Hanahan i Weinberg, 2011).

Antrahinoni su velika grupa hinonskih jedinjenja izolovanih iz prirodnih izvora. Prirodni antrahinoni se koriste u kozmetičkoj, farmaceutskoj industriji i u ishrani, posebno u azijskim zemljama. Nakon što je primećeno da poseduju široki spektar dejstva, mnogi polusintetički derivati su sintetisani i ispitani. Dejstvo prirodnih i polusintetičkih antrahinona obuhvata laksativno, antibiotsko, antiinflamatorno, antipiretičko i antiviralno dejstvo, kao i veliki antitumorski potencijal i potencijal inhibicije metastaziranja malignih ćelija. Najvažniji do sada utvrđeni mehanizmi dejstva antrahinona predstavljaju



## *Diskusija*

---

interkalacija DNK, interakcija sa kompleksom topoizomeraze II, inhibicija telomeraze, kao i interakcija sa komponentama metaboličkih puteva u ćelijama.

Sa biološkog aspekta, tiosemikarbazoni i halkoni predstavljaju značajne farmakofore. Tiosemikarbazoni pokazuju antibakterijsko, antiviralno, antifungalno i antiproliferativno dejstvo, a njihov mehanizam dejstva obuhvata inhibiciju ribonukleotid reduktaze, kao i interakciju sa topoizomerazom II, i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta. Halkoni poseduju antioksidativno, antimalarijski, antibakterijsko, antiviralno dejstvo, i to pre svega indukcijom ćelijske smrti, inhibicijom kinaza i sprečavanjem polimerizacije tubulina.

Sve opisane grupe farmakofora pokazuju veoma dobro antitumorsko, antiproliferativno i antimetastatsko dejstvo, što ih čini veoma zanimljivim za dalja pretklinička ispitivanja.

Istraživanja u ovoj doktorskoj tezi se zasnivaju na prethodno opisanim osobinama antrahinona, tiosemikarbazona i halkona, i predstavljaju pokušaj da sintezom jedinjenja koje sadrže te farmakofore i opisivanjem njihovog mehanizma dejstva dovedu do otkrića i razvoja hemoterapeutika sa poboljšanom aktivnošću i selektivnošću, kao i smanjenom toksičnošću u odnosu na već postojeće.

*In vitro* citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja je bila određena uz pomoć MTT kolorimetrijskog testa prema ćelijama cervikalnog adenokarcinoma (HeLa), dve ćelijske linije poreklom iz kancera dojke (MDA-MB-361 i MDA-MB-453), ćelijama hronične mijeloidne leukemija (K562), adenokarcinoma pluća (A549), kao i adenokarcinoma kolona (LS174).

Pokazana citotoksična aktivnost je varirala od 1,45  $\mu$ M do 50,54  $\mu$ M, u zavisnosti od posmatranog jedinjenja i tretirane maligne ćelijske linije. Generalno, najbolja citotoksična aktivnost je pokazana na K562 ćelijama, koje se od ostalih ćelijskih linija korišćenih u ovom radu razlikuju po tome što nisu adhezivne ćelije, i mezodermalnog su porekla, za razliku od ostalih ćelijskih linija koje su poreklom od adenokarcinoma. Zanimljivo je da grupa jedinjenja sa halkonskom strukturom (jedinjenja **10**, **11**, **12**, **13**), a

## *Diskusija*

---

koja generalno pokazuje bolju citotoksičnu aktivnost prema drugim ispitivanim malignim ćelijskim linijama u odnosu na ostala jedinjenja, pokazuje lošije dejstvo prema ovoj malignoj ćelijskoj liniji nego grupa antrahinonskih tiosemikarbazona.

Najbolje dejstvo na HeLa ćelijskoj liniji pokazuju takođe jedinjenja **10-13**, i ona su aktivnija i u odnosu na hemoterapeutik širokog spektra, cisplatinu.  $IC_{50}$  vrednosti antrahinonskih tiosemikarbazona na ovoj ćelijskoj liniji se kreću u opsegu od 8,19 do 21,01  $\mu$ M. Može se pretpostaviti da je imino grupa i trifluorometil, hlorid i furil supstituenti aromatičnog prstenavezanog za imino-grupu, najviše odgovorni za ovo izuzetno dobro dejstvo grupe antrahinona sa halkonskom strukturom.

Ćelijska linija poreklom iz metastatskog karcinoma dojke, MDA-MB-361, kod koje je uvećana ekspresija Her-2/neu receptora, izuzetno je rezistentna na dejstvo velikog broja hemoterapeutika. MTT testom je pokazano da i većina ispitivanih jedinjenja ima slabo citotoksično dejstvo prema ovoj ćelijskoj liniji. Međutim, pokazano je da je aktivnost jedinjenja **1** i **3** na ovim ćelijama dosta bolja od aktivnosti cisplatine, i samo 2 odnosno 3 puta slabija od aktivnosti doksorubicina. Zanimljivo je da jedinjenje **1** ima pet puta bolju aktivnost od jedinjenja **2**, a njihova struktura se razlikuje samo u jednoj metil grupi. Takođe, aktivnost jedinjenja **3** je skoro sedam puta veća od aktivnosti jedinjenja **6**, a razlikuje ih samo dužina bočnog alkil-niza tiosemikarbazona. I kod MDA-MB-361 grupa antrahinonskih halkona ima veoma dobro dejstvo, sa jedinjenjima **10**, **12** i **13** čije su  $IC_{50}$  vrednosti oko 10  $\mu$ M, i bolje od vrednosti cisplatine, iako dosta lošije od aktivnosti doksorubicina. Zanimljivo je da jedinjenje **11**, sa trifluorometil grupom, ima izrazito slabije dejstvo nego ostala jedinjenja ove serije. Druga ćelijska linija poreklom od kancera dojke, MDA-MB-453, koja ne eksprimira ni Her-2/neu ni estrogenski receptor, je mnogo osetljivija na dejstvo citostatika, a takođe i na dejstvo jedinjenja ispitivanih u ovom istraživanju. Sva jedinjenja pokazuju dobru aktivnost, sa  $IC_{50}$  u opsegu od 4,65  $\mu$ M do 19,55  $\mu$ M, pri čemu je  $IC_{50}$  sedam od trinaest jedinjenja manja ili jednaka  $IC_{50}$  vrednostima cisplatine prema ovim ćelijama. Najbolje dejstvo pokazuju jedinjenja **1** i **4**, koje odlikuje postojanje fenil, odnosno cikloheksil grupe tiosemikarbazonoskog dela molekula.

## Diskusija

---

Ćelije adenokarcinoma pluća, A549, su se takođe pokazale rezistentnije na neke od ispitivanih supstanci, ali i ovde su halkonska jedinjenja ispoljila najveći stepen aktivnosti ( $IC_{50}$  u opsegu 6,01-9,99  $\mu M$ ), i ova aktivnost je značajno bolja od aktivnosti referentnog citostatika, cisplatine. Takođe, veoma dobro dejstvo je pokazalo i jedinjenje **1**, antrahinonski tiosemikarbazon, čija vrednost  $IC_{50}$  iznosi 9,89  $\mu M$ .

Ispitivana jedinjenja su pokazala odličnu citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama adenokarcinoma kolona, LS174, koje eksprimiraju veliki broj onkogeni. Veliki broj jedinjenja je imao aktivnost uporedivu sa citotoksičnošću cisplatine, i neznatno lošiju čak i od aktivnosti doksorubicina. Izuzetno aktivno se pokazalo jedinjenje **12**, čija  $IC_{50}$  vrednost iznosi 1,76  $\mu M$ , što ga čini dva puta aktivnijom od doksorubicina prema ovoj ćelijskoj liniji, a tri puta aktivnijom od cisplatine. Ovo jedinjenje je deo serije antrahinonskih halkona, koje odlikuje prisustvo furanskog prstena. Takođe, iznenađujuće je da najslabije dejstvo ( $IC_{50}$  iznosi 17,18  $\mu M$ ) ostvaruje jedinjenje **10**, koje se inače pokazalo kao izuzetno aktivno prema ostalim testiranim malignim ćelijskim linijama.

Kada se pogledaju sve ispitivane maligne ćelijske linije, može se videti da generalno najbolje dejstvo ima jedinjenje **1** iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona, sa fenil grupom, kao i četiri jedinjenja iz grupe halkonskih derivata antrahinona, a posebno jedinjenje **10**, sa 3-hlorfenil grupom. Ovi podaci se slažu sa prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da su planarne strukture u molekulu antrahinona najbitnije za njihova dejstva, posebno antitumorska dejstva (Jin et al., 2011, Lee et al., 2013). Uvođenje različitih supstituenata na aromatični sistem u molekulu ispitivanih jedinjenja dovodi do povećanja aktivnosti, i to najčešće u zavisnosti od elektronskih svojstava dodatih grupa. Induktivni i rezonantni efekti supstituenata na aromatičnom prstenu ne utiču na elektronsku gustinu tri aromatična prstena molekula antrahinona, ali utiču na antiproliferativnu aktivnost ispitivanog jedinjenja, kao i stabilizaciju G-kvadrilpleksa u telomerama. Pokazano je da ovi efekti kod konjugovanih sistema mogu pojačavati i antiproliferativno i citotoksično dejstvo prema malignim ćelijama je jače (Mahesh Kumar et al, 2013; de Vasconcelos et al., 2013).

## Diskusija

---

Analiza dejstva ispitivanih jedinjenja na normalnim transformisanim ćelijama MTT testom je pokazala da neka od ovih jedinjenja selektivno deluju na ciljne maligne ćelije u odnosu na normalne ćelije. Ova karakteristika je izuzetno bitno svojstvo za odabir jedinjenja koja će se dalje ispitivati *in vivo*, a zatim i ući u klinička ispitivanja. Normalna ćelijska linija korišćena u ovom eksperimentu je bila MRC5, ćelijska linija poreklom od fetalnog plućnog tkiva.

