



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јован Д. Луковић

**Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и  
механизма деловања аналога халкона на  
ћелије тумора хуманог порекла**

докторска дисертација

Крагујевац, 2020.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jovan D. Luković

***In vitro* investigation of antitumor effect and  
mechanism of action of the chalcone  
analogues on human tumor cells**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2020.

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>Аутор</i>	
Име и презиме: Јован Луковић	
Датум и место рођења: 13.05.1986. Крагујевац	
Садашње запослење: незапослен	
<i>Докторска дисертација</i>	
Наслов: Испитивање <i>in vitro</i> антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла	
Број страница: 129	
Број слика: 36 слика и 3 табеле	
Број библиографских података: 281	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): медицина, клиничка и експериментална биохемија	
Ментор: Доц. др Ивана Николић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија	
<i>Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 01.04.2019.	
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: бр. IV-03-385/28 од 14.05.2019.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Доц. др Марија Анђелковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;</li><li>2. Проф. др Зоран Ратковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан;</li><li>3. Проф. др Јелена Башић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>4. Доц. др Милан Зарић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>5. Доц. др Петар Чановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.</li></ol>	
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Доц. др Марија Анђелковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, председник;</li><li>2. Проф. др Зоран Ратковић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан;</li><li>3. Проф. др Јелена Башић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>4. Доц. др Милан Зарић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан;</li><li>5. Доц. др Петар Чановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Биохемија, члан.</li></ol>	
Датум одбране дисертације:	

## DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

<i>Author</i>
Name and surname: Jovan Luković
Date and place of birth: 13.05.1986. Kragujevac
Current employment: unemployed
<i>Doctoral Dissertation</i>
Title: <i>In vitro</i> investigation of antitumor effect and mechanism of action of chalcone analogues on human tumor cells
No. of pages: 129
No. of images: 36 images and 3 tables
No. of bibliographic data: 281
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
Scientific area (UDK): medicine, clinical and experimental biochemistry
Mentor: Asst. Prof. Ivana Nikolić, MD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac
<i>Grade and Dissertation Defense</i>
Topic Application Date: 01.04.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic : no. IV-03-385/28 from 14.05.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Asst. Prof. Marija Anđelković, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, President;</li><li>2. Prof. Dr Zoran Ratković, Associate Professor at the Faculty of Science, University of Kragujevac, Organic Chemistry, member ;</li><li>3. Prof. Dr Jelena Bašić, MD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Niš, Biochemistry, member;</li><li>4. Asst. Prof. Milan Zarić, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, member;</li><li>5. Asst. Prof. Petar Čanović, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, member.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. Asst. Prof. Marija Anđelković, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, President;</li><li>2. Prof. Dr Zoran Ratković, Associate Professor at the Faculty of Science, University of Kragujevac, Organic Chemistry, member ;</li><li>3. Prof. Dr Jelena Bašić, MD, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Niš, Biochemistry, member;</li><li>4. Asst. Prof. Milan Zarić, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, member;</li><li>5. Asst. Prof. Petar Čanović, MD, Assistant Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Biochemistry, member.</li></ol>
Date of Dissertation Defense:

**Докторат посвећујем мојој мами Светлани и очуху Дамиру**

## *Захвалница*

*Велику захвалност дугујем свом ментору и пријатељу Ивани Николић на несебичној помоћи у изради докторске дисертације, на указаном поверењу, саветима, знању, смерницама и моралној подршци.*

*Захвалност дугујем научном сараднику Сузани Поповић на несебичној стручној помоћи и проф. др. Дејану Баскићу на материјалној помоћи.*

*Захвалност у изради докторске дисертације дугујем проф. др. Марини Митровић и свим члановима катедре за Биохемију Факултета медицинских наука у Крагујевцу.*

## Сажетак

**Увод:** Халкони су хетероциклична једињења која представљају прекурсоре у биосинтези флавоноида и других биолошки активних хетероцикличних једињења. Хемијска структура халкона, коју карактеришу два ароматична прстена повезана  $\alpha$ ,  $\beta$  – незасићеним карбонилним системом са три угљеникова атома, омогућава широк спектар биолошких активности од којих су најзначајнија антитуморска, антиинфламаторна и антиоксидативна дејства.

**Циљ:** Циљ овог истраживања био је испитивање потенцијалног антитуморског ефекта и механизма деловања седам аналога халкона (**X1**, **X2**, **X3**, **X4**, **X5**, **X6**, **X7**) на три различите врсте хуманих туморских ћелија (*HeLa*, *HCT-116* и *MDA-MB-231* ћелијске линије) и на здраве фибробласте као контролне ћелије (*MRC-5*). Као контролне супстанце коришћене су цисплатина (**cisPt**) и дехидрозингерон (**ДХЗ**).

**Метод:** Цитотоксични ефекат анализиран је употребом МТТ теста након 24 и 48 часовне инкубације туморских ћелија различитим концентрацијама испитиваних халкона **X1-X7** и референтних супстанци (**cisPt** и **ДХЗ**). Тип ћелијске смрти одређен је коришћењем проточне цитометрије (*flow*) коришћењем бојења *Annexin V-FITC/7-AAD*, док је експресија, активација и локализација регулаторних протеина апоптозе одређена коришћењем метода проточне цитометрије и имунофлуоресцентне микроскопије. Као део екперимента, методом проточне цитометрије анализиран је утицај аутофагије на промену процента цитотоксичности испитиваних халкона.

**Резултати:** Испитивани халкони **X1-X7** показују снажну антитуморску активност која је у већем броју параметара ефикаснија у односу на цисплатину. Такође, испитивани халкони индукују апоптозу туморских ћелија путем активације митохондријалног апоптотског пута, при чему халкони резултују повећање експресије регулаторних апоптотских протеина у третираним туморским ћелијама у односу на нетретиране, контролне ћелије. Испитивани халкони у одређеној мери индукују аутофагију у туморским ћелијама што доприноси њиховој цитотоксичности.

**Кључне речи:** Аналоги халкона, антитуморски ефекат, цитотоксичност, апоптоза, хумане туморске ћелије.

## Abstract

**Introduction:** Chalcones represents precursors in the biosynthesis of flavonoids, isoflavonoids and other biologically active heterocyclic compounds. The chemical structure of the chalcones is characterized by two aromatic rings connected by  $\alpha, \beta$  – unsaturated carbonyl system with three carbon atoms. Chemical structure of chalcones is responsible for their antitumor, antiinflammatory and antioxidant effects.

**Aim:** The main goal of this study was examine cytotoxic and apoptotic effect of the seven chalcone analogues (**X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7**) on three different types of human tumor cells (*HeLa* - human cervical cancer, *HCT-116* - human colon cancer and *MDA-MB-231* - human breast adenocarcinoma) and healthy fibroblasts as control cells (*MRC-5*).

**Method:** The cytotoxic effect was analyzed using the MTT assay after 24 and 48 hour incubation of tumor cells at different concentrations of the tested **X1-X7** chalcones and reference substances (*cisPt* and *DX3*). Cell death type (relative ratio of apoptotic and necrotic cells) was determined using flow cytometry using *Annexin V-FITC / 7-AAD* staining, while expression, activation and localization of apoptosis regulatory proteins were determined using flow cytometry and immunofluorescence microscopy. As part of the experiment, by flow cytometry was analyzed the contribution of autophagy in the process of apoptosis induced by the tested chalcone analogues was determined.

**Results:** The examined chalcones **X1-X7** show strong antitumor activity which is more effective compared to cisplatin. Also, the examined chalcones **X1-X7** induce cell death via activation of apoptosis in the tumor cells. The investigated chalcones achieve an effective apoptotic effect by activating the mitochondrial apoptotic pathway, resulting increased in expression of regulatory apoptotic proteins in treated tumor cells compared to untreated, control cells. Also, the examined chalcones to induce autophagy in tumor cells, which contributes to their cytotoxicity.

**Key words:** chalcone analogues, antitumor effect, cytotoxicity, apoptosis, human tumor cells.



# Садржај

1. Увод .....	1
1.1. Канцерогенеза .....	1
1.1.1. Учесталост канцера.....	5
1.2. Програмирана ћелијска смрт .....	6
1.2.1. Апоптоза.....	7
1.2.2. Аутофагија .....	19
1.3. Халкони .....	22
1.3.1. Биосинтеза халкона.....	24
1.3.2. Биолошка активност халкона .....	27
1.3.3. Ванилин.....	28
1.3.4. Аналоги халкона .....	30
2. Циљеви истраживања.....	34
3. Материјал и методе .....	36
3.1. Врста студије.....	36
3.2. Култивисање ћелија, реагенси и испитиване супстанце .....	36
3.3. МТТ тест цитотоксичности .....	38
3.4. Проточна цитометрија - <i>Annexin V-FITC</i> тест апоптотичности .....	39
3.5. Проточна цитометрија – анализа регулаторних протеина апоптозе.....	41
3.6. Флуоресцентна микроскопија – одређивање експресије регулаторних протеина апоптозе .....	41
3.7. Статистичка анализа података .....	42
4. Резултати .....	43
4.1. Аналоги халкона испољавају ефикасан цитотоксични ефекат на туморским ћелијама .....	43
4.1.1. Утврђивање цитотоксичних ефеката аналога халкона, цисплатине и дехидрозингерона на три различите врсте туморских ћелија <i>HeLa</i> , <i>HCT-116</i> и <i>MDA-MB-231</i> .....	43
4.1.2. <i>IC50</i> вредности аналога халкона .....	57
4.1.3. <i>IC50</i> вредности референтних супстанци.....	58
4.2. Аналоги халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу <i>HeLa</i> и <i>HCT-116</i> ћелија.....	60

4.2.1.	Аналози халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу <i>HeLa</i> ћелија	61
4.2.2.	Аналози халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу <i>HCT-116</i> ћелија.....	65
4.3.	Аналози халкона индукују апоптозу у туморским <i>HeLa</i> и <i>HCT-116</i> ћелијама путем активације митохондријалног апоптотског пута.....	68
4.3.1.	Аналози халкона узрокују повећану експресију активног <i>Bax</i> -а, повећану експресију каспазе-3 и смањену експресију <i>Bcl-2</i> протеина у <i>HeLa</i> ћелијама .....	69
4.3.2.	Аналози халкона узрокују повећану експресију активног <i>Bax</i> -а, повећану експресију каспазе-3 и смањену експресију <i>Bcl-2</i> протеина у <i>HCT-116</i> ћелијама .	77
4.4.	Допринос аутофагије процесу апоптозе индуковане од стране аналога халкона у <i>HeLa</i> и <i>HCT-116</i> ћелијама .....	85
5.	Дискусија .....	87
6.	Закључак .....	106
7.	Литература.....	108
8.	Листа ознака и скраћеница.....	130

# 1. Увод

## 1.1. Канцерогенеза

Канцер представља групу обољења које карактеришу нерегулисани раст, висок степен инвазивности и пролиферације ћелија са места њиховог настанка на друга, удаљена места у организму. Класификовано је преко сто врста карцинома који могу бити примарно локализовани у различитим ткивима. На пример, око 85% канцера може бити локализовано у епителним ћелијама и ови канцери се класификују као карциноми. Канцери који су присутни у ћелијама мезодерма (на пример ћелије костију и мишића) класификује се као саркоми, док се карциноми жлезданог ткива (на пример дојке) класификују као аденокарциноми (1).

Све врсте канцера се класификују или према врсти ткива у коме су локализовани или према примарном месту њиховог настанка (2).

Према првој класификацији, канцери су разврстани у шест главних категорија: карциноми, саркоми, мијеломи, леукемије, лимфоми и мешовите врсте канцера.

1. Карциноми представљају малигне туморе епителних ћелија коже и слузнице, при чему најчешће захватају секреторне органе као што су дојка, плућа, бешика, простата и дебело црево.  
Карцином су подељени у две подгрупе: аденокарциноми (развијају се у секреторним жлездама) и сквамозни карциноми који представљају један од главних врста канцера коже.
2. Саркоми представљају малигне туморе ћелија везивних и потпорних ткива, као што су мишићи, тетиве, меко ткиво, хрскавица, кости, крвни и лимфни судови и углавном се јављају у виду болних маса која имају изглед ткива у коме се развијају (3–5).
3. Мијеломи представљају туморе плазма ћелија косне сржи. Ова врста канцера често се назива вишеструки мијелом (енгл. *multiple myeloma*). Настанак и развој мијелома онемогућава продукцију антитела од стране плазма ћелија доводећи до слабљења имунског система, развоја анемије и повећане подложности инфекцијама. (6,7).

4. Леукемије представљају туморе крвних ћелија косне сржи и лимфног система који се карактеришу прекомерном продукцијом незрелих лимфоцита. Тако, у условима канцерогенезе косна срж производи лимфоците који немају протективну улогу, што узрокује склоност организма ка инфекцији. Леукемија утиче и на црвене крвне ћелије при чему може доћи до високог степена згрушавања крви и умора који је узрокован анемијом. У зависности од тога која врста крвних ћелија је захваћена леукемијом разликују се: гранулоцитна леукемија, лимфоцитна леукемија и еритремија (8).
5. Лимфоми представљају туморе лимфног система који се развијају у жлездама и лимфним чворовима. Разликују се две подгрупе лимфома: Хоџкинови лимфоми (енгл. *Hodgkin lymphoma*, код којих туморске ћелије замењују лимфоците при чему је компромитован имунски систем) и не-Хоџкинови лимфоми (енгл. *Non-Hodgkin lymphoma*) од којих су најчешћи дифузни Б-ћелијски лимфом и фоликуларни лимфом. *Reed-Sternberg*-ове ћелије које су присутне искључиво код Хоџкинових лимфома представљају диференцијално дијагностички маркер за две поменуте подгрупе лимфома (9).
6. Мешовите врсте канцера садрже две или више компоненти канцера које могу бити унутар једне категорије или из више различитих категорија, при чему се могу разликовати аденосквამозни канцер, мешовити мезодермални канцер, карциносарком или тератокарцином.

Према примарном месту настанка канцера, најчешћа места на којима се канцер развија су: кожа, плућа, груди, материца, колон и ректум. Ћелије канцера могу мигрирати кроз крвне судове и ткива што резултује њиховом инвазијом, размножавањем на различитим локацијама у организму (процес се назива метастаза и представља главни узрок смрти од канцера) (2).

Канцери различитог порекла поседују бројне карактеристике које се огледају у различитим молекуларним механизмима канцерогенезе унутар сваке врсте ћелија. Међутим, и поред бројних молекуларних механизма који су укључени у канцерогенезу, крајњи циљ свих ћелија канцера је исти – инвазија, преузимање и модулација нормалних функција ћелије у правцу њеног потпуног уништења. Према овоме, све врсте канцерогених ћелија имају низ способности за преживљавање и избегавање механизма одбране, од којих су најпознатије: способност за аутономне

сигнале раста, резистентност на инхибиторе раста, способност инхибиције апоптозе, способност неограниченог процеса репликације, способност ангиогенезе (формирање нових крвних судова), као и карактеристике инвазије и метастазе (10,11).

На ћелијској мембрани сваке ћелије присутни су бројни рецептори који омогућавају пренос сигнала из међућелијског простора у унутрашњост ћелије. Сигнални путеви трансдукције представљају међумолекулске интеракције које се огледају у сукцесивном преношењу сигнала унутар ћелије који доводе до промене у функцијама ћелије или промене у експресији одређених гена (12). Промене у сигналним путевима трансдукције (као што је нерегулисани раст ћелија) резултују трансформацијом здравих ћелија у правцу канцерогенезе.

Процес канцерогенезе карактеришу промене на ћелијском и генетском нивоу, као и неконтролисана деоба ћелија. Деоба ћелија (митоза) представља физиолошки процес који се одвија у свим ткивима и под одређеним условима, где се одржава равнотежа између пролиферације и програмиране ћелијске смрти у циљу одржавања интегритета ткива и органа.

Канцерогенеза настаје као последица промене у секвенци *DNK* молекула или мутације (13). Кључни корак у канцерогенези ћелија представља серија мутација одређених класа гена који регулишу раст и диференцијацију ћелија (као што су онкогени, тумор супресорски гени и *microRNK* гени) (14,15). Поменуте мутације гена могу да се јаве у виду адисије нуклеотида или одређених база *DNK* молекула, делеције хромозома или инхибиције или активације *microRNK* молекула који контролише експресију од 100 до 500 гена (16,17).

Такође, на развој малигног фенотипа канцерогених ћелија утичу повећана експресија онкогена, дисрегулација тумор супресорских гена и немогућност репарације *DNK* молекула чиме је омогућено преживљавање и неконтролисана деоба канцерогених ћелија (15). Нагомилавање поменутих генетских промена, као што су активирање протоонкогена у онкогене, дисрегулација тумор супресорских гена и немогућност репарације *DNK* гена резултују неконтролисаним растом и пролиферацијом канцерогених ћелија.

Онкогени представљају мутиране гене који кодирају синтезу нефункционалних протеина који су укључени у сигналне путеве неконтролисане деобе и повећане пролиферације канцерогених ћелија. У геному човека идентификовано је преко сто врста онкогена, а један од њих је *RAS* мутирани ген који је активиран у канцерогеним ћелијама плућа, јажника, колона и панкреаса (18–21).

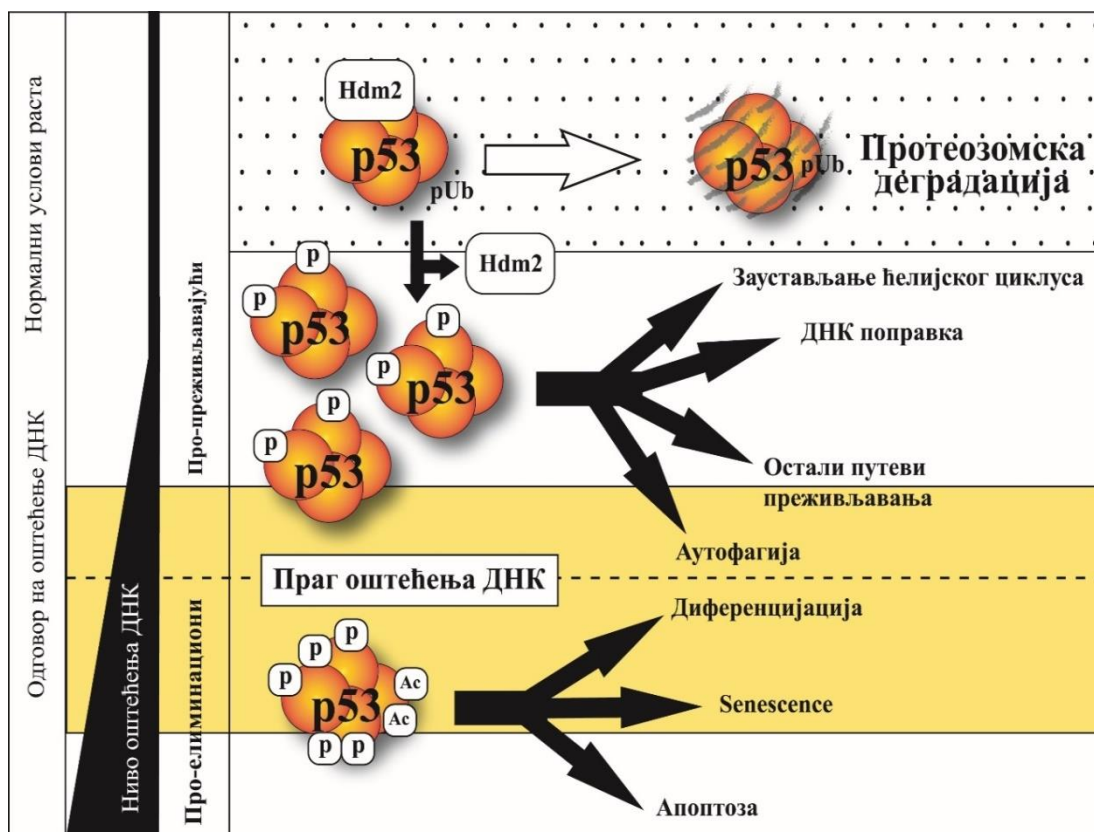
*RAS* мутирани ген кодира синтезу *Ras* протеина који активира два сигнална механизма. Први сигнални механизам је *MAPK* (митоген активиран протеин киназни пут, енгл. *mitogen-activated protein kinase*) чија активација резултује транскрипцијом гена укључених у раст и пролиферацију ћелија (22).

Други механизам представља активирање *PI3K/AKT/mTOR* сигналног пута (фосфатидилинозитол-3-киназни пут) који сигналном каскадом доводи до инхибирања процеса апоптозе (23).

За разлику од онкогена, неки гени доприносе развоју канцерогенезе када су инактивирани. Ова група гена представља тумор супресорске гене при чему је у геному човека идентификовано више од 15 врста ових гена. Наиме, тумор супресорски гени кодирају синтезу протеина који имају улогу у заустављању ћелијског циклуса и деобе ћелија (24). Мутација ових гена резултује синтезом нефункционалних протеина који нису у могућности да спрече пролиферацију ћелија (25,26).

*TP53* тумор супресорски ген је најчешћи мутирани ген у хуманим канцерогеним ћелијама који доприноси развоју канцерогенезе (27). *TP53* ген кодира синтезу транскрипционог фактора *p53* као одговор на патогене стимулусе као што су оштећење *DNK* молекула, хипоксија, оксидативни стрес, јонизујуће зрачење и онкогена хиперпролиферација (28,29).

*p53* транскрипциони фактор се синтетише у једру ћелије где се директно везује за *DNK* молекул. Након оштећења *DNK* молекула *p53* представља регулатор који усмерава ћелију или ка репарацији молекула *DNK* или ка активирању апоптозе (30–32). Осим овога, *p53* транскрипциони фактор има улогу у регулацији ћелијског циклуса и преласка ћелије из *G1* у *S* фазу, и из *G2* у *M* фазу ћелијског циклуса (33–35), као и улогу у процесима аутофагије (32,36,37), митотске катастрофе (38–40) и ангиогенезе (41,42). Улога *p53* фактора транскрипције зависи од нивоа оштећења *DNK* молекула (Слика 1). Услед своје вишеструке улоге у ћелији *p53* транскрипциони фактор је добио назив „чувар генома“.



**Слика 1.** Улога *p53* на ниво оштећења молекула *DNK*. У физиолошким условима ћелијске пролиферације смањена је експресија *p53* протеина услед његове деградације посредоване убиквитином. Оштећење *DNK* молекула резултује активацијом *p53* протеина који је активан и стабилан у свом фосфорилисаном облику. Активни *p53* протеин подстиче вијабилност ћелије покретањем ћелијског циклуса, регулише репарацију *DNK* молекула и индукује аутофагију. У условима оштећења молекула *DNK* при којима репарација није могућа, *p53* протеин има про-апоптотичну улогу и усмерава ћелију ка активирању апоптозе, док аутофагија има улогу алтернативног механизма за уклањање оштећених ћелија (35).

### 1.1.1. Учесталост канцера

Карциноми представљају главни узрок смрти у популацији широм света, иако Подаци Националног Центра за Здравствену Статистику у Сједињеним Америчким Државама извештавају непрекидан пад стопе смртности од карцинома у периоду од 1991. до 2017. године (43). Међутим, пад стопе смртности у поменутом периоду испитиван је праћењем укупне стопе смртности за четири најучесталија типа карцинома (карцином плућа, колона, дојке и простате), при чему је пад стопе смртности забележен једино за карцином плућа док код остала три карцинома у

периоду од 2008. до 2017. године није забележен значајан напредак. Подаци Националног Центра за Здравствену Статистику предвиђају у 2020. години преко 1,5 милиона нових пацијената оболелих од карцинома и преко 500,000 смртних исхода у Сједињеним Америчким Државама (43).

У Србији од 1999. до 2009. године забележена је највиша стопа смртности од канцера у Европи и четврта највећа стопа смртности у свету. Међутим, у периоду од 2009. године стопа смртности од канцера у Србији била је смањена за око 0,9% годишње али и даље Србија заузима исту позицију као четврта земља са највећом стопом смртности од канцера у свету (44).

Највећи пораст инциденце и морталитета код мушке популације у Србији у периоду од 2011. до 2015. године забележен је за канцер плућа (31%), колона (13%) и простате (8,4%), док је највећи пораст инциденце и морталитета код женске популације у Србији забележен за канцер дојке (18,3%), плућа (15,4%), колона (11,5%) и цервикса (4,9%) (44,45).

С обзиром на то да Национални Центар за Здравствену Статистику предвиђа у 2030-ој години повећан број оболелих од малигнитета у свету на 23,6 милиона и повећан број преминулих на 13 милиона годишње, неопходно је пронаћи ефикасније начине за правовремено дијагностиковање и ефикасно лечење малигнух тумора (46).

Услед повећане учесталости канцера у Србији, циљ овог истраживања био је да се обухвате карциноми различитих ткива: цервикса, колона и дојке, чија је учесталост у Србији повећана. Обзиром да канцерогене ћелије имају способност инхибиције програмиране ћелијске смрти, што резултује пролиферацијом неопластичних ћелија, напредак у лечењу карцинома усмерен је ка развоју нових супстанци које индукују програмирану ћелијску смрт искључиво канцерогених ћелија.

## **1.2. Програмирана ћелијска смрт**

Термин „програмирана ћелијска смрт“ представља строго регулисан процес смрти ћелије који је контролисан од стране ванћелијских и унутарћелијских сигнала. Контролисан процес смрти ћелија има значајну улогу у развоју, одржавању хомеостазе ткива, неоплазији и дегенерацији (47–50). Процес програмиране ћелијске смрти први је уочио *Walther Flemming* крајем 19. века и описао га као облик спонтане ћелијске смрти који се разликује од других облика ћелијске смрти (51). Овај облик спонтане ћелијске смрти 1972. године *Kerr* и сарадници су описали као апоптозу (52).



Апоптоза се одвија током развоја, хомеостазе, старења као и одбрамбени механизам попут имунских реакција или реакција при оштећењу ћелија (53,54). Апоптоза представља енергетски зависан процес који подразумева активирање цистеин аспартил протеаза које се називају каспазе (енгл. *caspases*; *cystein-dependent aspartate-specific proteases*) (55). До 2000. године процес апоптозе био је поистовећен са појмом програмиране ћелијске смрти, међутим новија истраживања су показала да постоје не-апоптотични облици програмиране ћелијске смрти, као што су аутофагија, некроптоза и парптоза (56).

Аутофагија је процес програмиране ћелијске смрти који може бити индукован у свим еукариотским ћелијама и представља процес динамичког преуређивања, рециклирања субцелуларних мембрана, цитоплазме и органела, формирања аутофагозома који се у лизозомима разграђује. Процес аутофагије је енергетски зависан процес који зависи од континуиране синтезе протеина и не зависи од активности каспаза (57,58).

Некроптоза (запаљенска ћелијска смрт) представља процес контролисане или програмиране некрозе који се индукује истим сигналима као и апоптоза, али се јавља искључиво у условима при којима је апоптоза генетски или хемијски инхибирана (56,59). Према овоме, апоптотски и некроптотски механизми могу обухватати заједничке сигналне молекуле попут активатора или инхибитора механизма деловања. Неколико рецептора смрти, као што су *Fas* и *TNFR* рецептори, осим апоптозе индукују и некроптозу. Процес некроптозе представља вирусни одбрамбени механизам који не зависи од каспаза и који у присуству инхибитора вирусне каспазе ограничава репликацију вируса (60,61).

*Sperandio* и сарадници 2000. године (62) описали су један алтернативни облик програмиране ћелијске смрти који се назива парптоза. Парптоза се морфолошки и биохемијски разликује од апоптозе, независна је од инхибитора каспазе и активира се алтернативним путем активирања каспазе-9 који је независан од протеина *Araf-1*. Парптоза се индукује током развоја, у трансгеним моделима Хантингтонове болести и амиотрофичној латералној склерози (63–65).

### **1.2.1. Апоптоза**

Процес апоптозе карактеришу различите морфолошке промене ћелије праћене сублијањем органела, фрагментацијом *DNK* молекула, бубрењем плазмалеме и

пикнозом која представља најзначајнију морфолошку карактеристику апоптотичне ћелије. Настале морфолошке промене последично доводе до фрагментације ћелије на мање делове који су окружени мембраном и настанка—апоптотских тела (61,66). Апоптотска тела се уклањају фагоцитозом од стране макрофага, паренхимских или неопластичних ћелија и деградирају се унутар фаголизозома. Овим начином деградације апоптотских тела онемогућено је ослобађање њиховог садржаја у интерстицијско ткиво. Фагоцитозом апоптотских тела долази до инхибиције секундарне некрозе и одсуства продукције анти-инфламаторних цитокина (67).

Поред морфолошких промена, апоптозу карактеришу одређене биохемијске промене ћелије које подразумевају екстернализацију фосфатидилсерина и активирање каспаза што резултује ослобађањем ћелијских компоненти и лизе ћелија (68,69).

Нарушена регулација ћелијске смрти може довести до развоја различитих обољења као што су канцер, синдром аутоимунске дефицијенције, неуродегенеративних болести као што су Паркинсонова (70,71), Алцхајмерова (72) и Хантингтонова болест, као и развоја амиотрофичне латералне склерозе (73–75). Поменута патолошка стања могу бити последица сузбијања процеса апоптозе (канцер) или пак могу настати као резултат прекомерне активације апоптозе (аутоимунске, неуродегенеративне болести и исхемија).

Током канцерогенезе, канцерогене ћелије садрже бројне молекулске механизме који доводе до сузбијања процеса апоптозе. Тако, један од првих и најјачих одбрамбених механизма којим туморске ћелије стичу отпорност на апоптозу је повећана експресија анти-апоптотичних протеина, као што је *Bcl-2* или смањена експресија про-апоптотичних протеина, као што је *Bax*.

Експресију *Bcl-2* и *Bax*-а регулише *p53* тумор супресорски ген који представља најчешћи мутирани ген у хуманој канцерогенези (76). Такође, *p53* тумор супресорски ген регулише ћелијски циклус (односно зауставља ћелијски циклус у *G1/S* фази у регулационој тачки за препознавање оштећеног *DNK* молекула), активира протеине за репарацију *DNK* молекула и уводи ћелију у апоптозу уколико није могућа репарација *DNK* молекула (77,78).

### **1.2.1.1. Каспазе**

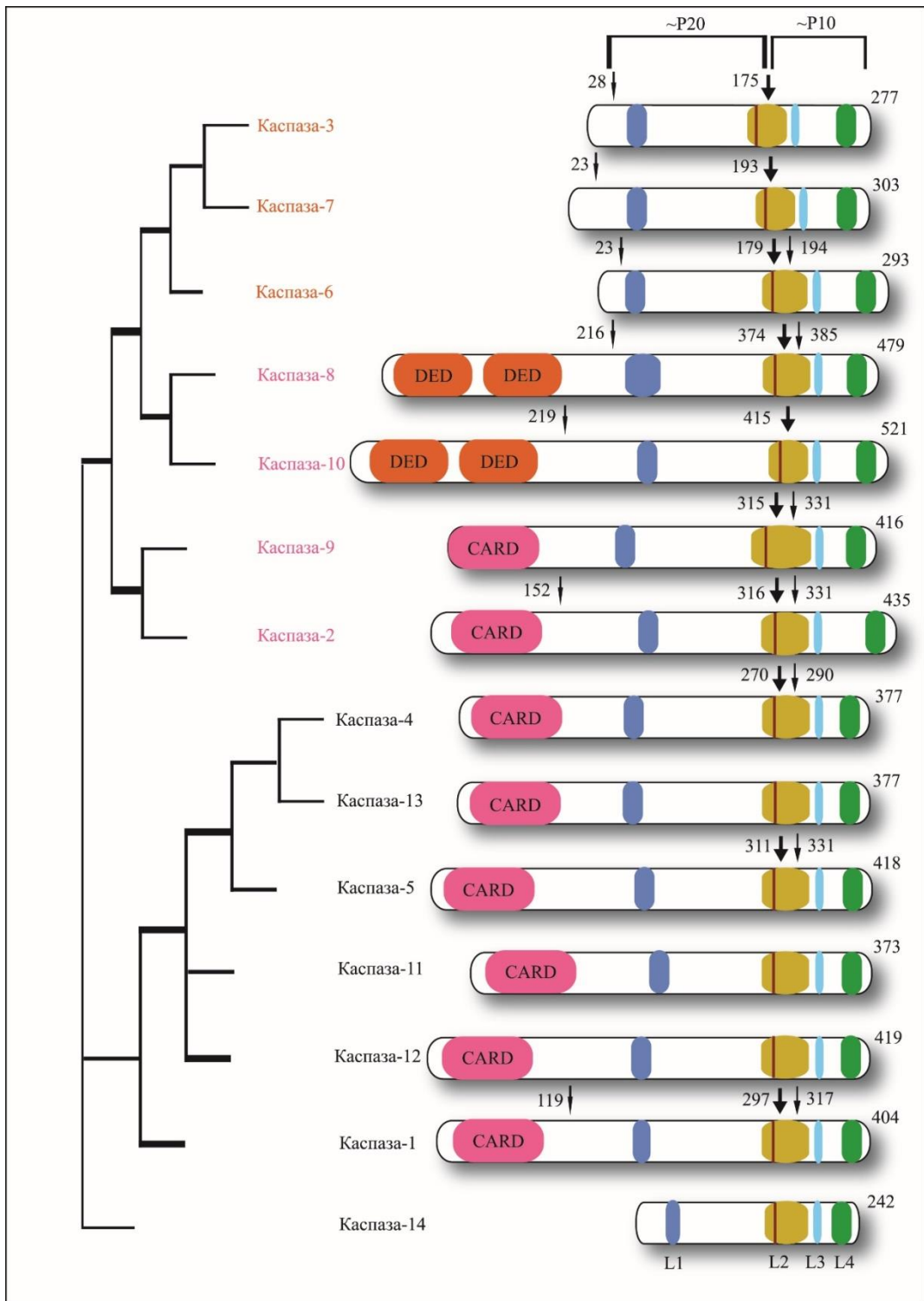
Бројни физиолошки и патолошки фактори индукују процес апоптозе путем активирања каспаза. Каспазе представљају групу специфичних цистеин аспартил

протеаза чија је главна улога иницијација и егзекуција процеса апоптозе. Ове специфичне протеазе представљају ендопептидазе које су локализоване у цитосолу ћелије и чији цистеински бочни ланац врши каталитичко раскидање пептидних веза супстрата који садрже аспарагинску аминокиселинску секвенцу.

Каспазе се синтетишу у ћелијама у неактивном или зимогеном облику који је познат под називом про-каспаза (79–81). Про-каспазе садрже четири домена: *NH2*-терминални продомен чија се дужина аминокиселинског остатка разликује у зависности од каспазе; велике субјединице дужине од око 20 килодалтона (*kDa*); мале субјединице дужине од око 10 *kDa*; и региона који повезује малу и велику субјединицу, при чему неке каспазе не садрже овај везујући регион.

Активирање каспаза подразумева протеолитичко раскидање пептидних веза које резултује раздвајањем велике и мале субјединице уз формирање хетеротетрамерног комплекса који се састоји од две велике и две мале субјединице (82,83).

Каспазе се разликују по дужини *NH2*-терминалног продомена који може бити дужи или краћи. Дужи *NH2*-терминални продомен садржи регион који је неопходан за везивање адаптерних молекула као што су домен ефектора смрти (*DED – death effector domains*) и домен регрутовања каспаза (*CARD – caspase recruitment domains*) (Слика 2) (84). Процес активирања каспаза остварује се хидрофобним интеракцијама путем *DED-DED* контакта или електростатичким интеракцијама путем *CARD-CARD* контакта (82,85,86).



**Слика 2.** Каспазе (цистеин аспартил специфичне протеазе) представљају специфичне протеазе које врше каталитичко разлагање супстрата који садржи аминокиселински остатак аспарагинске киселине. Каспазе које учествују у апоптози означене су црвеном бојом (ефекторне каспазе) и љубичастом бојом (иницијаторне каспазе). Положај раскидања пептидних веза и раздвајања каспаза на велику и малу субјединицу обележен је великом стрелицом, док су остали рестрикциони положаји обележени

мањим стрелицама. Све каспазе садрже четири петље које формирају каталитички простор и означене су са *L1*, *L2*, *L3* и *L4*, док је каталитички цистеински остатак означен црвеном линијом на почетку *L2* петље (85).

На основу своје функције каспазе се могу поделити на две основне групе:

- Инфламаторне каспазе – које учествују у процесу инфламације, односно активирању цитокина (каспазе -1, -4, -5, -11, -12, -13 и -14) и
- Апоптотске каспазе – које учествују у процесу апоптозе (каспаза -2, -3, -6, -7, -8, -9, и -10) (Слика 2).

Каспазе које учествују у процесу апоптозе могу се поделити на иницијаторне каспазе (каспазе-2, -8, -9, и -10) и егзекуторске (ефекторне) или извршилачке каспазе (каспазе-3, -6 и -7).

У свом неактивном, зимогеном облику, иницијаторне каспазе су неактивни мономери који се активирају хомодимеризацијом. Свака иницијаторна каспаза има своју активациону платформу, односно регион на *NH2*-терминалном про-домену за који се везује адаптерни молекул. Тако, про-каспаза-8 и/или -10 садржи домен ефектора смрти (*DED*) којим се везују за свој адаптерски молекул *FADD* и/или *TRADD* који такође садржи *DED* чиме долази до њихове олигомеризације и активирања у каспазу-8 и/или -10. Про-каспазе-2 и -9 садрже домен *CARD* преко кога се вржи њихова димеризација и активирање (86,87).

Ефекторне каспазе у зимогеном облику представљају неактивне хомодимере за чију су активацију неопходне активне иницијаторне каспазе, као што су каспаза-8 и/или -9. Иницијаторна каспаза врши протеолитичко раскидање пептидне везе неактивне егзекуторне каспазе при чему је дели на велику и малу субјединицу омогућавајући конформационе промене и њено активирање. Иницијаторна каспаза је неопходна за активирање прве егзекуторне каспазе у процесу каспазне каскаде, док се остале егзекуторне каспазе активирају аутопротеолизом или ограниченом протеолизом (82,88).

Активност каспаза представља регулисан процес у циљу одржавања ћелијске хомеостазе. Смањена активност апоптотских каспаза доводи до неадекватне ћелијске смрти што резултује развојем канцерогенезе, док прекомерна активност ових протеаза доводи до развоја неуродегенеративних болести. Такође, смањена активност инфламаторних каспаза може узроковати већу склоност ка инфекцији, док њихова прекомерна активност може узроковати повећану инфламацију. Иако је активност

каспаза од кључног значаја за развој канцерогенезе у хуманим туморским ћелијама није честа мутација гена који кодирају синтезу каспаза.

Резултати бројних истраживања су показали да инактивирање појединих каспаза често није довољно да се спречи каспазна каскада или да се механизам усмери на алтернативни не-апоптотични механизам ћелијске смрти (89–94).

Процес апоптозе могу индуковати различити спољашњи и унутрашњи агенси. Спољашњи агенси могу бити физички (зрачење, физичке трауме и хемотерапијски лекови) и инфективни (вируси и бактерије), док у унутрашње агенсе убрајамо аблације трофичног хормона, лечење глукокортикоидима или одсуство фактора раста (95–99).

Механизам апоптозе подразумева два основна активациона пута: спољашњи апоптотски пут (посредством рецептора смрти) и унутрашњи (митохондријални) апоптотски пут.

### **1.2.1.2. Спољашњи апоптотски пут**

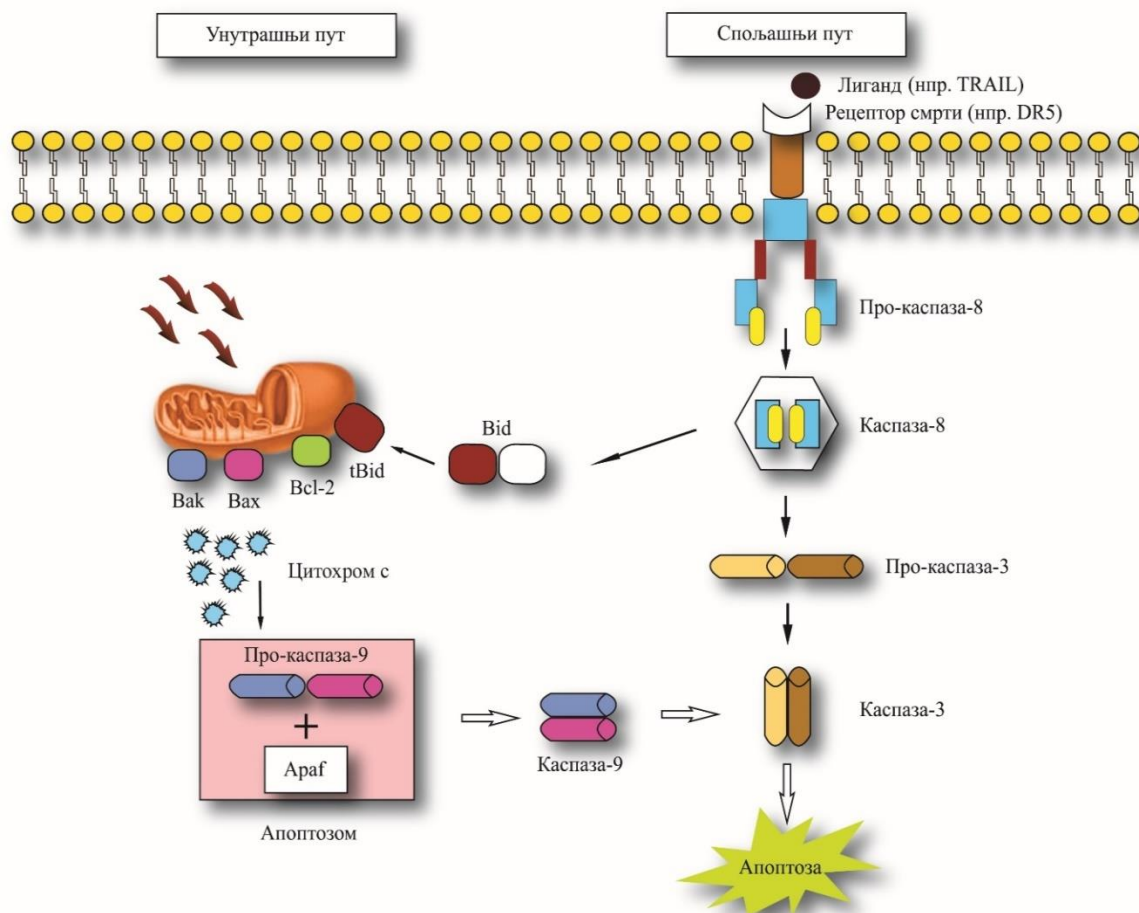
Спољашњи апоптотски пут индукује се везивањем лиганда за одговарајући рецептор смрти који је инкорпориран у ћелијску мембрану (Слика 3). Трансмембрански рецептори смрти који су највише проучавани припадају породици протеина фактора некрозе тумора, *TNF (Tumor Necrosis Factor)*, као што су *TNF-R1/CD120/DR1*; *Fas/CD95/Apo1/DR2*; *TRAMP/Apo3/Wsl1/DR3*; *TRAIL-R1/DR4*; *TRAIL-R2/DR5* и *DR6* (100).

Лиганди представљају трансмембранске протеине са *N*-терминалним доменом који је оријентисан ка ванћелијском простору и *C*-терминалним доменом који је оријентисан ка унутарћелијском простору.

*C*-терминални домен лиганда садржи очувану *TNF* хомологију са доменом који се везује за рецепторе смрти. Сви поменути рецептори смрти који припадају породици *TNF* цитокинских рецептора садрже домен смрти (*DD*, 80 аминокиселинских јединица) који је локализован у цитосолу ћелије. Након везивања лиганда за рецептор смрти долази до активирања *DD* и везивања адаптерног протеина *FADD (Fas Associated Death Domain)* за који се везују иницијаторне про-каспазе-8 (или 10), при чему се формира сигнални комплекс *DISC (Death Inducing Signaling Complex)* (101,102). *DISC* сигнални комплекс, који садржи адаптерни протеин *FADD* и про-каспазу-8, сукцесивно резултује активацијом каспазе-8. Активна каспаза-8 протеолитичким ракидањем пептидне везе активира про-каспазу-3 на активну каспазу-3 или активира про-апоптотични *Bid*

протеин који формира поре на мембрани митохондрија која ослобађа интрамембранске протеине у цитосол ћелије, што доводи до каспазне каскаде и активирања ефекторне каспазе-3 (101,103,104).

Самим тим каспаза-8 представља рестрикциону тачку преклапања спољашњег и митохондријалног апоптотског пута, где процес апоптозе може наставити да се одвија у цитосолу ћелије путем заобилажења митохондрија или може преко активирања *Bid* протеин наставити да се одвија митохондријалним апоптотским путем.



**Слика 3.** Спољашњи апоптотски пут преко рецептора смрти и унутрашњи (митохондријални) апоптотски пут који подразумева улогу *Bcl-2* групе протеина (105).

### 1.2.1.3. Митохондријални апоптотски пут

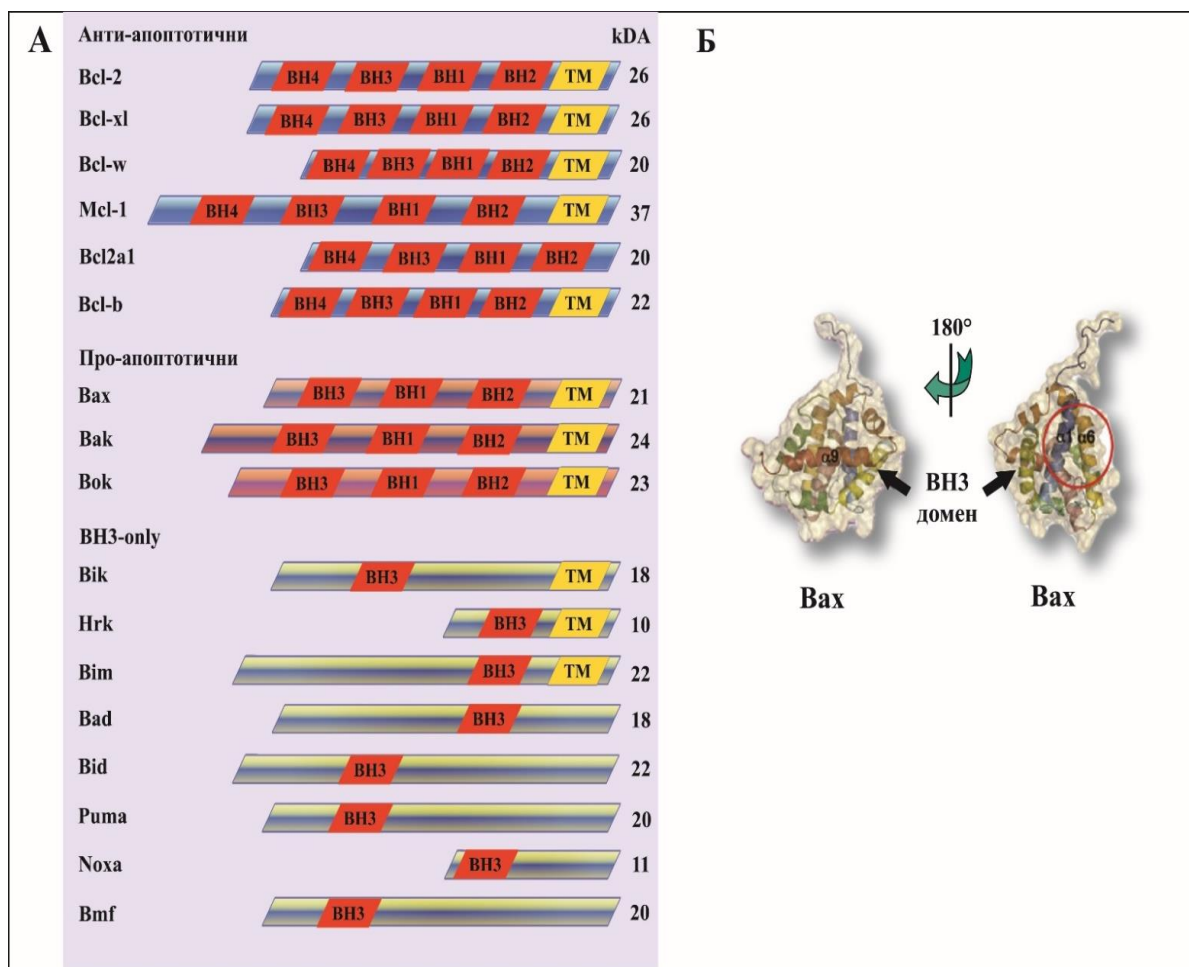
Митохондријални апоптотски пут може бити активиран великим бројем егзогених и ендогених стимулуса као што су оштећење *DNK* молекула, оксидативни стрес, зрачење и лечење цитотоксичним лековима (Слика 3) (105).

*Bcl-2* група протеина има кључну улогу у активирању митохондријалног апоптотског пута. Митохондријални апоптотски пут активира се као последица смањене експресије анти-апоптотичних протеина (на пример *Bcl-2* протеина) и повећане експресије про-апоптотичних протеина (на пример *Bax* протеина). Услед тога, на основу улоге у процесу апоптозе *Bcl-2* група протеина дели се на три подгрупе (Слика 4):

- анти-апоптотичне протеине (*Bcl-xl*, *Bcl-2*, *Mcl-1*, *Bcl-w*, *Bfl-1*) који садрже четири хомолога домена (*BH* – *BH1*, *BH2*, *BH3* и *BH4*) и инхибирају процес апоптозе;

- про-апоптотичне протеини који садрже три *BH* домена (уз одсуство *BH4* домена) као што су *Bax*, *Bak* и *Bok*, који се називају ефекторски протеини и формирају поре на спољашњој мембрани митохондрија што доводи до ослобађања апоптотичних молекула, као што је цитохром *c*;

- и про-апоптотичне протеине који садрже само *BH3* домен (који се називају иницијаторни протеини, *Bim*, *Bid*, *Puma*, *Noxa*, *Bad*, *Bmf*, *Hrk*) (86,106).



**Слика 4.** Структура *Bcl-2* групе протеина који учествују у активацији митохондријалног апоптотског пута. А) Три групе *Bcl-2* протеина: анти-апоптотични



са четири *BH* домена (*BH1-BH4*); про-апоптотични који не садрже *BH4* домен; и про-апоптотични који садрже само *BH3* домен (*BH3-only*). *TM* представља трансмембрански домен *Bcl-2* групе протеина преко ког се остварује контакт са спољашњом мембраном митохондрија. Б) Структура про-апоптотичног *Bax* протеина који формира поре на спољашњој мембрани митохондрија, где црвени круг представља место везивања за про-апоптотични *Bim* протеин (86,107).

Интеракција између *Bcl-2* групе протеина у циљу регулисања митохондријалног апоптотског пута може се вршити путем два механизма.

Први механизам представља индиректно активирање про-апоптотичних протеина *Bax*-а и *Bak*-а, где се про-апоптотични протеини који садрже само *BH3* домен као што су *Bad* и *Noxa* везују за анти-апоптотичне протеине што резултује ослобађање и активирање *Bax*-а и *Bak*-а.

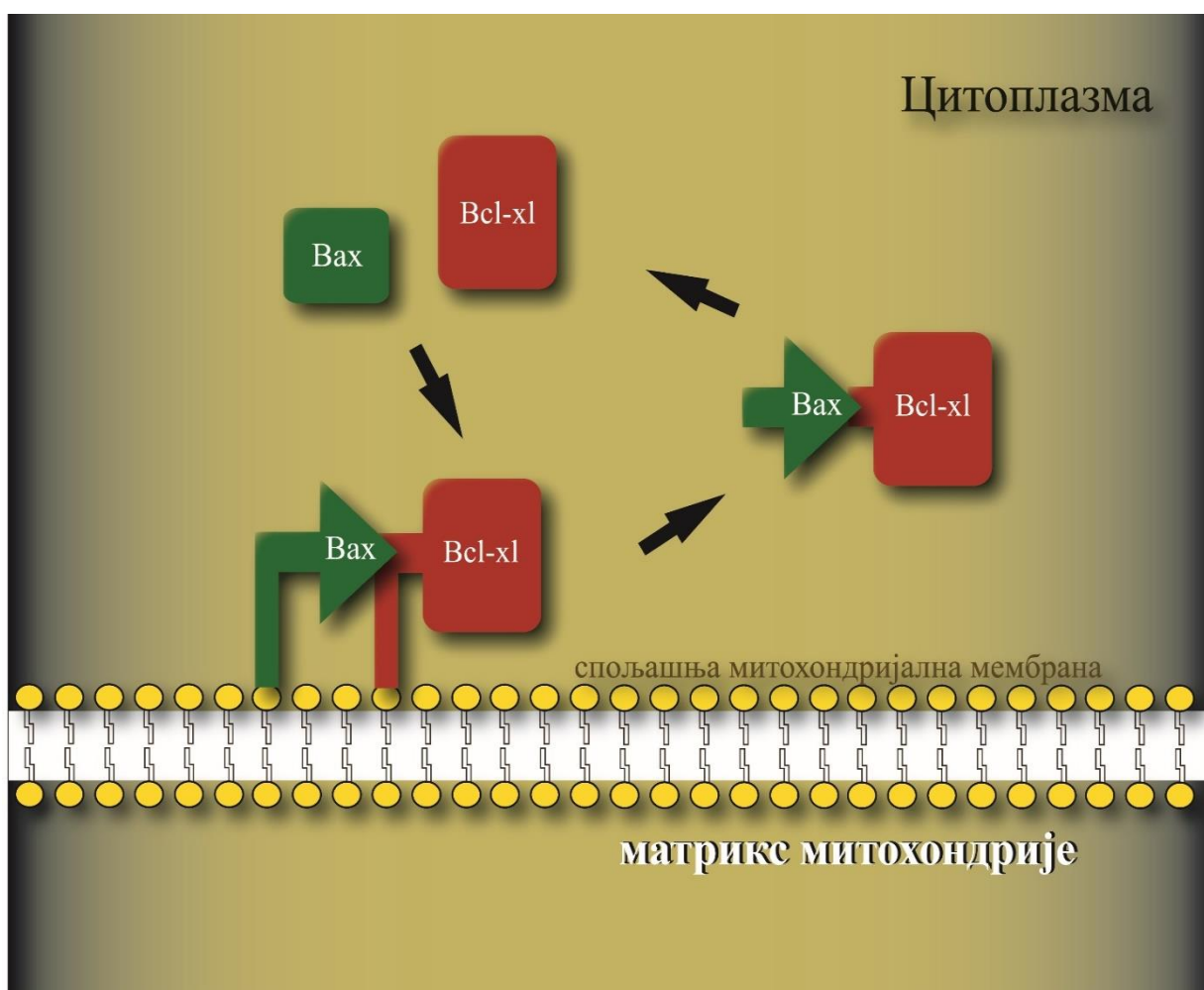
Други механизам представља могућност директног везивања осталих *BH3* протеина, као што су *Bim*, *Bid* и *Puma* за *Bak* и *Bax* што доводи до њихове олигомеризације (107). *Bax* и *Bak* протеини локализовани су у цитосолу ћелије на спољашњој митохондријалној мембрани при чему олигомеризацијом постају активни и формирају поре на спољашњој мембрани митохондрија. Формирањем пора на спољашњој мембрани митохондрија ослобађају се интрамембрански протеини међу којима је најзначајнији цитохром *c*. Ослобођени цитохром *c* у цитосолу ћелије са деоксиаденозинтрифосфатом (*dATP*) формира комплекс који активира апоптотску протеазу (*Apaf-1 – apoptotic protease activating factor 1*) за који се везује иницијаторна про-каспаза-9.

Овако формирану мултипротеински комплекс (који се састоји од цитохрома *c*, *Apaf-1* и про-каспазе-9) се назива апоптозом. Функција апоптозома јесте хидролиза аденозинтрифосфата (*ATP*) у циљу добијања енергије за протеолитичко активирање каспазе-9 (108). Про-каспаза-9 је преко свог *CARD* домена везана за *Apaf-1* који у односу на остале иницијаторне каспазе у току апоптозе остаје везан за апоптозом и задржава своју каталитичку активност.

Иницијаторна каспаза-9 сукцесивно активира (сече) про-каспазу-3 чиме се активира егзекуторна каспаза-3, што представља коначну тачку митохондријалног апоптотског пута (109,110). Једном активирана егзекуторна каспаза-3 каспазном каскадом активира све остале егзекуторне каспазе (аутопротеолитички каспазу-3 и каспазе-6 и 7) након чега процес апоптозе није могуће инхибирати. Покренута каспазна

каскада резултује инфилтрирањем ефекторних каспаза у једро ћелије и разградњом структурних и сигналних протеина, као и протеина који регулишу репликацију и транскрипцију *DNK* молекула. Као крајњи резултат долази до фрагментације *DNK* молекула ендонуклеазама које врше каталитичко раскидање нуклеинских киселина у структури молекула *DNK* (111–113).

Улога анти-апоптотичних протеина јесте да се везује за активне форме *Bax*-а и *Bak*-а чиме се спречава њихова олигомеризација. Овим деловањем анти-апоптотичних протеина инхибира се митохондријални апоптотски пут. Међутим, *Bcl-2* група протеина која садржи само *BH3* домен везује се за анти-апоптотичне протеине и онемогућава њихово везивање за *Bax* и *Bak* чиме се активира митохондријални апоптотски пут (Слика 5). Према томе, активирање или инхибирање процеса апоптозе зависи од тога да ли је у цитосолу ћелије равнотежа померена у смеру повећане експресије про-апоптотичних или анти-апоптотичних протеина.



Слика 5. У малигно неизмењеним ћелијама *Bax* и *Bcl-x1* протеини локализовани су у цитосолу ћелије и транслоцирају се на спољашњу мембрану митохондрија где долази

до њихове димеризације и транслокације овог димера у цитосол ћелије. За овај процес неопходна је доступност *BH3* домена *Bax*-а. Деловање апоптотског стимулуса доводи или до каталитичког раскидања овог димера од стране про-апоптотичних протеина (*BH3-only*) или до њиховог везивања за слободни *Bcl-xl* протеин што у оба случаја омогућује доступност домена *Bax* протеина и истовремено блокирање домена *Bcl-xl* протеина за који би се везао *Bax*. Овако слободан, односно активни *Bax* формира поре на спољашњој мембрани митохондрија и омогућује ослобађање про-апоптотичних молекула као што је цитохром *c* (107).

Недостатак гена који кодира синтезу ефекторних протеина (*Bax*-а и *Bak*-а) у ћелијама доводи до знатне отпорности ћелија на апоптозу. Резултати истраживања које су вршили *Lindsten* и сарадници (114) показали су да мишеви који су дефицитарни ефекторним протеинима имају повећан број мијелоидних и лимфоидних ћелија што доводи до увећања слезине и лимних чворова и инфилтрације лимфоцита у периферне органе. Лимфоцити мишева који су дефицитарни протеинима *Bax* и *Bak* су отпорни на активаторе митохондријалног апоптотског пута, укључујући смањење цитокина, етопозида и зрачење.

*Bcl-2* протеин представља први члан подгрупе анти-апоптотичних *Bcl-2* протеина. Прекомерна синтеза *Bcl-2* протеина доводи до неконтролисане пролиферације ћелија и канцерогенезе, а такође омогућава опстанак ћелија без ћелијске пролиферације. Прва истраживања која описују улогу *Bcl-2* протеина у апоптози вршена су на мишјим моделима. С тим у вези, прекомерна синтеза *Bcl-2* протеина код мишева доводи до аутоимуности, док одсуство гена који кодира синтезу *Bcl-2* протеина доводи до веће сензитивности ћелија на апоптотичне стимулусе (115,116).

Други анти-апоптотични протеин који припада подгрупи *Bcl-2* протеина, *Mcl-1* протеин, има значајну улогу у регулацији апоптозе, при чему његова прекомерна синтеза доприноси канцерогенези и резистентности на бројне антиканцерогене терапеутике. Недостатак гена који кодира синтезу *Mcl-1* протеина доводи до инсуфицијенције косне сржи и смањења броја хематопоеетских матичних ћелија (*HSC*) код мишева што доводи до смртог исхода у периоду од неколико недеља (117). Такође, *Mcl-1* протеин има кључну улогу у одржавању имуносупресивних *T* ћелија при чему одсуство овог протеина код експерименталних мишева резултује губитком тежине, инфламаторним процесима и смрћу у периоду од 4 до 8 недеља (118).

Остали анти-апоптотични *Bcl-2* протеини су мање значајни у хомеостази у односу на *Bcl-2* и *Mcl-1* протеине. Тако, *Bcl-xl* има минималан утицај на опстанак *T* ћелија лимфоцита, односно смањена експресија овог протеина резултује смањењем дупло позитивних тимоцита али не доводи до значајног смањења периферних лимфоцита. Повећана експресија *Bfl-1* протеина присутна је код неколико типова хуманих карцинома укључујући и хроничну лимфоцитну леукемију, али није забележена значајна отпорност на апоптотске стимулусе (119,120).

Активност про-апоптотичних протеина који садрже само *BH3* домен регулисана је на различите начине. Активност протеина *Noxa* и *Puma* регулисана је транскрипцијом гена који регулише синтезу *p53* протеина, при чему оштећење молекула *DNK* резултује повећаном синтезом ових протеина. *Bad* се инактивира путем сигналног рецептора фактора раста који подразумева фосфорилацију аминокиселинског остатка серина (*Ser-136*) *Bad*-а и одвајања 14-3-3 протеина. Ослобођени 14-3-3 протеин се везује за *Bad* доводећи до накнадне фосфорилације *Ser-155* остатка *BH3* домена *Bad* протеина чиме је онемогућена његова про-апоптотична активност односно везивање *Bad*-а за *Bcl-2* или *Bcl-xl* протеин.

Осим поменутих про-апоптотичних протеина који садрже само *BH3* домен, ова група про-апоптотичних протеина укључује *Bim* протеин који је везан за микротубуле и *Bmf* протеин који је везан за микрофиламенте при чему поремећај цитоскелета узрокује повећану експресију ових протеина (121,122). Повећано лучење фактора раста стимулише фосфорилацију *Bim*-а који је неактиван у фосфорилисаном облику, док смањено лучење фактора раста доводи до повећане експресије овог про-апоптотичног протеина. Недостатак гена који кодира синтезу *Bim*-а доводи до повећања лимфоидних и мијелоидних ћелија, оштећења у развоју тимоцита и значајну отпорност ћелија на различите апоптотске стимулусе (123).

Овој групи *Bcl-2* протеина (*BH3-only*) (Слика 4) припада *Bid* протеин чија је структура слична анти-апоптотичним протеинима и представља протеин укрштања спољашњег и унутрашњег митохондријалног пута. Каспаза-8 која се активира спољашњим апоптотским путем активира *Bid* у *t-Bid* (активна форма *Bid*-а) који даље усмерава апоптозу путем митохондрија. Активна форма *Bid*-а, *t-Bid* има могућност везивања за анти-апоптотични *Bcl-2* протеин чиме га инхибира, али се такође везује за про-апоптотични *Bax* чиме га активира. Код експерименталних мишева, недостатак гена који кодира синтезу *Bid*-а доводи до хематопоетског малигнитета који је сличан хроничној хуманој мијеломоноцитној леукемији (124) (125).

## 1.2.2. Аутофагија

Термин „аутофагија“ први пут је применио белгијски биохемичар *Christian de Duve* у другој половини 20. века и дефинисао аутофагију као биохемијски процес који се одвија у лизозомима (126). Аутофагија је позната као тип 2 програмиране ћелијске смрти и представља механизам протеолитичке деградације оштећених компоненти цитоплазме (органела и протеина) унутар лизозома (127) у циљу одржања ћелијске хомеостазе у условима гладовања, инфекције, кардиоваскуларних болести и неоплазије (128–130). Тако, аутофагија представља механизам одржавања ћелијске хомеостазе уклањањем онкогених протеинских супстрата, оштећених протеина и органела чиме се спречава трансформација неизмењених ћелија у канцерогене ћелије (131,132). Стога, аутофагија представља облик програмиране ћелијске смрти који има улогу у превенцији настанка карцинома (133). Међутим, након настанка малигног тумора, индукција аутофагије омогућава туморској ћелији раст и пролиферацију. У ћелијама сисара су присутна три основна типа аутофагије: макро-аутофагија, микро-аутофагија и аутофагија посредована шаперонима (134,135). Макро-аутофагија представља процес где изолациона двослојна мембрана (фагофора или тзв. пре-аутофагозомална мембрана) окружује цитосолне компоненте чиме се формира аутофагозом који са лизозомом формира аутолизозом (Слика 6). Након формирања аутолизозома одвојене цитосолне компоненте се разграђују каталитичким дејством лизозомалних ензима из фамилије протеаза (136) (137). Супротно макро-аутофагији, микро-аутофагија представља процес где цитосолне компоненте преузима лизозом инвагинацијом лизозомалне мембране. Карактеристично за оба типа аутофагије јесте то да путем селективних и неселективних механизма окружују структурно велике цитосолне компоненте.

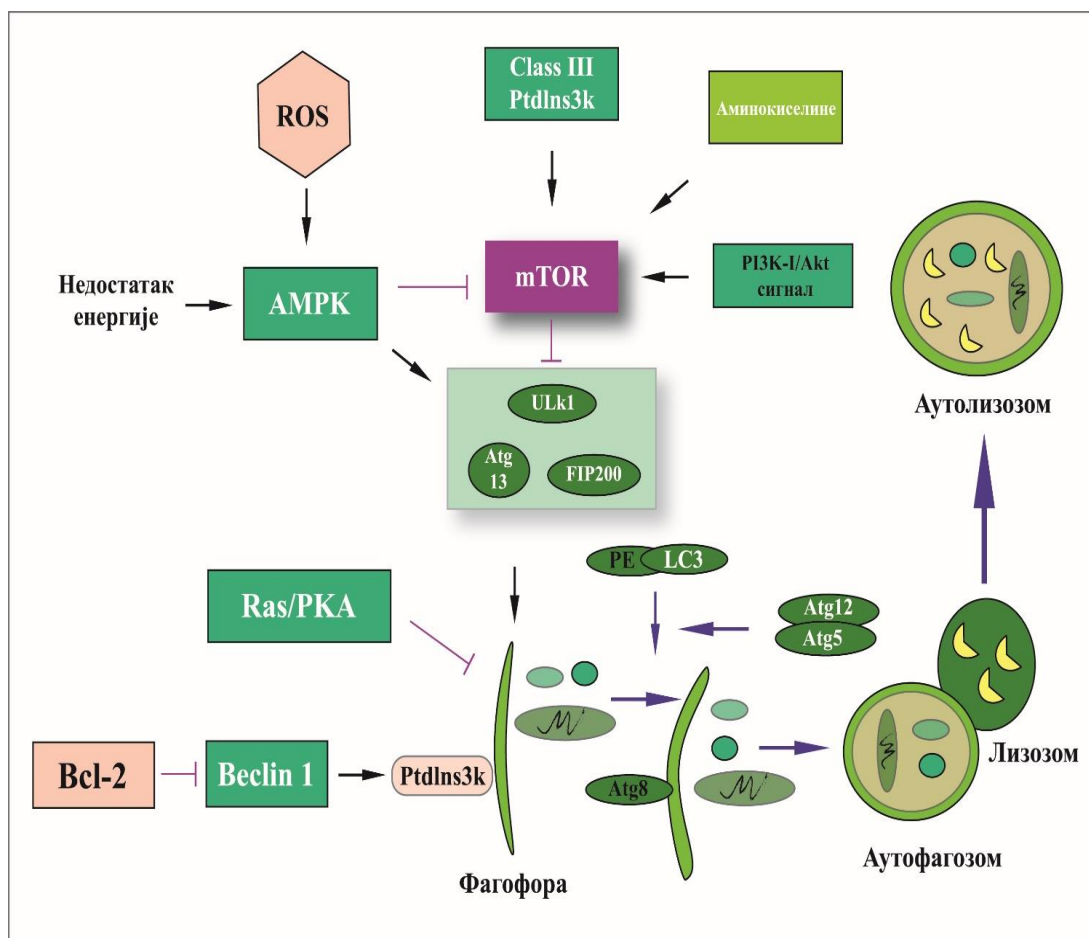
Аутофагија посредована шаперонима (протеини пратиоци) представља процес где шаперони допремају циљне цитосолне протеине до лизозома где долази до њихове транслокације у унутрашњост лизозома и последично њихове деградације. У условима гладовања аутофагија представља неселективан процес који резултује формирањем аутолизозома и разградњом цитосолних компоненти, док у условима стреса аутофагија има цитопротективну улогу где аутофагијски рецептори (*SAR*) препознају оштећене ћелијске компоненте, као што су оштећене митохондрије (митофагија), интрацелуларне патогене (патофагија) или протеинске агрегате (агрефагија) (137).

Најбоље испитани аутофагијски *SAR* протеини су протеини који припадају групи *p62/SQSTM1* рецепторских протеина које садрже шест протеина: *p62/SQSTM1* нуклеарни протеин; калцијум везујући протеин 2 (*CALCOCO2*); опинеурин (кога кодира *OPTN* ген); протеин чију синтезу кодира ген *NBR1*, који се налази у близини тумор супресорског гена *BRCA1*; *Tak1* везујући протеин; и *Toll* интерагујући протеин (138).

Процес ћелијске смрти посредоване аутофагијом већ дуже време представљен је као тип ћелијске смрти путем прекомерне цитосолне вакуолизације, али такође је утврђено да је примарна улога аутофагије заштитни механизам који доводи до повећања вијабилности ћелија путем одржавања интегритета ћелије, обнављањем метаболичких прекурсора и уклањањем унутарћелијских деградационих компоненти (128). Према томе, аутофагична ћелијска смрт не сматра се обликом програмиране ћелијске смрти, већ се сматра механизмом који је укључен у процес ћелијске смрти као неконтролисани разарајући процес (139). Ипак, утврђено је да аутофагија има улогу регулатора других облика ћелијске смрти. Тако, аутофагија представља механизам који регулише процес некроптозе у ћелијама патогених болести. На пример, у ћелијама дечје акутне лимфобластне леукемије је неопходна индукција процеса некроптозе која зависи од аутофагије у циљу превазилажења резистентност на глукокортикоиде (140) или у ендотелним ћелијама где инхибиција аутофагије одређује ток процеса некроптозе која је индукована палмитинском киселином (141). На основу овога, установљено је да аутофагија представља генетски контролисан процес који има важну улогу у одржавању хомеостазе ћелија.

Процес аутофагије може бити индукован различитим стимулусима, као што су недостатак хранљивих материја, хипоксија, реактивне кисеоничне врсте (*ROS*), агрегација протеина и оштећење органела (142,143) и регулисан је генима који кодирају синтезу *Atg* групе протеинских киназа (*Autophagy-related proteins*). Данас је познато више од 30 еволуционо очуваних *Atg* киназа. Након индуковања аутофагије *Atg1* комплекс (који садржи *Atg1/ULK*, *Atg13*, *Atg17*, *Atg29*, *Atg31* киназе) се транслоцира на фагофору што доводи до активирања фосфатидилинозитол 3-киназног комплекса (*PI3K*) (који садржи *Vps34* (*Vacuolar protein sorting 34*), *Vps15*, *Beclin1/Atg6* и *Atg14*) (144). Комплекс *PI3K* активира ефекторну киназу *Atg18* која формира комплекс са *Atg2* који учествује у формирању аутофагозома и контролише величину везикуле. У фази елонгације и затварања изолационе мембране учествују два протеинска комплекса: један комплекс који садржи *Atg12*, *Atg5* и *Atg16* киназе и други

фосфатидилетаноламински комплекс (*PE*) који садржи *Atg8* (*LC3*) и фосфатидилетаноламин. Фузијом формираног аутофагозома и лизозома формира се аутофаголизозом у коме се одвија деградација цитосолних компоненти (Слика 6). Тако, активација аутофагије поменутиим стимулусима и посредством *Atg* групе протеина обухвата више сигналних путева. Рапамицин (*mTOR*) представља серин/треонин киназу који има улогу негативног регулатора аутофагије (127). Према томе, у условима ситости, када је ћелија богата хранљивим материјама, *mTOR* је активан и фосфорилише протеин *Atg13* смањујући његов афинитет за везивање за *Atg1* и формирање комплекса, док у условима недостатка хранљивих материја *mTOR* је инхибиран при чему је омогућено формирање *Atg1* комплекса (145–148).



**Слика 6.** Механизам и регулација аутофагије. Аутофагију индукују различити стимулуси, као што су аминокиселине, недостатак енергије и *ROS*. У условима у којим је ћелија богата хранљивим материјама аутофагија је инхибирана посредством фосфатидилинозитол-3-киназног сигналног пута где *mTOR* и *Beclin1* представљају главне регулаторне протеине аутофагије (148).

Киназа *Beclin1* (*Atg6*) која учествује у формирању *PI3K* комплекса представља централну тачку у регулацији процеса аутофагије (149). Ова протеин киназа има улогу да катализује фосфорилацију хидроксилне групе на положају 3 инозитолског прстена при чему настаје фосфатидилинозитол-3-фосфат. *Beclin1* киназа има улогу у супресији тумора, регулисању ћелијске смрти, развоју ембриона и спречавању развоја неуродегенеративних и срчаних болести (150). Осим *mTOR* протеина, још једна група негативних регулатора аутофагије су анти-апоптотични *Bcl-2* протеини, као што је *Bcl-xl* који се везују за *BH3* домен протеина *Beclin1* и инхибирају његову активност, односно инхибирају формирање *PI3K* комплекса (151,152). Присуство про-апоптотичних *Bcl-2* протеина који садрже само *BH3* домен имају улогу активатора аутофагије при чему се везују за анти-апоптотични *Bcl-2* протеине и блокирају њихово везивање за *Beclin1*. Осим тога, протеин киназа (*DAPK* - *death-associated protein kinase*) индукује аутофагију фосфорилацијом *BH3* домена *Beclin1* протеина што резултује дисоцијацију димера *Beclin1-Bcl-xl*. Такође, битно је поменути да анти-апоптотични *Bcl-2* протеини инхибирају процес аутофагије једино у одсуству про-апоптотичних *Bcl-2* протеина *Bax*-а и *Bak*-а (148,153,154).

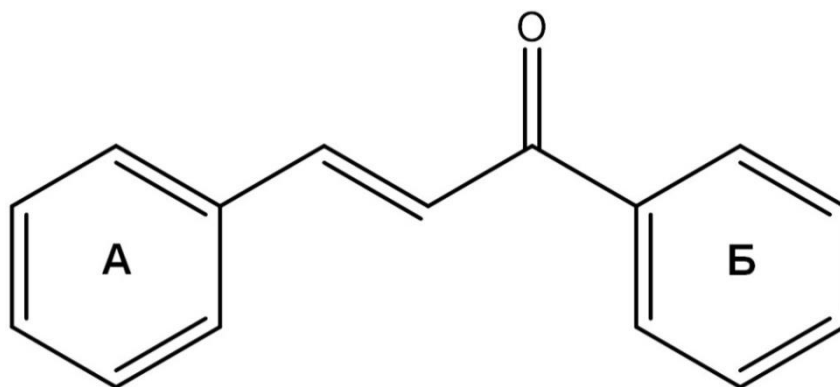
На основу досадашњих сазнања аутофагија има двоструку улогу у иницијацији и прогресији тумора, при чему се и репресија и стимулација аутофагије треба сматрати терапијским приступом у лечењу карцинома. Многи антитуморски лекови активирају процес аутофагије, односно тренутно нису познати терапеутици који немају никакав утицај на аутофагију. Многобројна синтетисана органска једињења индукују процес аутофагије у туморским ћелијама, док мањи број једињења представљају инхибиторе аутофагије, као што је хлорокин. С тим у вези, халкони представљају хетероциклична органска једињења која могу индуковати и апоптозу и аутофагију туморских ћелија.

### 1.3. Халкони

Фитоконституенти који су присутни у воћу, поврћу и зачинима представљају биолошки активне супстанце који имају широку примену као потенцијални терапеутици за лечење многих болести од којих су најзначајнија малигна обољења. Једни од оваквих фитоконституената су халкони, ароматични кетони, који представљају прекурсоре за биосинтезу флавоноида, изофлавоноида и других биолошки активних хетероцикличних једињења (155). Халкони су заступљени у



намирницама биљног порекла, најчешће у форми флоретина, халконарингенина и арбутина, где представљају интермедијере за биосинтезу флавоноида под каталитичким дејством ензима халкон синтазе (156,157). Бензилиденацетофенон представља примарно једињење које чини основу у хемијској структури халкона. Бензилиденацетофенон у својој структури садржи два ароматична прстена (А и Б прстен) који су повезани  $\alpha, \beta$  – незасићеним карбонилним системом са три угљеникова атома (158) (Слика 7). Осим своје заступљености у биљкама, халкони се у лабораторијским условима могу синтетисати реакцијом алдолне кондензације (*Claisen-Schmidt* – ове кондензације), односно кондензацијом арил кетона са ароматичним алдехидима у присуству одговарајућих кондензационих средстава. Халкони могу егзистирати у различитим конформацијама, док њихова биолошка активност зависи од погодне супституције прстена и од присуства  $\alpha, \beta$  – незасићене кетонске групе. Према томе, двострука веза између два угљеникова атома ( $C=C$ ) може бити присутна у (*E*) – или (*Z*) – конфигурацији у зависности од тога да ли су супституенти виших приоритета на супротним странама двоструке везе (*E* – *entgegen* – супротно) или са исте стране двоструке везе (*Z* – *zusammen* – заједно). Већина халкона изолована је као (*E*) – изомер због тога што (*E*) – конфигурација представља термодинамички најстабилнију конфигурацију. Ипак, основни (*E*) – халкон (Слика 1), халкон који не садржи ниједну супституисану функционалну групу, није пронађен као природни производ али су из природних производа изоловани његови једноставни деривати, као што су 4'-хидрокси-халкони (из биљке рода *Citrus*) и 4'-метокси-халкони (из биљке рода *Flemingia*) (159,160). С тим у вези, природни деривати халкона могу имати супституенте на оба ароматична прстена, а такође могу бити изоловани у слободном облику или у облику *O*- или *C*-гликозида. *E* – халкони као и њихови деривати и аналози испољавају ефикасне фармаколошке ефекте од којих су најзначајнији антитуморски (161–164), антиоксидативни (164–167), антиинфламаторни (168–170), антимикробни (165,171,172), и антифунгални ефекат (173,174).



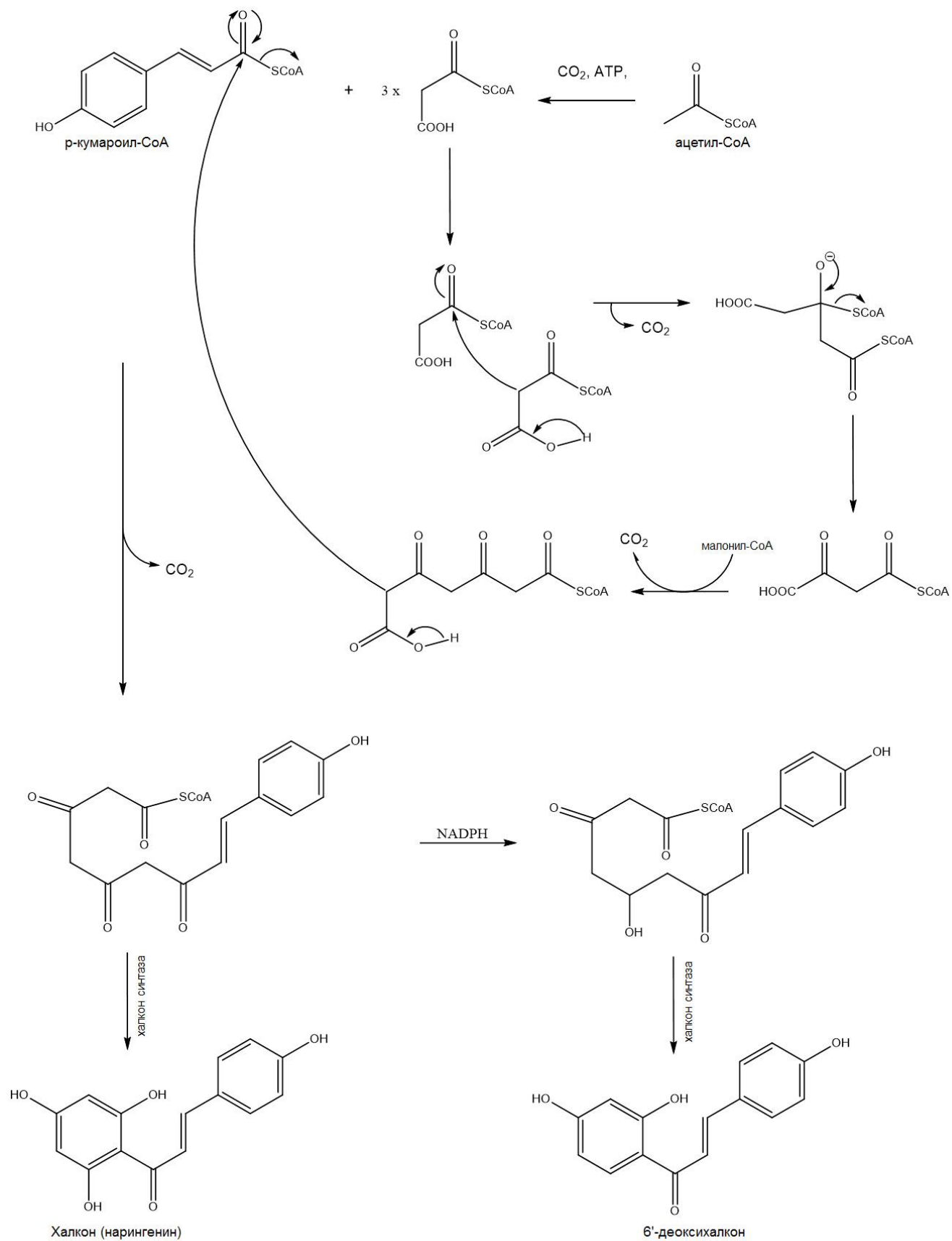
Слика 7. Структурна формула халкона.

Због њихове једноставне структуре халкони су категорисани у групу мањих флавоноида заједно са флаванонима и дихидрохалконима. Ова подкласа флавоноида је веома битна за биљке као конституент њиховог прилагођавања, а такође и за животиње и човека, при чему услед флексибилне конформације молекула и једноставне хемијске структуре имају значајну биохемијску и фармаколошку улогу. Халкони су првобитно пронађени у биљкама као жути и жутоцрвени цветни пигменти *Coreopsis*-а и *Compositae*-а, а касније су пронађени и у другим биљним породицама као што су *Solanaceae*, *Piperaceae*, *Apiaceae* и друге (175,176). Велики број халкона је изолован из породица биљака *Compositae* и *Leguminosae*, док су 6'-деоксихалкони присутни у махунаркама и пренилхалкони у биљкама хмеља. Највећи број халкона који се налази у природи је полихидроксилован, при чему ароматични прстенови представљају положаје супституисаних хидроксилованих група. Код већине халкона хидроксилована група је смештена на положајима C-2, C-4 и C-6 ароматичног А прстена, јер се биосинтеза ароматичног А прстена врши преко малонат-ацетатног пута, док Б прстен халкона углавном садржи хидроксиловану групу на положају C-4. Овакав полихидроксиловани халкон представља интермедијер и крајњи производ у биосинтези флавоноида, делује као одбрамбено једињење, учествује у интеракцији биљака и инсеката и доприноси лековитости биљака.

### 1.3.1. Биосинтеза халкона

Биосинтеза халкона се врши комбиновањем ацетат-малонатног и шикимског пута, при чему се малонил-*CoA* синтетише из ацетил-*CoA*, док се *p*-кумароил-*CoA* синтетише од фенилаланина у шикимском путу. У првом кораку биосинтезе халкона

долази до кондензације *p*-кумароил-*CoA* са три молекула малонил-*CoA* при чему настаје тетракетидни интермедијер. У другом кораку долази до циклизације тетракетидног интермедијера у присуству ензима халкон синтазе (Слика 8). Биосинтеза 6'-деоксихалкона се такође врши истим механизмом с тим што се формирани тетракетидни интермедијер прво редукује у присуству *NADPH* зависне халкон редуктазе и потом редуковани интермедијер циклизује у присуству халкон синтазе (177).



Слика 8. Биосинтеза халкона.

### 1.3.2. Биолошка активност халкона

Услед широке заступљености халкона у воћу, зачинима, чају и намирницама на бази соје, циљ исцрпних научних истраживања био је усмерен у правцу утврђивања њихове биолошке активности. Резултати многобројних истраживања показали су да халкони могу превалдати недостатке досадашњих антиканцерогених терапеутика, као што су неселективност терапеутика према малигно неизмењеним ћелијама, развој резистентности туморских ћелија на терапеутике и друге потенцијалне нежељене ефекте (супресија косне сржи, крварење, опадање косе, кожне реакције, мучнина, повраћање и друго). Многобројни досадашњи терапеутици испољавају генотоксичност услед интеракције са аминокиселинским групама нуклеинских киселина *DNK* молекула, међутим халкони услед своје флексибилне структуре имају слабију интеракцију са *DNK* молекулом и низак ризик од мутагености (178). Такође, резултати многобројних истраживања показују да халкони испољавају цитотоксично дејство и индукују апоптозу (и/или аутофагију) туморских ћелија (179–192).

Један природни 6'-деоксихалкон као што је Изоликуиритигенин представља пример халкона чији је антитуморски ефекат најчешће испитиван. Овај природни халкон испољава ефикасно антитуморско дејство на различите типове туморских ћелија као што су туморске ћелије колоне (*HCT-116* ћелијска линија) (179), простате (*PC-3*) (193), бубрега (*Caki*) (194), цервикса (*CaSki* и *HeLa*) (195) и лимфоцитне леукемије (*HL-60*) (196). Резултати ових истраживања, као и ранијих истраживања *in vitro* и *in vivo* показали су да Изоликуиритигенин испољава ефикасан цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије, индукује апоптозу поменутих ћелија и зауставља ћелијски циклус у *G2/M* фази. Следећи природни халкон, Ксантохумол (који је присутан у *Humulus lupulus L.*, *Sophora flavescens L.* и *Medicago sativa L.*) представља прениловани флавоноид биљног порекла који испољава широк спектар фармаколошких активности, укључујући и антиканцерогено дејство. Овај природни халкон испољава ефикасан цитотоксични ефекат на туморске ћелије дебелог црева (*HT-29* ћелијска линија) (180), желуца (*AGS*, *SGC-7901* и *MGC-803*) (197), дојке (*MCF-7* и *MDA-MB-231*) и јетре (ћелије хуманог хепатоцелуларног карцинома, *HepG2*) (198).

Осим Изоликуиритигенина и Ксантохумола из биљака су изоловани и други природни халкони који показују ефикасан антитуморски ефекат на различите туморске ћелије, као што су Ликохалкон *A* (185,199,200), Милепацин (186,201), Флавокаваин *B* (187,188,202) и други. Резултати истраживања показали су да готово сви поменути

природни халкони индукују апоптозу туморских ћелија при чему смањују експресију анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и повећавају експресију про-апоптотичног *Bax*-а што доводи до активације егзекуторне каспазе-3 (189,203,204). Такође, готово сви поменути природни халкони инхибирају пролиферацију туморских ћелија заустављањем ћелијског циклуса у *G2/M* фази (189,193,205).

Изоловањем природних халкона из биљака и накнадном синтезом једне или више функционалних група на А и/или Б ароматичном прстену могу се добити деривати халкона, док *de novo* синтезом једињења која имају сличну хемијску структуру као и природни халкони могу се синтетисати аналоги халкона.

Резултати многобројних истраживања показали су да деривати и аналоги халкона испољавају ефикасније антитуморско дејство у односу на природне халконе. Једно од таквих истраживања вршили су *Stompor* и сарадници (198) чији су резултати истраживања показали да деривати Ксантохумола испољавају ефикаснији антитуморски ефекат у односу на природни Ксантохумол. Наиме, два деривата Ксантохумола, од којих један садржи кондензовани молекул биотина на 4. положају ароматичног Б прстена а други садржи два кондензована молекула биотина на 4. положају оба ароматична прстена, испољавају ефикаснији цитотоксични ефекат на ћелије хуманог карцинома дојке (*MCF-7*, *MDA-MB-23* и *MCF-10A*) у односу на природни Ксантохумол који је изолован из биљака.