Citotoksična aktivost ispitivanih jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji se nalazi u opsegu od 11,79  $\mu\text{M}$  do 42,13  $\mu\text{M}$ . Zanimljivo je da je za 9 od 13 ispitivanih jedinjenja  $\text{IC}_{50}$  vrednost prema MRC5 ćelijama manja nego  $\text{IC}_{50}$  vrednost cisplatine prema toj ćelijskoj liniji, a svih trinaest jedinjenja pokazuju slabiju aktivnost nego doksorubicin. Najizraženiju aktivnost i prema ovim ćelijama su pokazala jedinjenja koja su bila najaktivnija i prema malignim ćelijskim linijama, odnosno jedinjenja antrahinona sa halkonskom strukturom (**10**, **11**, **12**, **13**), kao i jedinjenje **1**. Najslabije dejstvo prema normalnim ćelijama su pokazala jedinjenja **3** (42,13  $\mu\text{M}$ ), **5** (38,57  $\mu\text{M}$ ) kao i jedinjenje **8** (36,19  $\mu\text{M}$ ). Na osnovu dobijenih  $\text{IC}_{50}$  vrednosti prema normalnim ćelijama kao i prema malignim ćelijskim linijama izračunat je koeficijent selektivnosti, predstavljen u tabeli 4.2.

U ovoj tabeli, žutom bojom su istaknute vrednosti koeficijenta selektivnosti oko ili iznad 2,5. Ovo se smatra izuzetno dobrom selektivnošću, i jedinjenja koja pokazuju ovaj nivo selektivnosti se smatraju dovoljno bezbednim za primenu u kliničkoj praksi. Kako su sva ispitivana jedinjenja najbolju aktivnost ispoljila prema K562 ćelijama, koeficijent selektivnosti prema ovim ćelijama je veći od 2,5 za jedanaest od trinaest jedinjenja. Samo kod jedinjenja **11** i **13** koeficijent selektivnosti ne prelazi tu granicu, mada se i kod njih on može smatrati relativno dobrim. Ovo upućuje na mogućnost da jedinjenja iz ove grupe predstavljaju dobre kandidate za dalja ispitivanja potencijalnih lekova za tretman mijeloidnih leukemija. Osim K562, ispitivana jedinjenja su se pokazala kao dosta selektivna i prema HeLa i LS174 malignim ćelijskim linijama. Prema obe ove ćelijske linije je po šest ispitivanih jedinjenja selektivno. Sa druge strane, MDA-MB-361, MDA-MB-453 i A549 ćelije su se pokazale kao mnogo rezistentnije na aktivnost ispitivanih jedinjenja, tako da kod MDA-MB-453 ćelija, samo tri jedinjenja pokazuju zadovoljavajuću aktivnost, dok je kod druge dve ćelijske linije u pitanju samo po jedno jedinjenje.

## *Diskusija*

---

Po selektivnosti se posebno ističe jedinjenje **3**, čiji su koeficijenti selektivnosti veći od 2,5 na HeLa, K562, LS174 ćelijskim linijama, i što je posebno značajno, prema MDA-MB-361 ćelijama, ćelijama kancera dojke, vrlo rezistentnim prema mnogim tretmanima. Jedinjenje **3** pokazuje izuzetnu selektivnost prema ovoj ćelijskoj liniji, sa koeficijentom selektivnosti od 9,47. Značaj ovog podatka postaje još veći kad se upoređi sa koeficijentima selektivnosti ostalih ispitivanih jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji, koji su u najvećem broju slučajeva imali vrednosti ispod jedan, a svi ispod 2.

Ono što razlikuje jedinjenje **3** od ostalih jedinjenja iz grupe tiosemikarbazon-antrahinona je prisustvo heksil-grupe, i upoređivanje strukture i selektivnosti ovog jedinjenja pokazuje da je veoma moguće da ova heksil-grupa doprinosi aktivnosti, a posebno selektivnosti. U različitim studijama je pokazano da uvođenje heksil-grupe u neko jedinjenje može višestruko povećati njegovu dostupnost i aktivnost. Ovo se ne odnosi samo na terapeutike koje se koriste u tretmanu kancera, već i na one u drugim granama medicine. Na primer, 5-aminolevulinska kiselina je prekursor porfirina, i koristi se u fotodinamskoj terapiji (PDT), kao netoksično jedinjenje koje kada se selektivno izloži snopu svetlosti postaje toksično za ćelije u kojima se nalazi. Ovo jedinjenje se može dalje razvijati za tretman nazofaringealnih karcinoma, kancera kolona, itd, kao i tretmanu akni i drugih poremećaja. Studije su pokazale da uvođenje samo jedne heksil funkcionalne grupe u ovaj molekul višestruko povećava lipofilnost jedinjenja i prolazak kroz ćelijske membrane. Takođe, pokazano je i da, u malignim ćelijama, samo dodatak ove grupe povećava stepen indukcije apoptoze u malignim ćelijama, ali ne i toksičnost prema normalnim, zdravim limfocitima periferne krvi (Chu i Yow, 2012; Ren et al., 2002). Višestruko povećanje lipofilnosti je takođe pokazano i kod jedinjenja koja se koriste prilikom cerebrovaskularnih oštećenja, gde je izuzetno potrebno da korišćeno jedinjenje bude jako lipofilno, kao i pri kreiranju prolekova, čija efikasnost zavisi pre svega od prolaska kroz ćelijske membrane (Weng Larsen et al., 2001; Sheng et al., 2011). Može se pretpostavi da i u slučaju jedinjenja ispitivanih u ovom radu, uvođenje heksil-grupe kao bočnog lanca u molekulu antrahinonskog tiosemikarbazona dovodi do povećanja lipofilnosti ovog molekula, a samim tim i do lakšeg prolaska ovog jedinjenja u malignu ćeliju. Rezistencija malignih ćelija na širok spektar terapeutika se razvija kada dodje do povećanja ekspresije nespecifičnih efluks

## *Diskusija*

---

transportera. Baš ovo je moguće objašnjenje zašto jedinjenje **3** pokazuje veliku selektivnost i odličnu aktivnost prema MDA-MB-361 ćelijama – upravo zato što je ovom jedinjenju moguće da prođe u većoj količini kroz ćelijske membrane i ostvari svoju ulogu unutar ćelije.

Pored jedinjenja **3**, značajnu selektivnost pokazuju i tri jedinjenja iz grupe antrahinonskih halkona prema HeLa ćelijama. Koeficijenti selektivnosti prema ovoj malignoj ćelijskoj liniji iznose 8,65 za jedinjenje **10**, zatim 9,96 za jedinjenje **11** i 8,3 za jedinjenje **12**. Zbog ovoga, ova jedinjenja predstavljaju dobre kandidate za terapiju kancera koje odlikuje izuzetno brza deoba ćelija i visoka ekspresija enzima telomeraze. Jedinjenje **12** se takođe odlikuje i veoma visokim koeficijentom selektivnosti prema LS174 ćelijama (8,59). Ova maligna ćelijska linija eksprimira veliki broj onkogeni (c-myc, N-myc, H-ras, N-ras, itd.). Istraživanja jedinjenja u kojima je kao supstituent uvođen furanski prsten su pokazala da prisustvo ove funkcionalne grupe povećava citotoksični potencijal datog jedinjenja prema malignim ćelijama, kao i mogućnost inhibicije MDR1 efluks transportera, iako nije razjašnjeno na koji način ova grupa može da doprinese toj interakciji. Dodatno se smatra da efekti supstitucije jedinjenja furanskim prstenom omogućavaju i pospešuju interakciju sa tubulinom, i sprečavaju polimerizaciju tubulina, kao i interakciju sa drugim strukturama unutar ćelije. Pošto su ovo karakteristike koje se u mnogo većoj meri ispoljavaju u malignoj ćeliji nego u normalnim ćelijama, može se zaključiti da je selektivnost jedinjenja koje u sebi sadrži furanski prsten posledica interakcije sa navedenim strukturama (Lee et al., 2013; Fu et al., 2007).

Međutim, ovde je značajno primetiti da cisplatina ima koeficijent selektivnosti veći od 2,5 samo prema tri od šest ispitivanih ćelijskih linija, dok je doksorubicin selektivan samo prema K562 ćelijama. S obzirom na to da su ova dva hemoterapeutika često primenjivana u klinici, i to već dugi niz godina za tretman velikog broja različitih tipova maligniteta, koeficijent selektivnosti treba smatrati samo jednim od parametara koji određuju sudbinu nekog jedinjenja prilikom prekliničkog i kliničkog razvoja, ali ne i najvažnijim. Pogotovo u terapiji kancera, vrlo često benefiti korišćenja određene supstance opravdavaju upotrebu tog jedinjenja čak i kad pokazuje visoku toksičnost.

## *Diskusija*

---

Zbog pokazane izuzetne aktivnosti prema širokom spektru malignih ćelijskih linija, kao i selektivnosti u odnosu na normalnu ćelijsku liniju, bilo je značajno utvrditi i mehanizam dejstva ispitivanih jedinjenja. Kako pojedinačne komponente ovih trinaest jedinjenja pokazuju veoma plejotropnu aktivnost, koja uključuje dejstvo i interakciju sa velikim brojem ćelijskih meta, prvi korak u ispitivanju mehanizama dejstva je bilo utvrđivanje potencijalnog proapoptotskog dejstva jedinjenja.

Morfološka analiza HeLa ćelija tretiranih  $IC_{50}$  koncentracijama ispitivanih supstanci, čije su vrednosti prethodno utvrđene MTT citotoksičnim testom na ovoj ćelijskoj liniji, je pokazala da ispitivane supstance zaista izazivaju apoptozu u tretiranim ćelijama. Primetna je pojava smanjivanja ćelije, njene fragmentacije i kondenzacija nukleusa u rano-apoptotskim ćelijama. Ovo važi za obe grupe ispitivanih jedinjenja, antrahinonske tiosemikarbazone, kao i antrahinonske halkone sa iminskim fragmentom. Ćelije su takođe tretirane i duplo većom koncentracijom ispitivanih jedinjenja,  $2IC_{50}$ , tokom istog vremenskog perioda, i primetno je da postoji dozno zavisno dejstvo, ali i dalje je jasno da jedinjenja deluju proapoptotski. Kod jedinjenja **2**, **7** i **12** može se videti da je došlo do prolaska etidijum-bromida kroz membranu ćelije, i da se boji unutrašnjost ćelije ovom fluorescentnom bojom, što se objašnjava narušavanjem integriteta ćelijske membrane, do čega dolazi prilikom pojave sekundarne nekroze, kao i pojava jednog broja apoptotskih tela. Potrebno je naglasiti da u okviru ovog eksperimenta nisu fotografisani uzorci supernatanta tretiranih ćelija, u kome se nalazi najveći broj apoptotskih tela. Indukcija apoptoze je veoma povoljna karakteristika jedinjenja koja se koriste u klinici, pošto indukcija nekroze može dovesti do posledične inflamacije tkiva. Podaci dobijeni ovom metodom se slažu sa podacima iz literature o efektu antrahinona, halkona i tiosemikarbazona prema malignim ćelijama (Mai et al., 2014; Lou et al., 2009; Abu et al., 2013; Champelovier et al., 2013).