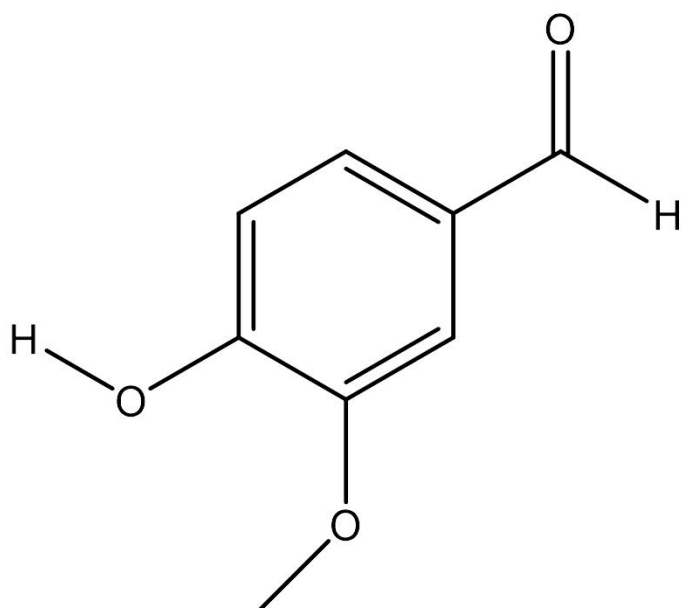
Следећи халкони који поткрепљују поменуто тврдњу су аналоги Милепацина, где Милепацин представља природни халкон изолован из биљке *Millettia Pachycarpa*. Тако, резултати истраживања које су вршили *An* и сарадници (201) су показали да сви аналоги Милепацина, који су *de novo* синтетисани од 2-хидрокси-4-метоксибензалдехида, испољавају ефикаснији цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије плућа (*A-549*), цервикса (*HeLa*), колоне (*HCT-116*), јајника (*A2780*) и желуца (*MGC-803*) у односу на природни Милепацин.

### 1.3.3. Ванилин

Ванилин представља ароматични алдехид који учествује у реакцији синтезе халкона, при чему се применом различите врсте арил или алкил кетона може синтетисати широк спектар аналога халкона. Ванилин је дериват бензалдехида, 4-хидрокси-3-метоксибензалдехида, карактеристичног мириса и слатког укуса и

представља фрагмент једињења изолованих из корена ђумбира, као што су дехидрозингерон, зингерон, гингерол, парадол и њихови деривати (Слика 9). Најзначајнији извор овог природног производа, који садржи алдехидну, етарску и фенолну групу, је биљка ванила која припада породици орхидеја (*Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* и *Vanilla pompona*). Ванила се углавном узгаја у Мексику, на Јави, Тахитију, Мадагаскару, Реуниону, Маурицијусу, Шри Ланки, Занзибару и Јамајци (206). Иако Мексико представља земљу порекла ваниле, највећи проценат светске производње ваниле преузеле су земље попут Индонезије и Мадагаскара са укупном светском производњом ваниле од око 89,5% (207,208).

Природни екстракт ваниле представља мешавину од неколико стотина различитих једињења, при чему ванилин представља главну компоненту са заступљеношћу од око 86%. Осим у махунама ваниле, ванилин је затупљен и у воћу и поврћу, као што су пасуљ, кукуруз, сунцокрет, боровница, нана, ананас, зоб, шећерна репе, камфор, цимет, кокос, јасмин, трешња, јагода, манго, разне врсте смола, кромпир и другим (209,210). Ванилин има широку примену у производњи хране, пића, парфема, сточне хране и производа за чишћење, а такође се комерцијално користи као интермедијер у производњи агрохемикалија, лекова, нутритивних лекова и других хемикалија. Годишња потражња за ванилином је преко 15000 тона, при чему се око 2000 тона производи од природног екстракта ваниле (211). Услед недостатка природног екстракта ваниле, данас се ванилин углавном синтетише у лабораторијским условима. Први комерцијални ванилин синтетисао је *Tiemann* 1876. године из еугенола, природног фенола, који је затупљен у каранфилићу (*Syzygium aromaticum*) и цимету (*Cinnamomum ceylonicum* и *Cinnamomum cassia*), док се данас ванилин синтетише из гвајакола или лигнина (212). Ванилин представља важну ароматичну компоненту природних производа и показује различите биолошке активности, као што су антитуморска (213,214), антиинфламаторна (215,216), антиоксидативна (217) и антимикробна (218,219) активност.



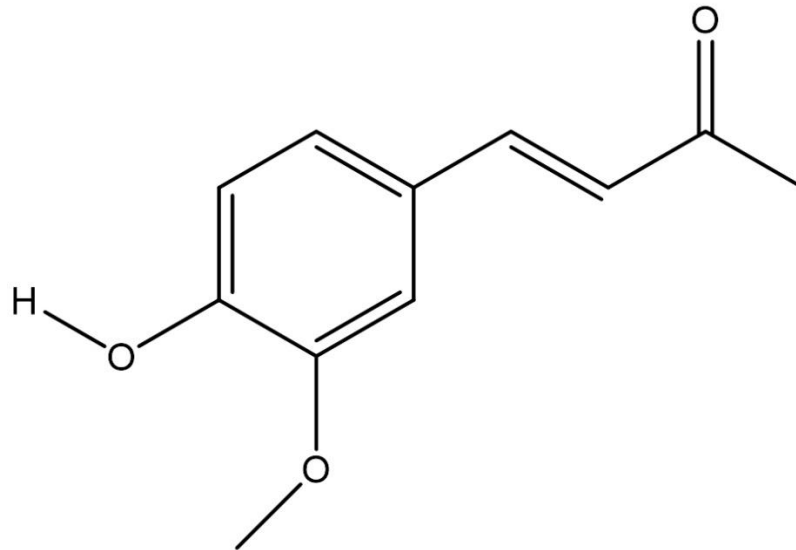
Слика 9. Ванилин.

#### 1.3.4. Аналоги халкона

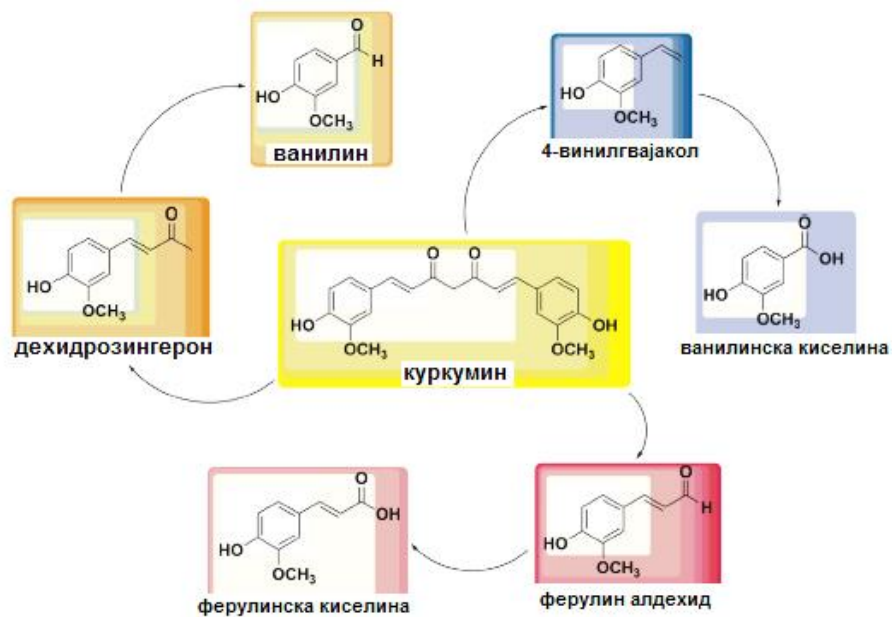
Пораст антимикуробне резистенције резултовало је убрзаним истраживањима употребе природних производа који испољавају антимикуробну активност, од којих је најзначајнији корен ђумбира (*Zingiber officinale Roscoe; family Zingiberaceae*) (220).

Ђумбир представља зачин који се користи не само у исхрани већ и као биљни препарат у већини источноазијских земаља. Дехидрозингерон (ДХЗ) представља фенолно једињење које је изоловано из корена ђумбира и према својој хемијској структури је мономерни аналог куркумина изолованог из корена куркуме (*Curcuma longa*) (Слика 10). Стога, ДХЗ представља деградациони производ куркумина који има већи биолошки полуживот од самог куркумина услед чега има већу биорасположивост (Слика 11). Такође, дехидрозингерон има сличну хемијску структуру као изоеугенол, који уместо метил групе има везану ацетил групу, при чему оба представљају биолошки активна једињења. Услед тога, дехидрозингерон испољава различите фармаколошке ефекте од којих су најзначајнији антитуморски, антиинфламаторни и антиоксидативни ефекат (221,222). Иако дехидрозингерон представљају фенолно једињење са коњугованим енонским системом, његова хемијска структура се разликује од осталих халкона по томе што је уместо арил групе за карбонилни С-атом везана метил група.





Слика 10. Дехидрозингерон.



Слика 11. Деградациони производи куркумина.

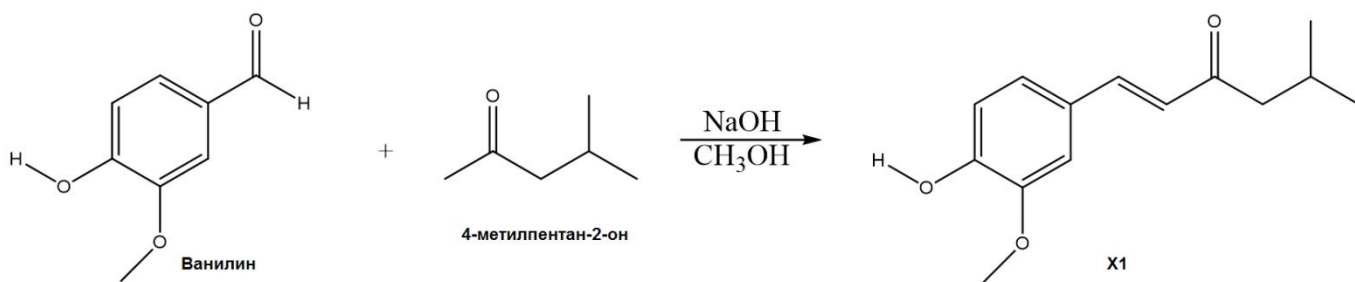
Аналози халкона чији су антитуморски ефекти испитивани у овом истраживању: (Е)-1-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (X1), (Е)-1-(3,4-

диметоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X2**), (E)-1-(4-етокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X3**), (E)-1-(4-изопропокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X4**), (E)-1-(3-метокси-4-пропоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X5**), (E)-1-(4-бутокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X6**), (E)-1-(4-(бензилокси)-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X7**), представљају структурне аналоге дехидрозингерона. По својој хемијској структури **X1** се разликују од дехидрозингерона по томе што је уместо метил групе за карбонилни C-атом везана изобутил група. Остали аналози халкона у серији једињења се разликују по супституенту на четвртом угљениковом атому ароматичног Б прстена: **X2** има супституисану метил групу, **X3**-етил групу, **X4**-изопропил групу, **X5**-пропил групу, **X6**-бутил групу и **X7**-бензил групу.

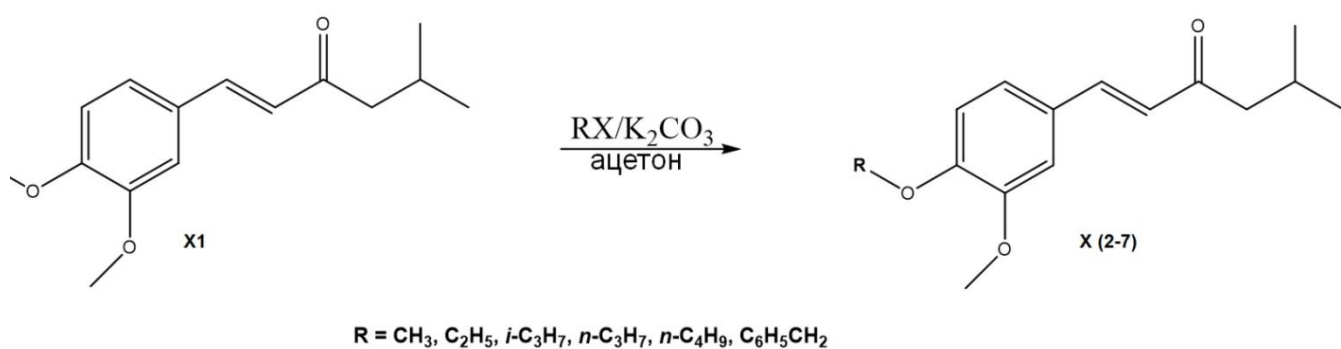
Аналог халкона **X1** синтетисан је под *Claisen-Schmidt*-овим условима од ванилина и 4-метилпентан-2-он при благо модификованим поступком, при чему је добијен производ реакције – халкон **X1** у високом приносу (Слика 12). Серија његових *O*-алкилних деривата (**X2-X7**) је добијена алкиловањем слободне фенолне групе са одговарајућим алкил халогенидима (Слика 13).

Резултати истраживања које су вршили *Muškinja* и сарадници (172) показали су да синтетисана серија халкона (**X1-X7**) показује снажно антимикуробно дејство према различитим врстама бактерија и гљива.

Услед снажног антимикуробног дејства синтетисаних халкона (**X1-X7**), у овом истраживању испитиван је њихов антитуморски ефекат на три врсте туморских ћелија: аденокарцином цервикса – *HeLa*, карцином дојке – *MDA-MB-231* и аденокарцином колона – *HCT-116*, при чему је циљ био да се обухвати што више ткива различитих органа оболелих од малигнитета. Као контролне супстанце коришћене су дехидрозингерон (*ДХЗ*) и цисплатина (*cisPt*). Дехидрозингерон је коришћен као контролна супстанца због своје структурне сличности са синтетисаним аналозима халкона, а такође испољава различите биолошке активности (221,222). Цисплатина је коришћена као друга контролна супстанца јер представља хемотерапеутски агенс који се користи за лечење малигних тумора различитих ткива као што су јајници, тестиси, бешика, колон, плућа, цервикс и дојка (223). Такође, због своје клиничке примене и значајног цитотоксичног ефекта на ћелије тумора, цисплатина се користи као контролна супстанца у испитивању антитуморског дејства готово свих органских једињења (224).



**Слика 12.** Синтеза (Е)-1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он, X1.



**Слика 13.** Синтеза (Е)-1-(4-алкокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он, X (2-7).

## 2. Циљеви истраживања

Циљ овог истраживања представља испитивање антитуморског ефекта седам аналога халкона: (Е)-1-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X1**), (Е)-1-(3,4-диметоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X2**), (Е)-1-(4-етокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X3**), (Е)-1-(4-изопропокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X4**), (Е)-1-(3-метокси-4-пропоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X5**), (Е)-1-(4-бутокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X6**), (Е)-1-(4-(бензилокси)-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X7**) на три различите врсте туморских ћелија хуманог порекла (*HeLa* – хумани карцином цервикса, *HCT-116* – хумани карцином колона и *MDA-MB-231* – хумани аденокарцином дојке), као и на здраве фибробласте плућа као контролне ћелије (*MRC-5*). Као контролне супстанце користићемо цисплатину (*cisPt*) и дехидрозингерон (*DX3*).

А) Главни циљеви овог истраживања су:

1. Утврдити потенцијални цитотоксични ефекат аналога халкона на поменуте туморске ћелије.
2. Испитати који од синтетисаних аналога халкона не испољава статистички значајан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама и упоредити њихов цитотоксични ефекат са ефектом референтних супстанци.
3. Утврдити који тип ћелијске смрти је доминантан (апоптоза или некроза) и утврдити да ли и у којој мери процес аутофагије утиче на цитотоксичност испитиваних супстанци према туморским ћелијама.
4. Утврдити дејство испитиваних супстанци на експресију, локализацију и активацију про-апоптотичног *Bax* протеина, анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и активне каспазе-3 након третмана испитиваним супстанцама на хумане туморске ћелије.

Б) На основу постављених циљева радне хипотезе студије су следеће:

1. Аналоги халкона испољавају цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије уз незнатан ефекат на здраве ћелије хуманих фибробласта.

2. Аналоги халкона индукују апоптозу хуманих туморских ћелија, уз могуће учешће аутофагије која доприноси процесу апоптозе.
3. Аналоги халкона повећавају експресију активног *Bax*-а и смањују експресију *Bcl-2* протеина у хуманим туморским ћелијама што резултује транслокацију цитохрома *c* из интрамембранског простора у цитосол ћелије и сукцесивно активирање ефекторне каспазе-3.

## 3. Материјал и методе

### 3.1. Врста студије

Тип студије представља *in vitro* студију која је извођена на материјалу људског порекла и реализована је у лабораторијама Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Антитуморски ефекат аналога халкона испитиван је на три различите врсте туморских ћелија хуманог порекла: ћелијска линија аденокарцинома дојке *MDA-MB-231*, аденокарцинома цервикса *HeLa*, карцинома колона *HCT-116* и на здравим фибробластима плућа хуманог порекла које су у овој студији биле коришћене као контролне ћелије, *MRC-5*.

У истраживању су коришћене две референтне супстанце, цисплатина и дехидрозингерон.

### 3.2. Култивисање ћелија, реагенси и испитиване супстанце

Четири хумане ћелијске линије које су коришћене у истраживању: *MDA-MB-231* (аденокарцином дојке, пасажа 11), *HeLa* (аденокарцинома цервикса, пасажа 6 и 7), *HCT-116* (карцинома колона, пасажа 12 и 14) и *MRC-5* (здрави фибробласти, пасажа 6) култивисане су у комплетном *DMEM*-у (*Dulbecco's Modified Eagle's medium, Sigma Aldrich D5671*) на  $37^{\circ}\text{C}$  у атмосфери са 5%  $\text{CO}_2$ .

Коришћена је следећа проскрипција за комплетни *DMEM* – 10% феталног говеђег серума (*FBS, Sigma-Aldrich, F7524*), антибиотик (*Roche, 11074440001*) и 1% неесенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich, M7145*). 10% *FBS* је претходно инактивиран (у воденом купатилу на  $37^{\circ}\text{C}$ ) и стерилисан је употребом шприца са нитроцелулозном мембраном (*Sartorius, 16534-K*).

Ћелије су чуване залеђене у течном азоту на температури од  $-196^{\circ}\text{C}$ . Одлеђена суспензија ћелија била је ресуспендована у медијуму (комплетном *DMEM*-у) и након центрифугирања талог је поново ресуспендован са свежим медијумом у циљу добијања ћелијске суспензије која је пренета у стерилне културолошке ћелијске флашкове од  $25\text{ cm}^2$  (*Greiner Bio-One, 690160*).

Након постизања конfluентности ћелија (80-90%) у флашковима, екстрахован је медијум и ћелије су испране 3 пута  $1 \times PBS$ -ом. У циљу одлепљивања ћелија од пластичне подлоге флашка, у флашкове је додато по 1 ml трипсина (*Sigma-Aldrich*, 85450С). Ћелијски флашкови су остављени током 3-4 минута у инкубатору након чега је потврда одлепљивања ћелија визуализована употребом инвертног микроскопа. Одвојена суспензија ћелија је даље коришћена за експерименте.

Непосредно пре експеримента ћелије су избројане коришћењем бројача са две коморе при чему је пипетирано 10  $\mu$ l ћелијске суспензије испод покровног стакла које потпуно покрива обе коморе за бројање ћелија. Ћелије се броје у четири квадрата након чега се израчунава средња вредност броја ћелија по једном квадрату. Добијена вредност броја ћелија се множи са  $10^4$  при чему се добија број ћелија у 1 ml ћелијске суспензије.

Седам синтетисаних аналога халкона на бази ванилина и дехидрозингерон су поклон од стране проф. др Зорана Ратковића и његових сарадника (Катедра за хемију, Природно-математички факултет, Крагујевац), док је цисплатина купљена од *Calbiochem* (CAS 15663-27-1).

Све испитиване супстанце су растворене у *DMSO*-у (*Sigma Chemical, ST. Lois, Mo*) до укупних концентрација од 0,3 до 300  $\mu$ M (видети слику 14), при чему финална концентрација *DMSO*-а није била већа од 0,5%.

Хлорокин је купљен од *Sigma Aldrich* (С6628) и растворен у двоструко дестилованој води у концентрацији од 20  $\mu$ M.

Цитотоксични и апоптотични ефекат испитиваних аналога халкона (**X1-X7**) представљали су независне варијабле, док су добијени параметри поменутог ефекта представљали зависне варијабле овог истраживања.

Цитотоксични ефекат испитиваних супстанци утврђен је коришћењем МТТ теста након 24 и 48 часова култивације различитим концентрацијама аналога халкона на три врсте туморских ћелија (*HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231*) и на здравим фибробластима (*MRC-5*) у односу на нетретиране ћелије. За одређивање степена цитотоксичне ефикасности испитиваних аналога халкона, као контролне супстанце коришћени су цисплатина и дехидрозингерон чији су цитотоксични ефекти на овим туморским ћелијама већ утврђени (одељак: Увод).

Следећи корак у испитивању антитуморског дејства аналога халкона подразумевао је утврђивање апоптотичног ефекта оних супстанци које су на једној од коришћених туморских ћелијских линија испољиле статистички значајан

цитотоксични ефекат, уз минимални статистички значајног цитотоксичног ефекта на ћелије хуманих фибробласта.

Тип ћелијске смрти (апоптоза и/или аутофагија) утврђен је коришћењем проточне цитометрије (*flow*) употребом *Annexin V-FITC* и 7-аминоактиномицин *D* бојења. У циљу утврђивања типа ћелијске смрти, *HeLa* и *HCT-116* ћелије су инкубирани у периоду од 48 часова испитиваним супстанцама у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима. Процент апоптотичних и некротичних ћелија у узорку утврђен је у односу на контролне, нетретирание *HeLa* и *HCT-116* ћелије.

Као део експеримента, након 24 часовне инкубације испитиваних супстанци вршен је ко-третман инхибитором аутофагије (хлорокином, *CQ*) у концентрацији од 20  $\mu$ M, како би се утврдило да ли процес аутофагије доприноси апоптотичном ефекту испитиваних супстанци.

У циљу испитивања механизма апоптозе индуковане од стране испитиваних аналога халкона коришћене су методе проточне цитометрије (*flow*) и флуоресцентне микроскопије.

Метода проточне цитометрије коришћена је за утврђивање експресије регулаторних апоптотских протеина *Bax-a*, *Bcl-2* и каспазе-3 након 24 часовне култивације *HeLa* и *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама седам аналога халкона, док је метода флуоресцентне микроскопије коришћена за утврђивање експресије *Bax-a*, *Bcl-2* и каспазе-3 након 24 часовне култивације *HeLa* и *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама три структурно различита аналога халкона (**X1**, **X5** и **X7**). Као део експеримента, методом проточне цитометрије одређен је релативни однос експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* и про-апоптотичног *Bax* протеина у третираним у односу на контролне, нетретирание ћелије у циљу утврђивања механизма апоптозе.

Након утврђивања типа ћелијске смрти, као део овог истраживања испитивана је укљученост процеса аутофагије методом флуоресцентне микроскопије након 48 часовне инкубације *HeLa* и *HCT-116* ћелија аналозима халкона у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима.

### **3.3. МТТ тест цитотоксичности**

Цитотоксични ефекат експерименталних супстанци утврђен је коришћењем МТТ колориметријског теста.



Принцип МТТ теста се заснива на редукцији жутог 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромида до нерастворног љубичастог формазана у метаболички активним ћелијама. Реакцију редукције катализују ензими митохондријалне оксидоредуктазе које представљају *NAD(P)H* зависне ензиме (225).

МТТ тест се врши у микротитар плочама са 96 бунара (96 *Greiner Bio-One*, CLS6509). Након трипсинизације и бројања ћелија, коришћењем мултифункционалне (мултиканалне) пипете у сваки бунар је засејан подједнак број ћелија ( $5 \times 10^3$  ћелија по пунару). Након 24 и 48 часова култивације *HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5* ћелија аналозима халкона и контролним супстанцама у концентрацијама од 0,3 до 300  $\mu\text{M}$ , уклоњен је медијум и у сваки бунар је додато по 100  $\mu\text{l}$  радног раствора МТТ-а.

Радни раствор МТТ-а је добијен из МТТ штока (5mg/ml) који је разблажен са *DMEM*-ом у односу 1:10.

Након 2 часа инкубације ћелија са МТТ раствором на 37°C у атмосфери са 0,5%  $\text{CO}_2$ , награђени кристали формазана су растворени помоћу 100%-тног диметил-сулфоксида (*DMSO*-а). Интензитет љубичасте боје одређен је мерењем апсорбанци на таласној дужини од 595 nm коришћењем читача 96-микротитар плоча (*Zenyth 3100*, *Anthos Labtec Instruments*).

Концентрација испитиваних супстанци која одговара  $IC_{50}$  вредностима након 24 и 48 часова третмана израчунате су коришћењем софтвера *Microsoft Office Excel 2010*, *ED50plus v1.0* или *GraphPad Prism 8*. Процент цитотоксичних ћелија израчунат је коришћењем формуле: Цитотоксичност (%) =  $(1 - (\text{абсорбанца експерименталне групе} / \text{абсорбанца контролне групе}) \times 100)$ .

### **3.4. Проточна цитометрија - *Annexin V-FITC* тест апоптотичности**

Након утврђивања статистички значајне цитотоксичности испитиваних супстанци на *HeLa* и *HCT-116* ћелије, испитиван је њихов апоптотични ефекат коришћењем проточне цитометрије применом *Annexin V-FITC/7-AAD* бојења.

Фосфатидил-серин представља молекул који је инкорпориран унутар ћелијске мембране и код вијабилних ћелија оријентисан је према цитосолу ћелије, док се у стадијуму ране апоптозе ћелија оријентише према екстрацелуларном простору под каталитичким дејством ензима флипаза и инхибицијом ензима аминоксифолипидних транслоказа.

Протеин *Annexin V-FITC* има велики афинитет везивања за фосфатидил-серин који је оријентисан ка спољашњем делу фосфолипидног двослоја ћелијске мембране апоптотичних ћелија при чему представља маркер за идентификацију ћелија у раном стадијуму апоптозе (226). Након везивања *Annexin V-FITC* протеина за фосфатидил-серин и побуђивања светлости арагонског ласера (таласне дужине 488 nm) емитује се зелена боја чиме се идентификује проценат апоптотичних ћелија.

Протеин *7-AAD* представља протеин који има велики афинитет везивања за молекулу *DNK* и нема способност да дифундује кроз очувану ћелијску мембрану вијабилних ћелија и ћелија у стадијуму ране апоптозе.

Након некрозе ћелија долази до нарушавања интегритета ћелијске мембране, дифундовања молекула *7-AAD* и инкорпорирања овог протеина између нуклеинских база дволанчаног *DNK* молекула. Након побуђивања светлости емитује се црвена боја чиме се идентификује проценат некротичних ћелија. Такође, нарушавањем интегритета ћелијске мембране протеин *Annexin V-FITC* дифундује кроз ћелијску мембрану при чему се *FITC* везује за молекулу *DNK* што представља маркер за идентификацију ћелија у касном стадијуму апоптозе.

Према овоме, у условима одсуства *Annexin V-FITC*-а (зелено бојење) и *7-AAD* (црвено бојење) ћелије су вијабилне; у условима присуства зелене и одсуства црвене боје ћелије су у стадијуму ране апоптозе; у условима присуства обе боје ћелије су у стадијуму касне апоптозе; и у условима одсуства зелене и присуства црвене боје ћелије су некротичне (227,228).

Након трипсинизације и бројења *HeLa* и *HCT-116* засејане су у плоче са 24 бунара (*Greiner Bio-One*, 662160) при чему је у сваки бунар засејано  $1 \times 10^5$  ћелија. Након инкубације ћелија у периоду од 24 часова, ћелије су третиране аналозима халкона и контролним супстанцама у концентрацијама која одговарају  $IC_{50}$  вредностима за сваку испитивану супстанцу током 48 часова.

Како би се испитало да ли процес аутофагије доприноси процесу апоптозе, након култивације ћелија у периоду од 24 часова у једну експерименталну групу додат је хлорокин (CQ) у концентрацији од 20  $\mu\text{M}$ .

Након 48 часовне култивације ћелије су пренете у епрувете за проточну цитометрију и три пута испране хладним *PBS*-ом. Након испирања, ћелије су ресуспендоване у 100  $\mu\text{l}$  хладног  $1 \times$  *binding buffer*-а (раствор *FACS buffer*-а и дестиловане воде у односу 1:10), обојене одговарајућим бојама и инкубиране у мраку у периоду од 15 минута. Након инкубације у сваку епрувету је додато по 400  $\mu\text{l}$  *binding*

*buffer*-а и проценат апоптотичних *HeLa* и *HCT-116* ћелија је анализиран употребом проточног цитометра *Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA)*.

### **3.5. Проточна цитометрија – анализа регулаторних протеина апоптозе**

У циљу утврђивања апоптотског сигналног пута одређивана је експресија регулаторних протеина апоптозе, *Bcl-2*, *Bax*-а и активне каспазе-3 након 24 часовног третмана *HeLa* и *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама седам аналога халкона.

Након инкубације, ћелије су испране 3 пута хладним *PBS*-ом, а потом фиксиране и пермеабилзоване коришћењем фиксационог и пермеабилзационог комплета (*Fixation and Permeabilization Kit, eBioscience, 88-824-00*).

Након пермеабилзације ћелије су инкубиране примарним антителима у периоду од 20 минута у разблажењу 1:500 (антитело разблажено у *PBS*-у): антитело за *Bcl-2 (anti-Bcl-2)*, антитело за каспазу-3 (*anti-caspase-3*) и антитело за активни *Bax (anti-Bax)*. Након инкубације, додат је *PBS*, а након центрифугирања и одливања супернатанта ћелије су ресуспендоване у 100  $\mu$ l *PBS*-а. Након овога, ћелије су инкубиране секундарним антителом *Alexa 488 (11001, Invitrogen, USA)* у разблажењу 1:1000, у периоду од 15 минута у мраку. Након инкубације и поновног испирања *PBS*-ом, центрифугирања и одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 300  $\mu$ l *PBS*-а и анализирани на проточном цитометру (*flow*). Експресија *Bcl-2*, *Bax*-а и активне каспазе-3 анализирана је коришћењем софтвера за проточну цитометрију (*Flowing Software 2*). Интензитет флуоресценције (*IF*) ћелија за регулаторне апоптотске протеине израчунат је у односу на интензитет флуоресценције изотипске контроле.

### **3.6. Флуоресцентна микроскопија – одређивање експресије регулаторних протеина апоптозе**

У циљу потврде механизма апоптозе методом флуоресцентне микроскопије утврђена је експресија и локализација кључних протеина апоптозе након 24 часовног третмана *HeLa* и *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама три структурно различита аналога халкона **X1**, **X5** и **X7**.

За одређивање експресије регулаторних апоптотских протеина методом флуоресцентне микроскопије коришћене су стаклене љуспице (*coverslips*) као подлога за ћелије.

Пре засејавања ћелија стаклене љуспице су стерилисане 80%-тним етанолом и осушене над пламеном. Потом су стерилисане стаклене љуспице пренете у плоче са 24 бунара. Након трипсинизације и бројања, ћелије су засејане на стаклене љуспице при чему је на сваку љуспицу засејано  $1 \times 10^5$  ћелија. Након култивације ћелија испитиваним супстанцама у периоду од 24 часова љуспице са ћелијама су испране 2 пута хладним *PBS*-ом и фиксиране 4%-тним формалдехидом у периоду од 30 минута.

Након фиксације, ћелије су опране 3 пута у *PBS*-у и пермеабелизоване 0,2%-тним раствором *Tween 20* (*Sigma-Aldrich*, P1379). Након пермеабелизације ћелија и испирања *PBS*-ом ћелије су током 10 минута блокиране пуфером (*blocking buffer*) који садржи 0,1% *Tween 20* и 10% *FBS*-а у *PBS*-у. Након инкубације ћелија и уклањања *blocking buffer*-а, ћелије су инкубиране током 1 часа примарним антителима за *Bcl-2*, каспазу-3, активни *Bax* и  $\beta$ -актин (#076, K4840; *Sigma Aldrich; Germany*) у разблажењу 1:100 (антитело разблажено у *blocking buffer*-у). Након инкубације, ћелије су опране 3 пута у *PBS*-у и инкубиране током 30 минута у мраку секундарним антителима Alexa 488 и Alexa 594 (поклон др Љупке Иванишевић, *Canada, Ottawa*) у разблажењу 1:200.

Након инкубације ћелија секундарним антителима, љуспице са ћелијама су опране 3 пута у *PBS*-у, 3 пута у дупло дестилованој води. Након испирања, стаклене љуспице су залепљене глицеролом на покровна стакла на страни на којој су ћелије биле залепљене за подлогу и посматране на микроскопу марке *Olympus*, модел *BX51* под увеличањем 400 $\times$  и 1000 $\times$ . Интензитет флуоресценције мерен је помоћу *ImageJ* софтвера.

### 3.7. Статистичка анализа података

Подаци су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (*SD*) за три поновљена појединачна експеримента. Статистичка обрада података анализирана је употребом програмског пакета *SPSS* (верзија 20), где су подаци који су пратили нормалну расподелу анализирани помоћу *Student*-овог *t*-теста, док су подаци који нису пратили нормалну расподелу анализирани помоћу *Kruskal-Wallis*-овог теста. За обраду података суме рангова коришћен је непараметријски *Mann-Whitney*-јев тест.

Статистички значајним резултатима су се сматрали они резултати чија је р вредност била мања или једнака вредношћу 0,05.

## 4. Резултати

### 4.1. Аналоги халкона испољавају ефикасан цитотоксични ефекат на туморским ћелијама

Један од циљева ове студије био је испитивање цитотоксичних ефеката седам аналога халкона (**X1-X7**) на три врсте туморских ћелија хуманог порекла (*HeLa* – ћелијска линија аденокарцинома цервикса, *HCT-116* – ћелијска линија карцинома колоне, *MDA-MB-231* – ћелијска линија аденокарцинома дојке), и на контролне ћелије које су биле здраве ћелије хуманих фибробласта плућа (*MRC-5*).

У циљу испитивања и упоређивања цитотоксичног ефекта аналога халкона на туморске ћелије, у студији су се као контролне супстанце користиле цисплатина (**cisPt**) и дехидрозингерон (**ДХЗ**) чији су цитотоксични ефекти на туморским ћелијама описани у многобројним студијама (одељак – Увод).

Цитотоксични ефекти испитиваних супстанци анализирани су методом МТТ теста вијабилности ћелија који се заснива на редукцији жутог тетразолијум бромида до љубичастог формазана у метаболички активним ћелијама. Након 24 и 48 часовног третмана различитим концентрацијама аналога халкона, цисплатине и дехидрозингерона МТТ тестом одређен је проценат (%) вијабилних туморских и здравих (контролних) ћелија. Након одређивања вијабилности ћелија, израчунат је цитотоксични ефекат испитиваних супстанци на ћелије коришћењем формуле: цитотоксичност (%) = 100 - % вијабилних ћелија.

#### 4.1.1. Утврђивање цитотоксичних ефеката аналога халкона, цисплатине и дехидрозингерона на три различите врсте туморских ћелија *HeLa*, *HCT-116* и *MDA-MB-231*

Испитивани халкон (E)-1-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X1**) представља први халкон у серији испитиваних аналога халкона који је синтетисан *de novo* од ванилина као полазног једињења. Услед тога, халкон **X1** представља први халкон овог истраживања чији је испитиван цитотоксични ефекат на три различите врсте туморских ћелија (*HeLa*, *HCT-116* и *MDA-MB-231*), као и ефекат на хумане фибробласте плућа (*MRC-5*).

Резултати овог истраживања показали су да аналог халкона **X1** испољава статистички значајан дозно и временски зависан цитотоксични ефекат на *HeLa* и *HCT-116* ћелије.

Након 24 и 48 часовног третмана халкон **X1**, у свим испитиваним концентрацијама (0,3, 1, 3, 10, 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$ ), испољавао је статистички значајан цитотоксични ефекат на *HeLa* и *HCT-116* ћелије ( $p \leq 0,05$ ), при чему није показао статистички значајан цитотоксични ефекат на контролне тј. здраве *MRC-5* ћелије у испитиваним временским интервалима ( $p > 0,05$ ) (Слика 14).

Повећање цитотоксичног ефеката аналога халкона на *HeLa* и *HCT-116* ћелије било је у директној корелацији са повећањем концентрације.

Након 24 и 48 часова инкубације *MDA-MB-231* ћелије показале су резистентност на различите концентрације **X1** у поређењу са *HeLa* и *HCT-116* ћелијама. Халкон **X1** је тек при концентрацијама од 100 и 300  $\mu\text{M}$  испољавао статистички значајан цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије ( $p \leq 0,05$ ).

После 24 часовног третмана *HeLa* ћелија различитим концентрацијама халкона **X1** од 0,3 до 30  $\mu\text{M}$ , цитотоксичност је износила од 21,66 до 65,39% у односу на контролне, нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 14А). Након 24 часовног третмана концентрацијама **X1** од 100 и 300  $\mu\text{M}$  на *HeLa* ћелије цитотоксичност је износила преко 80% (за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  цитотоксичност је износила 80,47%, и за концентрацију од 300  $\mu\text{M}$  цитотоксичност износила је 89,64%) у односу на контролне, нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 14А).

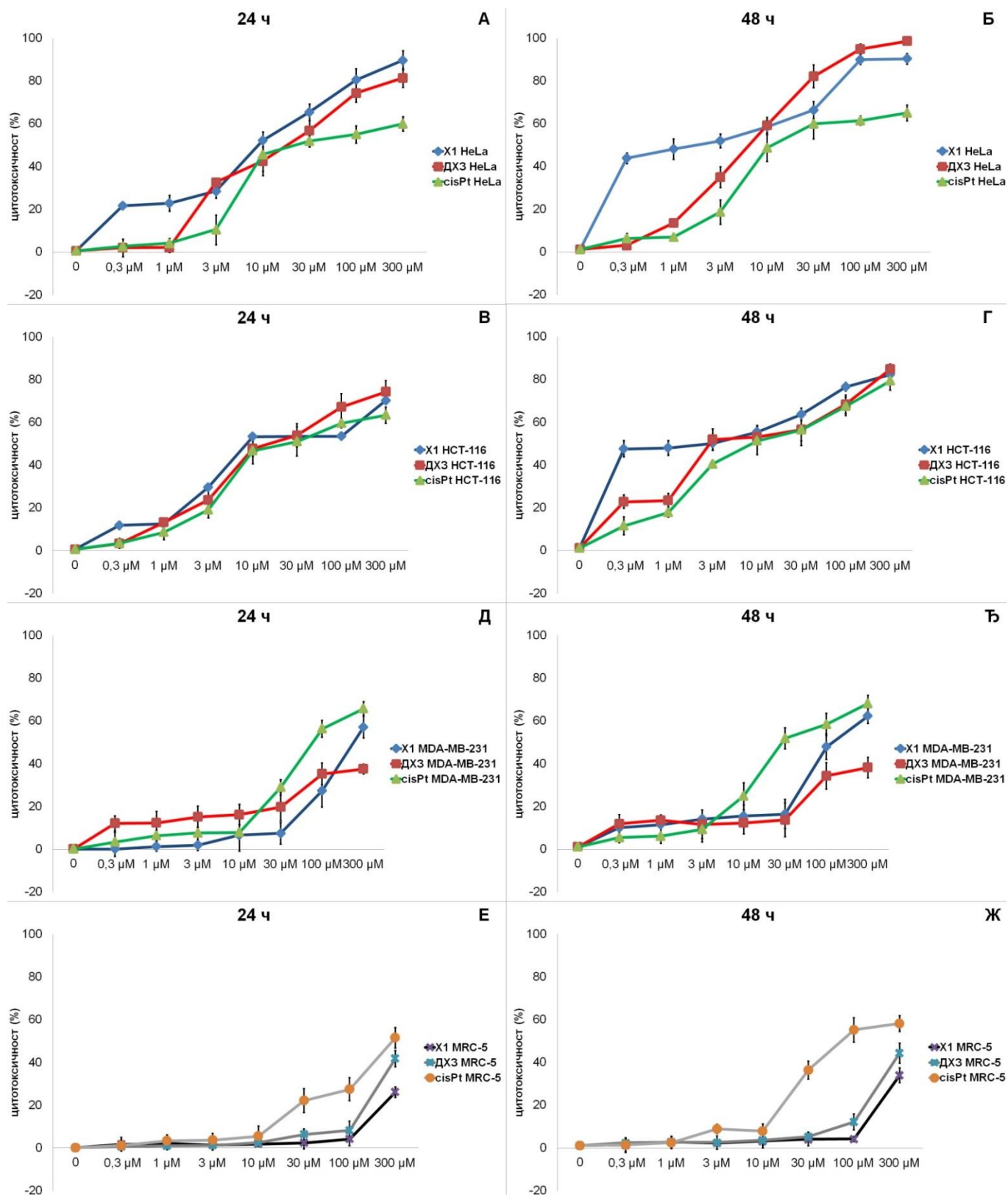
Након 48 часовне инкубације *HeLa* ћелија аналогом халкона **X1** цитотоксични ефекат кретао се од 43,79 до 90,32% (за 0,3  $\mu\text{M}$  = 43,79%; за 1  $\mu\text{M}$  = 48,10; за 3  $\mu\text{M}$  = 51,95%; за 10  $\mu\text{M}$  = 58,49%; за 30  $\mu\text{M}$  = 66,36%; за 100  $\mu\text{M}$  = 89,92%; и за 300  $\mu\text{M}$  = 90,32%) (Слика 14Б).

Након 24 часовне култивације *HCT-116* ћелија концентрацијама халкона **X1** од 0,3 и 1  $\mu\text{M}$ , цитотоксични ефекат није показао статистичку значајаност ( $p > 0,05$ ) (за 0,3  $\mu\text{M}$  – 11,77%, и 1  $\mu\text{M}$  – 12,51%) (Слика 14В). Међутим, након 24 часовне култивације

*HCT-116* ћелија концентрацијама халкона **X1** (3, 10, 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$ ), цитотоксични ефекат био је статистички значајан у односу на контролне, нетретиране *HCT-116* ћелије ( $p \leq 0,05$ ) (за 3  $\mu\text{M}$  – 29,67%, 10  $\mu\text{M}$  – 53,34%, 30  $\mu\text{M}$  – 53,37%, 100  $\mu\text{M}$  – 53,47% и 300  $\mu\text{M}$  – 70,27%).

Након 48 часовне инкубације *HCT-116* ћелија са **X1** цитотоксични ефекат био је статистички значајан у односу на контролне, нетретиране *HCT-116* ћелије (цитотоксичност се кретала у опсегу од 47,55% до 82,29%,  $p \leq 0,05$ ) (Слика 14Г).

Након 24 и 48 часовног третмана *MDA-MB-231* ћелија концентрацијама **X1** у опсегу од 0,3 до 30  $\mu\text{M}$  није било статистички значајног повећања цитотоксичности у односу на контролне, нетретиране *MDA-MB-231* ћелије ( $p > 0,05$ ). Међутим, након третмана *MDA-MB-231* ћелија са концентрацијама **X1** од 100 и 300  $\mu\text{M}$ , цитотоксичност је била статистички значајна (за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  цитотоксичност је износила 27,39% након 24 часа и 48,00% након 48 часа третмана, док је за концентрацију од 300  $\mu\text{M}$  цитотоксичност била 57,12% након 24 часа и 62,29% након 48 часа третмана,  $p \leq 0,05$ ), што указује на то да не постоји временска зависност цитотоксичности **X1** на *MDA-MB-231* ћелије (Слика 14Д и Ђ).



Слика 14. Цитотоксични ефекти аналога халкона X1, cisPt и DX3 на HeLa, HCT-116, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелије након 24 и 48 часовног третмана.



Инкубација контролних здравих *MRC-5* ћелија са свим испитиваним концентрацијама аналога халкона **X1** није довела до статистички значајног повећања цитотоксичности током испитиваних периода инкубације ( $p > 0,05$ ) (Слика 14Е и Ж).

Након испитивања цитотоксичног ефекта аналога халкона (**X1**) на три различите врсте туморских ћелија, следећи корак студије био је испитивање цитотоксичних ефеката осталих аналога халкона у серији једињења: (Е)-1-(3,4-диметоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X2**), (Е)-1-(4-етокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X3**), (Е)-1-(4-изопропокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X4**), (Е)-1-(3-метокси-4-пропоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X5**), (Е)-1-(4-бутокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X6**), (Е)-1-(4-(бензилокси)-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он (**X7**), на три различите врсте туморских ћелија *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231*, док су као контролне ћелије коришћени здрави хумани фибробласти (*MRC-5*) (Слике 15-20).

Испитивани халкони **X2-X7** испољавали су сличан цитотоксични ефекат на три различите врсте туморских ћелија као и халкон **X1**.

Сви испитивани аналози халкона (**X2-X7**) показали су ефикасне цитотоксичне ефекте на *HeLa* и *HCT-116* ћелије након 24 и 48 часова инкубације. Најефикаснији цитотоксични ефекат сви испитивани аналози халкона испољавали су након 48 часовног третмана на *HeLa* ћелије, при чему се проценат цитотоксичности након третмана највишим концентрацијама испитиваних халкона (100 и 300  $\mu\text{M}$ ) кретао од 83,52 до 95,97% (за **X2** 100 $\mu\text{M}$  – 87,57% и 300 $\mu\text{M}$  – 92,71%; за **X3** 100 $\mu\text{M}$  – 83,52% и 300 $\mu\text{M}$  – 92,76%; за **X4** 100 $\mu\text{M}$  – 90,67% и 300 $\mu\text{M}$  – 95,97%; за **X5** 100 $\mu\text{M}$  – 90,68% и 300 $\mu\text{M}$  – 93,16%; за **X6** 100 $\mu\text{M}$  – 89,57% и 300 $\mu\text{M}$  – 91,81%; и за **X7** 100 $\mu\text{M}$  – 87,97% и 300 $\mu\text{M}$  – 90,42%).

После истог дозног и временског интервала проценат цитотоксичности аналога халкона (**X2-X7**) за *HCT-116* ћелије кретао се од 67,81 до 85,76% (за **X2** 100 $\mu\text{M}$  – 78,41% и 300 $\mu\text{M}$  – 85,20%; за **X3** 100 $\mu\text{M}$  – 73,84% и 300 $\mu\text{M}$  – 85,48%; за **X4** 100 $\mu\text{M}$  – 76,90% и 300 $\mu\text{M}$  – 85,40%; за **X5** 100 $\mu\text{M}$  – 70,44% и 300 $\mu\text{M}$  – 85,76%; за **X6** 100 $\mu\text{M}$  – 84,07% и 300 $\mu\text{M}$  – 84,90%; и за **X7** 100 $\mu\text{M}$  – 67,81% и 300 $\mu\text{M}$  – 74,85%).

Ипак, након 24 и 48 часова култивације *MDA-MB-231* ћелија различитим концентрацијама испитиваних супстанци (од 0,3 до 300  $\mu\text{M}$ ), примећено је да *MDA-MB-231* ћелије показују одређени степен резистентности на халконе, при чему је статистички значајно повећање цитотоксичности испитиваних супстанци било приметно при концентрацијама од 100 и 300  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0,05$ ).

После оба временска интервала инкубације здравих ћелија испитиваним супстанцама (X2-X7) у примењеним концентрацијама није било статистички значајног цитотоксичног ефекта,  $p > 0,05$ , у односу на нетретиране *MRC-5* ћелије (Слика 15-20).

Третмани *HeLa*, *HCT-116* и *MDA-MB-231* ћелија цисплатином (*cisPt*) у ниским концентрацијама током 24 часова нису довели до статистички значајног цитотоксичног ефекта у односу на одговарајуће контролне, нетретиране ћелије (Слика 14А, В и Д).

Након третмана *HeLa* ћелија концентрацијама цисплатине од 10 до 300  $\mu\text{M}$  током 24 часа, дошло је до статистички значајног повећања цитотоксичности ( $p \leq 0,05$ ) (од 10  $\mu\text{M}$  – 45,61%, 30  $\mu\text{M}$  – 51,77%, 100  $\mu\text{M}$  – 54,92 и 300  $\mu\text{M}$  – 59,93%) у односу на нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 14А). Такође, након 48 часовне инкубације *HeLa* ћелија концентрацијама цисплатине од 10, 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$  цитотоксичност је била статистички значајна (цитотоксичност се кретала у опсегу од 48,58 до 64,97%,  $p \leq 0,05$ ) у односу на нетретиране *HeLa* ћелије у истом временском интервалу (Слика 14Б).

Након 24 часовне инкубације *HCT-116* ћелија концентрацијама цисплатине од 10 до 300  $\mu\text{M}$  проценат цитотоксичности био је статистички значајан ( $p \leq 0,05$ ) (цитотоксичност се кретала у опсегу од 46,76 до 63,39%) у односу на нетретиране *HCT-116* ћелије (Слика 14В). Међутим, након 48 часовне инкубације *HCT-116* ћелија цисплатином у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , цисплатина је испољила статистички значајан цитотоксични ефекат (40,47%) у односу на контролне ћелије ( $p \leq 0,05$ ). Такође, после 48 часова третмана *HCT-116* ћелија концентрацијама цисплатине (од 10 до 300  $\mu\text{M}$ ) цитотоксичност се кретала у опсегу од 51,30 до 79,32% у односу на контролу (Слика 14Г).

Третман *MDA-MB-231* ћелија цисплатином у концентрацијама од 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$  током 24 часова резутовао је статистички значајним цитотоксичним ефекатом ( $p \leq 0,05$ ) (30  $\mu\text{M}$  – 28,94%, 100  $\mu\text{M}$  – 56,32% и 300  $\mu\text{M}$  – 65,78%) у односу на нетретиране, контролне *MDA-MB-231* ћелије (Слика 14Д). Такође, након 48 часовног третмана *MDA-MB-231* ћелија ниским концентрацијама цисплатине није дошло до статистички значајног цитотоксичног ефекта ( $p > 0,05$ ), док при концентрацијама цисплатине (у опсегу од 10 до 300  $\mu\text{M}$ ) цитотоксичност је била статистички значајна у односу на нетретиране, контролне *MDA-MB-231* ћелије ( $p > 0,05$ ) и кретала се у опсегу од 24,85 до 68,13  $\mu\text{M}$  (Слика 14Ђ).

Након 24 и 48 часовне инкубације здравих ћелија ниским концентрацијама цисплатине цитотоксичност није била статистички значајна ( $p > 0,05$ ). Међутим, инкубација *MRC-5* ћелија концентрацијама цисплатине од 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$  довела је

до статистички значајног повећања цитотоксичности (за 30  $\mu\text{M}$  – 22,11% након 24 часа и 36,41% након 48 часова; 100  $\mu\text{M}$  – 27,46% након 24 часа и 55,25% након 48 часова; и 300  $\mu\text{M}$  – 51,52% након 24 часа и 58,20% након 48 часова,  $p \leq 0,05$ ) у односу на нетретиране *MRC-5* ћелије (Слика 14Е и Ж).

На основу резултата анализираних МТТ тестом, сви халкони **X1-X7** испољавали су снажнији цитотоксични ефекат на ћелије цервикса у поређењу са цисплатином током оба временска интервала. Наиме, применом концентрације од 3-10  $\mu\text{M}$  халкона **X1-X7** током 24 часова на *HeLa* ћелије резултовало је повећање цитотоксичности преко 50%, док је исти ефекат након 24 часова цисплатина испољила тек при концентрацији од 10 до 30  $\mu\text{M}$ . Након 48 часовног третмана на *HeLa* ћелије повећање цитотоксичности од 50% халкони **X1-X7** узрокују већ при концентрацијама од 1-3  $\mu\text{M}$ , док је исти ефекат након поменутог третмана цисплатина узроковала тек при концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ . Међутим, током 24 и 48 часовних третмана на *HCT-116* ћелије сви испитивани аналози халкона **X1-X7** и цисплатина испољавају сличан цитотоксични ефекат при чему повећање цитотоксичности од 50% узрокују у концентрацијама од 3-10  $\mu\text{M}$ . Детаљније поређење халкона **X1-X7** у односу на цисплатину одређено је на основу израчунатих  $IC_{50}$  вредности и описано је у одељку 4.1.3.  $IC_{50}$  вредности референтних супстанци.

Следећа референтна супстанца чији је цитотоксични ефекат испитиван и упоређиван са ефектима халкона, био је дехидрозингерон (**ДХЗ**). Најпре је био испитиван цитотоксични ефекат дехидрозингерона (у концентрацијама од 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 и 300  $\mu\text{M}$ ) у периоду од 24 часа на *HeLa* ћелије.

Резултати су показали да третман *HeLa* ћелија концентрацијама дехидрозингерона од 10 до 300  $\mu\text{M}$  резултује повећањем цитотоксичности (за 10  $\mu\text{M}$  – 42,45%, 30  $\mu\text{M}$  – 56,72%, 100  $\mu\text{M}$  – 74,33% и 300  $\mu\text{M}$  – 81,36%) у односу на контролне, нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 14А). Такође, након третмана *HeLa* ћелија концентрацијама дехидрозингерона од 10 до 300  $\mu\text{M}$  у периоду од 48 часова цитотоксичност је износила од 59,25% до 98,57% у односу на нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 14Б). Међутим, 0,3 и 1  $\mu\text{M}$  концентрације дехидрозингерона нису испољиле статистички значајан цитотоксични ефекат на *HCT-116* ћелије током оба временска интервала.

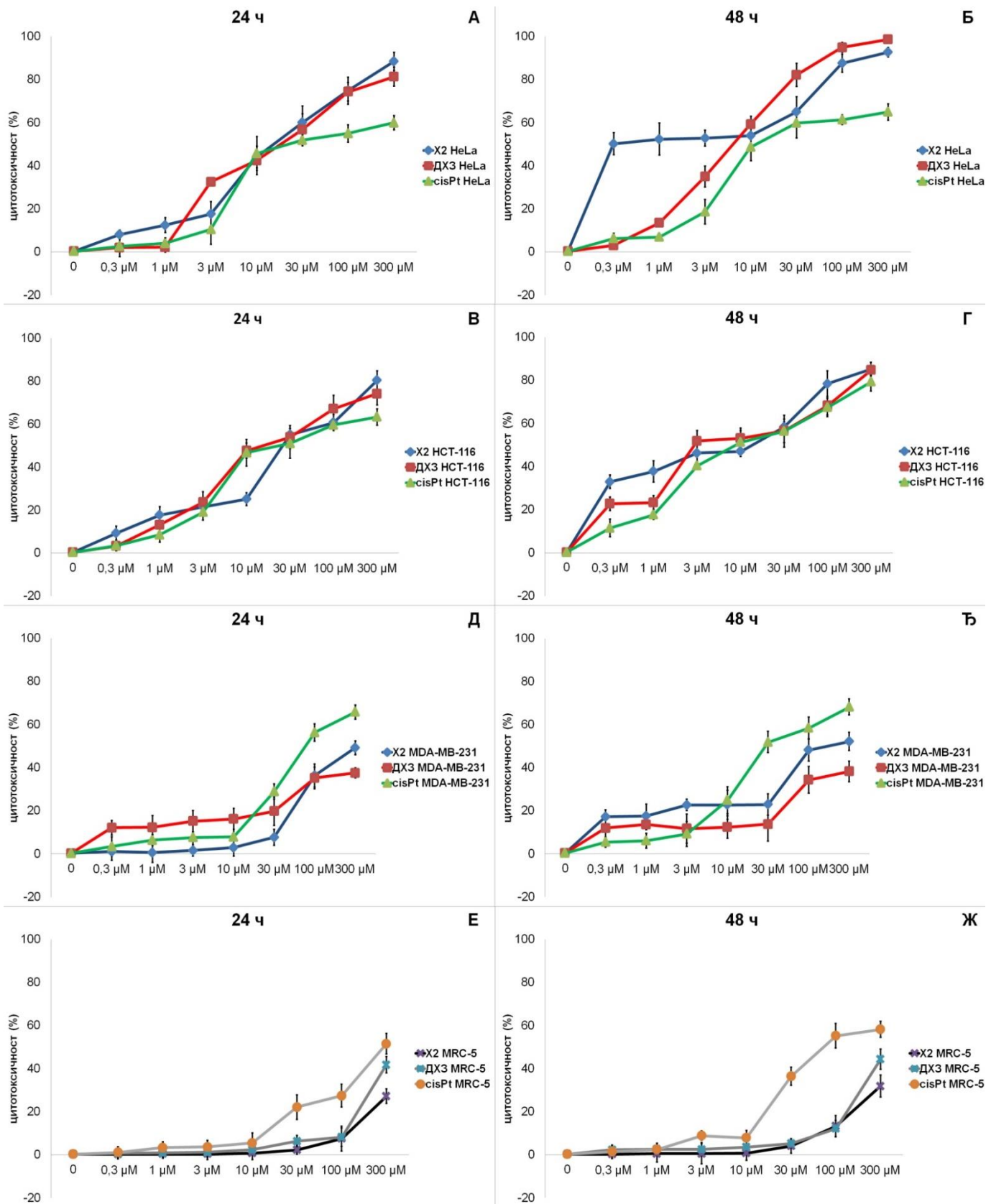
Пошто је испитивано дејство **ДХЗ** према *HeLa* ћелије, следећим експериментом испитиван је ефекат **ДХЗ** на *HCT-116* ћелије.

Након 24 и 48 часовне култивације *HCT-116* ћелија концентрацијама дехидрозингерона од 3 до 300  $\mu\text{M}$  цитотоксичност је била статистички значајна ( $p \leq 0,05$ ) (након 24 часовне инкубације ћелија цитотоксичност је била у опсегу од 23,67 до 74,28%, док је након 48 часовне инкубације ћелија цитотоксичност се кретала у опсегу од 51,89 до 84,73%) у односу на нетретиране *HCT-116* ћелије (Слика 14В и Г). Ипак, за разлику од 48 часовног третмана *ДХЗ*-а на *HeLa* ћелије, 0,3 и 1  $\mu\text{M}$  концентрације *ДХЗ*-а на *HCT-116* ћелије испољиле су статистички значајан цитотоксични ефекат ( $p \leq 0,05$ ).

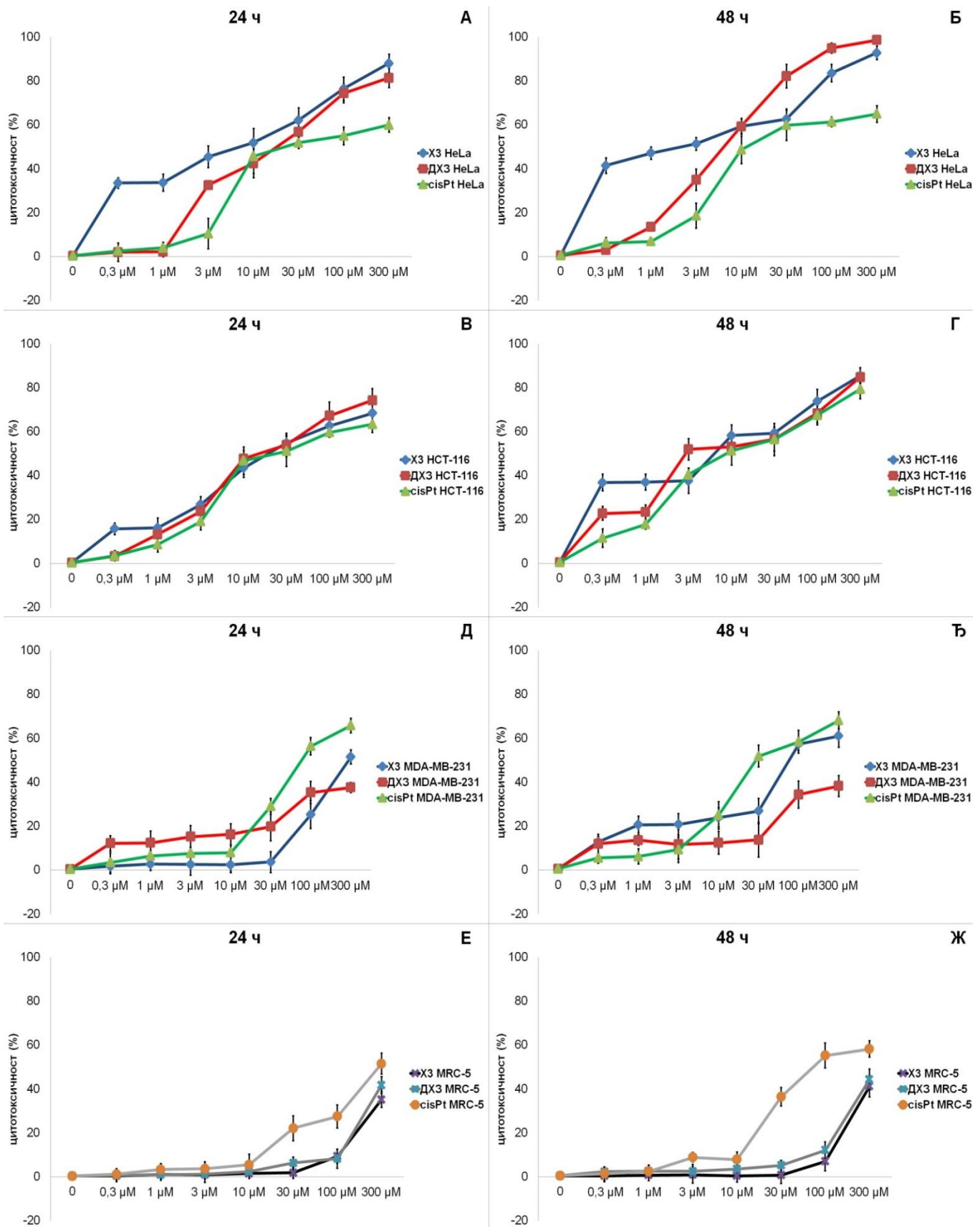
Након испитивања цитотоксичног ефекта *ДХЗ* на *HeLa* и *HCT-116* ћелије, наредном експериментом испитиван је његов цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије. Резултати овог експеримента су показали да *MDA-MB-231* ћелије показују резистентност у односу на различите концентрације дехидрозингерона у периоду инкубације од 24 и 48 часова (Слика 14Д и Ђ). Наиме, након инкубације *MDA-MB-231* ћелија концентрацијама дехидрозингерона од 0,3 до 30  $\mu\text{M}$  цитотоксичност није била статистички значајна у поређењу са контролним ћелијама. После 24 часова третмана *MDA-MB-231* ћелија 100  $\mu\text{M}$  концентрацијом дехидрозингерона цитотоксичност је била статистички значајна ( $p \leq 0,05$ ) и износила је 35,22%, а за 300  $\mu\text{M}$  износила је 37,56%, док након 48 часовне култивације *MDA-MB-231* ћелија 100  $\mu\text{M}$  концентрацијом дехидрозингерона цитотоксичност је износила 34,33%, а за 300  $\mu\text{M}$  – 38,21% (не постоји временска, већ само дозна зависност цитотоксичности дехидрозингерона на *MDA-MB-231* ћелије).

На основу резултата анализираних МТТ тестом, сви испитивани аналози халкона **X1-X7** испољавају ефикасније цитотоксичне ефекте на *HeLa* ћелије у односу на *ДХЗ*, док су цитотоксични ефекти **X1-X7** на остале туморске ћелије били слични са ефектом дехидрозингерона. Детаљније поређење цитотоксичног ефекта испитиваних халкона **X1-X7** у односу на дехидрозингерон одређено је на основу израчунатих  $IC_{50}$  концентрација и описано је у одељку 4.1.3.  $IC_{50}$  вредности референтних супстанци.

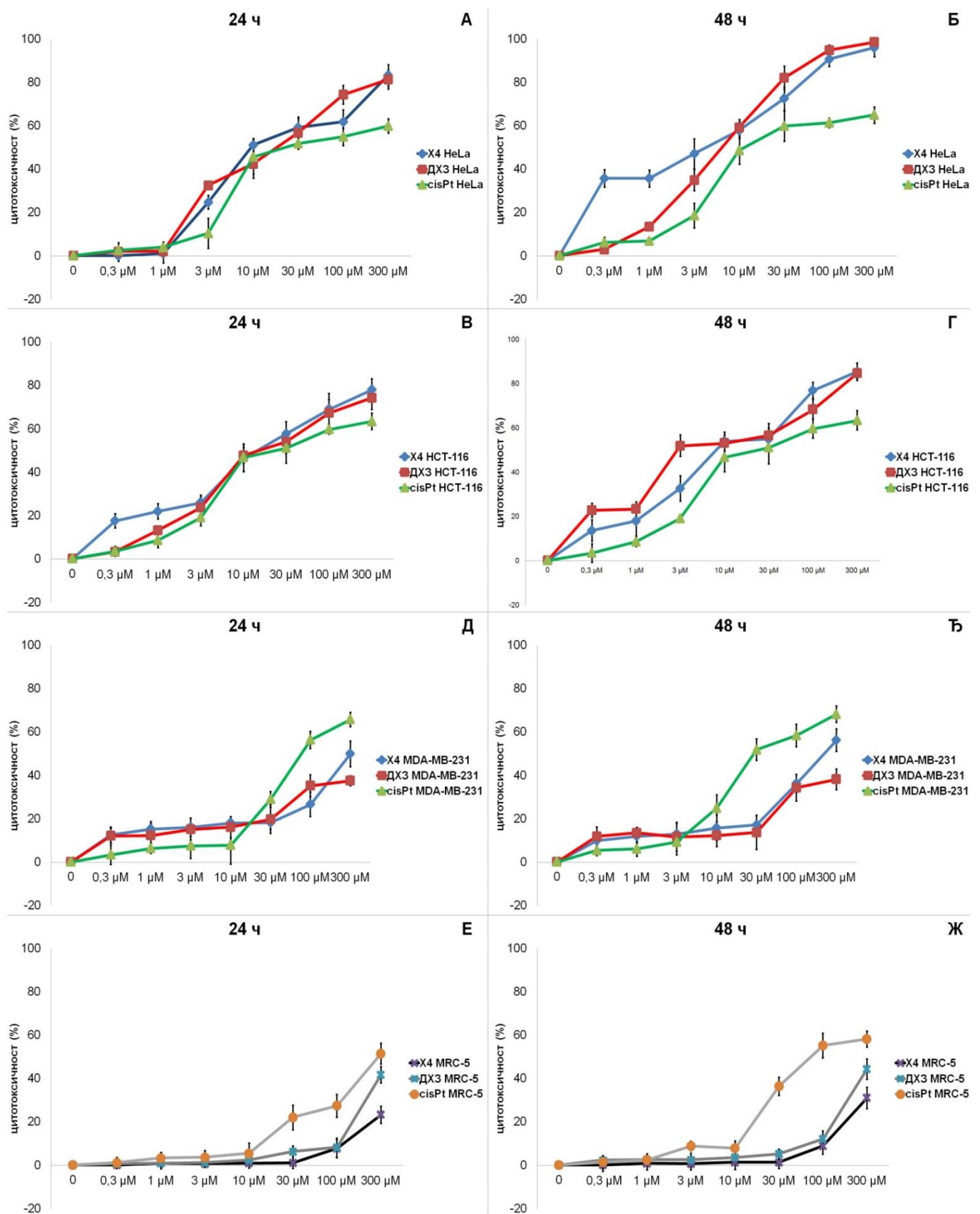
Инкубација *MRC-5* ћелија свим испитиваним концентрацијама дехидрозингерона није резултовала статистички значајним повећањем цитотоксичности у оба временска интервала ( $p > 0,05$ ), у односу на нетретиране *MRC-5* ћелије (Слика 14Е и Ж).



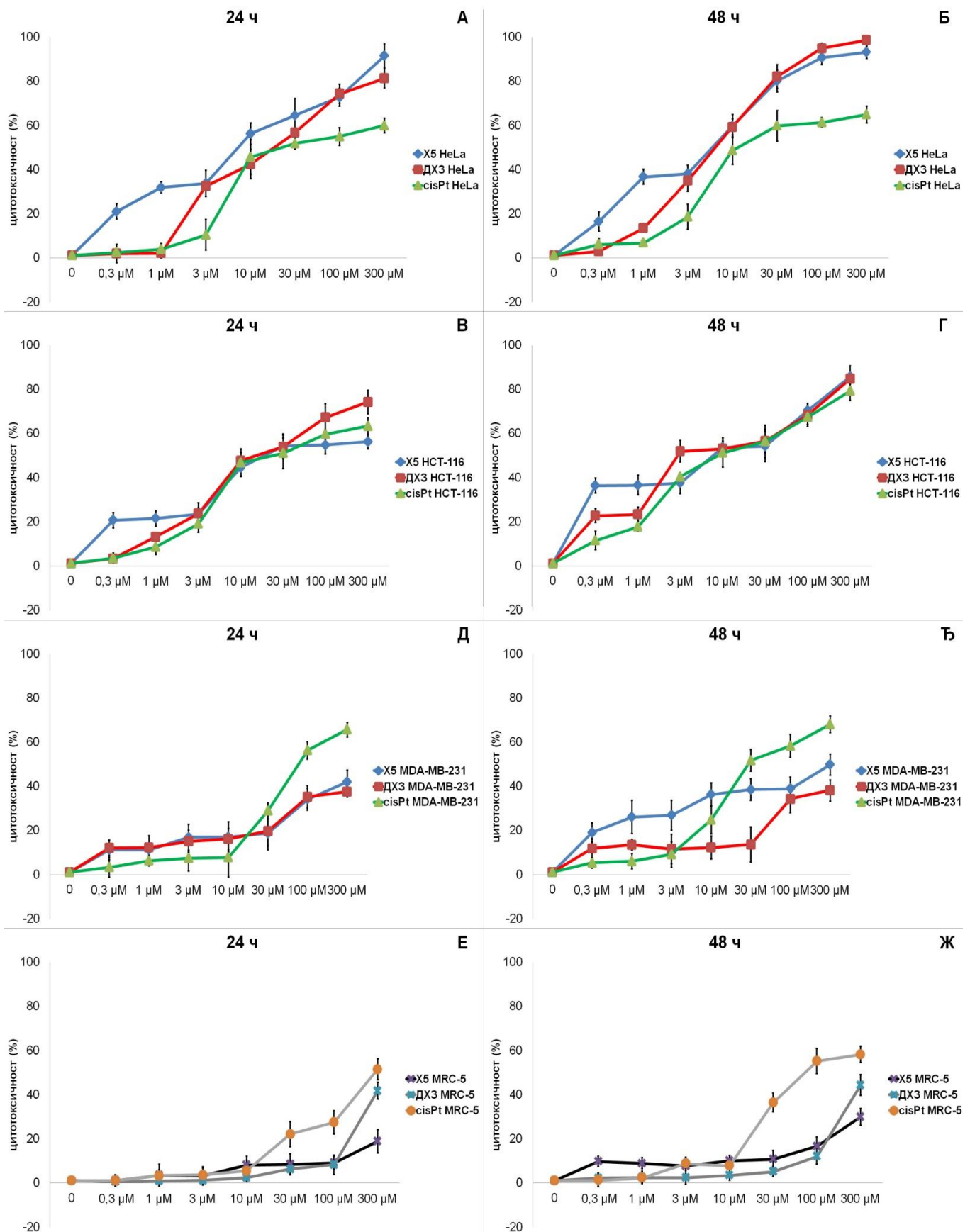
**Слика 15.** Цитотоксични ефекти X2, цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часовног третмана.



**Слика 16.** Цитотоксични ефекти аналога халкона **Х3**, цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часова третмана.

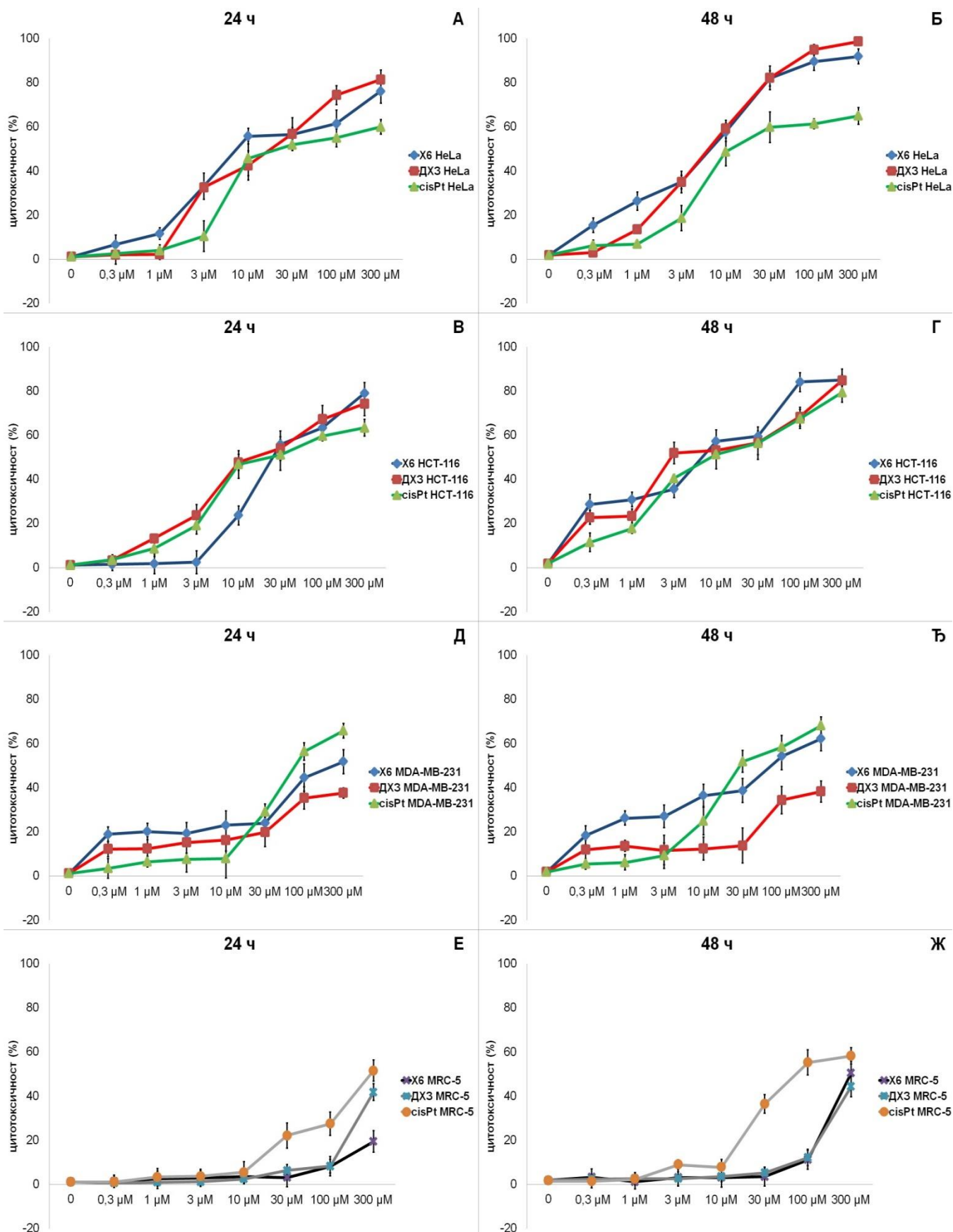


Слика 17. Цитотоксични ефекти X4, цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часовног третмана.

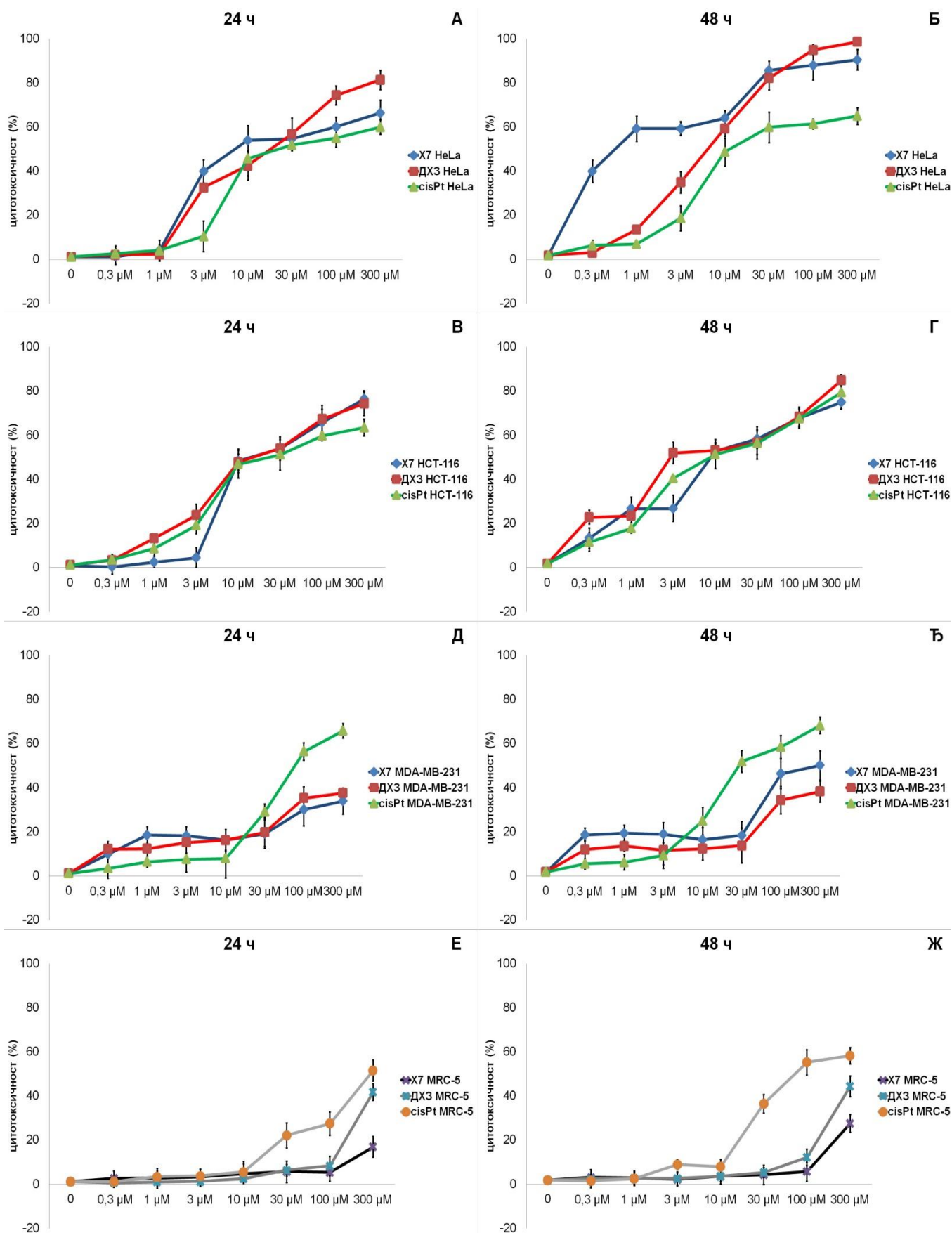


**Слика 18.** Цитотоксични ефекти X5, цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часовног третмана.





**Слика 19.** Цитотоксични ефекти цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часовног третмана.



Слика 20. Цитотоксични ефекти X7, цисплатине и дехидрозингерона на *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије након 24 и 48 часовног третмана.

#### 4.1.2. $IC_{50}$ вредности аналога халкона

Након испитивања цитотоксичних ефеката свих испитиваних супстанци, израчунате су њихове  $IC_{50}$  вредности.

У табели 1. приказане су израчунате  $IC_{50}$  вредности седам аналога халкона, цисплатине и дехидрозингерона за све испитиване ћелије.

Након 24 часовне инкубације *HeLa* ћелија са различитим концентрацијама **X1**, цисплатине и дехидрозингерона,  $IC_{50}$  вредности биле су у опсегу од 2,55 до 8,97  $\mu\text{M}$  ( $IC_{50}$  вредност за **X1** износила је  $8,97 \pm 1,45 \mu\text{M}$ , за **X2** -  $8,03 \pm 1,31 \mu\text{M}$ , за **X3** -  $2,55 \pm 1,23 \mu\text{M}$ , за **X4** -  $4,94 \pm 0,27 \mu\text{M}$ , за **X5** -  $4,11 \pm 1,46 \mu\text{M}$ , за **X6** -  $6,30 \pm 1,11 \mu\text{M}$  и за **X7** -  $6,18 \pm 1,72 \mu\text{M}$ ).

После третмана ћелија цервикса са аналозима халкона у периоду од 48 часова, израчунате  $IC_{50}$  вредности биле су у опсегу од 1,69 до 3,67  $\mu\text{M}$  ( $IC_{50}$  вредност за **X1** износила је  $3,67 \pm 1,17 \mu\text{M}$ , за **X2** -  $2,53 \pm 0,56 \mu\text{M}$ , за **X3** -  $3,64 \pm 0,86 \mu\text{M}$ , за **X4**  $2,96 \pm 0,66 \mu\text{M}$ , за **X5** -  $3,55 \pm 1,10 \mu\text{M}$ , за **X6** -  $3,51 \pm 1,25 \mu\text{M}$  и за **X7** -  $1,69 \pm 0,68 \mu\text{M}$ ) (Табела 1).

Следећим експериментом била је обухваћена *HCT-116* ћелијска линија.

Након 24 часовне култивације *HCT-116* ћелија различитим концентрацијама седам аналога халкона, израчунате  $IC_{50}$  вредности кретале су се у опсегу од 5,62 до 8,17 ( $IC_{50}$  вредност за **X1** износила је  $6,85 \pm 0,71 \mu\text{M}$ , за **X2** -  $7,57 \pm 1,24 \mu\text{M}$ , за **X3** -  $7,18 \pm 1,09$ , за **X4** -  $8,17 \pm 1,23 \mu\text{M}$ , **X5** -  $5,62 \pm 1,17 \mu\text{M}$ , **X6** -  $6,95 \pm 1,20$  и за **X7** -  $7,9 \pm 1,37 \mu\text{M}$ ). После третмана *HCT-116* ћелија са испитиваним супстанцама током 48 часова,  $IC_{50}$  вредности су износиле од 2,65 до 7,27  $\mu\text{M}$  ( $IC_{50}$  вредност за **X1** износила је  $2,65 \pm 0,87 \mu\text{M}$ , за **X2** -  $3,45 \pm 0,93 \mu\text{M}$ , за **X3** -  $4,12 \pm 0,95 \mu\text{M}$ , за **X4** -  $5,25 \pm 1,23 \mu\text{M}$ , за **X5** -  $5,09 \pm 0,87 \mu\text{M}$ , за **X6** -  $7,27 \pm 1,41 \mu\text{M}$ , за **X7** -  $6,76 \pm 0,92 \mu\text{M}$ ) (Табела 1).

Након оба временска интервала третмана *MDA-MB-231* ћелија различитим концентрацијама аналога халкона (0,3 – 300  $\mu\text{M}$ ), израчунате  $IC_{50}$  вредности нису биле статистички значајне ( $IC_{50}$  вредности су биле у опсегу од преко 100 до преко 300  $\mu\text{M}$ ,  $p > 0,05$ ).

Након израчунатих  $IC_{50}$  вредности свих аналога халкона на три различите врсте туморских ћелија након 24 и 48 часова третмана,  $IC_{50}$  вредности за *HeLa* ћелије биле су ниже у односу на  $IC_{50}$  вредности за *HCT-116* ћелије, док су  $IC_{50}$  вредности аналога

халкона за *MDA-MB-231* ћелије биле више у односу на  $IC_{50}$  вредности за *HeLa* и *HCT-116* ћелије (Табела 1).

После два временска интервала инкубације здравих ћелија свим концентрацијама аналога халкона,  $IC_{50}$  вредности нису биле статистички значајне ( $IC_{50}$  вредности су биле у опсегу од преко 200 до преко 300  $\mu\text{M}$ ,  $p > 0,05$ ) (Табела 1), односно биле су потребне високе концентрације аналога халкона како би био постигнут минимални цитотоксични ефекат на здравим фибробластима плућа (*MRC-5*).

#### 4.1.3. $IC_{50}$ вредности референтних супстанци

Након израчунатих  $IC_{50}$  вредности испитиваних супстанци за *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије, израчунате су  $IC_{50}$  вредности цисплатине и дехидрозингерона током два временска интервала у концентрацијама од 0,3 – 300  $\mu\text{M}$ .

Након 24 часовне инкубације *HeLa* ћелија са цисплатином и дехидрозингероном, израчунате  $IC_{50}$  вредности износиле су  $19,60 \pm 3,22 \mu\text{M}$  за цисплатину и  $9,61 \pm 2,16 \mu\text{M}$  за дехидрозингерон, док су након 48 часовног третмана  $IC_{50}$  вредности износиле  $9,70 \pm 1,40 \mu\text{M}$  за цисплатину и 5,41 за дехидрозингерон (Табела 1).

$IC_{50}$  вредности референтних супстанци за *HeLa* ћелије су биле више у односу на  $IC_{50}$  вредности аналога халкона, односно била је потребна виша  $IC_{50}$  вредност референтних супстанци у односу на аналоге халкона да би се постигао њихов цитотоксични ефекат.

Након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија различитим концентрацијама цисплатине и дехидрозингерона, израчунате  $IC_{50}$  вредности износиле су  $7,17 \pm 1,15 \mu\text{M}$  за цисплатину и  $5,71 \pm 0,66 \mu\text{M}$  за дехидрозингерон, док након истог третмана у периоду од 48 часова израчунате  $IC_{50}$  вредности износиле су  $4,82 \pm 1,45 \mu\text{M}$  за цисплатину и  $2,85 \pm 0,69 \mu\text{M}$  за дехидрозингерон (Табела 1).

Након 24 и 48 часова култивације *MDA-MB-231* ћелија различитим концентрацијама дехидрозингерона, израчунате  $IC_{50}$  вредности износиле су преко 300  $\mu\text{M}$  ( $IC_{50}$  вредности нису биле статистички значајне), док је након 24 часовног третмана цисплатине на *MDA-MB-231* ћелије, израчуната  $IC_{50}$  вредност износила  $93,56 \pm 11,43$

$\mu\text{M}$ , а након истог третмана у периоду од 48 часова,  $IC_{50}$  вредност за цисплатину износила је  $24,54 \pm 4,67 \mu\text{M}$  (Табела 1). На основу израчунатих  $IC_{50}$  вредности може се закључити да су *MDA-MB-231* ћелије високо резистентне на дејство дехидрозингерона, док су *MDA-MB-231* ћелије сензитивне на цисплатину, односно цисплатина испољава ефикаснији цитотоксични ефекат у односу на дехидрозингерон што се огледа у нижим  $IC_{50}$  вредностима за цисплатину.

После оба временска интервала инкубације здравих фибробласта различитим концентрацијама цисплатине и дехидрозингерона, израчунате  $IC_{50}$  вредности нису биле статистички значајне (за дехидрозингерон  $IC_{50}$  вредности износиле су преко  $300 \mu\text{M}$ , док је за цисплатину израчуната  $IC_{50}$  вредност била преко  $100 \mu\text{M}$  након краћег периода инкубације), осим дужег третмана *MRC-5* ћелија цисплатином, где је  $IC_{50}$  вредност износила  $44,25 \pm 14,72 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0,05$ ) (Табела 1). На основу израчунатих  $IC_{50}$  вредности референтних супстанци може се закључити да дехидрозингерон не делује цитотоксично на *MRC-5* ћелије, док цисплатина испољава цитотоксични ефекат током дужег временског третмана (током 48 часова).

$IC_{50}$	<i>HeLa</i>		<i>HCT-116</i>		<i>MDA-MB-231</i>		<i>MRC-5</i>	
	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч	24ч	48ч
X1	$8,97 \pm 1,45$	$3,67 \pm 1,17$	$6,85 \pm 0,71$	$2,65 \pm 0,87$	>200	$108,98 \pm 12,3$	> 300	> 300
X2	$8,03 \pm 1,31$	$2,53 \pm 0,56$	$7,57 \pm 1,24$	$3,45 \pm 0,93$	> 200	> 200	> 300	> 200
X3	$2,55 \pm 1,23$	$3,64 \pm 0,86$	$7,18 \pm 1,09$	$4,12 \pm 0,95$	> 200	$95,47 \pm 11,42$	> 300	> 200
X4	$4,94 \pm 0,27$	$2,96 \pm 0,66$	$8,17 \pm 1,23$	$5,25 \pm 1,23$	> 300	> 200	> 300	> 250
X5	$4,11 \pm 1,46$	$3,55 \pm 1,10$	$5,62 \pm 1,17$	$5,09 \pm 0,87$	> 300	> 300	> 300	> 200
X6	$6,30 \pm 1,11$	$3,51 \pm 1,25$	$6,95 \pm 1,20$	$7,27 \pm 1,41$	> 200	$88,72 \pm 9,35$	> 300	> 200
X7	$6,18 \pm 1,72$	$1,69 \pm 0,68$	$7,9 \pm 1,37$	$6,76 \pm 0,92$	> 300	> 200	> 300	> 200
цисплатина	$19,60 \pm 3,22$	$9,70 \pm 1,40$	$7,17 \pm 1,15$	$4,82 \pm 1,45$	$93,56 \pm 11,43$	$24,54 \pm 4,67$	>100	$44,25 \pm 14,72$
дехидрозингерон	$9,61 \pm 2,16$	$5,41 \pm 1,57$	$5,71 \pm 0,66$	$2,85 \pm 0,69$	> 300	> 300	> 300	> 200

**Табела 1.**  $IC_{50}$  вредности X1-X7, цисплатине и дехидрозингерона за *HeLa*, *HCT-116*, *MDA-MB-231* и *MRC-5* ћелије у периодима од 24 и 48 часова.

На основу израчунатих  $IC_{50}$  вредности током 24 часовног третмана свих испитиваних супстанци на *HeLa* ћелије,  $IC_{50}$  вредности испитиваних аналога халкона биле су ниже у односу на вредности референтних супстанци, односно цитотоксични ефекат аналога (X1-X7) након поменутог третмана био је ефикаснији у односу на ефекат референтних супстанци (*ДХЗ* и *cisPt*).