Kao nastavak ispitivanja potencijalnog proapoptotskog dejstva novosintetisanih jedinjenja, zanimala nas je distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana tim jedinjenjima, a u odnosu na kontrolu. Zbog toga su svih sedam ćelijskih linija korišćenih prilikom ispitivanja citotoksičnosti (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, K562, A549, LS174, MRC-5), tretirane ispitivanim jedinjenjima koncentracija  $IC_{50}$  i  $2IC_{50}$ ,

## *Diskusija*

---

i jedna i druga koncentracija tokom 24, 48 i 72 sata. Nakon tretmana, tretirane ćelije i kontrole su bojene propidijum jodidom, nakon čega su analizirane protočnim citometrom. Iako je iz rezultata ovih eksperimenata jasno da i male promene u strukturi molekula mogu dovesti do promena u intenzitetu ili načinu dejstva jedinjenja, kao i da dejstvo zavisi od maligne ćelijske linije koja je korišćena, generalno se može videti da postoje dozno i vremenski zavisno povećanje procenta ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa, što potvrđuje pretpostavku da ova jedinjenja izazivaju apoptozu u ciljnim ćelijama.

Prilikom tretmana HeLa ćelija, najkarakterističnije dejstvo su imala jedinjenja iz grupe antrahinonskih halkona, kod kojih prilikom tretmana ovih ćelija  $IC_{50}$  koncentracijom, ne dolazi do promene distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu, sve dok se ne produzi inkubacija na 72 sata, kada dolazi do naglog skoka ćelija u sub-G1 fazi, što može uputiti na zaključak da je za dejstvo ovih jedinjenja potreban duži tretman. Prilikom tretmana duplo većom koncentracijom ova četiri jedinjenja, posebno se ističe jedinjenje **13**, koje pri većim koncentracijama dovodi do G2/M zastoja, koji zatim, nakon duže inkubacije, uvodi ćelije u apoptozu, prilikom čega se povećava broj ćelija u sub-G1 fazi. Takođe, iz grupe antrahinona sa tiosemikarbazonskom farmakoforom, značajna su dejstva supstanci **1** i **7**, koja dovode do izuzetnog skoka u procentu sub-G1 ćelija, odnosno efikasno izazivaju apoptozu.

U skladu sa njihovom slabom citotoksičnom aktivnošću prema MDA-MB-361 ćelijskoj liniji, i prilikom tretmana ovih ćelija ispitivanim supstancama radi analize distribucije ćelijskog ciklusa ispitivana jedinjenja nisu pokazala izražene efekte osim blagog povećanja broja ćelija u sub-G1 fazi. Zanimljiva su jedinjenja **2** i **3** iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona, kao i grupa sa halkonskom strukturom, koja dovode do vremenski-zavisnog zastoja u G2/M fazi. Jedinjenje **3**, kao najaktivnije i najselektivnije prema ovoj ćelijskoj liniji je posebno interesantno za dalja istraživanja njegovog mehanizma dejstva. MDA-MB-453 ćelijska linija pokazuje mnogo veće promene prilikom tretmana ispitivanim supstancama, pri čemu je najviše izražen vremenski zavisno povećanje broja ćelija u sub-G1 fazi kod jedinjenja koja pripadaju grupi tiosemikarbazon-antrahinona. Halkonski supstituenti u molekulu antrahinona dovode do izazivanja G2/M zastoja nakon tretmana ove ćelijske linije, i to je najizraženije prilikom kraćeg vremena



## *Diskusija*

---

inkubacije. Duži tretman ovih ćelija dovodi do smanjenja procenta ćelija u toj fazi, i povećanja broja ćelija u sub-G1 fazi, odnosno do indukcije apoptoze dolazi tek nakon dužeg tretmana. Zanimljivo je i da prilikom primene  $2IC_{50}$  dolazi do bržeg povećanja broja ćelija u sub-G1 fazi, odnosno jasno se pokazuje dozno-zavisno dejstvo ovih jedinjenja.

Prilikom tretmana K562 ćelija ispitivanim supstancama, takođe je najizraženiji efekat halkonskih jedinjenja, kod kojih dolazi do značajnog povećanja ćelija u sub-G1 fazi. Dejstvo ostalih jedinjenja takođe dovodi do povećanja broja ćelija u ovoj fazi, ali u mnogo manjem obimu. Kod A549 i LS174 ćelijskih linija dolazi uglavnom do blagog povećanja procenta ćelija nakon tretmana svim ispitivanim jedinjenjima, pogotovo pri višim koncentracijama i dužem vremenu inkubacije. Posebno se, kod A549 ćelija, ističe jedinjenje **3**, čiji efekat pokazuje pravilnu vremensko-doznu zavisnost. Takođe, i kod jedne i kod druge ćelijske linije je primetno da jedinjenja **10**, **11**, **12** i **13**, koja poseduju halkonske supstituente, dovode do zastoja u G2/M fazi pri manjim koncentracijama. Posebno se ističe jedinjenje **10**, koje povećava procenat ćelija u ovoj fazi na 29,31% kod A549 ćelija, a 69,98% kod LS174 ćelija nakon inkubacije 24 sata sa  $IC_{50}$  koncentracijom supstance.

Prolazak kroz svaku od faza ćelijskog ciklusa je strogo kontrolisan kompleksnim interakcijama velikog broja proteina, od kojih su najbitniji ciklini i ciklin-zavisne kinaze (CDK). U G1 fazi, ćelije se pripremaju za replikaciju DNK molekula, koja se odvija u S fazi, a zatim, nakon sinteze drugog molekula DNK, ćelija ulazi u G2 fazu, gde dolazi do reparacije eventulanih oštećenja, da bi se ciklus završio M fazom, odnosno deobom ćelije. G1 fazu pre svega regulišu tri kinaze – Cdk4, Cdk6 i Cdk2.

Međutim, zbog pokazanih efekata grupe antrahinonskih halkona (jedinjenja **10**, **11**, **12** i **13**) prema većini ispitivanih ćelija, odnosno izazivanja G2/M zastoja, posebno nam je interesantan ovaj prelaz iz G2 u M fazu, i sam prolazak kroz mitozu, odnosno regulatori ovog procesa.

Tokom G2 faze, dolazi do sinteza B-tipa ciklina (B1 i B2), a kontrolu progresije kroz ćelijski ciklus preuzima Cdk1 kinaza. Ali, jedinjenja koja izazivaju zastoj u ovoj fazi ne moraju da deluju direktno na ove komplekse ciklina i ciklin zavisnih kinaza. Postoje različite pretpostavke na koji način različita jedinjenja utiču na progresiju kroz ćelijski

## *Diskusija*

---

ciklus, a među njima su interakcija sa p21, Bax i p53 proteinima, zatim sa sprečavanjem formiranja mitotičkog vretena, kao i sa inhibicijom topoizomeraze II, koja je ključna u razdvajanju hromatida u anafazi (Malumbres i Barbacid, 2005; Yadav et al., 2012).

Za mnoga jedinjenja poreklom iz biljaka je pokazano da bar delimično mogu izazivati zastoj u G2/M fazi, između ostalog i za doksorubicin. Istraživanja na nekoliko ćelijskih linija su pokazala da doksorubicin može imati različite efekte na različite ćelijske linije, ali kod svih izaziva privremeni zastoj u toj fazi. Neki od mehanizama njegovog dejstva su povećanje ekspresije p53 i p21 molekula, kao i povećana ekspresija ciklina B1 (Abu et al., 2013; Bar-On et al., 2013; Zuryń et al., 2012). Takođe, pokazano je i da različiti antrahinonski derivati mogu izazivati ovakav zastoj u ćelijskom ciklusu (Tu et al., 2011). Međutim, kako većina ispitivanih antrahinonskih tiosemikarbazona nije pokazala ovakvo dejstvo na ispitivanim ćelijama, može se zaključiti da je pre svega halkonski ostatak u molekulu halkonskih antrahinona odgovoran za dejstvo jedinjenja **10**, **11**, **12** i **13**.

Podaci iz literature u potpunosti podržavaju ovaj zaključak. Iako su različiti tipovi halkona izolovani iz prirodnih izvora ili sintetisani ispitivani na različitim ćelijama, a samim tim davali različitu jačinu efekta, pokazano je da mnogi halkoni imaju baš ovakav efekat na progresiju kroz ćelijski ciklus. Ono što je veoma zanimljivo je da se u svim istraživanjima primetan prvo zastoj u G2/M fazi, efekat koji može trajati od 8 do 48 sati, a zatim dolazi do smanjenja ćelija u ovoj fazi a povećanja u sub-G1 fazi. Dužina G2/M zastoja zavisi od tipa ćelijske linije na kojoj se vrši ispitivanje kao i od primenjene koncentracije ispitivanih supstanci (Pilatova et al., 2010; Rozmer et al., 2006; Lou et al., 2009). Neke od studija (Hsu et al., 2006; Lou et al., 2009) su proučavale na koji način halkoni mogu izazvati zastoj u G2/M fazi, i pokazano je da dolazi do povećanja ekspresije p21 i p27, ali i do smanjenja ekspresije ciklina A, ciklina B i Cdk1. Međutim, zbog velikog broja različitih mogućih mehanizama dejstva, za rasvetljavanje tačnog mehanizma, odnosno načina na koji jedinjenja ispitivana u ovom radu interaguju sa komponentama koje regulišu ćelijski ciklus, potrebni su dodatni eksperimenti koji će sa sigurnošću odgovoriti na ovo pitanje.

## Diskusija

---

Promena procenta ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa koja se može videti nakon određenog vremena inkubacije sa jednom od supstanci se pripisuje indukciji apoptoze nakon zastoja u mitozu. Termin „mitotska katastrofa“ obuhvata jednu vrstu ćelijske smrti koja može ali ne mora imati odlike klasične apoptoze, ali je karakteriše prisustvo poremećene kontrole ćelijskog ciklusa, i specifična oštećenja mitotičkog vretena ili DNK molekula (Castedo et al., 2004). Takođe, to što ova četiri ispitivana jedinjenja izazvala G2/M zastoj nakon inkubacije sa HeLa i K562 ćelijama, može se objasniti time da na ovim ćelijama kraće vreme inkubacije dovodi do zastoja u G2/M fazi, a da u trenutku kad su ćelije analizirane na protočnom citofluorimetru, došlo je već do indukcije apoptoze u ovim ćelijama.