С тим у вези, након поменутог третмана халкон **X3** испољио је најефикаснији цитотоксични ефекат са  $IC_{50}$  вредношћу од 2,55  $\mu\text{M}$ . Међутим, након 48 часовног третмана свих испитиваних супстанци на *HeLa* ћелије  $IC_{50}$  вредности испитиваних аналога халкона биле су ниже у односу на вредност *cisPt*,  $IC_{50}$  вредност *ДХЗ*-а била је слична као вредности испитиваних халкона, док је најефикаснији цитотоксични ефекат испољио халкон **X7** са  $IC_{50}$  вредношћу од 2,53  $\mu\text{M}$ .

Након израчунатих  $IC_{50}$  вредности током 24 часовног третмана свих испитиваних супстанци на *HCT-116* ћелије,  $IC_{50}$  вредности аналога халкона биле су сличне као вредности референтних супстанци, при чему је **X5** испољио најефикаснији цитотоксични ефекат са  $IC_{50}$  вредношћу од 5,62  $\mu\text{M}$ . Такође, након истог третмана током 48 часова, израчунате  $IC_{50}$  вредности свих испитиваних супстанци биле су сличне, при чему је X1 испољио најефикаснији цитотоксични ефекат са  $IC_{50}$  вредношћу од 2,65  $\mu\text{M}$ .

Израчунате  $IC_{50}$  вредности након оба временска периода свих испитиваних супстанци на *MDA-MB-231* ћелије најефикаснији цитотоксични ефекат испољила је *cisPt* са  $IC_{50}$  вредношћу од 24,54  $\mu\text{M}$  током 48 часова, док су  $IC_{50}$  вредности осталих испитиваних супстанци износиле преко 80, 100, 200 и 300  $\mu\text{M}$ .

Међутим, током 24 и 48 часова третмана испитиваних халкона (**X2-X7**), *cisPt* и *ДХЗ*-а на здраве контролне *MRC-5* ћелије, аналози халкона и дехидрозингерон показали су високу селективност са  $IC_{50}$  вредностима преко 100, 200 и 300  $\mu\text{M}$ , док је цисплатина испољила цитотоксичност са  $IC_{50}$  вредношћу од 44,25  $\mu\text{M}$ .

На основу ових резултата МТТ теста цитотоксичности може се закључити да аналози халкона испољавају ефикаснији цитотоксични ефекат на две различите врсте туморских ћелија *HeLa* и *HCT-116* у односу на цисплатину и дехидрозингерон са већом селективношћу према здравим контролним *MRC-5* ћелијама у односу на цисплатину.

## **4.2. Аналози халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу *HeLa* и *HCT-116* ћелија**

С обзиром на то да су резултати МТТ теста и израчунате  $IC_{50}$  вредности показали да све испитиване супстанце испољавају значајан цитотоксични ефекат на (*HeLa*) и (*HCT-116*), следећи циљ овог истраживања био је одређивање типа ћелијске смрти (апоптоза и/или некроза и/или аутофагија), односно испитивање који тип ћелијске смрти у највећој мери доприноси цитотоксичности испитиваних аналога халкона.

Након 48 часовног третмана *HeLa* и *HCT-116* ћелија са  $IC_{50}$  вредностима аналога халкона анализиран је проценат апоптотичних ћелија употребом методе проточне цитометрије (*Flow*) коришћењем боја *Annexin V-FITC* и 7-аминоактиномицин-*D* (*7-AAD*).

#### **4.2.1. Аналози халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу *HeLa* ћелија**

Третман *HeLa* ћелија у периоду од 48 часова са  $IC_{50}$  вредностима свих испитиваних аналога халкона (**X1-X7**) показао је значајно повећање процента апоптотичних ћелија у односу на контролне, нетретиране *HeLa* ћелије (Слика 21А и Б).

У нетретираним *HeLa* ћелијама проценат вијабилних ћелија износио је 92,28%, проценат апоптотичних ћелија 6,19% и проценат некротичних ћелија 1,53%. Након третмана *HeLa* ћелија са  $IC_{50}$  вредношћу **X1** (3,67  $\mu$ M) укупан проценат апоптотичних ћелија износио је 40,85%, (рана апоптоза – 37,30% и касна апоптоза – 3,55% ћелија). Процент некротичних ћелија није био статистички значајан и износио је 0,74% ( $p > 0,05$ ).

Такође, 48-часовни третман  $IC_{50}$  концентрацијама осталих аналога халкона **X2-X7** (2,53  $\mu$ M концентрација за **X2**, 3,64  $\mu$ M за **X3**, 2,96  $\mu$ M за **X4**, 3,5  $\mu$ M за **X5**, 3,5  $\mu$ M за **X6** и 1,69  $\mu$ M за **X7**) на *HeLa* ћелије резултовао је статистички значајним повећањем процента апоптотичних ћелија у поређењу са контролним ћелијама које нису биле третиране.

За аналог халкона **X2** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 40,46% (рана апоптоза – 37,07% и касна апоптоза – 3,39%) уз незнатан проценат некротичних ћелија од 0,65%.

За аналог халкона **X3** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 37,16% (рана апоптоза – 33,41% и касна апоптоза – 3,75%), док је проценат некротичних ћелија био незнатан (0,86%).

За аналог халкона **X4** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 51,56% (ране апоптозе – 45,49% и касне апоптозе – 6,07%) уз незнатан проценат некротичних ћелија (1,04%).

За аналог халкона **X5** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 43,29% (ране апоптозе – 40,48% и касне апоптозе – 2,81% у стадијуму), док је проценат некротичних ћелија био незнатан и износио је 0,69%.

За аналог халкона **X6** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 44,56% (рана апоптоза – 41,47% и касне апоптозе – 3,09%) уз занемарљив проценат некротичних ћелија који је износио 0,88%.

За аналог халкона **X7** проценат апоптотичних *HeLa* ћелија износио је 42,10% (ране апоптозе – 39,17% и касне апоптозе – 2,93%) уз занемарљив проценат некротичних ћелија који је износио 0,75% (Слика 21).

Инкубација *HeLa* ћелија са  $IC_{50}$  вредностима цисплатине и дехидрозингерона (за цисплатину 9,7  $\mu\text{M}$  и за дехидрозингерон 2,41  $\mu\text{M}$ ) резултовала је повећањем процента апоптотичних ћелија у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама (Слика 21).

Након третмана *HeLa* ћелија цисплатином, проценат апоптотичних ћелија износио је 41,9%, од чега је 37,98% ћелија било у стадијуму ране апоптозе, 3,92% у стадијуму касне апоптозе, док је проценат некротичних ћелија био незнатан и износио је 0,62%.

Након третмана *HeLa* ћелија дехидрозингероном проценат апоптотичних ћелија износио је 45,79 (ране апоптозе – 41,69% и касне апоптозе – 4,10%), уз незнатан проценат некротичних ћелија од 0,66%.

На основу резултата теста апоптотичности, након третмана *HeLa* ћелија са  $IC_{50}$  вредностима **X1-X7** и референтних супстанци проценат апоптотичних ћелија за **X1** се увећао за 6,6 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2 пута и проценат вијабилних ћелија се смањило за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X2** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6,5 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2,4 пута и проценат вијабилних ћелија се смањило за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X3** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 1,8 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,5 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X4** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 8,3 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 1,5 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,9 пута у односу на нетретиране ћелије;



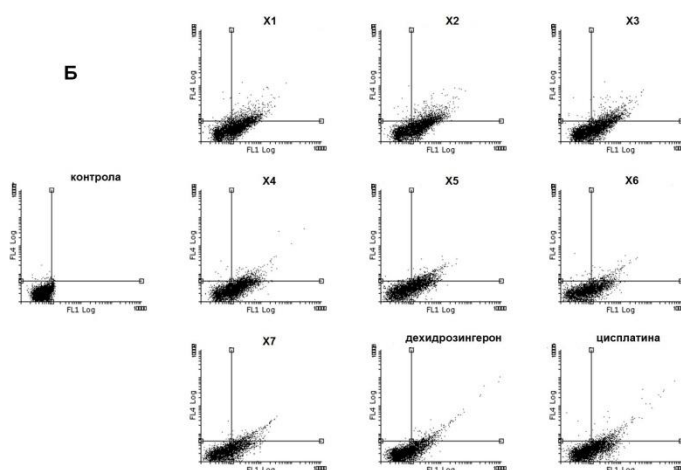
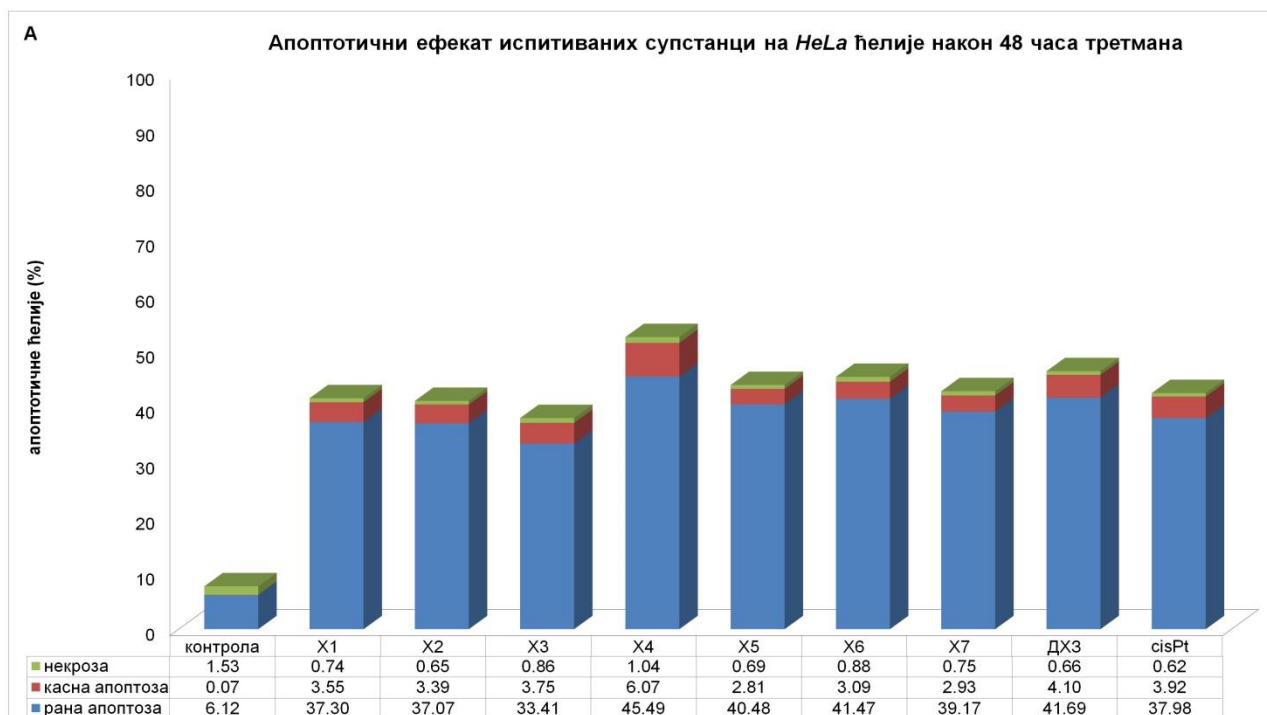
За **X5** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 7 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2,2 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X6** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 7 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 1,7 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,7 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X7** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6,8 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије;

За дехидрозингерон проценат апоптотичних ћелија увећао се за 7,4 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2,3 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,7 пута у односу на нетретиране ћелије;

За цисплатину проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6,8 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2,5 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије.



**Слика 21.** Апоптотични ефекти аналога халкона **X1-X7**, дехидрозингерона и цисплатине на *HeLa* ћелије након 48 часовног третмана са  $IC_{50}$  вредностима испитиваних супстанци. **А.** Резиме података о проценту апоптотичних ћелија након третмана *HeLa* ћелије испитиваним супстанцама у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама. **Б.** Вијабилне ћелије налазе се у доњем левом пољу *dot plot*-а, некротичне ћелије у горњем левом пољу, ћелије у стадијуму ране апоптозе у доњем десном пољу, и ћелије у стадијуму касне апоптозе у горњем десном пољу. Подаци су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка из три независна експеримента.

На основу добијених резултата теста апоптотичности најефикаснији апоптотични ефекат на *HeLa* ћелије показао је халкон **X4** у односу на остале испитиване аналоге халкона и референтне супстанце.

#### **4.2.2. Аналоги халкона, цисплатина и дехидрозингерон индукују апоптозу *HCT-116* ћелија**

Култивација *HCT-116* ћелија испитиваним супстанцама ( $IC_{50}$  вредности) резултовала је повећањем процента апоптотичних ћелија у односу на нетретиране *HCT-116* ћелије (Слика 22 А и Б). У контролним, нетретираним ћелијама, 95,08% од укупног броја ћелија било је вијабилно, 4,47% било је апоптотично (од тога, рана апоптоза – 4,29% и касна апоптоза – 0,18% ћелија), док проценат некротичних ћелија није био статистички значајан и износио је 0,45%.

Инкубација *HCT-116* ћелија са  $IC_{50}$  вредностима испитиваних аналога халкона (концентрација од 2,65  $\mu\text{M}$  за **X1**, 3,45  $\mu\text{M}$  за **X2**, 4,12  $\mu\text{M}$  за **X3**, 5,25  $\mu\text{M}$  за **X4**, 5,09  $\mu\text{M}$  за **X5**, 7,27  $\mu\text{M}$  за **X6** и 6,76  $\mu\text{M}$  за **X7**) резултовала је статистички значајним повећањем процента апоптотичних ћелија у односу на нетретиране ћелије ( $p \leq 0,05$ ). За аналог халкона **X1** проценат апоптотичних ћелија износио је 60,08% (рана апоптоза – 45,38% и касна апоптоза – 14,70% ћелија).

За аналог халкона **X2** проценат апоптотичних ћелија износио је 62,67% (рана апоптоза – 47,74% и касна апоптоза – 14,93% ћелија).

За аналог халкона **X3** проценат апоптотичних ћелија износио је 52,11% (рана апоптоза – 39,49% и касна апоптоза – 12,62% ћелија).

За аналог халкона **X4** проценат апоптотичних ћелија износио је 57,44% (рана апоптоза – 49,62% и касна апоптоза – 7,82% ћелија).

За аналог халкона **X5** проценат апоптотичних ћелија износио је 35,2% (рана апоптоза – 26,10% и касна апоптоза – 9,10% ћелија).

За аналог халкона **X6** проценат апоптотичних ћелија износио је 26,88% (рана апоптоза – 23,31% и касна апоптоза – 3,57% ћелија).

За аналог халкона **X7** проценат апоптотичних ћелија износио је 27% (рана апоптоза – 21,63% и касна апоптоза – 5,37% ћелија) (Слика 22).

Третман свим испитиваним халконима није статистички значајно ( $p > 0,05$ ) утицао на проценат некротичних ћелија (**X1** – 0,89%; **X2** – 0,63%; **X3** – 0,31; **X4** – 0,30; **X5** – 0,55; **X6** – 0,48; **X7** – 0,32).

Инкубација *HCT-116* ћелија цисплатином и дехидрозингероном у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима (за цисплатину концентрација од 4,82  $\mu\text{M}$  и за дехидрозингерон концентрација од 2,85  $\mu\text{M}$ ) резултовала је статистички значајним повећањем процента апоптотичних ћелија у поређењу са *HCT-116* ћелијама које нису биле третиране дехидрозингероном (Слика 22).

За дехидрозингерон проценат апоптотичних ћелија износио је 21,32% (рана апоптоза – 17,72% и касна апоптоза – 3,60% ћелија).

За цисплатину проценат апоптотичних ћелија био је 39,23% (рана апоптоза – 33,28% и касна апоптоза – 5,95% ћелија).

Третман контролним супстанцама није статистички значајно утицао на проценат некротичних ћелија (*cisPt* – 0,22 и *ДХЗ* – 0,11) ( $p > 0,05$ ).

На основу резултата теста апоптотичности, након третмана *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  вредностима **X1-X7** и референтних супстанци проценат апоптотичних ћелија за **X1** се увећао за 13,5 пута, и проценат вијабилних ћелија смањено се за 2,4 пута у односу на нетретиране ћелије. Процент некротичних ћелија за **X1** незнатно се увећао у односу на нетретиране *HCT-116* ћелије;

За **X2** проценат апоптотичних ћелија се увећао за 14 пута, и проценат вијабилних ћелија се смањено за 2,6 пута у односу на нетретиране ћелије. Процент некротичних ћелија за **X2** незнатно се увећао у односу на нетретиране ћелије;

За **X3** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 11,7 пута, проценат некротичних ћелија се смањено за 1,5 пута и проценат вијабилних ћелија смањено се за 2 пута у односу на нетретиране ћелије;

За **X4** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 12,9 пута, проценат некротичних ћелија се смањено за 1,5 пута и проценат вијабилних ћелија смањено се за 2,3 пута у односу на нетретиране ћелије;

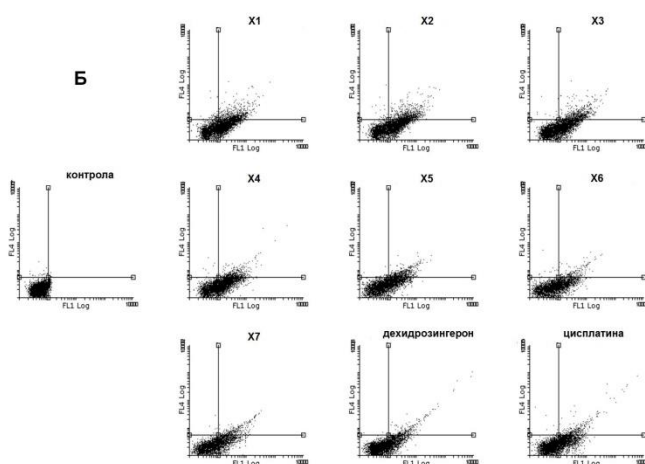
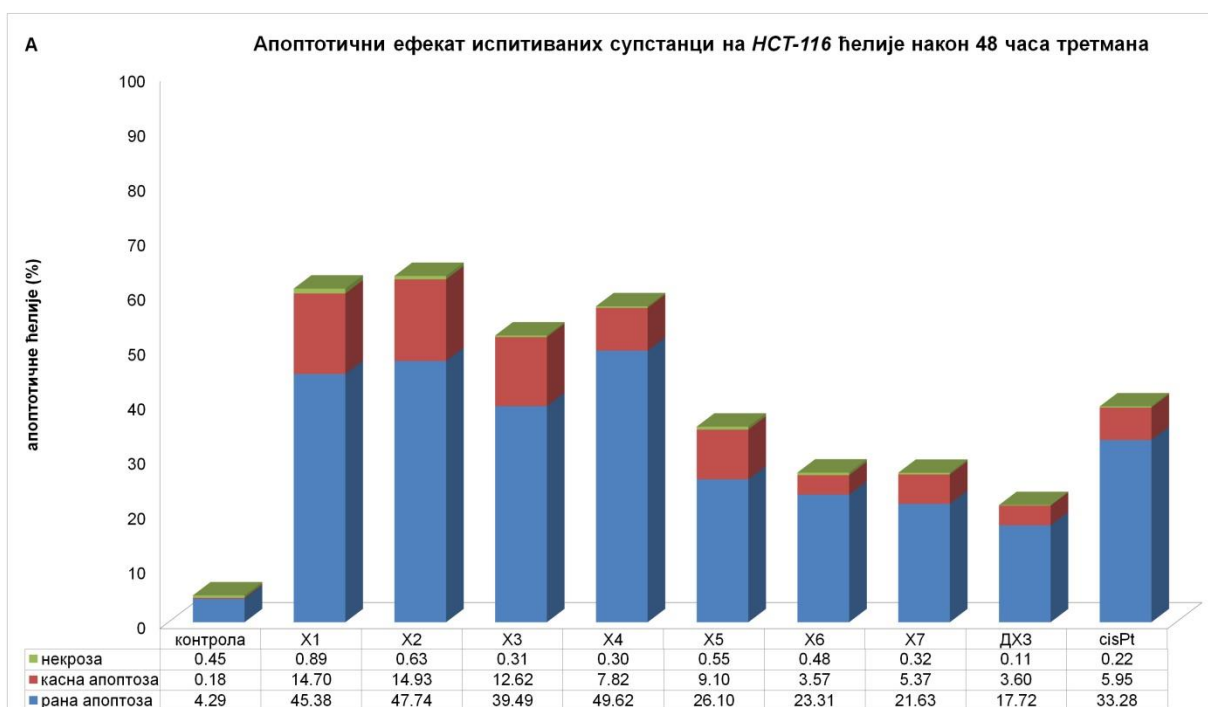
За **X5** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 7,9 пута, и проценат вијабилних ћелија смањено се за 1,5 пута у односу на нетретиране ћелије. Процент некротичних ћелија за **X5** незнатно се увећао у односу на нетретиране ћелије;

За **X6** проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6 пута, проценат некротичних ћелија био је непромењен и проценат вијабилних ћелија смањено се за 1,3 пута у односу на нетретиране ћелије. Процент некротичних ћелија је био незнатан и остао је исти као код нетретираних ћелија;

За X7 проценат апоптотичних ћелија увећао се за 6 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 1,4 пута и проценат вијабилних ћелија смањило се за 1,3 пута у односу на нетретиране ћелије;

За дехидрозингерон проценат апоптотичних ћелија увећао се за 4,8 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 4 пута и проценат вијабилних ћелија се смањило за 1,2 пута у односу на нетретиране ћелије;

За цисплатину проценат апоптотичних ћелија се увећао за 8,8 пута, проценат некротичних ћелија се смањило за 2 пута и проценат вијабилних ћелија се смањило за 1,6 пута у односу на нетретиране ћелије.



Слика 22. Апоптотични ефекти  $IC_{50}$  вредности аналога халкона X1-X7, дехидрозингерона и цисплатине на HCT-116 ћелије након 48 часова третмана. А.

Резиме података о проценту апоптотичних ћелија након третмана *HCT-116* ћелије испитиваним супстанцама у поређењу са контролним, нетретираним ћелијама. **Б.** Вијабилне ћелије налазе се у доњем левом пољу *dot plot*-а, некротичне ћелије у горњем левом пољу, ћелије у стадијуму ране апоптозе у доњем десном пољу, и ћелије у стадијуму касне апоптозе у горњем десном пољу. Подаци су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка из три независна експеримента.

На основу добијених резултата теста апоптотичности најефикаснији апоптотични ефекат на *HCT-116* ћелије показао је халкон **X2** у односу на остале испитиване аналоге халкона и референтне супстанце.

### **4.3. Аналоги халкона индукују апоптозу у туморским *HeLa* и *HCT-116* ћелијама путем активације митохондријалног апоптотског пута**

Пошто су досадашњи резултати овог истраживања показали да испитивани аналози халкона испољавају значајан цитотоксични и апоптотични ефекат на *HeLa* и *HCT-116* ћелије, следећи циљ ове студије био је испитивање механизма апоптозе путем којег аналози халкона индукују смрт туморских ћелија цервикса и колона.

У том циљу одређивана је експресија регулаторних протеина апоптозе: анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и про-апоптотичног активног *Bax*-а и егзекуторне активне каспазе-3 употребом метода проточне цитометрије (*Flow*) и имунофлуоресцентне микроскопије користећи специфична антитела за ове протеине.

У циљу детекције потенцијалних промена у експресији и локализацији регулаторних протеина апоптозе, *HeLa* и *HCT-116* ћелије су биле третиране *IC50* вредностима аналога халкона током 24 часа.

Апоптоза може бити индукована активирањем спољашњег и/или унутрашњег (митохондријалног) апоптотског пута. Спољашњи апоптотски пут подразумева активацију рецептора смрти (као што је *Fas*) који се везује за домен смрти *FADD* при чему се формира *DISC* комплекс. Формирани комплекс активира иницијаторну каспазу-8 која сукцесивно доводи до активације егзекуторне каспазе-3 и егзекуцију апоптозе.

Митохондријални апоптотски пут активира се као последица нарушене равнотеже између експресије и ефекта анти-апоптотских протеина као што је *Bcl-2* и про-апоптотских протеина као што је *Bax*. Смањена експресија *Bcl-2* протеина и повећана експресија активног *Bax*-а узрокује инкорпорирање овог про-апоптотског протеина у мембрану митохондрија, формирање пора и транслокацију цитохрома *c* из интрамембранског простора митохондрија у цитосол ћелије који са про-апоптотским *Araf-1* протеином и про-каспазом-9 формира апоптозом који активира каспазу-9, а затим и егзекуторну каспазу-3.

#### **4.3.1. Аналоги халкона узрокују повећану експресију активног *Bax*-а, повећану експресију каспазе-3 и смањену експресију *Bcl-2* протеина у *HeLa* ћелијама**

Протеин *Bcl-2* припада групи анти-апоптотичних протеина који инхибира процес апоптозе и омогућава преживљавање ћелија. Аналоги халкона представљају стимулусе апоптозе који узрокују смањење експресије *Bcl-2* протеина у цитосолу *HeLa* ћелија и индукују апоптозу у *HeLa* ћелијама.

У здравим ћелијама, про-апоптотски протеин *Bax* локализован је у цитосолу ћелије. Индукцијом апоптозе долази до активирања *Bax*-а који формира поре у спољашњој митохондријалној мембрани, транслокације цитохрома *c* у цитосол ћелије и сукцесивног активирања егзекуторне каспазе-3. Дисбаланс експресије про-апоптотичног *Bax* протеина и анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у корист *Bax*-а последица је активирања митохондријалног апоптотског пута од стране различитих апоптотских стимулуса, у које убрајамо и аналоге халкона (103,105,109,110).

У циљу одређивања механизам апоптозе, халконима третиране *HeLa* ћелије инкубиране су антителима за *Bcl-2*, активни *Bax* и активну каспазу-3, при чему је одређен ниво експресије и активација *Bax*-а, *Bcl-2* и каспазе-3 мерењем интензитета флуоросценције (*IF* –*fluorescence intensity*) (резултати мерења интензитета флуоросценције су изражени као медијана).

Добијени резултати показали су да 24 часовни третман *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама седам аналога халкона доводе до статистички значајног смањења интензитета флуоросценције ( $p \leq 0,05$ ) за анти-апоптотични *Bcl-2* протеин у односу на контролне, нетретиране *HeLa* ћелије. Вредност *IF* за *Bcl-2* протеин код нетретираних *HeLa* ћелија износила је 61,98, док су се вредности *IF* код **X1-X7** третираних *HeLa*

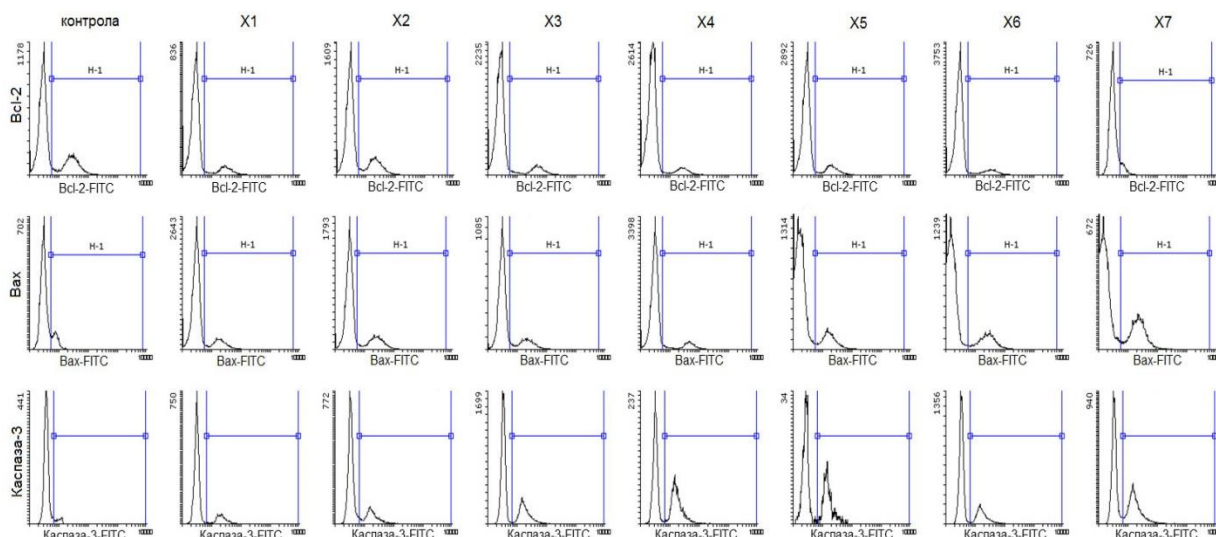
ћелија кретале од 27,22 до 48,66 (Табела 2). Односно, експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина код **X1-X7** третираних *HeLa* ћелија била је смањена у односу на нетретиране ћелије и то 1,9 пута (46,37%) за **X1**, 1,5 пута (34,96%) за **X2**, 1,4 пута (26,94%) за **X3**, 1,4 пута (26,41) за **X4**, 1,9 пута (47,47%) за **X5**, 1,3 пута (21,49%) за **X6** и 2,3 пута (56,08%) за **X7** (Слика 23 и 24Б).

Након одређивања експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у *HeLa* ћелијама третираним халконима, одређивали смо експресију активног про-апоптотичног *Bax* протеина третираних ћелија у односу на нетретиране ћелије. Као резултат третмана *HeLa* ћелија испитиваним халконима дошло је до транслокације активног *Bax*-а из цитосола ћелије у митохондрије што је резултовало статистички значајним повећањем експресије про-апоптотичног активног *Bax*-а (повећања интензитета *IF*) третираних *HeLa* ћелија у поређењу са ћелијама које нису биле третиране. Вредност *IF* за активни *Bax* код нетретираних *HeLa* ћелија била је 23,58, док су се вредности *IF* код халконима третираних *HeLa* ћелија кретале од 29,30 до 56,08 (Табела 2).

На основу резултата овог истраживања, експресија про-апоптотичног *Bax*-а код **X1-X7** третираних *HeLa* ћелија била је повећана у односу на нетретиране *HeLa* ћелије и то 1,2 пута (24,26%) за **X1**; 1,7 пута (65,82%) за **X2**; 1,9 пута (89,10%) за **X3**; 2,4 пута (137,83%) за **X4**; 1,5 пута (52,20%) за **X5**; 1,7 пута (73,62%) за **X6**; 1,4 пута (44,32%) за **X7** (Слика 23 и 24А).

Смањење експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и повећање експресије активног про-апоптотичног активног *Bax* протеина код третираних *HeLa* ћелија довело је до статистички значајно смањеног односа *Bcl-2/Bax* у односу на нетретиране ћелије. Наиме, вредност *IF* односа *Bcl-2/Bax* код нетретираних *HeLa* ћелија био је 2,63, док је након 24 часова третмана *HeLa* ћелија аналозима халкона у концентрацији која одговара  $IC_{50}$  вредности, вредност *IF* односа *Bcl-2/Bax* износила: 1,13 за **X1**, 1,03 за **X2**, 1,02 за **X3**, 0,81 за **X4**, 0,91 за **X5**, 1,19 за **X6** и 0,80 за **X7** (Табела 2). Изражено у процентима, 24 часовна инкубација *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама седам аналога халкона довела је до смањења односа *Bcl-2/Bax* од 2,3 пута (57,03%) за **X1**, 2,6 пута (60,84%) за **X2**, 2,6 пута (61,22%) за **X3**, 3,2 пута (69,20%) за **X4**, 2,9 пута (65,40%) за **X5**, 2,2 пута (54,75%) за **X6** и 3,3 пута (69,58%) за **X7** (Слика 25).





**Слика 23.** Репрезентативни хистограми експресије и активације регулаторних протеина апоптозе, *Bcl-2*, *Bax*-а и каспазе-3 у туморским *HeLa* ћелијама након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1-X7**.

медијана IF	<i>Bcl-2</i>	<i>Bax</i>	<i>Bcl-2/Bax</i> однос	Активна каспаза-3
контрола	61.98	23.58	2.63	5.83
X1	33.24	29.30	1.13	15.20
X2	40.31	39.10	1.03	22.10
X3	45.28	44.59	1.02	28.81
X4	45.61	56.08	0.81	42.07
X5	32.56	35.89	0.91	37.60
X6	48.66	40.94	1.19	23.55
X7	27.22	34.03	0.80	39.18

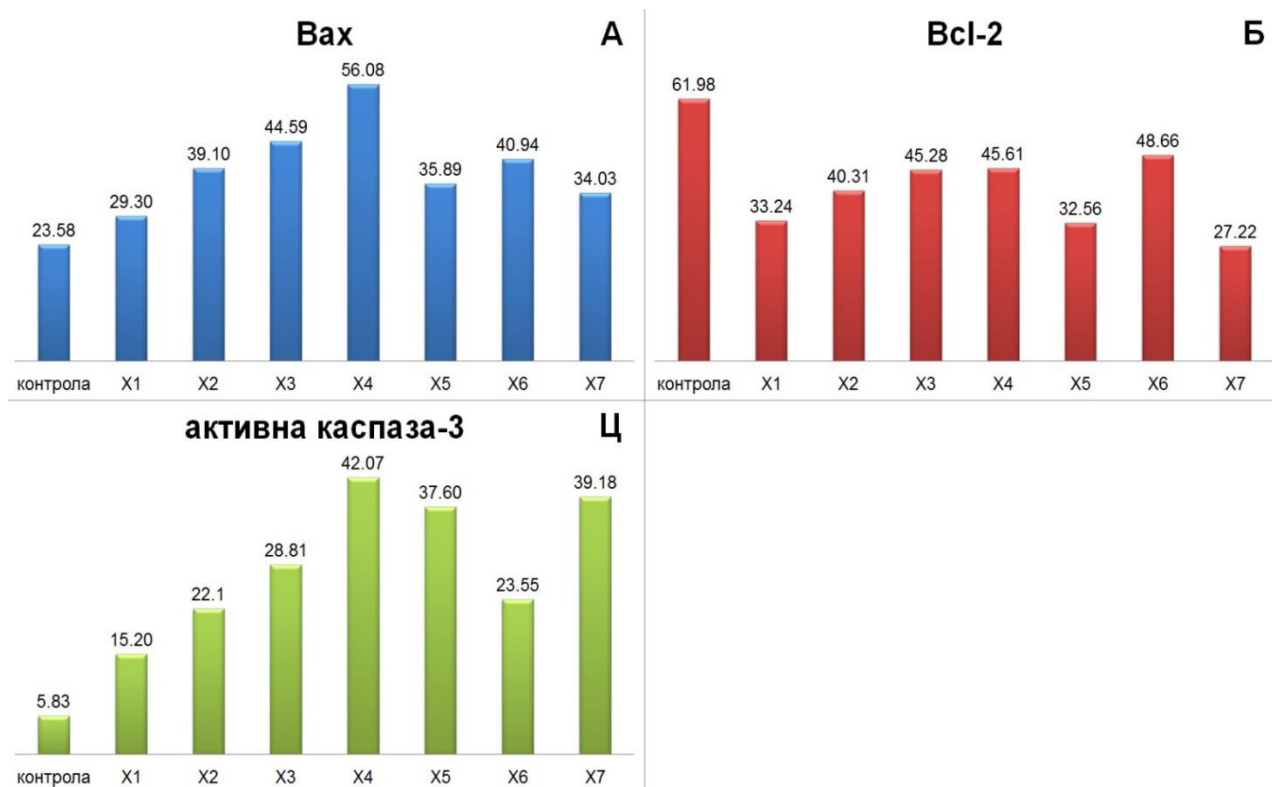
**Табела 2.** Измерене вредности интензитета флуоресценције (*IF*) за регулаторне апоптотичне протеине *Bcl-2*, активни *Bax* и каспазу-3, као и израчунат однос анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и про-апоптотичног активног *Bax* протеина након 24 часовног третмана *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона.

Након утврђивања смањеног релативног односа *Bcl-2/Bax* протеина који представља показатељ индукције апоптозе активирањем митохондријалног

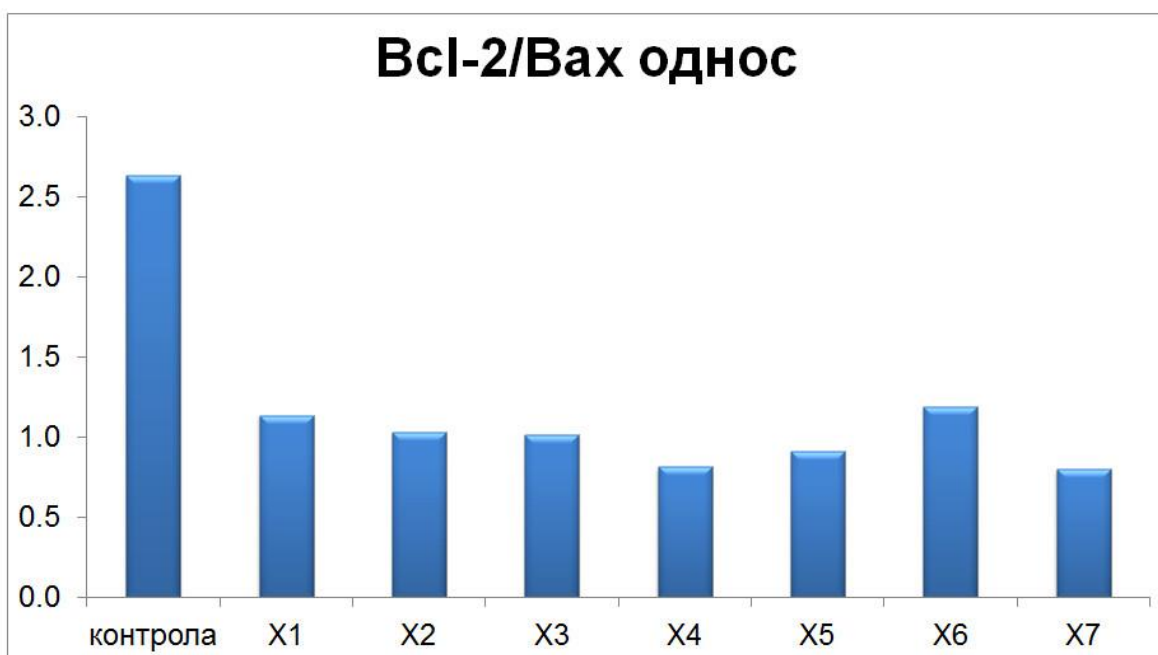
апоптотског пута, следећи циљ био је да се утврди да ли је егзекуторна каспаза-3 активирана аналозима халкона.

Сходно томе, резултати су показали да је 24 часовна инкубација *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама аналога халкона (X1-X7) довела до статистички значајно повећаног нивоа активне каспазе-3 у поређењу са нетретираним ћелијама. Вредност  $IF$  за активну каспазу-3 код нетретираних *HeLa* ћелија износила је 5,83, док су се  $IF$  вредности код X1-X7 третираних ћелија кретале од 15,20 до 42,07 (Табела 2).

Добијени резултати су показали да експресија активне каспазе-3 код халконима третираних *HeLa* ћелија била је статистички значајно повећана (2,6 пута за X1; 3,8 пута за X2; 4,9 пута за X3; 7,2 пута за X4; 6,5 пута за X5; 4 пута за X6; 6,8 пута за X7) у односу на контролне ћелије цервикса које нису биле третиране (Слике 23 и 24Ц).



**Слика 24.** Репрезентативни дијаграм који показује промену  $IF$  за протеине *Bcl-2*, активни *Bax* и каспазу-3 након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона X1-X7 на *HeLa* ћелије. **А.** Повећање  $IF$  за активни *Bax* код халконима третираних туморских ћелија у односу на нетретирание ћелије. **Б.** Смеђење вредности  $IF$  за *Bcl-2* код туморских *HeLa* ћелија које су биле третиране халконима у поређењу са нетретираним ћелијама. **Ц.** Повећање  $IF$  каспазе-3 код туморских *HeLa* ћелија које су биле третиране халконима у односу на нетретирание ћелије цервикса.

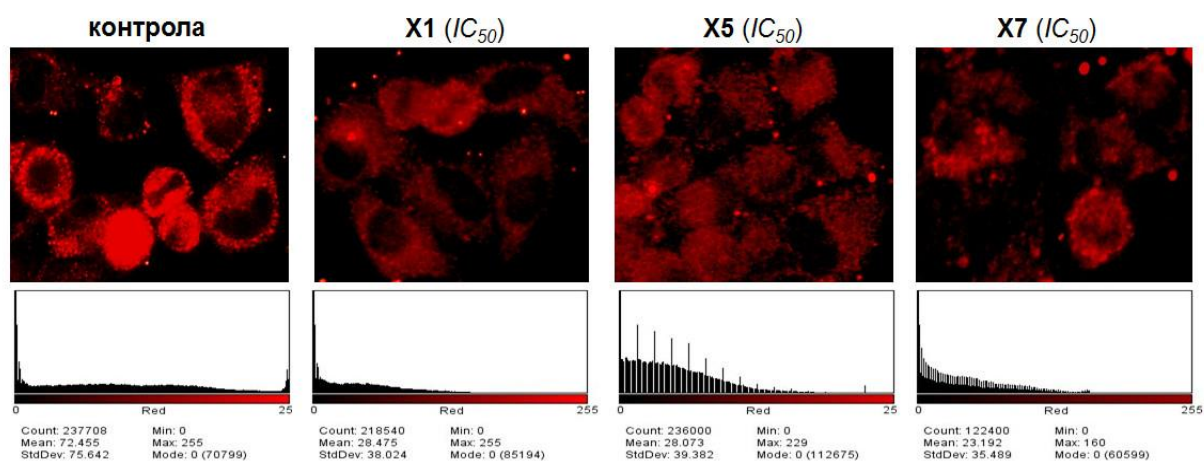


**Слика 25.** Репрезентативни дијаграм који показује промену  $IF$  односа анти-апоптотичног и про-апоптотичног протеина након третмана *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона **X1-X7** током 24 часа.

Као део експеримента, у циљу одређивања експресије регулаторних протеина апоптозе, добијени резултати проточном цитометријом потврђени су коришћењем методе имунофлуоресцентне микроскопије.

Наиме, након 24 часовне инкубације *HeLa* ћелија аналозима халкона **X1**, **X5** и **X7** у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима одређивана је експресија *Bcl-2* протеина, активног *Bax*-а и активне каспазе-3 мерењем просечног интензитета флуоросценције (*mean fluorescence intensity* – *MFI*).

Након 24 часова третмана *HeLa* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама халкона **X1**, **X5** и **X7**, вредност *MFI* за *Bcl-2* протеин била је статистички значајно смањена ( $p \leq 0,05$ ) у односу на нетретиране *HeLa* ћелије. Третман *HeLa* ћелија довео је до смањене експресије *Bcl-2* протеина у односу на нетретиране ћелије (72,5) и то од 2,5 пута за **X1** (28,5), 2,6 пута за **X5** (28,1) и 3,2 пута за **X7** (23,2) (Слика 26).

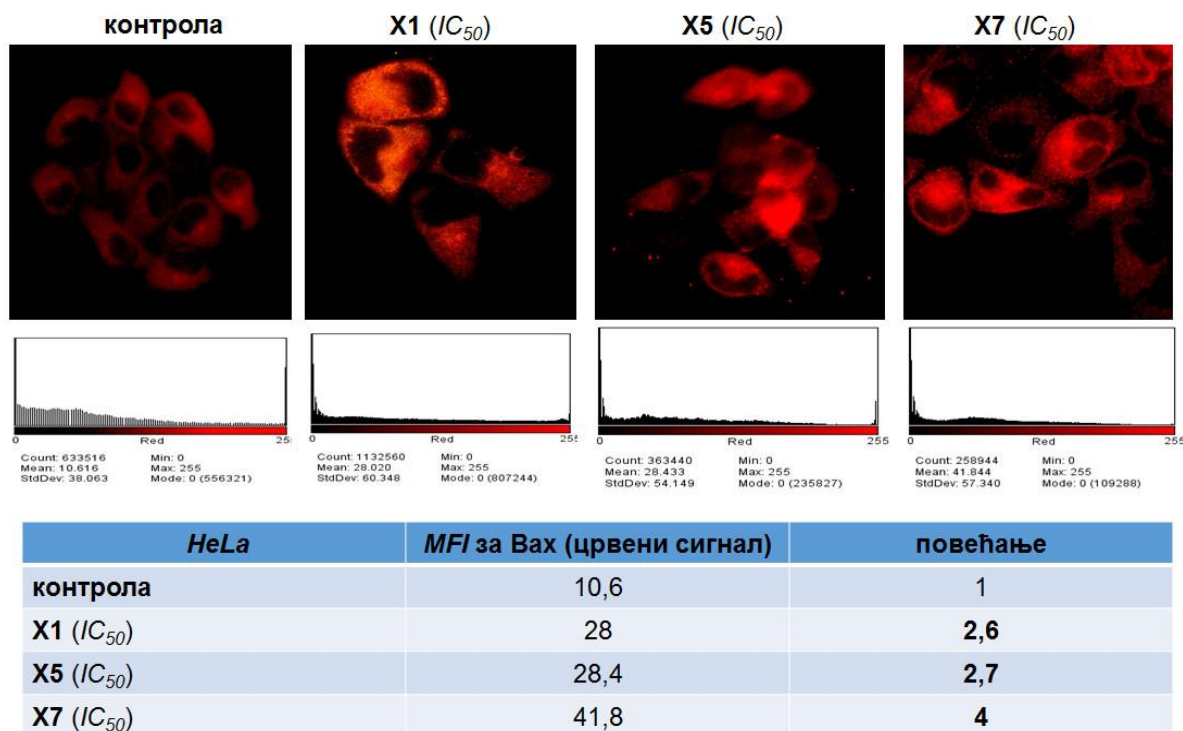


HeLa	MFI за Bcl-2 (црвени сигнал)	Смањење
контрола	72,5	1
X1 ( $IC_{50}$ )	28,5	2,5
X5 ( $IC_{50}$ )	28,1	2,6
X7 ( $IC_{50}$ )	23,2	3,2

**Слика 26.** Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у ћелијама карцинома цервикса након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**.

Након одређивања експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина коришћењем методе имунофлуоросцентне микроскопије, одређена је експресија активног про-апоптотичног *Bax* протеина код *HeLa* ћелија које су биле третиране халконима у односу на контролне ћелије.

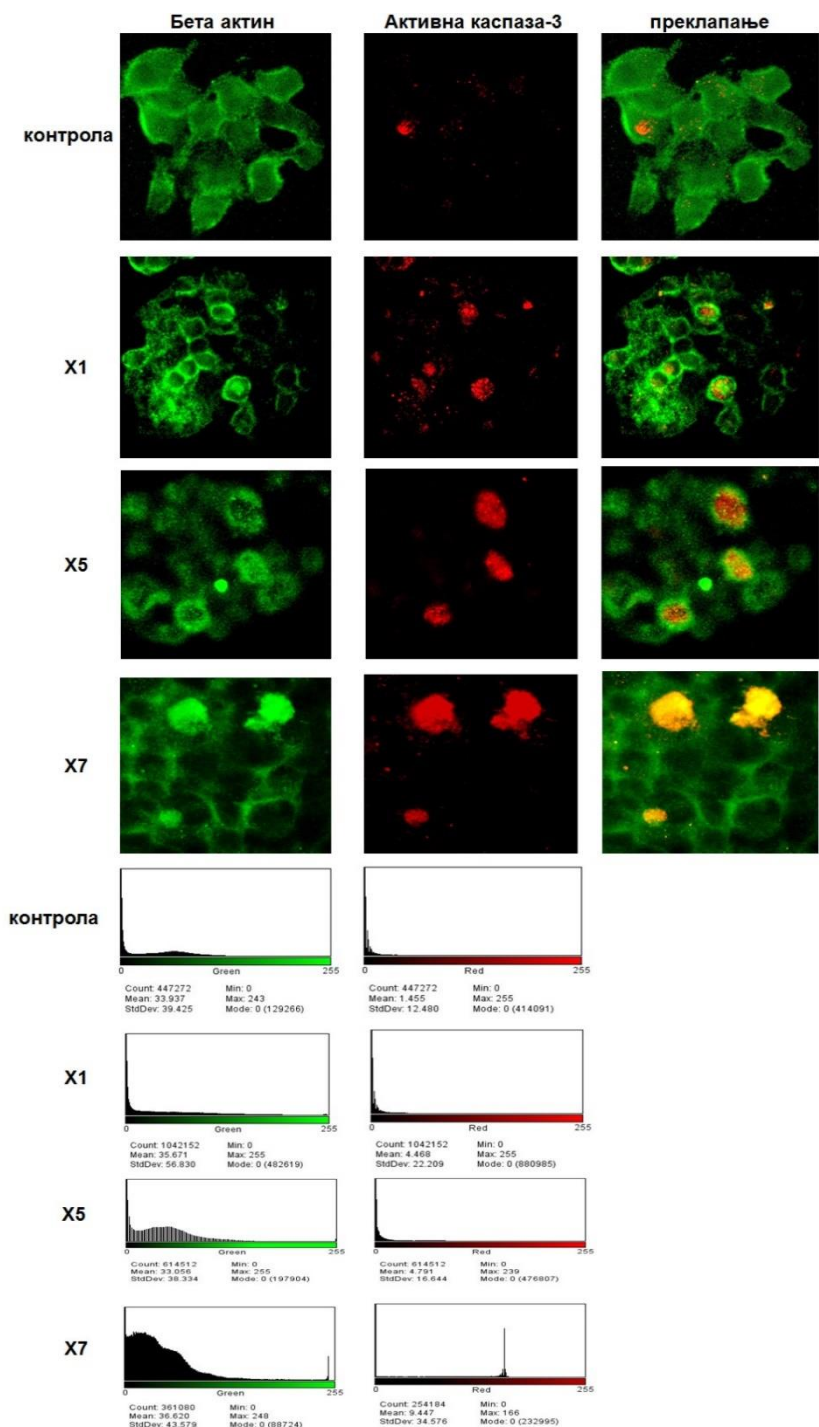
Третман *HeLa* ћелија током 24 часова  $IC_{50}$  концентрацијама три аналога халкона довели су до повећане експресије *Bax*-а у односу на нетретиране ћелије (10,6) и то од 2,6 пута за **X1** (28,0), 2,7 пута за **X5** (28,4) и 4 пута за **X7** (41,8) (Слика 27).



**Слика 27.** Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије про-апоптотичног *Bax* протеина у ћелијама карцинома цервикса након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**.

Након утврђивања смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и повећане експресије про-апоптотичног *Bax*-а, коришћењем методе имунофлуоресцентне микроскопије одређивано је да ли аналози халкона представљају стимулусе апоптозе *HeLa* ћелија при чему долази до активирања егзекуторне каспазе-3.

Инкубација *HeLa* ћелија у периоду од 24 часова  $IC_{50}$  концентрацијама аналога халкона **X1**, **X5** и **X7** довела је до статистички значајног повећања *MFI* вредности ( $p \leq 0,05$ ) за активну каспазу-3 у односу на нетретирание ћелије. Култивација *HeLa* ћелија халконима резултовала је повећање нивоа активне каспазе-3 у односу на *HeLa* ћелије које нису биле третиране (1,5) и то 3 пута за **X1** (4,5), 3,2 пута за **X5** (4,8) и 6,3 пута за **X7** (9,5) (Слика 28).



HeLa	MFI за бета актин (зелени сигнал)	MFI за активну каспазу-3 (црвени сигнал)	повећање
контрола	33,9	1,5	1
X1 ( $IC_{50}$ )	36,7	4,5	3
X5 ( $IC_{50}$ )	33,1	4,8	3,2
X7 ( $IC_{50}$ )	36,6	9,5	6,3

**Слика 28.** Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије ефекторне каспазе-3 у у ћелијама карцинома цервикса након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама

испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**. Након третмана HeLa ћелија халконима **X1**, **X5** и **X7** вршено је њихово бојење анти- $\beta$ -актином (зелени сигнал) и анти-каспазом-3 (црвени сигнал) као што је описано у поглављу Материјал и методе.

#### **4.3.2. Аналоги халкона узрокују повећану експресију активног *Bax*-а, повећану експресију каспазе-3 и смањену експресију *Bcl-2* протеина у *HCT-116* ћелијама**

Након утврђивања механизма деловања аналога халкона на *HeLa* ћелије, следећи циљ био је утврђивање њиховог механизма деловања на *HCT-116* ћелије. Сходно томе, коришћењем метода проточне цитометрије и имунофлуоресцентне микроскопије одређивана је експресија регулаторних протеина апоптозе (анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина, про-апоптотичног *Bax*-а и егзекуторне каспазе-3) након деловања испитиваних супстанци.

Резултати су показали да 24 часовна инкубација *HCT-116* ћелија аналозима халкона у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима, доводе до статистички значајног смањења експресије *Bcl-2* протеина. Наиме, мерењем интензитета флуоросценције (*IF*), резултати су показали статистички значајно смањење *IF* третираних *HCT-116* ћелија у поређењу са контролом (Слике 29 и 30). Вредност *IF* за *Bcl-2* код нетретираних ћелија износила је 25,00, док су се *IF* вредности након 24 часова третмана *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама аналога халкона кретале од 11,14 до 14,72 (Табела 3).

Тачније, инкубација *HCT-116* ћелија халконима довела је до смањене експресије *Bcl-2* протеина у односу на нетретиране ћелије и то 2,2 пута (55,44%) за **X1**, 1,9 пута (47,60%) за **X2**, 2 пута (50,80%) за **X3**, 2,1 пута (53,40%) за **X4**, 1,7 пута (41,12%) за **X5**, 2,3 пута (57,00%) за **X6** и 2,1 пута (51,68%) за **X7**.

Након добијених резултата који показују смањену експресију анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина код халкон третираних *HCT-116* ћелија, у следећем експерименту одређивана је експресија про-апоптотичног активног *Bax* протеина након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама аналога халкона.

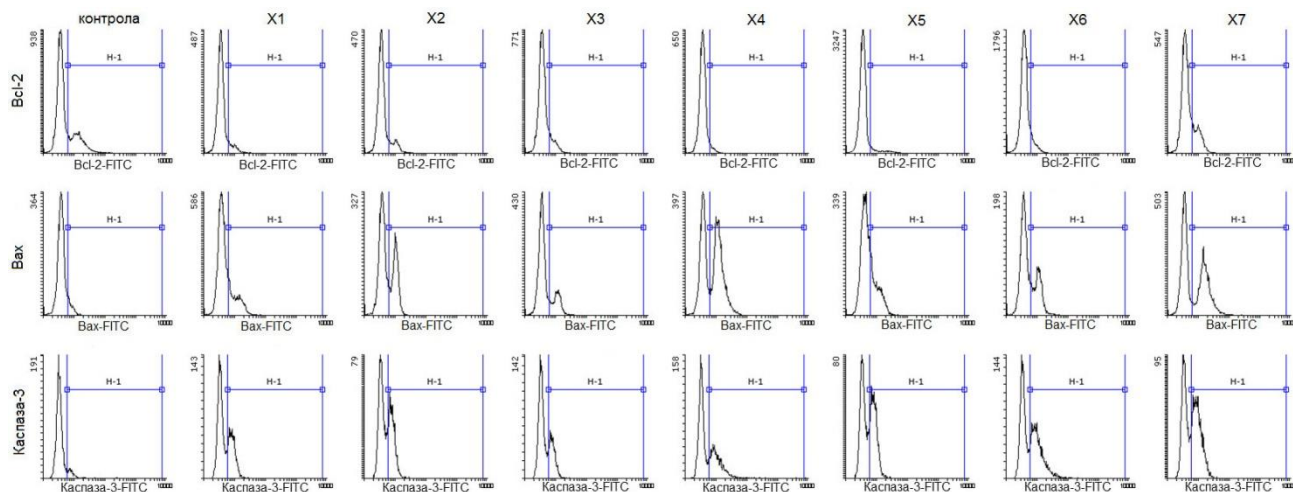
Резултати указују на статистички значајно повећање експресије активног *Bax* протеина у третираним *HCT-116* ћелијама у односу на поменуте туморске ћелије које нису биле третиране (Слика 13 и 14). Вредност *IF* за *Bax* код нетретираних ћелија износила је 8,74, док су се вредности *IF* код третираних *HCT-116* ћелија кретале од 11,04 до 16,85 (Табела 3). Прецизније, експресија про-апоптотичног *Bax*-а била је

статистички значајно повећана у третираним *HCT-116* ћелијама у односу на нетретиране ћелије, и то 1,4 пута (36,96%) за **X1**, 1,3 пута (33,29%) за **X2**, 1,4 пута (36,96%) за **X3**, 1,3 пута (26,32%) за **X4**, 1,9 пута (92,79%) за **X5**, 1,5 пута (51,26) за **X6** и 1,4 пута (36,96) за **X7**.

Након утврђивања смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и повећане експресије про-апоптотичног *Bax*-а код третираних *HCT-116* ћелија у односу на нетретиране ћелије, утврђиван је релативни однос *Bcl-2/Bax*.

Резултати истраживања показали су статистички значајно смањење релативног односа *Bcl-2/Bax* код *HCT-116* ћелија које су третиране халконима **X1-X7** у поређењу са контролним ћелијама (Слика 31). Вредности *IF* односа *Bcl-2/Bax* код нетретираних *HCT-116* ћелија био је 2,86, док је код третираних *HCT-116* ћелија *IF* вредност износила за **X1** – 0,93; **X2** – 1,12; **X3** – 1,03; **X4** – 1,06; **X5** – 0,87; **X6** – 0,81; и **X7** – 1,01 (Табела 3).

Тачније, 24 часовни третман *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама аналога халкона резултовао је смањењем односа *Bcl-2/Bax* од 3,1 пута (67,48%) за **X1**, 2,6 пута (60,84%) за **X2**, 2,8 пута (63,98%) за **X3**, 2,7 пута (62,94%) за **X4**, 3,3 пута (69,58) за **X5**, 3,5 пута (71,68%) за **X6** и 2,8 пута (64,69%) за **X7**, у односу на нетретиране ћелије.



**Слика 29.** Репрезентативни хистограми експресије и активације регулаторних протеина апоптозе, *Bcl-2*, *Bax*-а и каспазе-3 у туморским *HCT-116* ћелијама након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1-X7**.

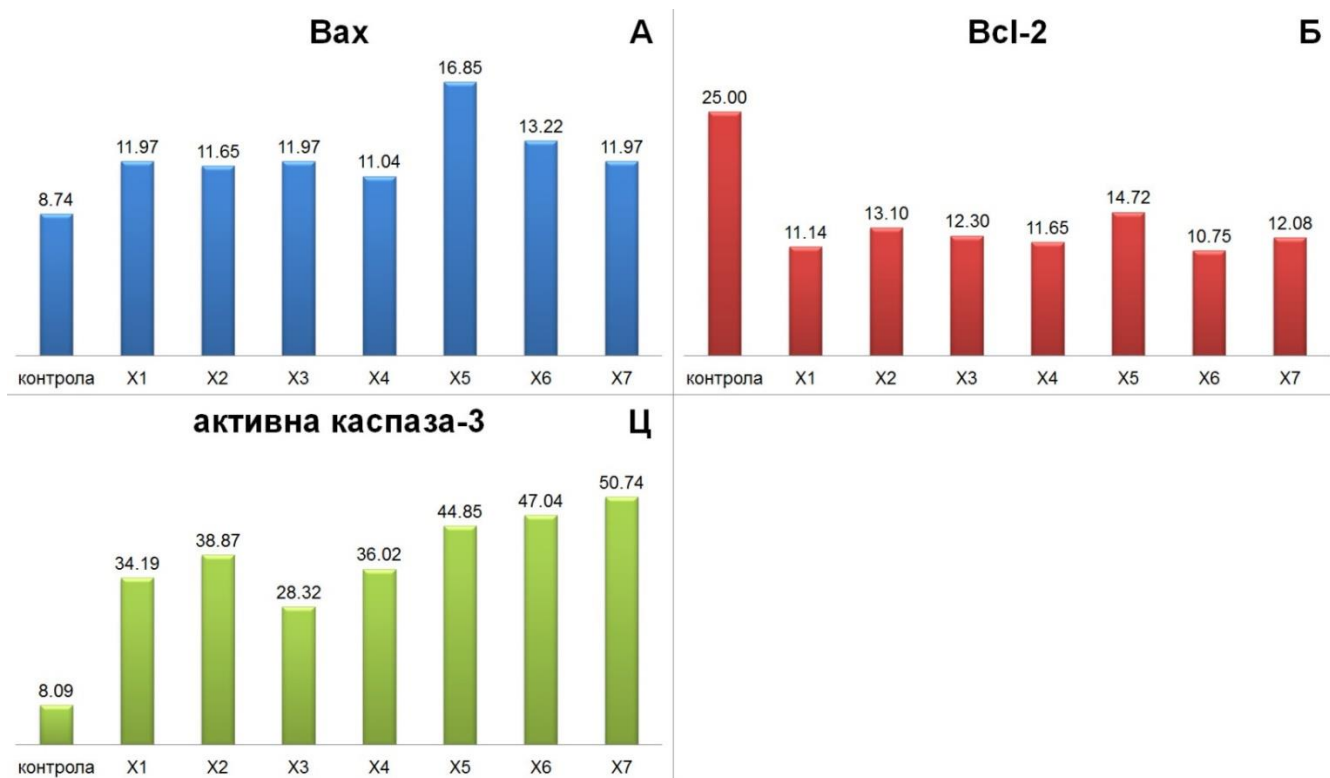


медијана IF	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax однос	Активна каспаза-3
контрола	25.00	8.74	2.86	8.09
X1	11.14	11.97	0.93	34.19
X2	13.10	11.65	1.12	38.87
X3	12.30	11.97	1.03	28.32
X4	11.65	11.04	1.06	36.02
X5	14.72	16.85	0.87	44.85
X6	10.75	13.22	0.81	47.04
X7	12.08	11.97	1.01	50.74

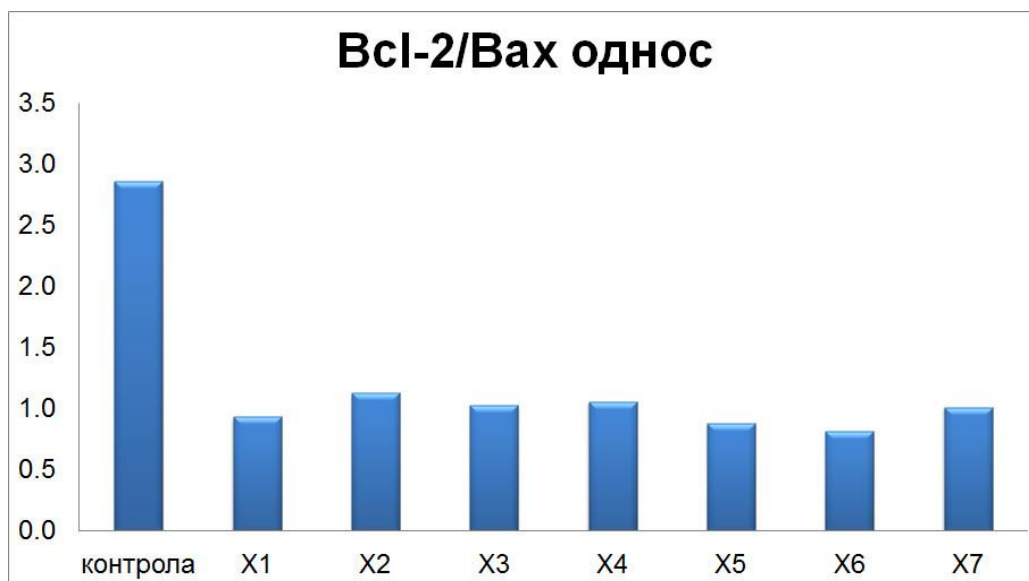
**Табела 3.** Измерене вредности интензитета флуоресценције (*IF*) за регулаторне апоптотичне протеине *Bcl-2*, активни *Bax* и каспазу-3, као и израчунат однос анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и про-апоптотичног активног *Bax* протеина након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона.

Након утврђене статистички значајне промене у експресијама анти-апоптотичног *Bcl-2* и про-апоптотичног *Bax* протеина, у следећем кораку одређивана је експресија егзекуторне каспазе-3 након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија аналозима халкона у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима.

Резултати истраживања показали су статистички значајно повећање *IF* вредности за каспазу-3 код третираних *HCT-116* ћелија у поређењу са ћелијама које нису биле третиране халконима **X1-X7** (Слике 29 и 30). Вредност *IF* за каспазу-3 код нетретираних *HCT-116* ћелија износила је 8,09, док су се *IF* вредности код третираних ћелија кретале од 28,32 до 50,74 (Табела 3). Наиме, култивација *HCT-116* ћелија резултовала је повећањем нивоа егзекуторне каспазе у односу на контролу и то 4,2 пута за **X1**, 4,8 пута за **X2**, 3,5 пута за **X3**, 4,5 пута за **X4**, 5,5 пута за **X5**, 5,8 пута за **X6** и 6,3 пута за **X7**.



**Слика 30.** Репрезентативни дијаграм који показује промену *IF* за протеине *Bcl-2*, активни *Bax* и каспазу-3 након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1-X7** на *HCT-116* ћелије. **А.** Повећање *IF* за активни *Bax* протеин код халконима третираних туморских ћелија у односу на нетретиране ћелије. **Б.** Смеђење вредности *IF* за *Bcl-2* код туморских *HCT-116* ћелија које су биле третиране халконима **X1-X7** у поређењу са нетретираним ћелијама. **Ц.** Повећање *IF* каспазе-3 код туморских *HCT-116* ћелија које су биле третиране халконима у односу на нетретиране ћелије колоне.



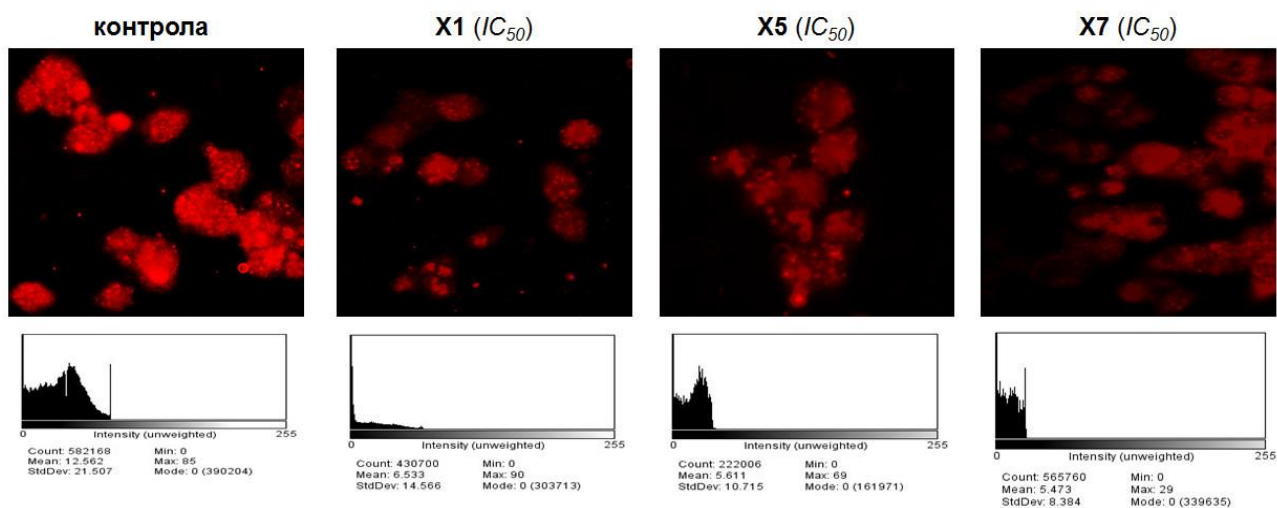
**Слика 31.** Репрезентативни дијаграм који показује промену *IF Bcl-2/Bax* односа након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона **X1-X7**.

Након утврђивања смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и повећане експресије про-апоптотичног *Bax*-а и егзекуторне каспазе-3, циљ даљег истраживања био је одређивање *Bcl-2*, *Bax*-а и каспазе-3 методом имунофлуоросцентне микроскопије.

Као репрезентативне супстанце које доводе до промене експресије регулаторних протеина апоптозе користили смо **X1**, **X5** и **X7**.

Након 24 часова инкубације *HCT-116* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама три аналога халкона, одређивана је експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина, про-апоптотичног *Bax*-а и егзекуторне каспазе-3 мерењем просечног интензитета флуоросценције (*mean fluorescence intensity – MFI*).

Поменути третман *HCT-116* ћелија резултовао је статистички значајним смањењем *MFI* вредности за *Bcl-2* у односу на контролне ћелије. Након 24 часовне инкубације *HCT-116* ћелија аналозима халкона **X1**, **X5** и **X7** у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима уследило је статистички значајно смањење експресије *Bcl-2* протеина у односу на контролне ћелије (*MFI* вредност износила је 12,9), и то 1,9 пута за **X1** (*MFI* вредност износила је 6,5), 2,2 пута за **X5** (*MFI* вредност износила је 5,6) и 2,3 пута за **X7** (*MFI* вредност износила је 5,5) (Слика 32).

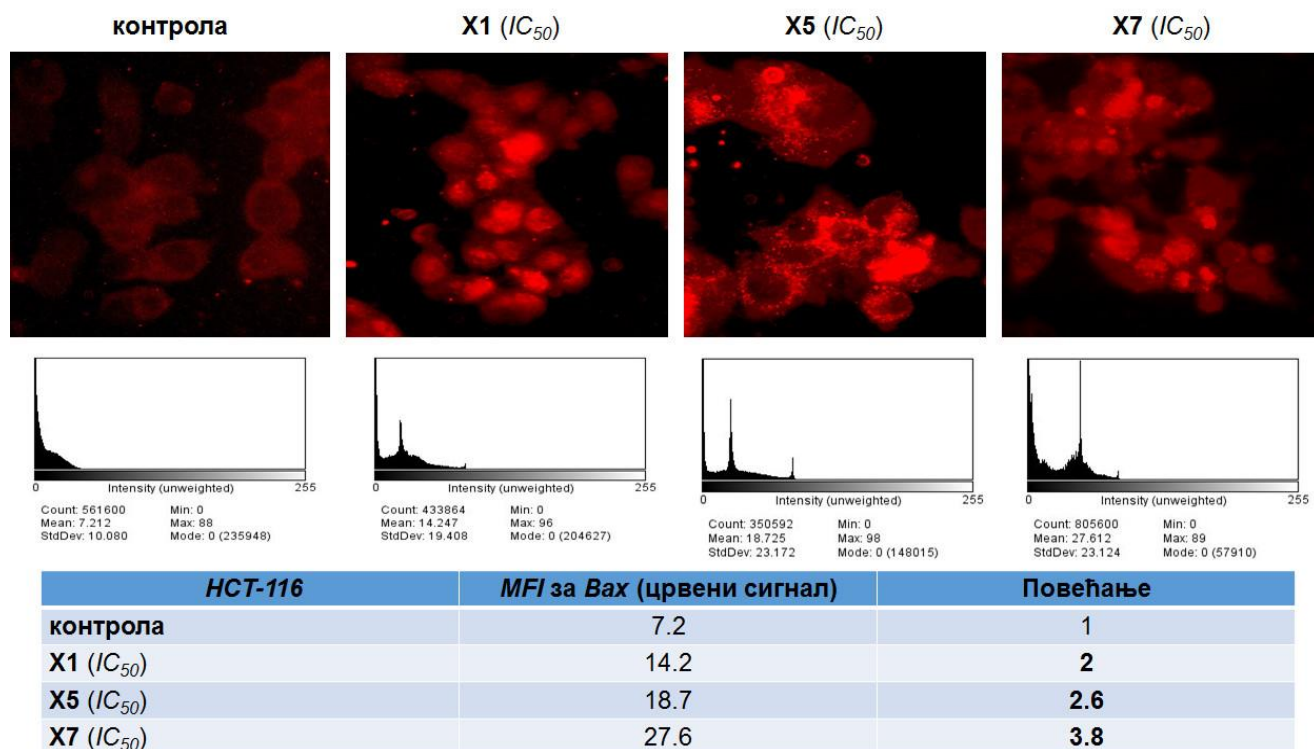


HCT-116	MFI за <i>Bcl-2</i> (црвени сигнал)	Смањење
контрола	12.6	1
X1 ( $IC_{50}$ )	6.5	1.9
X5 ( $IC_{50}$ )	5.6	2.2
X7 ( $IC_{50}$ )	5.5	2.3

**Слика 32.** Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у ћелијама карцинома колона након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**.

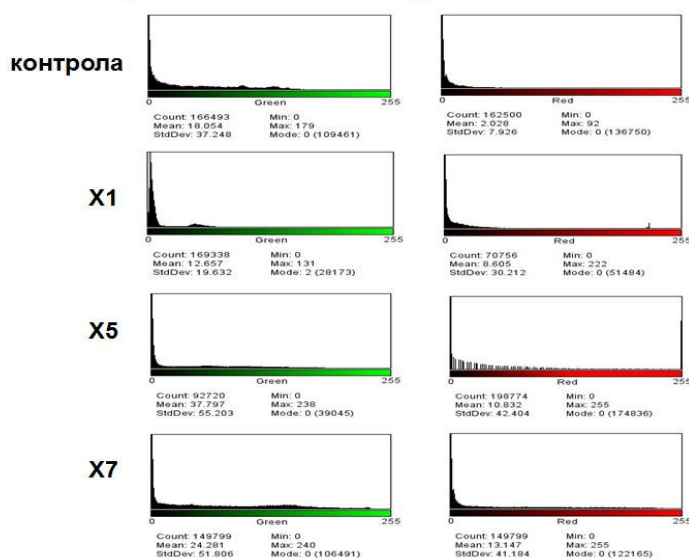
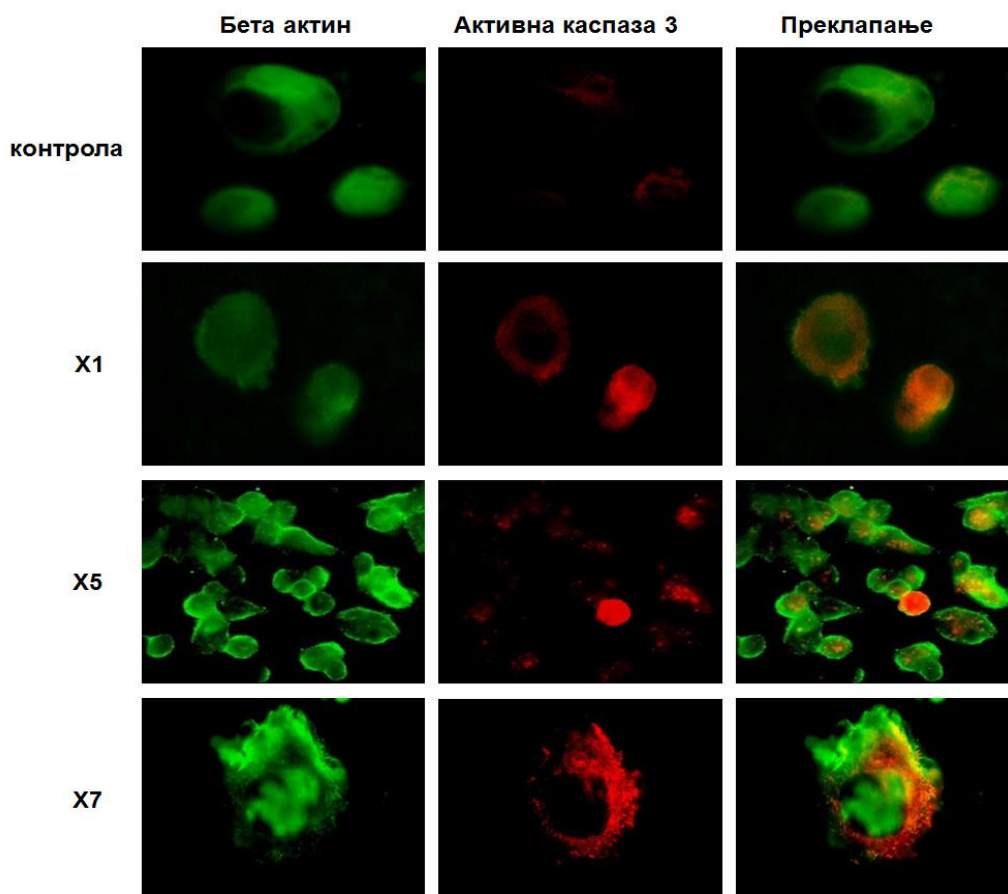
Након утврђене смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина, одређивана је експресија про-апоптотичног активног *Bax*-а након 24 часовног третмана *HCT-116* ћелија аналозима халкона **X1**, **X5** и **X7** у концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима.

Поменути третман резултовао је статистички значајним повећањем експресије *Bax*-а у поређењу са контролним ћелијама (*MFI* вредност износила је 7,2), и то 2 пута за **X1** (*MFI* вредност износила је 14,2), 2,6 пута за **X5** (*MFI* вредност износила је 18,7) и 3,8 пута за **X7** (*MFI* вредност износила је 27,6) (Слика 33).



**Слика 33.** Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије про-апоптотичног *Bax* протеина у ћелијама карцинома колона након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**.

Након утврђене смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и про-апоптотичног *Bax*-а методом имунофлуоресцентне микроскопије, истом методом одређивали смо да ли третман *HCT-116* ћелија аналозима халкона **X1**, **X5** и **X7** доводи до повећања експресије егзекуторне каспазе-3. У складу с тим, након 24 часовне инкубације *HCT-116* ћелија аналозима халкона **X1**, **X5** и **X7** у концентрацији која одговара  $IC_{50}$  вредностима мерењем *MFI* вредности процењена је експресију егзекуторне каспазе-3 у односу на нетретирание *HCT-116* ћелије (Слика 34). Резултати истраживања показали су да три аналога халкона доводе до статистички значајног повећања експресије ( $p \leq 0,05$ ) поменуте каспазе код третираних *HCT-116* ћелија у односу на контролу (2,0) и то 4,3 пута за **X1** (8,6), 5,4 пута за **X5** (10,8) и 6,6 пута за **X7** (13,2) (Слика 34).



HCT-116	MFI за бета актин (зелени сигнал)	MFI за активну каспазу-3 (црвени сигнал)	повећање
контрола	18,1	2,0	1
X1 ( $IC_{50}$ )	12,7	8,6	4,3
X5 ( $IC_{50}$ )	37,8	10,8	5,4
X7 ( $IC_{50}$ )	24,3	13,2	6,6

Слика 34. Имунофлуоресцентни приказ нивоа експресије ефекторне каспазе-3 у у ћелијама карцинома колона након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама

испитиваних халкона **X1**, **X5** и **X7**. Након третмана HeLa ћелија халконима **X1**, **X5** и **X7** вршено је њихово бојење анти- $\beta$ -актином (зелени сигнал) и анти-каспазом-3 (црвени сигнал) као што је описано у поглављу Материјал и методе.

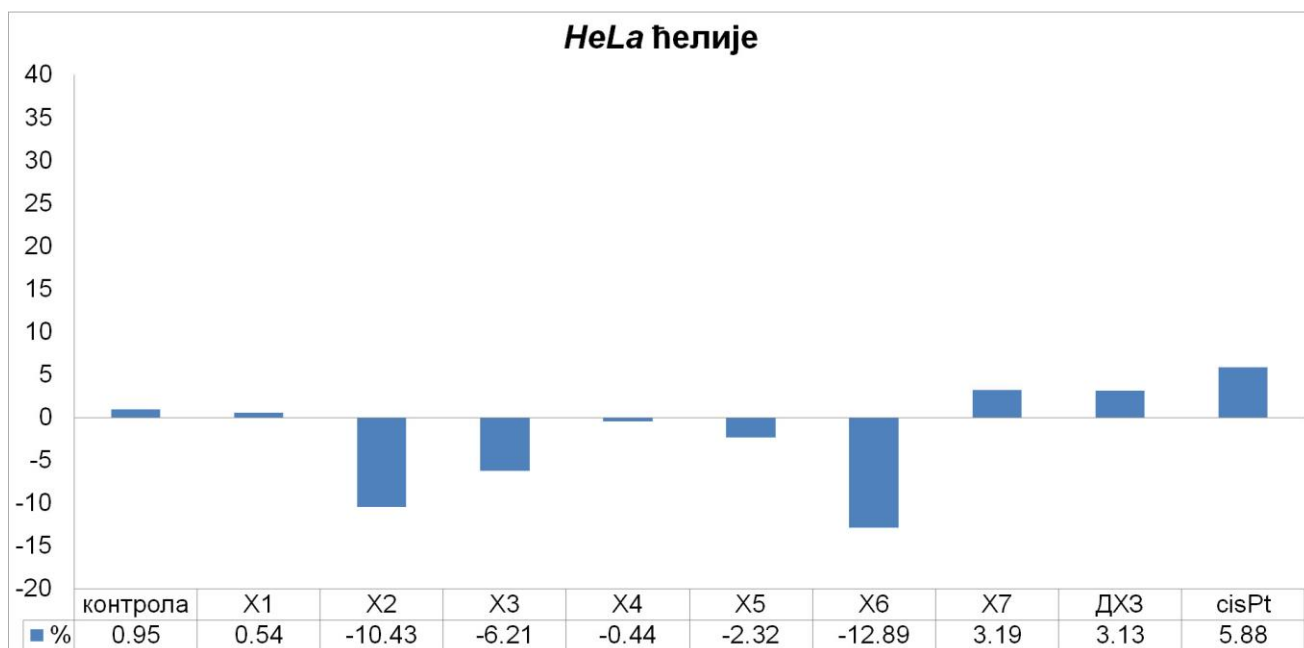
#### **4.4. Допринос аутофагије процесу апоптозе индуковане од стране аналога халкона у HeLa и HCT-116 ћелијама**

Након утврђивања да испитивани аналози халкона у HeLa и HCT-116 ћелијама индукују апоптозу, следећи циљ истраживања био је да се испита у ком степену процес аутофагије доприноси цитотоксичности испитиваних аналога халкона. У циљу овога, у једну експерименталну групу додат је хлорокин (CQ) који представља инхибитор аутофагије. Ко-ретман са CQ у концентрацији од 20  $\mu$ M вршен је након 24 часовног третмана HeLa и HCT-116 ћелија  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона и референтних супстанци. Након инкубације ћелија методом проточне цитометрије (*flow*) употребом бојења Annexin V-FITC/7-AAD одређиван је проценат апоптотичних ћелија, односно промена процента апоптотичних ћелија.

Код контролних, нетретираних HeLa ћелија, инхибиција аутофагије није резултовала значајном променом процента апоптотичних ћелија.

24 часовни третман са хлорокином имао је различит утицај на цитотоксични ефекат аналога халкона (Слика 35). Инхибиција аутофагије је у значајној мери довела до смањења апоптозе индуковане аналозима **X2** и **X6**, односно проценат апоптотичних ћелија се смањио за 10,43% (**X2**) и 12,89% (**X6**). Ко-ретман са хлорокином је имао нешто мањи ефекат на цитотоксичност индуковану аналогом **X3** (смањење процента апоптотичних ћелија за 6,21%), док је ефекат на цитотоксичност **X1**, **X4**, **X5** и **X7** био практично занемарљив (0,54%, 0,44%, 2,32% и 3,19%).

Такође, ко-ретман HeLa ћелија са CQ није довео до значајних промена у цитотоксичном ефекту референтних супстанци (**DX3** – 3,13%; **cisPt** – 5,88%).

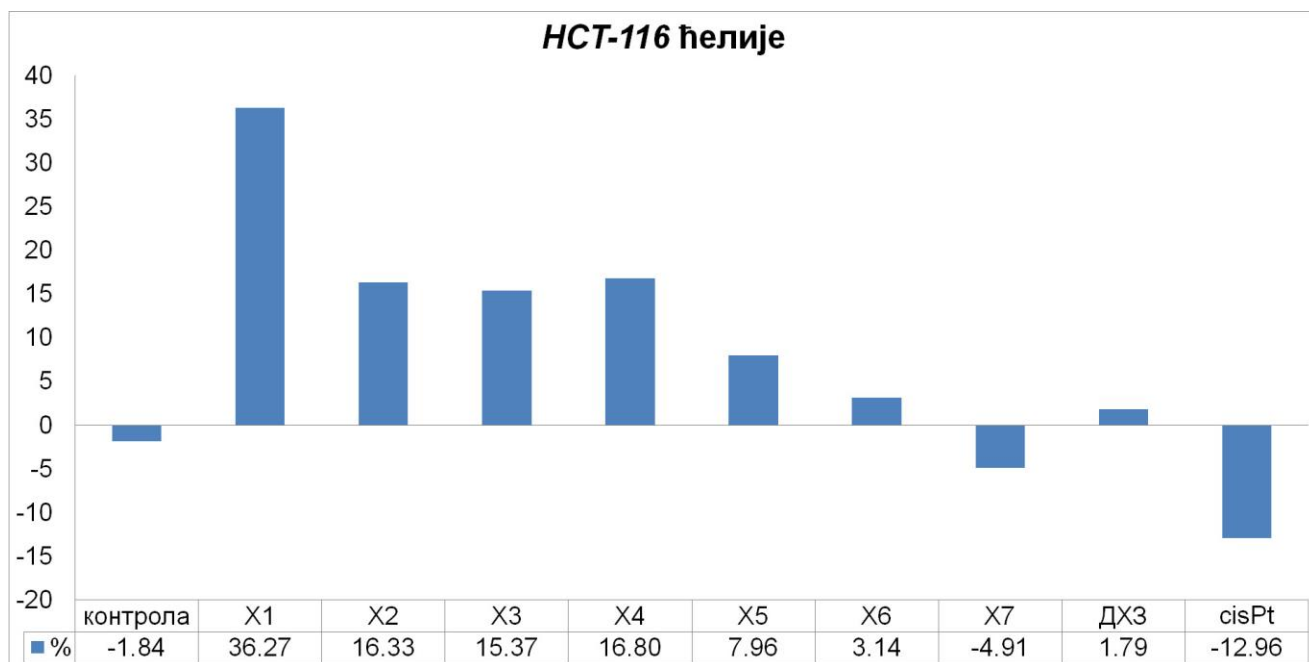


**Слика 35.** Репрезентативни дијаграм који показује промену процента апоптотичних ћелија карцинома цервикса након додатка хлорокина као инхибитора аутофагије. У халконима третираним *HeLa* ћелијама након 24 часова додат је хлорокин и одређен проценат апоптотичних ћелија методом проточне цитометрије употребом бојења *Annexin V-FITC/7-AAD* као што је описано у одељку Материјал и методе.

Ко-третман *HCT-116* ћелија са CQ и аналозима **X1**, **X2**, **X3** и **X4** резултовао је у значајном смањењу процента апоптотичних ћелија (**X1** – 36,27; **X2** – 16,33; **X3** – 15,37 и **X4** – 16,8%) (Слика 20). Инхибиција аутофагије имала је мањи ефекат на цитотоксичност индуковану халконом **X5** (процент апоптотичних ћелија се смањио за 7,96%) и занемарљив ефекат на цитотоксичност **X6** и **X7** (3,14% и 4,91%).

Ко-третман *HCT-116* ћелија са *cisPt* и CQ довео је до изразите промене процента апоптотичних ћелија од -12,96%, док ко-третман са *ДХЗ* и CQ није резултовао значајном променом процента апоптотичних ћелија (1,79%).





**Слика 36.** Репрезентативни дијаграм који показује промену процента апоптотичних ћелија карцинома колона након додатка хлорокина као инхибитора аутофагије. У халконима третираним *НСТ-116* ћелијама након 24 часова додат је хлорокин и одређен проценат апоптотичних ћелија методом проточне цитометрије употребом бојења *Annexin V-FITC/7-AAD* као што је описано у одељку Материјал и методе.

## 5. Дискусија

Малигне болести представљају главни узрок смрти како у Србији, тако и широм света. Протеклих година забележен велики пораст морталитета и инциденце канцера у нашој земљи, при чему су главни узроци смртности код мушке популације карциноми плућа и колона, док је главни узрок смртности код женске популације карцином дојке (44–46).

Канцер представља групу малигнитета коју карактеришу нерегулисани раст, пролиферација ћелија, инвазија и метастаза. Канцерогенеза је узрокована вишеструким серијама мутација гена који регулишу раст и диференцијацију ћелија, при чему нагомилавање мутација доводи до поремећаја експресије, активације и локализације молекула који су примарни за механизме одбране ћелија. Поменуте карактеристике канцерогенезе омогућене су способношћу канцерогених ћелија за избегавање процеса програмиране ћелијске смрти (10–12).

Пролиферација и диференцијација туморских ћелија одвија се знатно брже у односу на малигно неизмењене ћелије где молекул *DNK* представља најважнији молекул у деоби ћелија. Услед тога, молекул *DNK* често представља мету антиканцерогених лекова (229). Кључни ефекат антиканцерогених лекова подразумева индукцију апоптозе као главног облика програмиране ћелијске смрти (53).

Протеини који регулишу процес апоптозе представљају групу *Bcl-2* протеина, где су најзначајнији протеини анти-апоптотични *Bcl-2* и про-апоптотични *Bax* протеини. С тим у вези, експресија, локализација и активација *Bcl-2* и *Bax* протеина представља веома значајне параметре за сузбијање тумора путем индукције процеса апоптозе. Индуковањем апоптозе од стране антиканцерогених лекова, лекови делују као стимулуси који уводе туморске ћелије у апоптозу, односно доводе до активирања про-апоптотичног *Bax*-а који формира поре у спољашњој митохондријалној мембрани и ослобађа цитохром *c* из интрамембранског простора митохондрија, што сукцесивно доводи до каспазне каскаде и активирања егзекуторне каспазе-3 (101,103–105).