Da bi se potvrdio potencijal indukcije apoptoze u ovim ćelijama, kao i da bi se otkrili detalji mehanizma dejstva ovih jedinjenja, HeLa ćelije tretirane ispitivanim jedinjenjima koncentracije  $2IC_{50}$ , su inkubirane sa specifičnim inhibitorima kaspaze-3,-8 i -9 (Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK). Rezultati pokazuju da sve supstance, osim jedinjenja **7** i **9**, ostvaruju svoje efekte aktivacijom sve tri kaspaze. Ovaj rezultat pokazuje da ove supstance imaju širok spektar dejstava, koji može aktivirati i spoljašnji i unutrašnji apoptotski put, a posledično i efektorsku kaspazu-3. Unutrašnji apoptotski put se aktivira otpuštanjem citohroma c iz mitohondrija i otvaranjem Bax/Bak kanala, što rezultuje formiranjem Apaf-1/kaspaze-9 apoptozoma, i aktivaciju kaspaze-9. Spoljašnji apoptotski put se aktivira vezivanjem liganda za membranske receptore smrti, što nizom procesa dovodi do aktivacije kaspaze-8 i formiranja DISC kompleksa. I jedna i druga kaspaza nizom kaskadnih reakcija aktiviraju efektorsku kaspazu-3 (Cullen i Martin, 2009).

Istraživanja derivata antrahinona je pokazalo da ova jedinjenja uglavnom dovode do apoptoze aktivacijom spoljašnjeg apoptotskog puta. Eksperimenti na prirodnim antrahinonima su pokazali da je moguće da se ovaj put ne aktivira preko liganda smrti kao što su FasL i TNF, već preko aktivacije Bid proteina (*BH3 interacting-domain death agonist*), na čiju ekspresiju može uticati prisustvo povećanih količina p53. Iako su drugi derivati antrahinona pokazali mogućnost aktivacije kaspaze-8 i preko Fas/FasL i TRAIL puta aktivacije, postoji mogućnost da jedinjenja ispitivana u ovom radu dovode do oštećenja koja povećavaju ekspresiju p53, i posledičnu aktivaciju kaspaze-8 (Lin et al.,

2010a; Wang et al., 2011). Sa druge strane, određen broj antrahinonskih derivata može indukovati apoptozu i aktivacijom kaspaze-9, bez aktivacije kaspaze-8 (Srinivas et al., 2003).

Poznato je da halkoni pre svega aktiviraju unutrašnji apoptotski put, aktivacijom kaspaze-9, oslobađanjem citohroma c iz mitohondrija (Hsu et al., 2006; Singh et al., 2013). Ovo važi i za tiosemikarbazone, i generalno sve helatore jona, koji bar parcijalno svoje dejstvo ostvaruju indukcijom kaspaze-9 (Yuan et al., 2014). Međutim, pojedini halkoni pokazuju i sposobnost aktivacije kaspaze-8, i to indukcijom ekspresije brojnih molekula kao što su bcl-2, CD40, FasL, TNF $\alpha$ , itd (Mai et al., 2014). Može se pretpostaviti da je efekat koji ispitivana jedinjenja ostvaruju na HeLa ćelijama, odnosno aktivacija oba apoptotska puta rezultat kombinacije farmakofora sa različitim efektima, i na taj način je poboljšana aktivnost jedinjenja. Takođe, između različitih puteva aktivacije efektorske kaspaze-3 postoje interakcije, tako da i to može doprineti delovanju ovih jedinjenja preko oba signalna puta.

Pored ovog efekta koji ostvaruje većina ispitivanih jedinjenja, zanimljivo je dejstvo jedinjenja **7** i **9**, koji kao supstiuente imaju 2-tiofenilmetil i 3-piridilmetil grupe. Inhibicija kaspaze-3 samo blago utiče na njihovo dejstvo. Takođe, inhibicija kaspaze-9 utiče na veoma mali procenat smanjenja ćelija u sub-G1 fazi prilikom tretmana jedinjenjem **7**, dok to isto važi za kaspazu-8 i jedinjenje **9**. Iz ovoga se može zaključiti da se njihov apoptotski efekat samo delimično ostvaruje aktivacijom kaspazne kaskade. Iako je apoptoza primarni vid ćelijske smrti, postoji i nekoliko drugih tipova koji su nezavisni ili samo delimično zavisni od aktivacije kaspaza. Indukcija drugih tipova ćelijske smrti se, osim fiziološki, može indukovati i uz pomoć TNF- $\alpha$ , kao i različitih hemoterapeutika (Bröker i Kruyt, 2005). Pokazano je da na primer flavonoidi mogu da indukuju autofagiju u ciljnim ćelijama, kao i da neki antrahinoni izazivaju ćelijsku smrt nezavisnu od kaspaza u ćelijama gljiva (Champelovier et al., 2013; Tsang et al., 2013). Dalja ispitivanja ova dva jedinjenja, **7** i **9**, su potrebna da bi se razumeo njihov mehanizam delovanja, koji je samo u malom procentu zavistan od aktivacije kaspaza.

Matriksne metaloproteinaze su proteolitički enzimi koji pripadaju grupi cink-zavisnih endopeptidaza. Predstavljaju ključne elemente u molekularnoj komunikaciji između ćelije i ćelijske mikrosredine. Svojom dejstvom učestvuju i regulišu brojne procese kao što su razvoj organa, inflamatorni procesi, a takođe je njihova aktivnost veoma bitna u razvoju i progresiji tumora. Mogu regulisati rast, diferencijaciju i apoptozu kancer ćelija, a pre svega, i klinički najinteresantnije, migraciju i invazivnost kancer ćelija, kao i angiogenezu u tumorskom tkivu (Egeblad i Werb, 2002; Kessenbrock et al., 2010). Neki od ovih enzima se aktiviraju proteolitičkim putem. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza je povišena u skoro svim kancerima. Za istraživanja predstavljena u ovom radu, najzanimljiviji predstavnik ove familije je bila matriksna metaloproteinaza 2 (MMP-2). Ova proteinaza igra ključnu ulogu u remodelovanju tumorske mikrosredine, a i njena aktivnost u srčanom mišiću je značajna, pogotovo u razvoju i progresiji mnogih srčanih oboljenja. Supstrati ovog enzima su i receptor za faktor rasta fibroblasta (FGFR1), kao i laminin (Egeblad i Werb, 2002; Kupai et al., 2010). Takođe veoma interesantan podatak je i da doksorubicin, široko primenjivani hemoterapeutik, indukuje ekspresiju MMP-2 i MMP-9 proteina, pre svega u srcu. Mehanizam dejstva uključuje transkripciju gena i aktivaciju već postojećih rezervi ovih molekula, i moguće je da je i ovo jedan od načina koji doprinosi kardiotoksičnosti doksorubicina (Bai et al., 2004; Spallarossa et al., 2006).

Primenom želatinske zimografije je ispitan uticaj ispitivanih jedinjenja na aktivnost matriksnih metaloproteinaza u HeLa ćelijama, i to pri tretmanu subtoksičnim koncentracijama ovih jedinjenja. Želatinskom zimografijom je moguće pratiti aktivnosti i MMP-2 i MMP-9 enzima, međutim, pošto je aktivnost MMP-2 mnogo veća od aktivnosti MMP-9, vizualizacija ove trake na gelu je mnogo lakša i brža nego vizualizacija MMP-9 na istom gelu, i zbog toga često nije moguće videti dodatne trake na tim gelovima. Takođe, treba istaći da različite maligne ćelijske linije imaju različiti bazalni nivo ekspresije MMP-2, u zavisnosti od njihovog migratornog i invazivnog potencijala. Za razliku od referentnih uzoraka cisplatine i doksorubicina, koji ne pokazuju razliku u aktivnosti MMP-2, ostala jedinjenja pokazuju značajan efekat na smanjenje aktivnosti ovih enzima u odnosu na kontrolu. Jedinjenje **7** je jedino koje pokazuje slab efekat prema ovim enzimima, a jedinjenja **5** i **8** pokazuju najsnažnije dejstvo.

## Diskusija

---

Antrahinoni su poznati po svojoj sposobnosti da utiču na ekspresiju i aktivnost matriksnih metaloproteinaza, zbog čega je njihovo dejstvo vezano za inhibiciju metastaziranja, invazivnosti i neoangiogeneze. Istraživanja su pokazala da se dejstvo prirodnih antrahinona ostvaruje smanjenjem ekspresije MMP-2 i MMP-9, i to preko regulacije promotora njihovih gena. Kako promotori gena ovih proteinaza poseduju vezivna mesta brojnih regulatora, uključujući i NF- $\kappa$ B, AP-1, SP1, i brojnih drugih, smatra se da regulacija nivoa ekspresije matriksnih metaloproteinaza ide preko regulacije neke od ovih komponenti. Poznato je da MAPK signalni put kao i RhoB protein takođe regulišu ekspresiju MMP-2 i -9 (Suboj et al., 2012). MAP kinaze (*mitogen-activated protein kinase*) je familija proteina koja ima funkciju u proliferaciji, preživljavanju, morfogenezi i pokretljivosti odnosno invazivnosti ćelija, i obuhvata brojne članove, od kojih su najbitniji ERK1, ERK2, JNK 1 i 2, kao i p38 MAPK. Jedna studija je pokazala da antrahinoni, ili jedan broj antrahinona, najverovatnije deluju preko p38 MAPK signalnog puta (Lin et al., 2010b).

Za razliku od antrahinona, ispitivanja različitih halkona su pokazala raznovrsniju sliku. Dok su određena istraživanja dolazila do zaključka da halkoni suprimiraju ekspresiju samo MMP-9 u velikoj meri, ali ne i MMP-2 (Rodrigues et al., 2011), druge studije pokazuju značajan efekat halkona prema nekoliko vrsta matriksnih metaloproteinaza. Određeni autori povezuju aktivnost halkona izolovanih iz prirodnih izvora sa inhibicijom sekrecije MMP-2 čak i do 80% (Ngameni ET AL., 2006), a najnovija istraživanja pokazuju da se ova regulacija ekspresije matriksnih metaloproteinaza odvija preko inaktivacije FAK/JNK signalnog puta, odnosno takođe interakcijom sa MAP kinaznim putevima. Ova studija (Lin i Shih, 2014) je takođe pokazala da osim ova dva člana MAP kinaza, ispitivani halkoni ne utiču na ostale članove te familije. Takođe, osim ovog dejstva, halkoni mogu uticati na povećanje ekspresije I $\kappa$ B $\alpha$ , kao i na sprečavanje njegove fosforilacije, što sve dovodi do smanjenja aktivnosti NF- $\kappa$ B, i sprečava njegovu interakciju sa promotorom matriksnih metaloproteinaza.

U skladu sa navedenim istraživanjima, u grupi ispitivanih derivata antrahinona, pretpostavlja se da je antrahinonska farmakofora nosilac najvećeg dela uticaja na ekspimiranje i aktivnost matriksne metaloproteinaze 2, mada i drugi delovi molekula

## *Diskusija*

---

doprinosu ovoj aktivnosti. Ovo istraživanje pruža osnovu za dalje provjere interakcija ispitivanih jedinjenja i pre svega NF- $\kappa$ B, kao i MAPK signalnih puteva.

Neoangiogeneza u tumorskom tkivu predstavlja jedan od do sada nerešenih problema u razvoju kancer terapija. Ona predstavlja ograničavajući faktor pri širenju i metastaziranju tumora kroz organizam (Kessenbrock et al., 2010). Prilikom prekliničkih istraživanja, potrebno je istražiti potencijal ispitivanih jedinjenja da suprimiraju angiogenetske procese. Jedan od načina na koji može da se ispita potencijal ispitivanih jedinjenja da utiču na određene faze angiogeneze je i primenom *Tube formation assay*-a, koji je zasnovan na tome da endotelijalne ćelije formiraju kapilarne strukture na površini rekonstruisanog ekstracelularnog matriksa bazalne membrane, suplementiranog faktorima rasta i drugim supstancama (Arnaoutova et al., 2009).

U skladu sa njihovim inhibitornim uticajem na matriksne metaloproteinaze, antrahinoni poseduju dobre anti-angiogenetske karakteristike, dobro opisane u literaturi. Ono što se generalno ističe je da polarnost molekula derivata antrahinona doprinosi njegovoj efikasnosti u inhibiciji neoangiogeneze (He et al., 2009; He et al., 2011). Nedavno je pokazano da prirodni antrahinoni mogu interagovati sa pripadnicima familije STAT transkripcionih faktora, preciznije sa STAT3, koji je eksprimiran u mnogim tipovima kancera, a reguliše ekspresiju mnogih nizvodnih gena koje su odgovorne za neoangiogenezu. Takođe, smatra se da deo svog dejstva ostvaruju i preko blokade fosforilacije VEGFR2 (Subramaniam et al., 2013). Halkoni takođe predstavljaju dobre kandidate za razvoj antitumorskih lekova, pošto je pokazano da oni mogu delovati ili direktno na VEGFR-2 (Rizvi et al., 2012) ili inhibicijom različitih signalnih puteva u ćeliji (Varinska et al., 2012; Mojzis et al., 2008).

Prilikom ispitivanja jedinjenja predstavljenih u ovom radu, izabrano je osam od trinaest jedinjenja čiji potencijal inhibicije neoangiogeneze je proveren uz pomoć *Tube formation assay*-a. Ova jedinjenja su izabrana na osnovu prethodnih eksperimenata, i to ne samo na osnovu njihove citotoksične aktivnosti prema ciljnim ćelijama, već i po mogućem mehanizmu njihovog dejstva i uticaju na druge procese u ćeliji. Rezultati su u skladu sa podacima iz literature i pokazano je da na veštačkoj bazalnoj membrani, ispitivana

## *Diskusija*

---

jedinjenja **1, 2, 3, 7, 10, 11, 12** i **13** dovode do smanjenog formiranja tubularnih struktura. Dejstva jedinjenja **3** i **10** su posebno izražena. Kako jedinjenje **10** ima veoma polarnu strukturu, njegovo izuzetna aktivnost je očekivana u inhibiciji neoangiogeneze, i pretpostavka je da ovo jedinjenje može stupati u interakcije sa komponentama signalnih puteva koji kontrolišu ovaj proces. Ono što je, međutim, zanimljivo, je da jedinjenje **3**, koje je dosta lipofilno, takođe pokazuje iznenađujuće dobro dejstvo na endotelijalnim ćelijama. Moguće objašnjenje dejstva ovog jedinjenja je da ono deluje direktno na VEGFR2, molekul koji poseduje hidrofobni džep, preko koga se ostvaruju regulacija ove kinaze (Schwartz i Murray, 2011; Sanphanya et al., 2013). Iako su potrebna dalja istraživanja da bi se ova potencijalna interakcija ispitala, može se pretpostaviti da hidrofobni lanac jedinjenja **3** poseduje odgovarajuću strukturu i dužinu da bi mogla interakcijom sa hidrofobnim regulatornim džepom VEGFR2 da utiče na supresiju njegove aktivnosti.

Invazivnost, odnosno potencijal migracije ćelija, i uticaj ispitivanih jedinjenja na ove karakteristike EA.hy926 ćelijske linije je takođe ispitan u ovom radu. Ćelije su praćene na mikroskopu tokom 24 sata, i izračunat je procenat zatvaranja proreza u monosloju.

Jedinjenja koja su imala najviše izraženi inhibicioni uticaj na migraciju ovih ćelija su antrahinonski halkoni, osim jedinjenja **13**. Najviše se ističe jedinjenje **12**, sa furanskim prstenom. Iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona, najefikasnije su delovale supstance **7, 8** i **9**. Kako su pojedinačne supstance pokazale različite uticaje na migraciju, invazivnost i neoangiogenezu malignih i normalnih ćelijskih linija, može se zaključiti da ove supstance interaguju sa unutarćelijskim komponentama specifičnim za te ćelijske procese ili njihovim regulatornim elementima.

Jedinjenja ispitivana u ovom radu, serija od devet antrahinonskih tiosemikarbazona i četiri antrahinonskih halkona, je pokazala izuzetno dobro citotoksično i antiproliferativno dejstvo prema nizu malignih ćelijskih linija, poreklom iz različitih tipova tumora. Takođe, ove supstance su pokazale dobru selektivnost prema mnogim ćelijskim linijama, a jedinjenje **3** se posebno ističe kao veoma aktivno i selektivno prema vrlo rezistentnoj ćelijskoj liniji poreklom iz metastaze kancera dojke u odnosu na normalnu. Istraživanje njihovog dejstva je dovelo do saznanja da ove supstance izazivaju apoptozu u ciljnim



## *Diskusija*

---

ćelijama, a antrahinonski halkoni to čine prvo dovodeći do zastoja u G2/M fazi. Sve supstance, osim jedinjenja **7** i **9** indukuju apoptozu i preko unutrašnjeg i preko spoljašnjeg signalnog puta. Takođe, ova jedinjenja su veoma aktivna u inhibiciji metastaziranja, supresijom ekspresije matriksnih metaloproteinaza, inhibiciji angiogeneze kao i migracije i invazivnosti.

Grupa antrahinonskih halkona je pokazala veoma izraženo dejstvo u svim ispitivanjima, i mogla bi da predstavlja izuzetno dobru osnovu za dalja istraživanja. Posebno je primetno da jedinjenja sa halogenim supstituentima, kao i furanskim prstenom imaju snažnu aktivnost, dok jedinjenje **13**, sa benzenskim prstenom ima umerenije dejstvo na sve karakteristike maligne ćelije.

U grupi antrahinonskih tiosemikarbazona posebno se ističu jedinjenja **1** i **3**. Jedinjenje **1**, sa fenil supstituentom na tioamidnom delu molekula, poseduje izrazito snažnu citotoksičnu aktivnost, ali je manje efikasno u supresiji drugih procesa u kancer ćeliji. Sa druge strane, jedinjenje **3**, iako je manje citotoksično i ima manju antiproliferativnu aktivnost od jedinjenja **1**, poseduje druge, veoma zanimljive karakteristike, i potencijal interakcije sa komponentama maligne ćelije, čime inhibitorno deluje na migraciju i angiogenezu. Ono što ga posebno odlikuje je izuzetno dobra selektivnost.

Rezultati ovog istraživanja, koje po prvi put predstavlja uticaj kombinovanih farmakofora sa već poznatim anti-tumorskim karakteristikama, na različite aspekte razvoja, proliferacije i metastaziranja tumora, će doprineti razvoju aktivnijih i manje toksičnih citostatika i kao glavni cilj imaju poboljšanje terapije kancera.

### 6. Zaključak

- Grupa novosintetisanih derivata antrahinona koja se sastoji od dve podgrupe, antrahinonskih tiosemikarbazona i antrahinonskih halkona sa iminskim fragmentom, pokazuje izuzetno dobro citotoksično i antiproliferativno dejstvo prema nizu malignih ćelijskih linija, kao i značajnu selektivnost prema malignim u odnosu na normalne transformisane ćelije.
- Najbolje dejstvo jedinjenja pokazuju prema K562 malignim ćelijama, dok generalno najslabije dejstvo imaju na MDA-MB-361 ćelije kancera dojke, osim jedinjenja **3**, koje je pokazalo izuzetno dejstvo kao i selektivnost prema ovim ćelijama.
- Morfološka analiza malignih ćelija tretiranih ispitivanim jedinjenjima pokazuje da ova jedinjenja deluju indukujući apoptozu u ciljnim ćelijama.
- Grupa jedinjenja sa halkonskom farmakoforom dovodi do G2/M zastoja u ćelijskom ciklusu tretiranih malignih ćelija, nakon čega dolazi do indukcije apoptoze u ovim ćelijama.
- Sva jedinjenja indukuju apoptozu u ciljnim ćelijama aktivacijom i spoljašnjeg i unutrašnjeg apoptotskog puta, osim jedinjenja **7** i **9**, čija se dejstvo samo delimično ostvaruje preko jednog od ova dva puta.
- Sva ispitivana jedinjenja, osim jedinjenja **7**, pokazuju izuzetan potencijal sprečavanja metastaza, inhibicijom MMP-2, pri čemu jedinjenja **5** i **8** pokazuju najbolje dejstvo.
- Od osam jedinjenja kod kojih je ispitivan potencijal sprečavanja neoangiogenze, jedinjenje **3** iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona, i jedinjenje **10** iz grupe antrahinonskih halkona su pokazala najveću aktivnost.