Протеини *Bcl-2* и *Bax* локализовани су у цитосолу ћелије код малигно неизмењених ћелија. Повећана експресија активног *Bax*-а који је након идуковања апоптозе локализован у митохондријама и смањена експресија *Bcl-2* протеина у цитосолу ћелија представљају погодне маркере за идентификацију ћелија у апоптози.

Иако антиканцерогени лекови представљају ефикасну терапију за сузбијање малигнитета, примарна или секундарна резистентност канцерогених ћелија на антиканцерогене лекове, као и неселективност лекова према здравим ћелијама најчешћа су нежељена терапијска дејства (230,231). Услед тога, неопходна је синтеза и примена нових антиканцерогених једињења која ће редуковати нежељена дејства.

Природни и синтетисани халкони, као и њихови деривати и аналози представљају биолошки активне супстанце које имају широку примену у лечењу малигнитета. Халкони представљају интермедијере за биолошку синтезу флавоноида са њима сличним хемијским и биохемијским карактеристикама, услед чега своје дејство најчешће испољавају слободним дифундовањем кроз ћелијску мембрану и везивањем за молекул *DNK*. Сходно томе, халкони се својом  $\alpha$ ,  $\beta$  – незасићеном карбонилном групом везују за *N*-терминалну аминок групу гуанина у структури *DNK* молекула чиме остварују свој антитуморски ефекат (232,233).

Сви испитивани халкони у овом истраживању представљају аналоге дехидрозингерона. За разлику од дехидрозингерона који садржи метил групу везану за карбонилни угљеников атом, седам испитиваних халкона (**X1-X7**) садрже изобутил

групу везану за карбонилни угљеников атом и међусобно се разликују по супституисаној функционалној групи на четвртом угљениковом атому ароматичног Б прстена. С обзиром на то да су испитивани халкони синтетисани у лабораторијским условима, *de novo* од ванилина, може се рећи да наши халкони (**X1-X7**) представљају аналоге дехидрозингерона на бази ванилина.

Наиме, први халкон у серији **X1** садржи хидроксилну групу везану за 4. положај ароматичног Б прстена и представља једињење које је *de novo* синтетисано полазећи од ванилина. Остали испитивани халкони у серији једињења (**X2-X7**) синтетисани су супституцијом различитих функционалних група са водониковим атомом халкона **X1** и то: метил групом за **X2**, етил групом за **X3**, изопропил групом за **X4**, пропил групом за **X5**, бутил групом за **X6** и бензил групом за **X7**.

Предмет овог истраживања био је одређивање антитуморских ефекта седам аналога халкона (**X1-X7**) на три врсте туморских ћелија, *HeLa*, *HCT-116* и *MDA-MB-231*, као и ефекта на здраве *MRC-5* ћелије које су коришћене као контролне ћелије. Као контролне супстанце користили смо цисплатину и дехидрозингерон који већ имају потврђен антитуморски ефекат на различите врсте туморских ћелија (221,222).

Први корак у испитивању антитуморског дејства лекова и њиховој потенцијалној примени у медицинске сврхе представља *in vitro* студију испитивања њиховог цитотоксичног ефекта применом МТТ теста.

Како би нека супстанца могла бити потенцијални агенс за лечење малигнитета неопходно је испитати њен ефекат на здравим ћелијама. Сходно томе, неопходно је утврдити да ли су испитивани аналози халкона селективни према здравим ћелијама малигно неизмењеног ткива, и да ли су селективнији према здравим ћелијама у односу на референтне супстанце.

С тим у вези, циљ овог истраживања био је испитивање и упоређивање цитотоксичних ефеката аналога халкона **X1-X7** и референтних супстанци (цисплатине и дехидрозингерона) на здраве хумане фибробласте плућа. Резултати ове студије показали су да сви испитивани халкони **X1-X7** показују високу селективност према *MRC-5* ћелијама током 24 и 48 часовног третмана.

Штавише, током 24 часовне инкубације ћелија халконима **X1-X7** у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  проценат цитотоксичности био је испод 35%, док за двоструко дужи временски период од 48 часова при истој концентрацији испитиваних аналога проценат цитотоксичности је био испод 50%. Израчунате  $IC_{50}$  вредности свих испитиваних аналога халкона након оба временска интервала су у опсегу од 200-300

μM (Табела 1), што указује на то да сви аналози халкона имају назнатан цитотоксични ефекат на здраве хумане фибробласте.

Дехидрозингерон, који представља структурни аналог испитиваних халкона и који је у овом истраживању коришћен као референтна супстанца не показује значајан цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије у испитиваним временским интервалима, где су израчунате  $IC_{50}$  концентрације износиле преко 300 μM. Сви испитивани аналози халкона показују знатно већу селективност према *MRC-5* ћелијама у односу на цисплатину која је коришћена као друга референтна супстанца овог истраживања.

Резултати свих досадашњих истраживања за различите аналоге и деривате халкона нису показали већу селективност према здравим ћелијама у односу на наше испитиване халконе **X1-X7**.

С тим у вези је једно истраживање које су објавили *Tatjana* и сарадници 2018. године (234). Аутори поменутог истраживања испитивали су антитуморско дејство 23 антрахинонска халкона на ћелије хумане леукемије при чему су као контролне здраве ћелије користили хумане фибробласте плућа, *MRC-5*. Резултати истраживања ових аутора показали су да три антрахинонска халкона након 24 часовног третмана испољавају значајан цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије са ниским вредностима  $IC_{50}$  концентрација. Од укупно 23 испитивана антрахинонска халкона, аутори наводе да само три халкона показују селективност према *MRC-5* ћелијама. Овим се потврђују и резултати овог истраживања у коме је показано да аналози халкона не испољавају статистички значајан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама (Табела 1).

Ксантахумол представља један од многобројних природних халкона који је изолован из биљке хмеља (*Humulus lupulus*). Иако представља природни халкон, ксантахумол показује снажнији цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије у односу на наше испитиване халконе. С тим у вези, резултати једног истраживања су показали да Ксантахумол испољава цитотоксичност на *MRC-5* ћелије током 48 часовног третмана са  $IC_{50}$  вредношћу од 149,20 μM (235), док су  $IC_{50}$  вредности наших халкона **X1-X7** током истог третмана знатно више, преко 200 μM.

У следећем истраживању *Maioral* и сарадници (236) испитивали су цитотоксични ефекат синтетисаног халкона означеног као A23 на дванаест туморских ћелијских линија док су као здраве контролне ћелије користили хумане фибробласте плућа *MRC-5*. Резултати истраживања ових аутора показали су да након 24 часовног третмана 100 μM A23 на *MRC-5* ћелије цитотоксичност износила око 50%, док код халкона овог истраживања **X1-X7** цитотоксичност није прелазила 25%. Стога, наши

испитивани халкони **X1-X7** показују знатно већу селективност нпрема *MRC-5* ћелијама у односу на халкон *A23* у истраживању *Maioral* и сарадника.

Након потврде веома високе резистентности *MRC-5* ћелија на наше испитиване халконе **X1-X7** која се огледа у њиховом минималним (незнатном) цитотоксичним ефектима, који су слабији од ефекта скоро свих до сада испитиваних халкона, стекао се услов за испитивање цитотоксичних ефеката халкона **X1-X7** на туморске ћелије цервикса, колона и дојке. Резултати овог истраживања показују да сви халкони на бази ванилина (**X1-X7**) испољавају ефикасане дозно и временски зависне цитотоксичне ефекте на туморске *HeLa* и *HCT-116* ћелије. Ипак, ћелије канцера дојке (*MDA-MB-231*) показују одређен степен резистентности на испитиване аналоге халконе **X1-X7**.

Први тип карцинома код кога је испитиван цитотоксични ефекат халкона (**X1-X7**) је хумани карцином цервикса (*HeLa* – ћелијске линија). Резултати овог истраживања су показали да третмани **X1-X7** на *HeLa* ћелије доводе до значајног повећања цитотоксичности у односу на нетретирание ћелије, као и да је овај ефекат временски и дозно зависан (Слика 1, 2-7).

Цитотоксични ефекат цисплатине за разлику од испитиваних халкона је мањи, док је цитотоксични ефекат друге референтне супстанце, дехидрозингерона, на *HeLa* ћелије сличан је као ефекат испитиваних аналога **X1-X7**.

За разлику од резултата добијених у овом истраживању, аналози халкона (дехидрозингерона) које су синтетисали *Burmudžija* и сарадници (222) испољавали су знатно мање ефикасне цитотоксичне ефекте на *HeLa* ћелије. *Burmudžija* и сарадници синтетисали су десет халкона који се од дехидрозингерона разликују у томе што уместо незасићене двогубе везе садрже циклопропански прстен. Од десет испитиваних халкона у истраживању поменутих аутора, халкон са бензил групом (коју садржи и наш **X7**) показао је најефикаснији цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије. Међутим, израчунате  $IC_{50}$  вредности у истраживању поменутих аутора су 2 до 5 пута веће за троструко дужи временски интервал у односу на наше испитиване аналоге халкона (Табела 1). Такође у истраживању поменутих аутора, цисплатина која је коришћена као референтна супстанца показала је најефикаснији цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије.

У другом истраживању *Sangpheak* и сарадници (237) испитивали су цитотоксичне ефекте три деривата халкона (који садрже супституисане метокси групе на ароматичном Б прстену) на *HeLa* ћелије након 24 часовне инкубације. Три деривата халкона означени су као *3c*, *3d* и *3f* деривати који испољавају значајан цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије. Након 24 часовног третмана наших халкона (**X1-X7**) показало

се да испитивани халкони овог истраживања имају већу цитотоксичност (Табела 1) на *HeLa* ћелије у поређењу са дериватима халкона ових аутора. Међутим, један дериват халкона у истраживању ових аутора који је означен као *3d* испољава цитотоксични ефекат у концентрацији која је у опсегу наших испитиваних халкона (Табела 1).

У следећем истраживању *Zhu* и сарадници (238) испитивали су антитуморске ефекте 14 синтетисаних једињења халкона на *HeLa* ћелије током 48 часова. Наши аналози халкона испољавају значајно ефикаснију цитотоксичност (ниже концентрације) на ћелије цервикса у поређењу са цитотоксичношћу свих халкона у истраживању *Zhu*-а и сарадника.

*Arévalo* и сарадници су у истраживању из 2019. године испитивали цитотоксични ефекат 4-нитрохалкона на *HeLa* ћелије током 24 часовног третмана. Једињење 4-нитрохалкон показало је знатно слабији цитотоксични ефекат, од 5-20 пута мањи у односу на 4-нитрохалкон.

На основу поменутих истраживања можемо закључити да аналози халкона на бази ванилина испољавају знатно снажнији цитотоксични ефекат на ћелије хуманог карцинома цервикса у односу на ефекат многобројних до сада испитаних аналога и деривата халкона. Сходно томе, испитивани халкони овог истраживања могу бити имплементирани као једни од најефикаснијих антиканцерогених терапеутика за лечење карцинома цервикса.

Следећи корак овог *in vitro* истраживања био је испитивање и упоређивање цитотоксичних ефеката испитиваних халкона на ћелије хуманог аденокарцинома колоне (*HCT-116* ћелијска линија). Након 24 и 48 часовног третмана на *HCT-116* ћелије све испитиване супстанце су показале дозно и временско повећање цитотоксичности. Референтна супстанца, дехидрозингерон, показала је ефикаснији цитотоксични ефекат на *HCT-116* ћелије у односу на цисплатину.

Како би установили степен ефикасности испитиваних аналога халкона на *HCT-116* ћелије, осим поређења њиховог цитотоксичног ефекта са ефектима референтних супстанци неопходно је било и поређење њиховог ефекта у односу на друге деривате и аналоге халкона у истраживањима других аутора.

С тим у вези, *Wang* и сарадници (239) су 2019. године испитивали антитуморске активности 32 синтетисана халогена аналога халкона који припадају групи тиенопиримидинских халкона. Од свих испитиваних халкона у истраживању *Wang*-а и сарадника само су три халкона и то након дужег периода инкубације *HCT-116* ћелија била у опсегу  $IC_{50}$  концентрација наших халкона на бази ванилина. Ипак, у поређењу

са халконима овог истраживања, три поменути халкона у истраживању ових аутора не показују селективност према *MRC-5* ћелијама што представља примарни услов за њихову потенцијалну примену као антиканцерогених терапеутика.

У другом истраживању *Han* и сарадници (161) испитивали су антитуморско дејство две серије аналога халкона на *HCT-116* ћелије: прва серија халкона која садржи супституисану 4-оксохиназолин групу уместо ароматичног Б прстена (означена је као серија *3a-c*); и друга серија халкона која садржи супституисану 4-оксохиназолин групу уместо ароматичног А прстена (означена као *6a-c*). Након 72 часовног третмана аналозима халкона ових аутора на *HCT-116* ћелије прва серија халкона (*3a-c*) је испољила ефикаснији цитотоксични ефекат у односу на другу серију халкона (*6a-c*). Од свих халкона прве серије, дванаест халкона имали су цитотоксични ефекат сличан нашим испитиваним халконима али током дужег, 72 часовног третмана.

*Shankaraiah* и сарадници (240) испитивали су цитотоксичне ефекте 24 синтетисана хетероциклична халкона на бази ванилина на *HCT-116* ћелије током 48 часовног третмана. Од свих халкона на бази ванилина у истраживању ових аутора седам халкона је испољило значајне цитотоксичне ефекте. Израчунате  $IC_{50}$  вредности седам хетероцикличних халкона у истраживању *Shankaraiah* и сарадника биле су у складу са  $IC_{50}$  вредностима наших халкона (Табела 1). Такође, резултати истраживања ових аутора показују да два халкона (означена као *4a* и *4b*) имају ефикасније цитотоксичне ефекте у односу на наше аналоге халкона што представља један од ретких резултата свих досадашњих истраживања. Халкони у истраживању *Shankaraiah*-а и сарадника, као и наши аналози халкона, синтетисани су *de novo* од ванилина као полазне супстанце. Кључна разлика у хемијској структури између халкона ових аутора и наших аналога халкона представља: присуство ароматичног А прстена код халкона *Shankaraiah*-а и сарадника, као и присуство пиперидинил, морфолинил, индолинил или тетраhydroхинолинил групе супституисане на Б ароматичном прстену. Такође, већина халкона у серији једињења ових аутора садржи халоген (хлор, бром или флуор) супституисан за ароматични А прстен. На основу анализираних разлике у хемијској структури између халкона *Shankaraiah*-а и сарадника и наших халкона **X1-X7** може се закључити да присуство ароматичног А прстена резултује смањење цитотоксичности халкона на бази ванилина. Такође, присуство халогена који представљају електрон-акцепторску групу додатно резултује смањење цитотоксичности халкона на бази ванилина. Ипак, у погледу на то како хемијска структура халкона на бази ванилина утиче на њихов цитотоксични ефекат, остају

нејасне изразито ниске  $IC_{50}$  вредности халкона означених као 4a и 4b који у својој хемијској структури садрже А прстен и пиперидинил групу уз одсуство халогена.

Стога, на основу других истраживања у којима је испитивана цитотоксичност халкона на *HCT-116* ћелије и поређењем са цитотоксичношћу халкона **X1-X7**, може се закључити да аналоги халкона овог истраживања испољавају ефикасније антитуморске ефекте на ћелије канцера колоне у односу на већину до сада испитиваних аналога и деривата халкона, услед чега наши халкони могу наћи примену као потенцијални агенси за лечење овог малигнитета.

Осим поређења цитотоксичних ефеката халкона у серији аналога на бази ванилина (**X1-X7**) са референтним супстанцама (*cisPt* и *DX3*) на појединачним ћелијским линијама (*HeLa* и *HCT-116*), такође је неопходно упоредити цитотоксичне ефекте свих испитиваних супстанци на *HeLa* ћелије у односу на *HCT-116* ћелије.

Сходно томе, након 24 и 48 часовног третмана на *HeLa* и *HCT-116* ћелије, резултати су показали да су  $IC_{50}$  концентрације шест аналога халкона (**X2-X7**) више за *HeLa* ћелије у односу на *HCT-116* ћелије (Табела 1). Међутим, резултати овог истраживања су показали да и поред ефикасних цитотоксичних ефеката испитиваних халкона **X1-X7** на ћелије карцинома колоне и цервикса, ћелије карцинома дојке (*MDA-MB-231* ћелијска линија) показују одређени степен резистентности. Пет испитиваних халкона овог истраживања испољавали су цитотоксичност  $\geq 50\%$  тек при највишој концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  током 24 часовног третмана на *MDA-MB-231* ћелије. Ипак, цисплатина је испољила најефикаснији цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије у односу на све испитиване супстанце овог истраживања.

Резултати многобројних досадашњих истраживања показали су да су *MDA-MB-231* ћелије резистентне на већину биолошки активних супстанци. С тим у вези, резултати истраживања *Li*-а и сарадника (241) показали су да *MDA-MB-231* ћелије показују резистентност на куркумин који представља димер дехидрозингерона. У истраживању ових аутора након 24 часовног третмана куркумином на *MDA-MB-231* ћелије вијабилност ћелија износила је око 90%, односно проценат цитотоксичности износио је око 10%, што је у складу са резултатима наших аналога халкона на *MDA-MB-231* ћелијама. Штавише, неки аналоги халкона овог истраживања испољили су ефикаснији цитотоксични ефекат у односу на куркумин у истраживању *Li*-а и сарадника.

У другом истраживању испитиван је цитотоксични ефекат синтетисаног халкона на *MDA-MB-231* ћелије који у својој хемијској структури садржи ароматични



прстен који је кондензован са ароматичним Б прстеном халкона (236). Резултати истраживања показали су да су израчунате  $IC_{50}$  вредности синтетисаног халкона током 24 часовног третмана у складу са резултатима наших аналога, док након 48 часовног третмана синтетисани халкон испољава ефикаснији цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије у односу на наше испитиване халконе **X1-X7**. Ипак, цитотоксични ефекат синтетисаног халкона на *MDA-MB-231* ћелије био је мање ефикасан у односу на остале ћелијске линије у истраживању ових аутора: *K562* – хронична мијелоидна леукемија, *Kasumi* – акутна мијелоидна леукемија, *Jurkat* – акутна Т лимфоцитна леукемија, *CEM* – акутна лимфобластна леукемија, *HL-60* – акутна промијелоцитна леукемија, *U-937* – хумана мијелоидна леукемија, *MM.1S* – Б лимфобластна леукемија, *HT-29* – хумани аденокарцином колона, *A549* – хумани карцином плућа и *HeLa* – хумани карцином цервикса.

У следећем истраживању, *Yunyun Di* и сарадници (242) испитивали су цитотоксични ефекат лигнана изолованих из ланеног семена (секо-изоларициресинола и ентеролактона) на *MDA-MB-231* ћелије. Лигнани се од халкона разликују по томе што у својој хемијској структури уместо  $\alpha$ ,  $\beta$  незасићене карбонилне групе садрже дихидроксилни алкохол или тетрагидрофурански прстен. Према овоме, секо-изоларициресинол у својој хемијској структури садржи бутан-1,4-диол, док ентеролактон садржи тетрагидрофурански прстен. Аутори овог истраживања испитивали су да ли и у коликој мери комбиновани третман лигнана са карбоплатином и доксорубицином испољава ефикаснији цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије у односу на појединачне третмане. Међутим, резултати појединачних третмана секо-изоларициресинола и ентеролактона на *MDA-MB-231* ћелије показали су да ћелије карцинома дојке показују резистентност на лигнани и сагласно је са резултатима ове студије. Према овоме, освртом на хемијску структуру лигнана и на основу резултата истраживања ових аутора може се претпоставити да ароматични А и Б прстенови халкона немају утицај на антитуморски ефекат код *MDA-MB-231* ћелија. Међутим, резултати истраживања *Tatjane* и сарадника (243) показали су да халкони који садрже тиофенски прстен уместо ароматичног А прстена испољавају значајан цитотоксични ефекат на *MDA-MB-231* ћелије, где су израчунате  $IC_{50}$  вредности биле 5-20 пута ниже у односу на наше халконе.

Различита активност халкона у поменутих истраживањима указује на то да поједине функционалне групе у структури халкона и дехидрозингерона значајно утичу

на њихову биолошку активност. Наиме, *Tuong-Ha Do* и сарадници (244) су на основу прегледа литературе од 2007. до 2014. године представили однос хемијске структуре и активности халкона. Прегледом литературе, ови аутори су установили да супституисана хидрокси, метокси или метилендиокси група на ароматичном А прстену утиче на антиканцерогену активност халкона.

Међутим, дехидрозингерон, који представља аналог наших халкона **X1-X7** не садржи ароматични А прстен у својој хемијској структури. С тим у вези, *Hampannavar* и сарадници (221) су 2016. године објавили како различите функционалне групе дехидрозингерона утичу на његову биолошку активност. На пример, присуство метокси- и хидрокси-групе на ароматичном Б прстену омогућава анти-оксидативну активност дехидрозингерона, док остали делови молекула доприносе поменутом ефекту. Исто тако, дехидрозингерон испољава значајну анти-инфламаторну активност, где замена метил групе која је везана за С-атом карбонилне групе са ди-етил или ди-метил групама узрокује повећање анти-инфламаторне активности (наши халкони **X1-X7** садрже изобутил групу). Такође,  $\alpha$ ,  $\beta$  – незасићена карбонилна група заслужна је за анти-мутагено дејство дехидрозингерона. Стога, може се претпоставити да присуство ароматичног А прстена халкона није неопходно за биолошку активност халкона.

На основу досадашњих истраживања поуздано се може рећи да наши испитивани халкони **X1-X7** имају ефикаснији антитуморски ефекат у односу на ефекте већине до сада синтетисаних и изолованих халкона. С тим у вези, антитуморска активност наших халкона огледа се у њиховим веома ниским концентрацијама које су довољне за постизање ефикасног цитотоксичног ефекта на канцерогене ћелије (првенствено туморске ћелије цервикса и колона), као и веома високе концентрације наших халкона које имају минимални ефекат на здраве ћелије фибробласта. На пример, применом 100-150  $\mu\text{M}$  **X1-X7** на *HeLa* и *HCT-116* ћелије постиже се цитотоксичност од преко 90%, док истовремено поменута доза лека испољава незнатан ефекат на здраве *MRC-5* ћелије. Према томе, резултати цитотоксичности испитиваних аналога халкона који су утврђени МТТ тестом могу имати веома значајан допринос у проналажењу ефикаснијих анти-канцерогених агенса у односу на досадашње лекове.

Ипак, цитотоксични ефекат неког лека представља параметар који показује да је дошло до смрти ћелија али не одређује на који начин је до тога дошло, односно не одређује тип ћелијске смрти. Како би неки лек имао примену као ефикасни антиканцерогени агенс неопходно је утврдити који тип ћелијске смрти је доминантан (апоптоза и/или некроза). Када се говори о неком антиканцерогеном агенсу од

пресудне је важности да ли тај агенс индукује неки од типова програмиране ћелијске смрти (апоптоза, аутофагија, некроптоза и други) или индукује некрозу туморских ћелија.

За разлику од програмиране ћелијске смрти која је строго регулисан процес, некроза представља енергетски независан и неконтролисани облик ћелијске смрти који настаје као узрок хипоксије или инфламације. Процес некрозе често је праћен повећаном продукцијом про-инфламаторних протеина који узрокују нарушавање интегритета ћелијске мембране и ослобађање ћелијског садржаја у околна ткива што последично резултује каскаду инфламаторних цитокина и оштећење ткива. Међутим, процес програмиране ћелијске смрти, за разлику од некрозе, представља строго контролисан и енергетски зависан процес који подразумева низ биохемијских и морфолошких карактеристика које постепено доводе до смрти ћелије без ослобађања ћелијског садржаја у околна ткива. Најпознатији облик програмиране ћелијске смрти је апоптоза за коју се дуго сматрало да представља једини облик контролисане смрти ћелија. Апоптозу карактерише низ морфолошких (кондензација хроматина, фрагментација једарног *DNK* молекула, скупљање ћелије, бубрење ћелијске мембране и губитак адхезије са суседним ћелијама) и биохемијских (екстернализација фосфатидилсерина и активирање каспаза) промена које доводе до стварања „апоптотских тела“ која бивају одстрањена од стране макрофага чиме не долази до ослобађања ћелијског садржаја у околна ткива и њиховог оштећења. Пошто је једна од најзначајнијих карактеристика туморских ћелија способност инхибиције апоптозе, основни циљ досадашњих и будућих истраживања заснива се на проналажењу агенаса који индукују апоптозу туморских ћелија (53–56,61,66,68,69).

С тим у вези, следећи корак овог истраживања био је се испита који тип ћелијске смрти индукују испитивани аналози халкона, односно који тип ћелијске смрти у највећој мери доприноси ефикасној цитотоксичности халкона **X1-X7**. Апоптотични ефекат процењен је након 48 часовног третмана у концентрацијама испитиваних халкона и референтних супстанци које резултују 50% повећања цитотоксичности ( $IC_{50}$  концентрације) на *HeLa* и *HCT-116* ћелије употребом проточне цитометрије (*flow*) коришћењем протеина *Annexin V-FITC* и *7-AAD*.

Резултати овог истраживања показали су да примена концентрације халкона **X1-X7** која одговара  $IC_{50}$  вредностима повећава проценат апоптотичних *HeLa* ћелија у поређењу са контролом, уз незнатан проценат некротичних ћелија. Повећање процента апоптотичних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране ћелије указује на то да апоптоза

представља доминантан тип ћелијске смрти индукован од стране испитиваних халкона (Слика 21).

Резултати овог истраживања су у складу са резултатима који су добијени у истраживањима других аутора. У једном истраживању испитиван је цитотоксични и апоптотични ефекат два једињења халкона супституисана са рутенијум (II) комплексом (рутенијум-халкон) (245). Рутенијум-халкон комплекси у истраживању *Jovanović* и њених сарадника (245) садрже халконе као лиганде који су везани за 4. координационо место рутенијума који садржи три диметил-сулфоксидне групе. Биолошки активна једињења у истраживању ових аутора повећавају цитотоксичност *HeLa* ћелија путем индуковања апоптозе што је сагласно са резултатима ове студије. Такође, највећи проценат апоптотичних ћелија након третмана рутенијум-халкон комплекса био је у стадијуму ране апоптозе уз незнатан број некротичних ћелија, што је у складу са нашим резултатима након третмана халкона **X1-X7** на *HeLa* ћелије.

У другом истраживању *Xuan* и сарадници (246) испитивали су антитумоско дејство и механизам деловања природног халкона Изоликирителигенина (енгл. *Isoliquiritigenin*) који је присутан у воћу и поврћу. Резултати истраживања ових аутора су показали да Изоликирителигенин испољава ефикасан цитотоксичан и апоптотичан ефекат на *HeLa* ћелије, при чему индукција апоптозе у туморским ћелијама од стране овог халкона у највећем проценту доприноси његовој цитотоксичности, што је у складу са резултатима наших испитиваних халкона **X1-X7**.

Још један природан халкон, Ликохалкон А присутан је у корену слатког лука (*Glycyrrhiza inflata Batalin*) који се користи у кинеској традиционалној медицини и испољава ефикасан антитуморски ефекат на различите туморске ћелије (247). Резултати истраживања *Jen-Pi Tsai*-а и сарадника (247) показали су да Ликохалкон А повећава цитотоксичност *HeLa* ћелија путем индукције апоптозе што је у сагласности са апоптотичним ефектом испитиваних аналога халкона овог истраживања.

У следећем истраживању *Su Hyun Hong*-а из 2019. године (248), резултати су показали да Ликохалкон А испољава ефикасан антитуморски ефекат на канцерогене ћелије бешике (*T24* ћелијска линија) путем индукције апоптозе која представља главни узрок цитотоксичности поменутих туморских ћелија. Поред поменутих истраживања, Ликохалкон А испољава значајан антитуморски ефекат на *H460*, *A549*, *HOS*, *MG-63*, *MDA-MB-231* ћелије (249–251).

Након утврђивања ефикасног апоптотичног ефекта **X1-X7** на *HeLa* ћелије, у следећем кораку овог истраживања, методом *Annexin V-FITC/7-AAD* проточне

цитометрије, утврђено је да примена концентрације која доводи до 50% повећања цитотоксичности **X1-X7** резултује повећањем процента апоптотичних *HCT-116* ћелија у односу на нетретиране ћелије, док је проценат некротичних ћелија био незнатан (Слика 22). Сходно резултатима који показују висок проценат апоптотичних ћелија, халкони **X1-X7** индукује апоптозу у *HCT-116* ћелијама која представља доминантан тип ћелијске смрти.

У истраживању *Hao Jin* и сарадници (179) испитивали су антитуморску активност механизам деловања већ поменутог природног халкона Изоликвиритигенина. Резултати истраживања ових аутора показали су да овај природни халкон испољава значајан цитотоксични ефекат путем индукције апоптозе у *HCT-116* ћелијама (смањење вијабилности *HCT-116* ћелија како је приказано у истраживању. Сходно томе, резултати истраживања *Hao Jin* и сарадници (179) су у складу са резултатима наших аналога халкона. Такође, на основу доступних литературних података установљено је да Изоликвиритигенин индукује апоптозу у туморским ћелијама и цервикса и колона (као и испитивани халкони овог истраживања), захваљујући његовој хемијској структури (193,252–254). Кључна разлика између Изоликвиритигенин и халкона **X1-X7** је у томе што уместо резорцинола који представља А прстен овог природног халкона аналози халкона имају супституисану изобутил групу за карбонилни С-атом. С тим у вези, освртом на веома сличну хемијску структуру између Изоликвиритигенина и халкона **X1-X7**. Међутим, ефикаснији цитотоксични и апоптотични ефекат испитиваних халкона овог истраживања огледа се у одсуству резорцинолског прстена који може да прави мале стерне сметње са суседним молекулима након дифундовања у ћелије тумора.

У истраживању *Han*-а и сарадника (161) већ је поменуто да су резултати цитотоксичних ефеката дванаест халкона који садрже супституисану 4-оксохиназолин групу на *HCT-116* ћелије у сагласности са цитотоксичним ефектима халкона овог истраживања. Један 4-оксохиназолин-халкон који је означен са *3f* испољио је најефикаснији цитотоксични ефекат карцином колона у односу на остале халконе са  $IC_{50}$  вредношћу која је слична са вредностима овог истраживања. Резултати истраживања *Han*-а и сарадника су показали да халкон *3f* испољава цитотоксични ефекат на *HCT-116* ћелија путем индукције апоптозе, што је у складу са халконима овог истраживања, али је за разлику од третмана халкона **X1-X7** овог истраживања највећи проценат ћелија био у стадијуму касне апоптозе.

Поред поменутих истраживања, халкони које су синтетисали и чији су антитуморски ефекат испитивали други аутори у својим истраживањима: *Li* и сарадници (255); *Dong* и сарадници (256); *Romagnoli* и сарадници (257); *Saavedra* и сарадници (258); *Teng* и сарадници (259); *Gil* и сарадници (260); *Kamal* и сарадници (261); *Ayati* и сарадници (263); и *Marquina* и сарадници (191), резултовали су да је повећање цитотоксичности халкона узроковано индукцијом апоптозе како за *HeLa* и *HCT-116* ћелије тако и за друге туморске ћелије: хумани хепатоцелуларни карцином (*Bel 7402*, *SMMC 7721* и *HepG2* ћелијске линије); карцином плућа (*H460* и *A549* ћелијске линије); мијелоидне леукемије (*U-937* и *K562* ћелијске линије); карцином дојке (*MDA-MB-231* и *MCF-7* ћелијске линије); и карцином простате (*PC-3* ћелијска линија) што је у сагласности са резултатима овог истраживања.

Након утврђивања ефикасног цитотоксичног и апоптотичног ефекта халкона **X1-X7**, следећи циљ овог истраживања био је да се утврди активациони пут преко кога испитивани халкони индукују апоптозу у туморским *HeLa* и *HCT-116* ћелијама. Наиме, постоје два главна активациона пута преко којих апоптоза може бити индукована: спољашњи апоптотски пут – преко рецептора смрти и унутрашњи (митохондријални) апоптотски пут – пут посредством митохондрија.

Резултати овог истраживања показали су да све испитиване супстанце (аналози халкона **X1-X7**, *cisPt* и *DX3*) индукују апоптозу активирањем митохондријалног апоптотског пута. Кључни протеини који имају улогу у активирању митохондријалног апоптотског пута представљају протеине који припадају *Bcl-2* групи протеина. Митохондријални апоптотски пут активира се као последица нарушене равнотеже између експресије анти-апоптотичних протеина као што је *Bcl-2* протеин и про-апоптотичних протеина као што је *Bax* протеин. Наиме, деловање неког апоптотског стимулуса, као што су наши аналози халкона, доводи до смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у цитосолу ћелија и повећане експресије и активности про-апоптотичног *Bax* протеина. Активни *Bax* протеин формира поре на спољашњој митохондријалној мембрани и дифундује у унутрашњост митохондрија. Кроз формиране поре у спољашњој митохондријалној мембрани дифундују про-апоптотични протеини, као што је цитохром *c* из интрамембранског простора митохондрија у цитосолу ћелије што доводи до формирања апоптозома, активирања каспазе-9 и сукцесивно до активирања егзекуторне каспазе-3.

С тим у вези, за испитивање механизма деловања путем активирања митохондријалног апоптотског пута у туморским ћелијама након деловања

испитиваних аналога халкона неопходно је одређивање експресије и локализације регулаторних апоптотских протеина анти-апоптотичног *Bcl-2*, про-апоптотичног активног *Bax*-а и егзекуторне каспазе-3.

Експресија регулаторних протеина апоптозе утврђена је након 24 часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога халкона на *HeLa* и *HCT-116* ћелије употребом методе проточне цитометрије и имунофлуоресцентне микроскопије.

Резултати овог истраживања показују да сви испитивани аналози халкона узрокују смањење експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина у цитосолу ћелије, повећање експресије про-апоптотичног активног *Bax* протеина у митохондријама код *HeLa* ћелија које су биле третиране халконима **X1-X7** у поређењу са контролним ћелијама цервикса (Слика 24А и Б). Такође, сви испитивани аналози халкона узрокују смањење *Bcl-2/Bax* односа за третиране *HeLa* ћелије у поређењу са контролном групом *HeLa* ћелија које нису биле третиране халконима (Слика 25). Сходно томе, резултати овог истраживања показали су да испитивани халкони **X1-X7** резултују повећање експресије егзекуторне каспазе-3 у третираним *HeLa* ћелијама у односу на нетретиране ћелије (Слика 24Ц). Такође, метода имунофлуоресцентне микроскопије омогућила је потврду да три структурно различита испитивана халкона, **X1**, **X5** и **X7** резултују смањену експресију *Bcl-2* протеина и повећану експресију поменуте активне каспазе и активног *Bax*-а у *HeLa* ћелијама у поређењу са ћелијама цервикса које нису биле третиране. При томе, промена у експресији регулаторних протеина апоптозе употребом имунофлуоресцентне микроскопије код третираних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране ћелије били су у складу са резултатима добијеним употребом проточне цитометрије (Слике 26-28).

Такође, резултати овог истраживања су показали да испитивани халкони **X1-X7** доводе до смањене експресије анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина, повећане експресије про-апоптотичног активног *Bax*-а и повећане експресије егзекуторне активне каспазе-3 у *HCT-116* ћелијама у поређењу са контролним ћелијама (Слика 30). Такође, сви испитивани аналози халкона узрокују смањење односа *Bcl-2/Bax* код *HCT-116* ћелија у односу на контролу (Слика 31). Као и за *HeLa* ћелије, метода имунофлуоресцентне микроскопије омогућила је потврду да три структурно различита испитивана халкона, **X1**, **X5** и **X7** резултују смањену експресију *Bcl-2* протеина и повећану експресију активног *Bax*-а, као и повећану експресију егзекуторне каспазе-3 код *HCT-116* ћелија у односу на контролне ћелије колоне које нису биле подвргнуте третману (Слике 32-34).

Резултати овог истраживања који показују да испитивани халкони индукују апоптозу карцинома цервикса и колоне путем активирања митохондријалног апоптотског пута, у складу су са резултатима истраживања других аутора (161,239,262–265).

У истраживању, Wang и сарадници (239) испитивали су антитуморско дејство и механизам деловања синтетисаних тиено-пиримидинских халкона. Резултати истраживања ових аутора показали су да један тиено-пиримидински халкон, означен као 8d индукује апоптозу HCT-116 ћелија путем активације митохондријалног апоптотског пута. Сходно томе, резултати истраживања Wang-а и сарадника показали су да халкон 8d на дозно зависан начин повећава експресију и активност иницијаторне каспазе-9 и ефекторних каспаза-3 и -7, што је у сагласности са резултатима овог истраживања у смислу повећања експресије и активности егзекуторне каспазе-3 у HCT-116 ћелијама.

Резултати другог истраживања су показали да хиназолинонски дериват халкона показује свој антитуморски ефекат на HCT-116 ћелије индуковањем апоптозе туморских ћелија путем активирања митохондријалног апоптотског пута (264). У истраживању ових аутора, третман хиназолинонског халкона довео је до значајног смањења *Bcl-2/Bax* односа, односно значајно је смањењо експресију анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина и значајно повећао експресију про-апоптотичног *Bax* протеина третираних HCT-116 ћелија у поређењу са контролним туморским ћелијама, што је у сагласности са резултатима ове студије. Такође, како промена *Bcl-2/Bax* односа доводи до активирања митохондријалног апоптотског пута и на крају активирања егзекуторне каспазе-3, резултати истраживања ових аутора показали су значајно повећање експресије каспазе-3 третираних HCT-116 ћелија у односу на нетретиране ћелије. Повећање експресије и активности каспазе-3 у истраживању ових аутора у складу је са резултатима овог истраживања за наше испитиване аналоге X1-X7.

У следећем истраживању Zhang и сарадници (265) испитивали су антитуморски ефекат полифенолног једињења, 3,4,20,40-тетрахидроксихалкона (бутеина) у односу на цисплатину на ћелије карцинома цервикса (*HeLa*). Резултати истраживања Zhang и сарадника показују да комбиновани третман бутеина и цисплатине резултује смањење нивоа анти-апоптотичног *Bcl-2* и повећање нивоа про-апоптотичног *Bax*-а у *HeLa* ћелијама у односу на њихове појединачне третмане. Повећана експресија регулаторних протеина апоптозе након третмана бутеина на *HeLa* ћелије у сагласности је са



результатима овог истраживања. На основу резултата ових аутора може се закључити да бутеин индукује апоптозу *HeLa* ћелија путем активирања митохондријалног апоптотског пута, а такође у комбинованом третману са цисплатином резултује ефикаснији цитотоксични и апоптотични ефекат цисплатине.

Такође, аутори других истраживања су објавили да бутеин индукује апоптозу у туморским ћелијама јајника (*ES-2* и *TOV-21G* ћелијске линије) (266) и цервикса (*C-33A* и *SiHa* ћелијске линије) (267) путем активације митохондријалног апоптотског пута. Третман бутеина на поменуте туморске ћелије довео је до повећања експресије *Bax*-а и каспазе-3, као и значајног смањења експресије *Bcl-2* протеина третираних туморских ћелија у поређењу са контролом, што је сагласно резултатима ове студије за наше испитиване халконе **X1-X7**.

Осим поменутих истраживања у којима бутеин индукује апоптозу путем активирања митохондријалног апоптотског пута у различитим туморским ћелијама, и халкони других аутора имају исти механизам деловања на различите врсте туморских ћелија: Ликохалкон А у туморским ћелијама мокраћне бешике (*T24* ћелијска линија) (248); нафтилхалкон у ћелијама акутне леукемије (*K562* и *Jurkat* ћелијске линије) (236,268); два синтетисана халкона у истраживању *Ramirez-Tagle* и сарадника у ћелијама хепатоцелуларног карцинома (*HepG2* ћелијска линија) (269); Ликохалкон Б у ћелијама сквамозног карцинома (*HN22* и *HSC4* ћелијске линије) (270).

Иако активирање митохондријалног апоптотског пута представља примарни механизам деловања халкона на туморске ћелије, ова биолошки активна једињења у мањој или већој мери свој ефекат остварују активирањем спољашњег апоптотског пута или активирањем оба сигнална апоптотска пута (179,270–273)

Резултати *Romagnoli* и сарадника (257) показали су да хибридни дериват халкона показује значајан цитотоксични ефекат на ћелије хумане леукемије (*U937* ћелијска линија) путем индукције и спољашњег и унутрашњег апоптотског пута. Аутори овог истраживања одређивали су експресију активних каспаза, каспазе-9, -8, -3 и -6 у халконима третираним *U937* ћелијама где су резултати показали повећану активност ових каспаза у односу на контролне, нетретиране.

У другом истраживању које су вршили *Winter* и сарадници (272) испитиван је механизам деловања три нафтил-халкона на ћелије мишје лимфоцитне леукемије – *L1210* ћелијска линија. Резултати *Winter*-а и сарадника показали су да третман нафтил-халкона на поменуте туморске ћелије узрокује повећање експресије и активности иницијаторних каспаза-8 и -9 и ефекторне каспазе-3 што сукцесивно доводи до

активирања и спољашњег и унутрашњег апоптотског пута. Резултати експресије регулаторних протеина апоптозе у истраживању ових аутора показали су да два нафтил-халкона узрокују смањење експресије *Bcl-2* и *p53* протеина и повећање експресије *Fas* лиганда.

Међутим, један од нафтил-халкона узроковао је смањење експресије *p53* протеина и повећање експресије *Fas* лиганда, док је експресија *Bcl-2* протеина била непромењена у односу на нетретирани хелије. Према томе, два нафтил-халкона индуковала су апоптозу у *L1210* хелијама активирањем и спољашњег и унутрашњег апоптотског пута, док је један нафтил-халкон индуковао апоптозу туморских хелија активирањем искључиво спољашњег апоптотског пута. Такође, у истраживању *Winter*-а и сарадника аутора три нафтил-халкона у *L1210* хелијама узроковала су повећану концентрацију калцијума и активност каспазе-12 што је сукцесивно резултовало активирањем апоптозе путем ендоплазматичног ретикулума.

Иако апоптоза представља примарни тип хелијске смрти индукован од стране халкона, многобројни халкони индукују аутофагију туморских хелија (247,274–278).

Аутофагија представља генетски контролисан тип хелијске смрти где долази до разградње оштећених цитосолних компоненти у лизозомима хелије у циљу одржавања хомеостазе хелија. Ипак, аутофагија не представља самосталан процес програмиране хелијске смрти, већ представља механизам који је укључен у друге механизме хелијске смрти, као што је апоптоза. Досадашња истраживања показала су да многобројни деривати и аналози халкона индукују и апоптозу и аутофагију у различитим типовима туморских хелија.

У једном истраживању испитиван је антитуморски ефекат Ксантоангелола на хелије хепатоцелуларног карцинома (*Hep3B* и *Huh7* хелијске линије) (279). Ксантоангелол представља прениловани природни халкон који је изолован из јапанске биљке *Angelica keiskei Koidzumi*. Резултати истраживања *Yang*-а и сарадника (279) показали су да Ксантоангелол испољава значајан цитотоксични ефекат на *Hep3B* и *Huh7* хелије индукцијом аутофагије у туморским хелијама. Аутори овог истраживања испитивали су експресију регулаторних протеина аутофагије, *LC3B* (-I и -II), *p62* и *Beclin-1* протеина, где су резултати истраживања показали значајно повећање експресије поменутих аутофагних протеина у третираним *Hep3B* и *Huh7* хелијама у односу на нетретирани хелије.

С тим у вези, следећи циљ овог истраживања био је да се утврди у ком степену аутофагија доприноси цитотоксичности испитиваних аналога халкона на *HeLa* и *HCT-116* ћелије, који свој цитотоксични ефекат остварују путем индуковања апоптозе.

Након 24 часовне култивације *HeLa* и *HCT-116* ћелије  $IC_{50}$  концентрацијама испитиваних аналога и референтних супстанци додат је 20  $\mu$ M хлорокин (CQ) – инхибитор аутофагије. Допринос аутофагије процењен је употребом *Annexin V-FITC/7-AAD* проточне цитометрије. Резултати овог истраживања су показали да за халконе **X2** (етокси група) и **X6** (бутокси група) инхибиција аутофагије у *HeLa* ћелијама значајно доводи до смањења апоптозе индуковане од стране ових халкона (за **X2** од 10,43% и за **X6** од 12,89%), односно инхибиција аутофагије доводи до смањења цитотоксичног ефекта халкона **X2** и **X6** на *HeLa* ћелије. Ипак, инхибиција аутофагије у *HeLa* ћелијама за остале испитиване халконе, *cisPt* и *DX3* није имала значајан ефекат на њихову цитотоксичност.