## Zaključak

---

- Na inhibiciju potencijala migriranja najbolje su delovala jedinjenja iz grupe antrahinonskih halkona, kao i jedinjenja **7**, **8** i **9** iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona. Najviše se ističe inhibitorno dejstvo jedinjenja **12**.
- Ispitivani antrahinonski derivati pokazuju značajna antitumorska dejstva, i selektivnost prema ciljnim malignim ćelijama. Ova istraživanja predstavljaju osnovu za dalji razvoj ovih jedinjenja u terapijske svrhe.
- Ispitivana serija antrahinonskih halkona je generalno pokazala najbolja dejstva na različite aspekte malignog rasta, proliferacije i metastatskog potencijala malignih ćelija.
- Iz grupe antrahinonskih tiosemikarbazona, najviše se ističu jedinjenja **1** i **3**, sa fenil i heksil-supstituentima, koji poseduju značajno citotoksično, antiinvazivno, antineoangiogenetsko i antimetastatsko dejstvo.

### **7. Literatura**

- Abu N, Akhtar MN, Ho WY, Yeap SK, Alitheen NB. 3-Bromo-1-hydroxy-9,10-anthraquinone (BHAQ) inhibits growth and migration of the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Molecules*. 2013; 18(9):10367-77.
- Adams DJ. The Valley of Death in anticancer drug development: a reassessment. *Trends Pharmacol Sci*. 2012; 33(4):173-80.
- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 1999; 59(11):2615-22.
- Agarwal VR, Bulun SE, Leitch M, Rohrich R, Simpson ER. Use of alternative promoters to express the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in breast adipose tissues of cancer-free and breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(11):3843-9.
- Almeida D, Gerhard R, Leitto D, Davilla C, Damasceno M, Schmitt F. Topoisomerase II-alfa gene as a predictive marker of response to anthracyclines in breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2014. doi: 10.1016/j.prp.2014.06.017.
- Arnaoutova I, George J, Kleinman HK, Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*. 2009; 12(3): 267-74.
- Arora A, Scholar EM. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315(3):971-9.
- Ashley N, Poulton J. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 378(3):450-5.
- Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep* 2004; 11:505-8.

## *Literatura*

---

- Balis JU, Bumgarner SD, Paciga JE, Paterson JF, Shelley SA. Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction. *Exp Lung Res.* 1984; 6(3-4):197-213.
- Bao L, Hazari S, Mehra S, Kaushal D, Moroz K, Dash S. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol.* 2012; 180(6):2490-503.
- Bar-On O, Shapira M, Hershko DD. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2007; 18(10): 1113-21.
- Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature.* 1996; 379(6562):225-32.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6):401-10.
- Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8):592-603.
- Birrell SN, Hall RE, Tilley WD. Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998; 3(1):95-103.
- Boumendjel A, Boccard J, Carrupt PA, Nicolle E, Blanc M, Geze A, Choisnard L, Wouessidjewe D, Matera EL, Dumontet C. Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones: forward structure-activity relationship. *J Med Chem.* 2008; 51(7):2307-10.
- Bröker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3155-62.
- Broxterman HJ, Gotink KJ, Verheul HM. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib. *Drug Resist Updat.* 2009; 12(4-5): 114-26.
- Bublely GJ. Is the flare phenomenon clinically significant? *Urology.* 2001; 58(2): 5-9.

## *Literatura*

---

- Canzoneri JC, Oyelere AK. Interaction of anthracyclines with iron responsive element mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(21):6825-34.
- Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014; 34(1):106-35.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004; 23(16):2825-37.
- Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K, Nadkarni A. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutat Res.* 2013; 753(1):7-23.
- Chen J, Ghorai MK, Kenney G, Stubbe J. Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(11): 3781-90.
- Chen J, Huang YW, Liu G, Afrasiabi Z, Sinn E, Padhye S, Ma Y. The cytotoxicity and mechanisms of 1,2-naphthoquinone thiosemicarbazone and its metal derivatives against MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 197(1):40-8.
- Chen J, Stubbe J. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Curr Opin Chem Biol.* 2004; 8(2): 175-81.
- Chen M, Bragger Christensen S, Zhai L, Rasmussen MH, Theander TG, Frøkjær S, Steffansen B, Davidsen J, Kharazmi A. The novel oxygen nated chalcone, 2,4-dimethoxy-4'-butoxychalcone, exhibits potent activity against human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in vitro and rodent parasites *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* in vivo. *J Infect Dis.* 1997; 176(5): 1327-33.
- Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Wright F, Pasqualini JR. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 72(1-2): 23-7.

## *Literatura*

---

- Choi RJ, Ngoc TM, Bae K, Cho HJ, Kim DD, Chun J, Khan S, Kim YS. Anti-inflammatory properties of anthraquinones and their relationship with the regulation of P-glycoprotein function and expression. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1-2): 272-81.
- Chu ES, Yow CM. Modulation of telomerase and signal transduction proteins by hexyl-ALA-photodynamic therapy (PDT) in humandoxorubicin resistant cancer cell models. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2012; 9(3): 243-55.
- Cocco MT, Congiu C, Onnis V, Pellerano ML, De Logu A. Synthesis and antimycobacterial activity of new S-alkylisothiosemicarbazone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10(3):501-6.
- Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer.* 2006;6(1):75-83.
- Colditz GA, Wei EK. Preventability of Cancer: The Relative Contributions of Biologic and Social and Physical Environmental Determinants of Cancer Mortality. *Annu Rev Public Health.* 2012;33: 137-156.
- Cole PD, Zebala JA, Kamen BA. Antimetabolites: A new perspective. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2005; 2(4): 337-342.
- Cortés-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7(2):56-60.
- Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal.* 2011; 5(2):101-10.
- Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ.* 2009; 16(7):935-8.
- Davies B, Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease. *Br J Cancer.* 1993; 67(5):1126-31.

- de Vasconcelos A, Campos VF, Nedel F, Seixas FK, Dellagostin OA, Smith KR, de Pereira CM, Stefanello FM, Collares T, Barschak AG. Cytotoxic and apoptotic effects of chalcone derivatives of 2-acetyl thiophene on human colon adenocarcinoma cells. *Cell Biochem Funct.* 2013; 31(4):289-97.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* 2005; 24(17):2909-15.
- Dilworth JR, Huetting R. Metal complexes of thiosemicarbazones for imaging and therapy. *Inorganica Chimica Acta.* 2012; 389:3-15.
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *PNAS USA.* 1983; 80(12):3734-7.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(3):161-74.
- El-Sharief MA, Abbas SY, El-Bayouki KA, El-Gammal EW. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid) thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. *Eur J Med Chem.* 2013; 67:263-8.
- Farber S, Diamond LK. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med.* 1948; 238(23):787-93.
- Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med.* 2012; 18(9):509-15.
- Fu Y, Xu B, Zou X, Ma C, Yang X, Mou K, Fu G, Lü Y, Xu P. Design and synthesis of a novel class of furan-based molecules as potential 20S proteasome inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17(4):1102-6.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(3):177-83.
- Gaafar RM, Surmont VF, Scagliotti GV, Van Klaveren RJ, Papamichael D, Welch JJ, Hasan B, Torri V, van Meerbeeck JP. A double-blind, randomised, placebo-controlled phase III intergroup study of gefitinib in patients with advanced NSCLC,



## Literatura

---

non-progressing after first line platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2011; 47(15):2331-40.

- Gafner S, Wolfender JL, Mavi S, Hostettmann K. Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Med*. 1996; 62(1):67-9.
- Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol*. 2014; 5:25.
- GLOBOCAN 2012. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
- Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S, Tedesco F, Rambaldi A, Introna M. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood*. 2000; 95(12):3900-8.
- Gore ME, Larkin JM. Challenges and opportunities for converting renal cell carcinoma into a chronic disease with targeted therapies. *Br J Cancer*. 2011; 104(3):399-406.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(1):48-58.
- Grant SK. Therapeutic protein kinase inhibitors. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(7):1163-77.
- Gruber BM, Anuszevska EL, Bubko I, Gozdzik A, Priebe W, Fokt I. Relationship between topoisomerase II-DNA cleavable complexes, apoptosis and cytotoxic activity of anthracyclines in human cervix carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2005; 25(3B):2193-8.
- Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006; 127(4):679-95.
- Hall RE, Birrell SN, Tilley WD, Sutherland RL. MDA-MB-453, an androgen-responsive human breast carcinoma cell line with high level androgen receptor expression. *Eur J Cancer*. 1994; 30A(4):484-90.

## *Literatura*

---

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144(1): 57-86.
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Hata T, Sugawara R. Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. II. Description of the strain. *J Antibiot (Tokyo)*. 1956; 9(4):147-51.
- He ZH, He MF, Ma SC, But PP. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. *J Ethnopharmacol*. 2009; 121(2):313-7.
- He ZH, Zhou R, He MF, Lau CB, Yue GG, Ge W, But PP. Anti-angiogenic effect and mechanism of rhein from *Rhizoma Rhei*. *Phytomedicine*. 2011; 18(6):470-8.
- Helsen C, Van den Broeck T, Voet A, Prekovic S, Van Poppel H, Joniau S, Claessens F. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21(4):T105-T118.
- Hietala P, Marvola M, Parviainen T, Lainonen H. Laxative potency and acute toxicity of some anthraquinone derivatives, senna extracts and fractions of senna extracts. *Pharmacol Toxicol*. 1987; 61(2):153-6.
- Howat S, Park B, Oh IS, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *N Biotechnol*. 2014; 31(3):242-5.
- Hsu YL, Kuo PL, Tzeng WS, Lin CC. Chalcone inhibits the proliferation of human breast cancer cell by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44(5):704-13.
- Huang H, Chen Q, Ku X, Meng L, Lin L, Wang X, Zhu C, Wang Y, Chen Z, Li M, Jiang H, Chen K, Ding J, Liu H. A series of alpha-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones inhibit topoisomerase II $\alpha$  catalytic activity. *J Med Chem*. 2010; 53(8):3048-64.
- Huang HC, Chang JH, Tung SF, Wu RT, Foegh ML, Chu SH. Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator. *Eur J Pharmacol*. 1992; 211(3):359-64.
- Huang M, Shen A, Ding J, Geng M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci*. 2014; 35(1):41-50.

## *Literatura*

---

- Hudis CA. Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med.* 2007; 357(1):39-51.
- Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics.* 2010; 10(9):1886-90.
- Iehlé C, Radvanyi F, Gil Diez de Medina S, Ouafik LH, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5alpha-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 68(5-6):189-95.
- Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(10):821-34.
- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. World Health Organization. 2012; 101: 41-70.
- Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature.* 1970; 227(5254):168-70.
- Jin GZ, Jin HS, Jin LL. Synthesis and antiproliferative activity of 1,4-bis(dimethylamino)-9,10-anthraquinone derivatives against P388mouse leukemic tumor cells. *Arch Pharm Res.* 2011; 34(7):1071-6.
- Joo WD, Visintin I, Mor G. Targeted cancer therapy - are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas.* 2013; 76(4):308-14.
- Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci.* 1992; 102 (Pt 3):401-16.
- Kalejta RF, Shenk T, Beavis AJ. Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry.* 1997; 29(4):286-91.
- Kang YH, Lee KA, Ryu CJ, Lee HG, Lim JS, Park SN, Paik SG, Yoon DY. Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006; 237(1):33-44.

## Literatura

---

- Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 2008; 10(5):611-8.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141(1):52-67.
- Kolundžija B, Marković V, Stanojković T, Joksović L, Matić I, Todorović N, Nikolić M, Joksović MD. Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014; 24(1):65-71.
- Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 143C:207-222.
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988; 107(4):1589-98.
- Kumar A, Dhawan S, Aggarwal BB. Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene.* 1998; 17(7):913-8.
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010; 61(2):205-9.
- Kurhanewicz J, Vigneron DB, Brindle K, Chekmenev EY, Comment A, Cunningham CH, Deberardinis RJ, Green GG, Leach MO, Rajan SS, Rizi RR, Ross BD, Warren WS, Malloy CR. Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: prospects for translation to clinical research. *Neoplasia.* 2011; 13(2):81-97.

## Literatura

---

- Lai JM, Chang JT, Wen CL, Hsu SL. Emodin induces a reactive oxygen species-dependent and ATM-p53-Bax mediated cytotoxicity in lung cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2009; 623(1-3):1-9.
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda).* 2013; 3(8):1213-24.
- Lee HY, Pan SL, Su MC, Liu YM, Kuo CC, Chang YT, Wu JS, Nien CY, Mehndiratta S, Chang CY, Wu SY, Lai MJ, Chang JY, Liou JP. Furanylzaindoles: potent anticancer agents in vitro and in vivo. *J Med Chem.* 2013; 56(20):8008-18.
- Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res.* 2005; 591(1-2):247-63.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2(2):329-33.
- Limonta P, Manea M. Gonadotropin-releasing hormone receptors as molecular therapeutic targets in prostate cancer: Current options and emerging strategies. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39(6):647-63.
- Limonta P, Montagnani Marelli M, Mai S, Motta M, Martini L, Moretti RM. GnRH receptors in cancer: from cell biology to novel targeted therapeutic strategies. *Endocr Rev.* 2012; 33(5):784-811.
- Lin ML, Lu YC, Chung JG, Li YC, Wang SG, N G SH, Wu CY, Su HL, Chen SS. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.* 2010a; 291(1):46-58.
- Lin ML, Lu YC, Chung JG, Wang SG, Lin HT, Kang SE, Tang CH, Ko JL, Chen SS. Down-regulation of MMP-2 through the p38 MAPK-NF-kappaB-dependent

pathway by aloe-emodin leads to inhibition of nasopharyngeal carcinoma cell invasion. *Mol Carcinog.* 2010b; 49(9):783-97.

- Lin SH, Shih YW. Antitumor effects of the flavone chalcone: inhibition of invasion and migration through the FAK/JNK signaling pathway in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Mol Cell Biochem.* 2014; 391(1-2):47-58.
- Liu M, Wilairat P, Croft SL, Tan AL, Go ML. Structure-activity relationships of antileishmanial and antimalarial chalcones. *Bioorg Med Chem.* 2003; 11(13):2729-38.
- Liu XL, Tee HW, Go ML. Functionalized chalcones as selective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(1):171-80.
- Lou C, Wang M, Yang G, Cai H, Li Y, Zhao F, Yang H, Tong L, Cai B. Preliminary studies on anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxychalcone isolated from *Herba Oxytropis* in human gastric cancer MGC-803 cells. *Toxicol In Vitro.* 2009; 23(5):906-10.
- Ludwig JA, Szakács G, Martin SE, Chu BF, Cardarelli C, Sauna ZE, Caplen NJ, Fales HM, Ambudkar SV, Weinstein JN, Gottesman MM. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1-positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(9):4808-15.
- Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 1999;59(1):141-50.
- Mahesh Kumar J, Idris MM, Srinivas G, Vinay Kumar P, Meghah V, Kavitha M, Reddy CR, Mainkar PS, Pal B, Chandrasekar S, Nagesh N. Phenyl 1,2,3-triazole-thymidine ligands stabilize G-quadruplex DNA, inhibit DNA synthesis and potentially reduce tumor cell proliferation over 3'-azido deoxythymidine. *PLoS One.* 2013; 8(8):707-98.

- Mai CW, Yaeghoobi M, Abd-Rahman N, Kang YB, Pichika MR. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure-activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur J Med Chem.* 2014; 77:378-87.
- Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* 2005; 30(11):630-41.
- Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 1984; 25(1):83-125.
- Marković V, Jančićević A, Stanojković T, Kolundžija B, Sladić D, Vujčić M, Janović B, Joksović L, Djurdjević PT, Todorović N, Trifunović S, Joksović MD. Synthesis, cytotoxic activity and DNA-interaction studies of novel anthraquinone-thiosemicarbazones with automerizable methylene group. *Eur J Med Chem.* 2013; 64:228-38.
- Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol Interv.* 2011; 11(2):141-50.
- Mojzis J, Varinska L, Mojzisova G, Kostova I, Mirossay L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol Res.* 2008; 57(4):259-65.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2):55-63.
- Moudi M, Go R, Yien CYS, Nazre M. Vinca Alkaloids. *Int J Prev Med.* 2013; 4(11): 1231-1235.
- Ngameni B, Touaibia M, Patnam R, Belkaid A, Sonna P, Ngadjui BT, Annabi B, Roy R. Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*. *Phytochemistry.* 2006; 67(23):2573-9.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(4):274-84.

## *Literatura*

---

- Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006; 2(3):213-9.
- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur J Med Chem.* 2007; 42(2):125-37.
- Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. Analysis of anticancer drugs: a review. *Talanta.* 2011; 85(5):2265-89.
- Nutting CM, van Herpen CM, Miah AB, Bhide SA, Machiels JP, Buter J, Kelly C, de Raucourt D, Harrington KJ. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2009; 20(7):1275-9.
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52(6):1213-25.
- Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods.* 1991; 145(1-2):199-203.
- Opletalová V, Kalinowski DS, Vejsová M, Kunes J, Pour M, Jampílek J, Buchta V, Richardson DR. Identification and characterization of thiosemicarbazones with antifungal and antitumor effects: cellular iron chelation mediating cytotoxic activity. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21(9):1878-89.
- Orłowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(6):1649-57.
- Osborne C, Tripathy D. Aromatase inhibitors: rationale and use in breast cancer. *Annu Rev Med.* 2005; 56:103-16.
- Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(6):428-38.



## *Literatura*

---

- Parveen Z, Brunhofer G, Jabeen I, Erker T, Chiba P, Ecker GF. Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of new chalcone derivatives as inhibitors of human P-glycoprotein. *Bioorg Med Chem*. 2014; 22(7):2311-9.
- Patel DJ, Kozlowski SA, Rice JA. Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic-DNA complexes in solution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(6):3333-7.
- Patel KJ, Trédan O, Tannock IF. Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 72(1):127-38.
- Patel MN, Halling-Brown MD, Tym JE, Workman P, Al-Lazikani B. Objective assessment of cancer genes for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12(1): 35-50.
- Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, Raber MN. The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). *Cancer Treat Rev*. 1993; 19(4):351-86.
- Pelosi G. Thiosemicarbazone metal complexes: from structure to activity. *Open Crystallography Journal*. 2010; 3(1): 16-28.
- Perez EA. Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 114(2):195-201.
- Peters GJ, Hooijberg JH, Kaspers GJL, Jansen G. Folates and antifolates in the treatment of cancer; role of folic acid supplementation on efficacy of folate and non-folate drugs. *Trends in Food Science & Technology* 2005; 16(1): 289-297.
- Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr, Doll R. Mortality from smoking worldwide. *British Medical Journal* 1996; 52(1):12-21.
- Phan LM, Yeung SC, Lee MH. Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer Biol Med*. 2014; 11(1):1-19.

## Literatura

---

- Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, Ostro A, Mojzis J. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol In Vitro*. 2010; 24(5):1347-55.
- Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem Biol*. 2013; 8(1): 82-95.
- Povirk LF. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res*. 1996; 355(1-2):71-89.
- Press MF, Sauter G, Buyse M, Bernstein L, Guzman R, Santiago A, Villalobos IE, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M, Robert N, Crown J, Bee V, Taupin H, Flom KJ, Tabah-Fisch I, Pauletti G, Lindsay MA, Riva A, Slamon DJ. Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2011; 29(7):859-67.
- Ren QG, Wu SM, Peng Q, Chen JY. Comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexylester mediated photodynamic action on human hepatoma cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2002, 34(5): 650-4.
- Rizvi SU, Siddiqui HL, Nisar M, Khan N, Khan I. Discovery and molecular docking of quinolyl-thienyl chalcones as anti-angiogenic agents targeting VEGFR-2 tyrosine kinase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012; 22(2):942-4.
- Robak T, Korycka A, Lech-Maranda E, Robak P. Current status of older and new purine nucleoside analogues in the treatment of lymphoproliferative diseases. *Molecules*. 2009; 14(3):1183-226.
- Rodrigues J, Abramjuk C, Vásquez L, Gamboa N, Domínguez J, Nitzsche B, Höpfner M, Georgieva R, Bäumlner H, Stephan C, Jung K, Lein M, Rabien A. New 4-maleamic acid and 4-maleamide peptidyl chalcones as potential multitarget drugs for human prostate cancer. *Pharm Res*. 2011; 28(4):907-19.
- Rozmer Z, Berki T, Perjési P. Different effects of two cyclic chalcone analogues on cell cycle of Jurkat T cells. *Toxicol In Vitro*. 2006; 20(8):1354-62.

## Literatura

---

- Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol.* 1998; 153(1):103-8.
- Sanphanya K, Wattanapitayakul SK, Phowichit S, Fokin VV, Vajragupta O. Novel VEGFR-2 kinase inhibitors identified by the back-to-front approach. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013; 23(10):2962-7.
- Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N Engl J Med.* 2002; 346(9):683-93.
- Schrantz N, Blanchard DA, Auffredou MT, Sharma S, Leca G, Vazquez A. Role of caspases and possible involvement of retinoblastoma protein during TGFbeta-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *Oncogene.* 1999; 18(23):3511-9.
- Schwartz PA, Murray BW. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg Chem.* 2011; 39(5-6):192-210.
- Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(4): 278-87.
- Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K. The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43:69-98.
- Semple SJ, Pyke SM, Reynolds GD, Flower RL. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Res.* 2001; 49(3):169-78.
- Sheng H, Spasojevic I, Tse HM, Jung JY, Hong J, Zhang Z, Piganelli JD, Batinic-Haberle I, Warner DS. Neuroprotective efficacy from a lipophilic redox-modulating Mn(III) N-Hexylpyridylporphyrin, MnTnHex-2-PyP:rodent models of ischemic stroke and subarachnoid hemorrhage. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338(3):906-16.
- Simpson ER. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86(3-5):225-30.
- Singh N, Sarkar J, Sashidhara KV, Ali S, Sinha S. Anti-tumour activity of a novel coumarin-chalcone hybrid is mediated through intrinsic apoptotic pathway by inducing PUMA and altering Bax/Bcl-2 ratio. *Apoptosis.* 2014; 19(6):1017-28.

## Literatura

---

- Sitzmann M, Ihlenfeldt WD, Nicklaus MC. Tautomerism in large databases. *J Comput Aided Mol Des.* 2010; 24(6-7):521-51.
- Song X, Liu X, Chi W, Liu Y, Wei L, Wang X, Yu J. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 $\alpha$  gene. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006; 58(6):776-84.
- Spallarossa P, Altieri P, Garibaldi S, Ghigliotti G, Barisione C, Manca V, Fabbi P, Ballestrero A, Brunelli C, Barsotti A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc Res.* 2006; 69(3):736-45.
- Spanswick VJ, Cummings J, Ritchie AA, Smyth JF. Pharmacological determinants of the antitumour activity of mitomycin C. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56(11):1497-503.
- Srinivas G, Anto RJ, Srinivas P, Vidhyalakshmi S, Senan VP, Karunakaran D. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *Eur J Pharmacol.* 2003; 473(2-3):117-25.
- Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science.* 1998; 279(5356):1534-41.
- Strekowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutat Res.* 2007; 623(1-2):3-13.
- Su YT, Chang HL, Shyue SK, Hsu SL. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(2):229-41.
- Suboj P, Babykutty S, Valiyaparambil Gopi DR, Nair RS, Srinivas P, Gopala S. Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF- $\kappa$ B. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 45(5):581-91.

## Literatura

---

- Subramaniam A, Shanmugam MK, Ong TH, Li F, Perumal E, Chen L, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Ahn KS, Kumar AP, Hui KM, Sethi G. Emodin inhibits growth and induces apoptosis in an orthotopic hepatocellular carcinoma model by blocking activation of STAT3. *Br J Pharmacol.* 2013; 170(4):807-21.
- Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(7):1961-73.
- Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem.* 1997; 40(14):2113-6.
- Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KH, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(12):2463-6.
- Tadigoppula N, Korthikunta V, Gupta S, Kancharla P, Khaliq T, Soni A, Srivastava RK, Srivastava K, Puri SK, Raju KS, Wahajuddin, Sijwali PS, Kumar V, Mohammad IS. Synthesis and insight into the structure-activity relationships of chalcones as antimalarial agents. *J Med Chem.* 2013; 56(1):31-45.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010; 70(14):5649-69.
- Tammela TL. Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 360(1-2):59-67.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139(5):871-90.
- Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5- $\alpha$  reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *Prostate.* 2005; 63(3):231-9.
- Tindall DJ, Rittmaster RS. The rationale for inhibiting 5 $\alpha$ -reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. *J Urol.* 2008; 179(4):1235-42.

- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*. 1976; 12(3):180-91.
- Tomasetti M, Santarelli L, Neuzil J, Dong L. MicroRNA regulation of cancer metabolism: role in tumour suppression. *Mitochondrion*. 2014. doi: 10.1016/j.mito.2014.06.004.
- Topcu Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J Clin Pharm Ther*. 2001; 26(6):405-16.
- Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, Sawyers CL. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 2009; 324(5928):787-90.
- Tsang PW, Wong AP, Yang HP, Li NF. Purpurin Triggers Caspase-Independent Apoptosis in *Candida dubliniensis* Biofilms. *PLoS One*. 2013; 8(12):e86032.
- Tu HY, Huang AM, Teng CH, Hour TC, Yang SC, Pu YS, Lin CN. Anthraquinone derivatives induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in NTUB1 cells. *Bioorg Med Chem*. 2011 Sep 15;19(18):5670-8.
- Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nico B, Ria R, Pellegrino A, Dammacco F. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood*. 1999; 94(12):4143-55.
- Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011; 147(2):275-92.
- Varinska L, van Wijhe M, Belleri M, Mitola S, Perjesi P, Presta M, Koolwijk P, Ivanova L, Mojzisz J. Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. *Eur J Pharmacol*. 2012; 691(1-3):125-33.

## Literatura

---

- Veloso A, Biewen B, Paulsen MT, Berg N, Carmo de Andrade Lima L, Prasad J, Bedi K, Magnuson B, Wilson TE, Ljungman M. Genome-wide transcriptional effects of the anti-cancer agent camptothecin. *PLoS One*. 2013; 8(10):e78190.
- Vogel S, Barbic M, Jürgenliemk G, Heilmann J. Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *Eur J Med Chem*. 2010; 45(6):2206-13.
- Wang J, Zhao H, Kong W, Jin C, Zhao Y, Qu Y, Xiao X. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis*. *Phytomedicine*. 2010; 17(8-9):684-9.
- Wang JH, Shu LH, Yang LL, Zhang M, He P. 2-Hydroxy-3-methylantraquinone from *Hedyotis diffusa* WILLD induces apoptosis via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-8 in human leukemic THP-1 cells. *Arch Med Res*. 2011; 42(7):577-83.
- Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*. 1971; 93(9):2325-7.
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956(b); 124:269-270.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956(a); 123:309-314.
- Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005; 437(7058):497-504.
- Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011; 17(11):1359-70.
- Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*. 2013; 123(8):3190-200.

## *Literatura*

---

- Weng Larsen S, Engelbrecht Thomsen AE, Rinvar E, Friis GJ, Larsen C. Effect of drug lipophilicity on in vitro release rate from oil vehicles using nicotinic acid esters as model prodrug derivatives. *Int J Pharm.* 2001; 216(1-2):83-93.
- Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, Helgason E, Ernst JA, Eby M, Liu J, Belmont LD, Kaminker JS, O'Rourke KM, Pujara K, Kohli PB, Johnson AR, Chiu ML, Lill JR, Jackson PK, Fairbrother WJ, Seshagiri S, Ludlam MJ, Leong KG, Dueber EC, Maecker H, Huang DC, Dixit VM. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature.* 2011; 471(7336):110-4.
- Wnuk SF, Robins MJ. Ribonucleotide reductase inhibitors as anti-herpes agents. *Antiviral Res.* 2006; 71(2-3):122-6.
- Woessner JF Jr. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol.* 1995; 248:510-28.
- Wundes A, Kraft GH, Bowen JD, Gooley TA, Nash RA. Mitoxantrone for worsening multiple sclerosis: tolerability, toxicity, adherence and efficacy in the clinical setting. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010; 112(10):876-82.
- Yadav V, Sultana S, Yadav J, Saini N. Gatifloxacin induces S and G2-phase cell cycle arrest in pancreatic cancer cells via p21/p27/p53. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47796.
- Yang H, Xu LN, He CY, Liu X, Fang RY, Ma TH. CFTR chloride channel as a molecular target of anthraquinone compounds in herbal laxatives. *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32(6):834-9.
- Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010; 31(6):220-7.
- Yen GC, Duh PD, Chuang DY. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. *Food Chemistry.* 2000; 70(4): 437-441.



## *Literatura*

---

- Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood*. 2004 Sep 1; 104(5): 1450-8.
- Zagotto G, Sissi C, Lucatello L, Pivetta C, Cadamuro SA, Fox KR, Neidle S, Palumbo M. Aminoacyl-anthraquinone conjugates as telomerase inhibitors: synthesis, biophysical and biological evaluation. *J Med Chem*. 2008; 51(18):5566-74.
- Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(1):28-39.
- Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012; 18(11):1639-42.
- Zuryń A, Litwiniec A, Gackowska L, Pawlik A, Grzanka AA, Grzanka A. Expression of cyclin A, B1 and D1 after induction of cell cycle arrest in the Jurkat cell line exposed to doxorubicin. *Cell Biol Int*. 2012; 36(12):1129-35.

Branka S. Kolundžija rođena je 21.07.1987. u Beogradu. Završila je Dvanaestu beogradsku gimnaziju, a zatim 2006. godine upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je u februaru 2011. sa prosečnom ocenom 9,58 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Nakon diplomiranja zaposlena je u junu 2011. godine kao istraživač-pripravnik u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, gde je angažovana na projektu broj 175011 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, pod nazivom „Modifikatori biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima“. U oktobru iste godine upisala je doktorske akademske studije, smer Molekularna biologija eukariota na Biološkom fakultetu. U februaru 2013. godine, Branka Kolundžija je stekla naučno zvanje istraživač-saradnik. Do danas je publikovala 10 naučnih radova, kao i veći broj saopštenja na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima. Od 2011. godine je član Evropskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research), kao i Srpskog društva istraživača raka (SDIR).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Бранка Колунџија \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ М3001/2011 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 25.09.2014. \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Бранка Колунџија \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3001/2011 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Молекуларна биологија еукариота \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Испитивање механизма антитуморског деловања деривата  
\_\_\_\_\_ антрахинона *in vitro* \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф.др Душанка Савић-Павићевић, научни сарадник др Татјана  
Станојковић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Бранка Колунџија \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 25.09.2014. \_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Испитивање механизма антитуморског деловања деривата антрахинона *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 25.09.2014.



---

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.