Међутим, након третмана свих испитиваних супстанци на *HCT-116* ћелије, резултати овог истраживања показују да је за четири халкона **X1-X4** аутофагија у значајној мери допринела њиховој цитотоксичности (процент апоптотичних ћелија након CQ третмана је смањен од 15,37 до 36,27%). Ипак, инхибиција аутофагије у *HCT-116* ћелијама за остале испитиване халконе и *DX3* није имала значајан ефекат на њихову цитотоксичност, док је инхибиција аутофагије у значајној мери смањила цитотоксичности *cisPt* на *HCT-116* ћелије.

Резултати досадашњих истраживања других аутора показали су да је процес аутофагије укључен у процес апоптозе индуковане од стране многобројних аналога и деривата халкона. Резултати једног таквог истраживања показали су да Флавокаваин *B* који представља природни халкон изолован из биљке *kava*, испољава ефикасан цитотоксични ефекат на хумане ћелије глиобластома (*U-251*, *U-87* и *T98-G* ћелијске линије) при чему индукује и апоптозу и аутофагију у туморским ћелијама (280). Тачније, резултати истраживања ових аутора показали су да аутофагија значајно доприноси цитотоксичности Флавокаваина *B* на хумане ћелије глиобластома. Један од екперимената у истраживању ових аутора био је ко-третман хлорокина и Флавокаваина *B* где су резултати истраживања показали да комбиновани третман испољава ефикаснији цитотоксични и апоптотични (и/или аутофагични) ефекат на *U-251* ћелије.

У другом истраживању које су објавили *Shen* и сарадници (249) 2019. године, Ликохалкона *A* испољава ефикасан цитотоксични ефекат на хумане ћелије остеосаркома (*HOS* ћелијска линије) путем индуковања апоптозе и аутофагије

туморских ћелија. Резултати истраживања ових аутора показали су да комбиновани третман Ликохалкона А и хлорокина довели до значајне промене вијабилности *HOS* ћелија у односу на њихове појединачне третмане. Такође, резултати поменутог комбинованог третмана на *HOS* ћелије узроковао је значајно смањење (око 50%) процента апоптотичних ћелија у односу на третман Ликохалкона А пре додавања хлорокина што је сагласно нашим испитиваним халконима **X1-X7** ове студије.

У следећем истраживању, резултати су показали да је комбиновани третман Изобавахалкона и хлорокина на *U-937* ћелије довео до значајног смањења цитосолне вакуолизације што последично доводи до промене процента вијабилних ћелија у односу на појединачне третмане Изобавахалкона и хлорокина што је сагласно са резултатима ове студије (281).

## 6. Закључак

Различити антитуморски ефекти аналога халкона на три различите врсте туморских ћелија огледа су у експримирању различитих молекула у туморским ћелијама. Такође, сматра се да разлике антитуморских ефеката између **X1-X7** на једној врсти ћелија могу бити последица присуства различитог супституента на четвртом *S*-атому ароматичног *B* прстена.

Исто тако, услед ефикаснијег антитуморског дејства наше серије синтетисаних халкона који не садрже *A* ароматични прстен у односу на већину до сада испитиваних халкона са оба ароматична прстена, улога *A* ароматичног прстена у механизму деловања халкона није још увек детаљно утврђена.

Услед поменутих претпоставки неопходно је детаљно испитати механизам деловања халкона **X1-X7** на појединачне туморске ћелијске линије, пре свега са освртом на њихову хемијску структуру.

На основу анализираних резултата овог истраживања, аналози халкона на бази ванилина **X1-X7** испољавају снажне антитуморске ефекте на канцерогене ћелије колона и цервикса.

Своје антитуморске ефекте, халкони **X1-X7** испољавају путем индуковања апоптозе у туморским ћелијама што узрокује њихов ефикасан цитотоксични ефекат.

Такође, на повећање цитотоксичног ефекта неких халкона у серији ових аналога утиче индукција аутофагије у туморским ћелијама која доприноси повећању процента апоптотичних ћелија.

Поред овога, аналози халкона **X1-X7** показују изразиту селективност према здравим ћелијама, која је ефикаснија од халкона досадашњих истраживања која су прегледана.

С тим у вези, значајност високе селективности халкона **X1-X7** на здраве ћелије представља битан предуслов за даља испитивања њиховог антитуморског ефекта и механизма деловања на друге ћелијске линије, као и *in vivo* истраживања на животињским моделима.

## 7. Литература

1. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 2012;360.
2. Berman JJ. Tumor classification: molecular analysis meets Aristotle. 2004;4(10):1-9.
3. Yang J, Ren Z, Du X, Hao M, Zhou W. The role of mesenchymal stem/progenitor cells in sarcoma: update and dispute. *Stem cell investigation*. 2014;1:1-9.
4. Rastogi S, Agarwal A, Shishak S, Barwad A, Dhamija E, Pandey R, et al. Discordance of Histo-pathological Diagnosis of Patients with Soft Tissue Sarcoma Referred to Tertiary Care Center. 2019;4(4):119-23.
5. Nakamura T, Nakata K, Hata S, Ono K, Katsuyama T. Histochemical characterization of mucosubstances in synovial sarcoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1984;8(6):429-34.
6. Covut F, Driscoll JJ, Cooper B, Gallogly M, De Lima M, Malek E. Racial and age-related disparities in early mortality affect the outcomes of multiple myeloma patients *Letter*. 2020;1-5.
7. Lynch HT, Thomé SD. Familial multiple myeloma. *Blood*. 2009;114(4):749–50.
8. Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Progress in Tumor Research*. 2016;43:87–100.
9. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cells lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 2002;346(25):1937-47.
10. Wang C, Li L, Fu D, Qin T, Ran Y, Xu F, et al. Discovery of chalcone-modified estradiol analogs as antitumour agents that Inhibit tumour angiogenesis and epithelial to mesenchymal transition. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;176:135-48.
11. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
12. Papin JA, Hunter T, Palsson BO, Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(2):99–111.
13. Brown RL. Cancer Prevention. *WHO Chron*. 1964;18:323–7.
14. Belikov A V. The number of key carcinogenic events can be predicted from cancer incidence. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–8.
15. Croce CM. Oncogenes and cancer. supplementary appendix. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502–11.

16. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769–73.
17. Balaguer F, Link A, Lozano JJ, Cuatrecasas M, Nagasaka T, Boland CR, et al. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010;70(16):6609–18.
18. Fang B. RAS signaling and anti-RAS therapy: Lessons learned from genetically engineered mouse models, human cancer cells, and patient-related studies. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2015;48(1):27–38.
19. Al-Ghamdi S, Albasri A, Cachat J, Ibrahim S, Muhammad BA, Jackson D, et al. Cten Is Targeted by Kras Signalling to Regulate Cell Motility in the Colon and Pancreas. *PLoS ONE*. 2011;6(6):1-8.
20. Fecteau RE, Lutterbaugh J, Markowitz SD, Willis J, Guda K. GNAS Mutations Identify a Set of Right-Sided, RAS Mutant, Villous Colon Cancers. *PLoS ONE*. 2014;9(1):1-5.
21. Kosik A, Bekier ME, Katusin JD, Kaur H, Zhou X, Diakonova M, et al. Investigating the role of aurora kinases in RAS signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009;106(1):33–41.
22. Delire B, Stärkel B. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *Eur J Clin Invest*. 2015;45(6):609–623.
23. Gupta YP, Grabocka E, Sagi DB. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2013;11(11):761–774.
24. Stramucci L, Pranteda A, Bossi G. Insights of crosstalk between p53 protein and the MKK3/MKK6/p38 MAPK signaling pathway in cancer. *Cancers*. 2018;10(5):1-10.
25. Gu J, Spitz MR, Zhao H, Lin J, Grossman HB, Dinney CP, et al. Roles of tumor suppressor and telomere maintenance genes in cancer and aging—an epidemiological study. *Carcinogenesis*. 2005;26(10):1741-47.
26. Lehman TA, Reddel R, Pfeifer AMA, Spillare E, Kaighn ME, Weston A, et al. Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. *Environmental Health Perspectives*. 1991;93:133-44.
27. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, et al. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. 2009;16:1-12.
28. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749-58.
29. Cox ML, Meek DW. Phosphorylation of serine 392 in p53 is a common and integral event during p53 induction by diverse stimuli. *Cellular Signalling*. 2010;22:564-71.

30. Luff SA, Kao CY, Papoutsakis ET. Role of p53 and transcription-independent p53-induced apoptosis in shear-stimulated megakaryocytic maturation, particle generation, and platelet biogenesis. *PLoS ONE*. 2018;13(9):1-25.
31. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria. *Molecular Cell*. 2003;11:577-90.
32. Yang Y, Uzunbas GK, Perez LP, Sawant A, Hu ZS, Zhao Y, et al. Autophagy promotes mammalian survival by suppressing oxidative stress and p53. *GENES & DEVELOPMENT*. 2020;34:1–13.
33. He Y, Wang Z, Hu Y, Yi X, Wu L, Cao Z, et al. Sensitive, Selective Monitoring of DNA Damage-Induced Intracellular p21 Protein and Unraveling the Role of p21 Protein in DNA Repair and Cell Apoptosis by Surface Plasmon Resonance. *Royal Society of Chemistry*. 2020;00:1-8.
34. Gao J, Xia R, Chen J, Gao J, Luo X, Ke C, et al. Inhibition of esophageal-carcinoma cell proliferation by genistein via suppression of JAK1/2-STAT3 and AKT/MDM2/p53 signaling pathways. *Aging*. 2020;12(7):6240-59.
35. Helton ES, Chen X. p53 Modulation of the DNA Damage Response. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2007;100:883–96.
36. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Mergny MD, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*. 2008;10(6):676–87.
37. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO Journal*. 2007;26(10):2527–39.
38. Kofman AV, Kim J, Park SY, Dupart E, Letson C, Bao Y, et al. microRNA-34a promotes DNA damage and mitotic catastrophe. *Cell Cycle*. 2013;12(22):3500–11.
39. Vitale I, Manic G, Castedo M, Kroemer G. Caspase 2 in mitotic catastrophe: The terminator of aneuploid and tetraploid cells. *MOLECULAR & CELLULAR ONCOLOGY*. 2017;4(3):1-4.
40. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15:1153–62.
41. Ramos H, Calheiros J, Almeida J, Barcherini V, Santos S, Carvalho ATP. SLMP53-1 Inhibits Tumor Cell Growth through Regulation of Glucose Metabolism and Angiogenesis in a P53-Dependent Manner. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(596):1-13.
42. Berger B, Capper D, Lemke D, Pfenning PN, Platten M, Weller M, et al. Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2010;12(9):894–907.



43. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30.
44. Ilic M, Ilic I. Cancer mortality in Serbia, 1991–2015: an age-period-cohort and joinpoint regression analysis. *Cancer Commun.* 2018;38(10):1-16.
45. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Živković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. *BMC Cancer.* 2013;13:1–11.
46. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30.
47. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011;147(4):742–58.
48. Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Molecular Cell Biology.* 2002;3:779-87.
49. Yang Y, Jiang G, Zhang P, Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research.* 2015;2(1):1-12.
50. Mishra AP, Salehi B, Sharifi-Rad M, Pezzani R, Kobarfard F, Sharifi-Rad J, et al. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. *Molecular Diagnosis and Therapy.* 2018;22(3):281–95.
51. Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2001;2(7):545–50.
52. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Cancer.* 1972;26:239-57.
53. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
54. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International.* 2019;43(6):582–92.
55. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell.* 1996;87:171.
56. Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science.* 2014;127:2135–44.
57. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3–12.
58. Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y. Yeast autophagosomes: De novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 2002;12(5):231–5.

59. Matsumura H, Shimizu Y, Ohsawa Y, Kawahara A, Uchiyama Y, Nagata S. Necrotic Death Pathway in Fas Receptor Signaling. 2000;151(6):1247-55.
60. Najafov A, Chen H, Yuan J. Necroptosis and Cancer. Trends in Cancer. 2017;3(4):294–301.
61. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V., et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012;19(1):107–20.
62. Sperandio S, De Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(26):14376–81.
63. Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington’s disease.2000;97(14):8093-97.
64. Stephenson J, Amor S. Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. Drug Discovery Today: Disease Models. 2017;25(26):35-44.
65. Del Canto MC, Gurney ME. Development of Central Nervous System Pathology in a Murine Transgenic Model of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. American journal of Pathology. 1994;145(6):1271-9.
66. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. Cell Death Differ. 2007;14(7):1237–43.
67. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infection and Immunity. 2005;73(4):1907–16.
68. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res. 2000;45(3):528–37.
69. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2013;1833(12):3448–59.
70. von Herrmann KM, Salas LA, Martinez EM, Young AL, Howard JM, Feldman MS, et al. NLRP3 expression in mesencephalic neurons and characterization of a rare NLRP3 polymorphism associated with decreased risk of Parkinson’s disease. npj Park Dis. 2018;4(1):1-9.
71. Pain S, Belin J. Regulation of Protein Synthesis and Apoptosis in Lymphocytes of Parkinson Patients : The Effect of Dopaminergic Treatment. 2020;19(5-6):178-83.

72. Tan MS, Tan L, Jiang T, Zhu XC, Wang HF, Jia CD, et al. Amyloid- $\beta$  induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2014;5(8):1–12.
73. Huang MLH, Chiang S, Kalinowski DS, Bae DH, Sahni S, Richardson DR. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: Cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;1-26.
74. Su Z, Sheng L, Yu P, Ren N, Li Y, Qin Z. Regulation of microRNAs by IRE1 $\alpha$  in apoptosis: implications for the pathomechanism of neurodegenerative diseases. *Int J Neurosci.* 2020;0(0):1–7.
75. Rozpędek-Kamińska W, Siwecka N, Wawrzyńkiewicz A, Wojtczak R, Pytel D, Diehl JA, et al. The PERK-Dependent Molecular Mechanisms as a Novel Therapeutic Target for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1-40.
76. Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death and Differentiation.* 2006;13(8):1256–9.
77. Toshiyuki M, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293–9.
78. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 2002;181–182:475–81.
79. Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1998;1387:17-31.
80. Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ, Los M. Caspases and cancer: Mechanisms of inactivation and new treatment modalities. *Experimental Oncology.* 2004;26(2):82-97.
81. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological Reviews.* 2003;193:10–21.
82. Wolf BB, Green DR. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. 1999;274(29):20049-52.
83. Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M. Caspases - Their Role in Apoptosis and Other Physiological Processes as Revealed by Knock-Out Studies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* 2002;50(1):19–34.
84. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. 2005;37(11):719-27.
85. Shi Y. Review Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis which include caspase-3,-6, and-7 (Figure 1). An initiator caspase is characterized by an extended N-terminal prodomain (90 amino acids) important for its function. *Molecular Cell.* 2002;9:459–70.

86. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(3):231–41.
87. Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO Journal*. 2003;22(16):4132–42.
88. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(11):897–907.
89. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nature Medicine*. 2000;6(5):529–35.
90. Kim S. Inactivating Mutations of Caspase-8 Gene in Colorectal Carcinomas. *Information Technology , Learning and Performance Journal*. 2003;21(1):1–9.
91. Kelly JL, Novak AJ, Fredericksen ZS, Liebow M, Ansell SM, Dogan A. Germline Variation in Apoptosis Pathway Genes and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(11):2847-58.
92. Lan Q, Morton LM, Armstrong B, Hartge P, Menashe I, Zheng T, et al. Genetic variation in caspase genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of 3 population-based case-control studies. *Blood*. 2009;114(2):264-7.
93. Chen K, Zhao H, Hu Z, Wang LE, Zhang W, Sturgis EM. CASP3 Polymorphisms and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(19):6343-9.
94. Soung YH, Lee JW, Kim SY, Park WS, Nam SW, Lee JY, et al. Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Human Genetics*. 2004;115(2):112–5.
95. Collins MKL, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, López-Rivas A. Growth factors as survival factors: Regulation of apoptosis. *BioEssays*. 1994;16(2):133–8.
96. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*. 2005;26(2):263-70.
97. Gruver-Yates A, Cidlowski J. Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells*. 2013;2(2):202–23.
98. Falcone C, Mazzoni C. External and internal triggers of cell death in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(11-12):2237–50.
99. Illidge TM. Radiation-induced apoptosis. *Clinical Oncology*. 1998;10(1):3–13.
100. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(24):8247–54.

101. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1813:558–63.
102. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*. 2004;16:139-44.
103. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998;94(4):481–90.
104. Kumar R, Herbert PE, Warrens AN. An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery*. 2005;3(4):268–77.
105. Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, Caltabiano R, Vespasiani G, Castorina S, et al. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie’s disease. *BioMed Research International*. 2014;14:1-10.
106. Wilfling F, Weber A, Potthoff S, Vögtle FN, Meisinger C, Paschen SA, et al. BH3-only proteins are tail-anchored in the outer mitochondrial membrane and can initiate the activation of Bax. *Cell Death and Differentiation*. 2012;19:1328–36.
107. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Developmental Cell*. 2011;92-101.
108. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of Cell Science*. 2010;123(19):3209–14.
109. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):2942–55.
110. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis: Abstract: *Nature*. *Nature*. 2000;407(6805):770–6.
111. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96-9.
112. Sokolović T, Lazović M, Đurić D, Cekić V. Indukcija apoptoze jedan od mehanizama citotoksičnosti antiproliferativnog efekta hipericina. *Timočki Medicinski Glasnik*. 2013;38(1):31-4.
113. Hua ZJ, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*. 2000;10:205-11.
114. Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong W-X, Rathmell JC, Shiels HA, et al. The Combined Functions of Proapoptotic Bcl-2 Family Members Bak and Bax Are Essential for Normal Development of Multiple Tissues cells within both the central nervous and hematopoietic systems. Thus, Bax and Bak have overlapping roles in the regulation. *Molecular Cell*. 2000;6:1389–99.
115. Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune

- disease (oncogene/transgenic mice/lymphocyte lifespan/lupus mice/glomerulonephritis). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88:8661–5.
116. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell.* 1993;75(2):229–40.
117. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, et al. Obligate Role of Anti-Apoptotic MCL-1 in the Survival of Hematopoietic Stem Cells. 2005;307:1101-4.
118. Pierson W, Cauwe B, Policheni A, Schlenner SM, Franckaert D, Berges J, et al. Anti-apoptotic Mcl-1 is critical for the survival and niche-filling capacity of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2013;14(9):959–65.
119. Morales AA, Olsson A, Celsing F, Österborg A, Jondal M, Osorio LM. High expression of bfl-1 contributes to the apoptosis resistant phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer.* 2005;113:730–7.
120. Ma A, Pena JC, Chang B, Margosian E, Davidson L, Alt FW, et al. Bclx regulates the survival of double-positive thymocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(11):4763–7.
121. Kepp O, Gottschalk K, Churin Y, Rajalingam K, Brinkmann V, Machuy N, et al. Bim and Bmf Synergize To Induce Apoptosis in Neisseria Gonorrhoeae Infection. *PLoS Pathogens.* 2009;5(3):1-10.
122. Piñon JD, Labi V, Egle A, Villunger A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene.* 2008;27(Suppl 1):S41-S52.
123. Herold MJ, Stuchbery R, Mérimo D, Willson T, Strasser A, Hildeman D, et al. Impact of conditional deletion of the pro-apoptotic BCL-2 family member BIM in mice. *Cell Death and Disease.* 2014;5(10):1-7.
124. Zinkel SS, Ong CC, Ferguson DO, Iwasaki H, Akashi K, Bronson RT, et al. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. *GENES & DEVELOPMENT.* 2003;17:229–39.
125. Delbridge ARD, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nature.* 2016;16:99-109.
126. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology.* 1967;33(2):437–49.
127. Kim YC, Guan K. Review Series: autophagy overview of mTOR signaling pathway. *The Journal of Clinical Investigation.* 2015;2(1):25–32.
128. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011;147(4):728–41.

129. Shen HM, Mizushima N. At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39(2):61–71.
130. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011;469(7330):323.
131. Yang A, Rajeshkumar NV, Wang X, Yabuuchi S, Alexander BM, Chu GC, et al. Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov*. 2014;4(8):905–13.
132. Amaravadi V, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *GENES & DEVELOPMENT*. 2016;30:1913–30.
133. Pietrocola F, Demont Y, Castoldi F, Enot D, Durand S, Semeraro M, et al. Metabolic effects of fasting on human and mouse blood in vivo. *Taylor & Francis Group*. 2017;13(3):567-78.
134. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*. 2013;1-13.
135. Marshall RS, Vierstra RD. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling *Annual Review of Plant Biology*. 2018;69:173-208.
136. Kaminsky V, Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2012;1824(1):44–50.
137. Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(8):1-29.
138. Kirkin V, Rogov V V. A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Molecular Cell*. 2019;76:268–85.
139. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(12):1004–10.
140. Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, et al. Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1310-23.
141. Khan MJ, Alam MR, Weiermair MW, Karsten F, Groschner L, Riederer M, et al. Inhibition of Autophagy Rescues Palmitic Acid-induced Necroptosis of Endothelial Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2012;287(25):21110-20.
142. Green DR, Levine B. To Be or Not to Be? How Selective Autophagy and Cell Death Govern Cell Fate. *Cell*. 2014:65-75.
143. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):651-62.

144. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*. 2010;6:764–76.
145. Scott RC, Neufeld TP. Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death. 2007;17(1):1-11.
146. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated Induction of Autophagy Via an Apg1 Protein Kinase Complex. *The Journal of Cell Biology*. 2015;150(6):1507-13.
147. Jung CH, Hiroyuki T, Hingo M, Makoto H, Shu T, Shizuo A, et al. ULK1-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular biology of the cell*. 2008;19:5373–86.
148. Luo P, Gao F, Niu D, Sun X, Song Q, Guo C, et al. The Role of Autophagy in Chondrocyte Metabolism and Osteoarthritis: A Comprehensive Research Review. *BioMed Research International*. 2019:1-7.
149. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Research*. 2007;17:839-49.
150. Beth Levine, Guido Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008;132:27–42.
151. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO Journal*. 2007;26:2527–39.
152. Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J*. 2008;410:1–17.
153. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, et al. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO*. 2009;10(3):285-92.
154. Lindqvist LM, Heinlein M, Huang DCS, Vaux DL. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak. *PNAS*. 2014:1-6.
155. Mandge S, Hamendra PS, Gupta SD, Moorthy HN. Synthesis and Characterization of Some Chalcone Derivatives. *Trends in Applied Sciences Research*. 2007;2(1):52–6.
156. Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev*. 2011;10(3):397–412.
157. Waliszewski KN, Ovando SL, Pardo VT. Effect of hydration and enzymatic pretreatment of vanilla beans on the kinetics of vanillin extraction. *J Food Eng*. 2007;78(4):1267–73.



158. Vignesh SLGUN. Synthesis and pharmacological properties of chalcones : a review. *Res Chem Intermed.* 2017;43(11):6043–77.
159. Larsen M, Kromann H, Kharazmi A, Nielsen SF. Conformationally restricted anti-plasmodial chalcones. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2005;15(21):4858–61.
160. Kozłowski D, Trouillas P, Calliste C, Marsal P, Lazzaroni R, Duroux JL. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. *J Phys Chem A.* 2007;111(6):1138–45.
161. Han X, Peng B, Xiao BB, Cao SL, Yang CR, Wang WZ, et al. Synthesis and evaluation of chalcone analogues containing a 4-oxoquinazolin-2-yl group as potential anti-tumor agents. *Eur J Med Chem.* 2019;586–601.
162. Huang X, Huang R, Li L, Gou S, Wang H. Synthesis and biological evaluation of novel chalcone derivatives as a new class of microtubule destabilizing agents. *Eur J Med Chem.* 2017;132:11–25.
163. Khan I, Garikapati KR, Setti A, Shaik AB, Kanth Makani VK, Shareef MA, et al. Design, synthesis, in silico pharmacokinetics prediction and biological evaluation of 1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole chalcone as EGFR /Akt pathway inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2019;163(2019):636–48.
164. Shaik A, Bhandare RR, Palleapati K, Nissankararao S, Kancharlapalli V, Shaik S. Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Some Novel Isoxazole Ring Containing Chalcone and Dihydropyrazole Derivatives. 2020;25(1047):1-12.
165. Kaur H, Singh J, Narasimhan B. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic evaluation of diazenyl chalcones along with insights to mechanism of interaction by molecular docking studies. *BMC Chem.* 2019;13(1):1–19.
166. Sang Z, Wang K, Zhang P, Shi J, Liu W, Tan Z. Design, synthesis, in-silico and biological evaluation of novel chalcone derivatives as multi-function agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2019;180:238–52.
167. Wang L, Chen HC, Yang X, Tao JJ, Liang G, Wu JZ, et al. The novel chalcone analog L2H17 protects retinal ganglion cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Neural Regen Res.* 2018;13(9):1665–72.
168. Vijaya Bhaskar Reddy M, Hung HY, Kuo PC, Huang GJ, Chan YY, Huang SC, et al. Synthesis and biological evaluation of chalcone, dihydrochalcone, and 1,3-diarylpropane analogs as anti-inflammatory agents. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(7):1547–50.
169. Sasidharan R, Sreedharannair Leelabaiamma M, Mohanan R, Jose SP, Mathew B, Sukumaran S. Anti-inflammatory effect of synthesized indole-based chalcone (2E)-3-(4-bromophenyl)-1-(1H-indol-3-yl) prop-2-en-1-one: an in vitro and in vivo studies. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019;41(6):568–76.

170. Rashid H, Xu Y, Ahmad N, Muhammad Y, Wang L. Promising anti-inflammatory effects of chalcones via inhibition of cyclooxygenase, prostaglandin E<sub>2</sub>, inducible NO synthase and nuclear factor kb activities. *Bioorg Chem.* 2019;87:335–65.
171. Henry EJ, Bird SJ, Gowland P, Collins M, Cassella JP. Ferrocenyl chalcone derivatives as possible antimicrobial agents. *J Antibiot (Tokyo).* 2020:1-10.
172. Muškinja J, Ratkovi Z, Rankovi B, Kosani M. Synthesis of O-Alkyl Derivatives of Dehydrozingerone Analogues. *Kragujev J Sci.* 2016;38:97–106.
173. Mellado M, Espinoza L, Madrid A, Mella J, Chávez-Weisser E, Diaz K, et al. Design, synthesis, antifungal activity, and structure–activity relationship studies of chalcones and hybrid dihydrochromane–chalcones. *Mol Divers.* 2019;(0123456789):1-13.
174. Ahmad A, Wani MY, Patel M, Sobral AJFN, Duse AG, Aqlan FM, et al. Synergistic antifungal effect of cyclized chalcone derivatives and fluconazole against *Candida albicans*. *Medchemcomm.* 2017;8(12):2195–207.
175. Harborne JB. Comparative biochemistry of flavonoids—I. *Phytochemistry.* 1966;5:111–5.
176. Rozmer Z, Perjési P. Naturally occurring chalcones and their biological activities. *Phytochemistry Reviews.* 2016;15:87–120.
177. Shirley BW. Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Sci.* 1996;1(11):377–82.
178. Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM. Bioactivities of Chalcones. *ChemInform.* 2010;31(6):no-no.
179. Jin H, Seo GS, Lee SH. Isoliquiritigenin-mediated p62/SQSTM1 induction regulates apoptotic potential through attenuation of caspase-8 activation in colorectal cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2018;841:90–7.
180. Liu X, An LJ, Li Y, Wang Y, Zhao L, Lv X, et al. Xanthohumol chalcone acts as a powerful inhibitor of carcinogenesis in drug-resistant human colon carcinoma and these effects are mediated via G2/M phase cell cycle arrest, activation of apoptotic pathways, caspase activation and targeting Ras /MEK/ERK pa. *J BUON.* 2019;24(6):2442–7.
181. Gil HN, Jung E, Koh D, Lim Y, Lee YH, Shin SY. A synthetic chalcone derivative, 2-hydroxy-3',5,5'-trimethoxychalcone (DK-139), triggers reactive oxygen species-induced apoptosis independently of p53 in A549 lung cancer cells. *Chemico-Biological Interactions.* 2018:1-24.
182. Wang K, Zhang W, Wang Z, Gao M, Wang X, Han W, et al. Flavokawain A inhibits Prostate cancer cells by inducing cell cycle arrest and cell apoptosis and regulating the Glutamine Metabolism pathway. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2020;1-28.

183. Bartmańska A, Tronina T, Popłońska J, Milczarek M, Psurska BF, Wietrzyk J. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. *Molecules*. 2018;23:1-14.
184. Solorzano DP, Scholler M, Bernhardt G, Buschauer A, König B, Puentes CO. Tariquidar-related chalcones and ketones as ABCG2 modulators. *ACS Med. Chem. Lett*. 2018;1-7.
185. Lu WJ, Wu GJ, Chen RJ, Chang CC, Lien LM, Chiu CC, et al. Licochalcone A attenuates glioma cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest. *Food Funct*. 2018;9(8):4500–7.
186. Wu W, Ma B, Ye H, Wang T, Wang X, Yang J, et al. Millepachine, a potential topoisomerase II inhibitor induces apoptosis via activation of NF- $\kappa$ B pathway in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7(32):52281–93.
187. Bakar AA, Akhtar MN, Ali NM, Yeap SK, Quah CK, Loh WS, et al. Design, synthesis and docking studies of flavokawain B type chalcones and their cytotoxic effects on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Molecules*. 2018;23(3):1–14.
188. Abu N, Akhtar MN, Yeap SK, Lim KL, Ho WY, Abdullah MP, et al. Flavokawain B induced cytotoxicity in two breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB231 and inhibited the metastatic potential of MDA-MB231 via the regulation of several tyrosine kinases In vitro. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):1–14.
189. Wang D, Liang J, Zhang J, Wang Y, Chai X. Natural Chalcones in Chinese Materia Medica: Licorice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020;1-14.
190. Bilginer S, Gul HI, Erdal FS, Sakagami H, Gulcin I. New halogenated chalcones with cytotoxic and carbonic anhydrase inhibitory properties: 6-(3-Halogenated phenyl-2-propen-1-oyl)-2(3H)-benzoxazolones. *Arch Pharm*. 2020;1-8.
191. Marquina S, Maldonado-Santiago M, Sánchez-Carranza JN, Antúnez-Mojica M, González-Maya L, Razo-Hernández RS, et al. Design, synthesis and QSAR study of 2'-hydroxy-4'-alkoxy chalcone derivatives that exert cytotoxic activity by the mitochondrial apoptotic pathway. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2019;27:43–54.
192. Altowyan MS, Barakat A, Al-Majid AM, Al-Ghulikah HA. Spiroindolone analogues bearing benzofuran moiety as a selective cyclooxygenase COX-1 with TNF- $\alpha$  and IL-6 inhibitors. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27:1208–16.
193. Zhang B, Lai Y, Li Y, Shu N, Wang Z, Wang Y, et al. Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G2/M cell cycle arrest and cell apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2018;821:57–67.
194. Kim DH, Park JE, Chae IG, Park G, Lee SY, Chun KS. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation of human renal carcinoma Caki cells through the ROS-mediated regulation of the Jak2/STAT3 pathway. *Oncol Rep*. 2017;38(1):575–83.

195. Hirchaud F, Hermetet F, Ablise M, Fauconnet S, Vuitton DA, Prétet JL, et al. Isoliquiritigenin Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Downregulation of HPV16 E6 Expression in Cervical Cancer Ca Ski Cells. *Planta Med.* 2013;79(17):1628–35.
196. Li D, Wang Z, Chen H, Wang J, Zheng Q, Shang J, et al. Isoliquiritigenin induces monocytic differentiation of HL-60 cells. *Free Radic Biol Med.* 2009;46(6):731–6.
197. Wei S, Sun T, Du J, Zhang B, Xiang D, Li W. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer in vitro. *Oncol Rep.* 2018;40(6):3213–22.
198. Stompor M, Świtalska M, Wietrzyk J. The influence of a single and double biotinylation of xanthohumol on its anticancer activity. *Acta Biochim Pol.* 2019;66(4):559–65.
199. Chen X, Liu Z, Meng R, Shi C, Guo N. Antioxidative and anticancer properties of Licochalcone A from licorice. *J Ethnopharmacol.* 2017;198:331–7.
200. Bortolotto LFB, Barbosa FR, Silva G, Bitencourt TA, Belebony RO, Baek SJ, et al. Cytotoxicity of trans-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:425–33.
201. An B, Zhang S, Yan J, Huang L, Li X. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of new hybrids of millepachine and phenstatin as potent tubulin polymerization inhibitors. *Org Biomol Chem.* 2017;15(4):852–62.
202. Yeap SK, Abu N, Akthar N, Ho WY, Ky H, Tan SW, et al. Gene Expression Analysis Reveals the Concurrent Activation of Proapoptotic and Antioxidant-Defensive Mechanisms in Flavokawain B-Treated Cervical Cancer HeLa Cells. *Integr Cancer Ther.* 2017;16(3):373–84.
203. Palko-Łabuz A, Kostrzewa-Susłow E, Janeczko T, Środa-Pomianek K, Poła A, Uryga A, et al. Cyclization of flavokawain B reduces its activity against human colon cancer cells. *Human and Experimental Toxicology.* 2020;39:262–75.
204. Huang X, Wang M, Wang C, Hu W, You Q, Ma T, et al. Synthesis and biological evaluation of novel millepachine derivative containing aminophosphonate ester species as novel anti-tubulin agents. *Bioorganic Chemistry.* 2019:1-13.
205. Xiao X ying, Hao M, Yang X ying, Ba Q, Li M, Ni S juan, et al. Licochalcone A inhibits growth of gastric cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Cancer Letters.* 2011;302:69–75.
206. Mino D, Jayakumar VN, Veena SS, Vimala J, Basha A, Saji K V., et al. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2008;55:459–70.
207. Dean JR, Schlotterbeck JO. Vanilla Extract. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* 1916. 1916;8(7):607–14.

208. Havkin-frenkel D, Dorn R, Michael D, Road D. Chapter 4 Vanilla. 1997.
209. Devappa RK, Rakshit SK, Dekker RFH. Forest biorefinery: Potential of poplar phytochemicals as value-added co-products. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6):681–716.
210. Dhar P, Bajpai PK, Tayade AB, Chaurasia OP, Srivastava RB, Singh SB. Chemical composition and antioxidant capacities of phytococktail extracts from trans-Himalayan cold desert. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13.
211. Rana R, Mathur a, Jain CK, Sharma SK, Mathur G. Microbial Production of Vanillin. *Int J Biotechnol Bioeng Res.* 2013;4(3):227–34.
212. Esposito LJ, Formanek K, Kientz G, Mauger F, Maureaux V, Robert G, et al. Vanillin. *Kirk-Othmer Encycl Chem Technol.* 2000:
213. Ramadoss DP, Sivalingam N. Vanillin extracted from Proso and Barnyard millets induce apoptotic cell death in HT-29 human colon cancer cell line. *Nutr Cancer.* 2019;0(0):1–16.
214. Elsherbiny NM, Younis NN, Shaheen MA, Elseweidy MM. The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. *Pathol Res Pract [Internet].* 2016;212(9):767–77.
215. Guo T, Su Z, Wang Q, Hou W, Li J, Zhang L, et al. Vanillin protects lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting ERK1/2, p38 and NF- $\kappa$ B pathway. *Future Med Chem.* 2019;11(16):2081–94.
216. Zhao D, Jiang Y, Sun J, Li H, Huang M, Sun X, et al. Elucidation of The Anti-Inflammatory Effect of Vanillin In Lps-Activated THP-1 Cells. *J Food Sci.* 2019;84(7):1920–8.
217. Bezerra DP, Soares AKN, De Sousa DP. Overview of the role of vanillin on redox status and cancer development. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
218. Méndez-Líter JA, Tundidor I, Nieto-Domínguez M, De Toro BF, González Santana A, De Eugenio LI, et al. Transglycosylation products generated by *Talaromyces amestolkiae* GH3  $\beta$ -glucosidases: Effect of hydroxytyrosol, vanillin and its glucosides on breast cancer cells. *Microb Cell Fact.* 2019;18(1):1–12.
219. López-Malo A, Alzamora SM, Argai A. Effect of natural vanillin on germination time and radial growth of moulds in fruit-based agar systems. *Food Microbiol.* 1995;12(C):213–9.
220. Kuo PC, Damu AG, Cherng CY, Jeng JF, Teng CM, Lee EJ, et al. Isolation of a natural antioxidant, dehydrozingerone from *Zingiber officinale* and synthesis of its analogues for recognition of effective antioxidant and antityrosinase agents. *Arch Pharm Res.* 2005;28(5):518–28.

221. Hampannavar GA, Karpoormath R, Palkar MB, Shaikh MS. An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG). *Bioorganic Med Chem.* 2016;24(4):501–20.
222. Burmudžija AZ, Muškinja JM, Kosanić MM, Ranković BR, Novaković SB, Đorđević SB, et al. Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Dehydrozingerone based Cyclopropyl Derivatives. *Chem Biodivers.* 2017;14(8):e1700077.
223. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-Associated Nephrotoxicity and Pathological Events. *Cell Stress Responses Ren Dis.* 2005:107–21.
224. Guda R, Korra R, Balaji S, Palabindela R, Eerla R, Lingabathula H, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 8-substituted-6-hydrazonoindolo[2,1-b]quinazolin-12(6H)-one scaffolds as potential cytotoxic agents: IDO-1 targeting molecular docking studies. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(20):4741–8.
225. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell Viability Assays. *Assay Guid Man.* 2013;114(8):785–96.
226. Lee WY, Lee GD. A Novel Fungicidal Action of Silver Nanoparticles: Apoptosis Induction. CHAPTER 16.
227. Schmid I, Uittenbogaart CH, Keld B, Giorgi J V. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of Immunological Methods.* 1994;170:145–57.
228. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.
229. Moscoso NB, Benavides JCR, Wegman PO. Development of anticancer drugs based on the hallmarks of tumor cells. *Tumor Biol.* 2014:1-15.
230. Jansman FG, Sleijfer DT, de Graaf JC, Coenen JL, Brouwers JR. Management of chemotherapy-induced adverse effects in the treatment of colorectal cancer. *Drug Saf.* 2001;24(5):353–67.
231. Lötsch J, Schneider G, Reker D, Parnham MJ, Schneider P, Geisslinger G, et al. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol Med.* 2013;19(12):742–53.
232. Abdallah HH, Mavri J, Repič M, Lee VS, Wahab HA. Chemical Reaction of Soybean Flavonoids with DNA: A Computational Study Using the Implicit Solvent Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:1269-83.
233. Tawani A, Kumar A. Structural Insight into the interaction of Flavonoids with Human Telomeric Sequence. *Scientific Reports.* 2015;5:

234. Stanojković T, Marković V, Matić IZ, Mladenović MP, Petrović N, Krivokuća A, et al. Highly selective anthraquinone-chalcone hybrids as potential antileukemia agents. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2018;28(15):2593–8.
235. Yong W, Ho Y, Abd Malek S. Xanthohumol induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Pharmacogn Mag*. 2015;11(44):275.
236. Maioral MF, Bodack C do N, Stefanos NM, Bigolin Á, Mascarello A, Chiaradia-Delatorre LD, et al. Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies. *Biochimie*. 2017;140:48–57.
237. Sangpheak K, Mueller M, Darai N, Wolschann P, Suwattanasophon C, Ruga R, et al. Computational screening of chalcones acting against topoisomerase II $\alpha$  and their cytotoxicity towards cancer cell lines. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2019;34(1):134–43.
238. Zhu H, Tang L, Zhang C, Wei B, Yang P, He D, et al. Synthesis of chalcone derivatives: Inducing apoptosis of HepG2 cells via regulating reactive oxygen species and mitochondrial pathway. *Front Pharmacol*. 2019;10:1–13.
239. Wang FC, Peng B, Cao SL, Li HY, Yuan XL, Zhang TT, et al. Synthesis and cytotoxic activity of chalcone analogues containing a thieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl group as the A-ring or B-ring. Vol. 94, *Bioorganic Chemistry*. 2020.
240. Shankaraiah N, Nekkanti S, Brahma UR, Praveen Kumar N, Deshpande N, Prasanna D, et al. Synthesis of different heterocycles-linked chalcone conjugates as cytotoxic agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2017;25:4805–16.
241. Li Y, Wang P, Chen X, Hu J, Liu Y, Wang X, et al. Activation of microbubbles by low-intensity pulsed ultrasound enhances the cytotoxicity of curcumin involving apoptosis induction and cell motility inhibition in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015:1-23.
242. Di Y, De Silva F, Krol ES, Alcorn J. Flaxseed Lignans Enhance the Cytotoxicity of Chemotherapeutic Agents against Breast Cancer Cell Lines MDA-MB-231 and SKBR3. *Nutrition and Cancer*. 2018:1-10.
243. Fogaça TB, Martins RM, Beghini KR, Carapina C, Ritter M, de Pereira CMP, et al. Apoptotic effect of chalcone derivatives of 2-acetylthiophene in human breast cancer cells. *Pharmacol Reports*. 2017;69(1):156–61.
244. Do TH, Nguyen DM, Truong VD, Do THT, Le MT, Pham TQ, et al. Synthesis and selective cytotoxic activities on rhabdomyosarcoma and noncancerous cells of some heterocyclic chalcones. *Molecules*. 2016;21(3).
245. Jovanovic KK, Gligorijevic N, Gaur R, Mishra L, Radulovic S. Anticancer activity of two ruthenium(II)-DMSO-chalcone complexes: Comparison of cytotoxic, pro-apoptotic and antimetastatic potential. *Journal of B.U.ON*. 2016;21:482–90.

246. Xuan Y, Bo Z, Lu G, Hua WZ, Cui YB, Liang LL, et al. Involvement of the Mitochondrion-dependent and the Endoplasmic Reticulum Stress-signaling Pathways in Isoliquiritigenin-induced Apoptosis of HeLa Cell. *Biomed Environ Sci.* 2013;26(4):268-76.
247. Tsai JP, Lee CH, Ying TH, Lin CL, Lin CL, Hsueh JT. Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(30):28851-66.
248. Hong SH, Cha HJ, Hwang-Bo H, Kim MY, Kim SY, Ji SY, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of licochalcone a through ROS-mediated cell cycle arrest and apoptosis in human bladder cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20:1-9.
249. Shen TS, Hsu YK, Huang YF, Chen HY, Hsieh CP, Chen CL. Licochalcone A Suppresses the Proliferation of Osteosarcoma Cells through Autophagy and ATM-Chk2 Activation. *Molecules.* 2019;24:1-12.
250. Qiu C, Zhang T, Zhang W, Zhou L, Yu B, Wang W, et al. Licochalcone a inhibits the proliferation of human lung cancer cell lines A549 and H460 by inducing G2/M cell cycle arrest and ER stress. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017;18(8):1-11.
251. Huang WC, Su HH, Fang LW, Wu SJ, Liou CJ. Licochalcone A Inhibits Cellular Motility by Suppressing E-cadherin and MAPK Signaling in Breast Cancer. *Cells.* 2019;8(218):1-18.
252. Wang TT, Chen ZZ, Xie P, Zhang WJ, Du MY, Liu YT, et al. Isoliquiritigenin suppresses the proliferation and induced apoptosis via miR-32/LATS2/Wnt in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Pharmacol.* 2019;856:172352.
253. Li C, Zhou X, Sun C, Liu X, Shi X, Wu S. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation, apoptosis and migration of osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2019;41(4):2502–10.
254. Si L, Yang X, Yan X, Wang Y, Zheng Q. Isoliquiritigenin induces apoptosis of human bladder cancer T24 cells via a cyclin-dependent kinase-independent mechanism. *Oncology Letters.* 2017;14:241–9.
255. Li Z, Zhang L, Gao M, Han M, Liu K, Zhang Z, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers Xanthoangelol-induced protective autophagy via activation of JNK/c-Jun Axis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2019;38(8):1-16.
256. Dong N, Liu X, Zhao T, Wang L, Li H, Zhang S, et al. Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;105:195–203.



257. Romagnoli R, Prencipe F, Cara LCL, Oliva P, Balardi S, Balardi PG. Synthesis and biological evaluation of alphanbromoacryloylamido indolyl pyridinyl propenones as potent apoptotic inducers in human leukaemia cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2018;33(1):727-42.
258. Saavedra E, Del Rosario H, Brouard I, Quintana J, Estévez F. 6'-Benzyloxy-4-bromo-2'-hydroxychalcone is cytotoxic against human leukaemia cells and induces caspase-8- and reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2018;298:137–45.
259. Teng Y, Wang L, Liu H, Yuan Y, Zhang Q, Wu M, et al. 30-Geranyl-mono-substituted chalcone Xanthoangelovl induces apoptosis in human leukemia K562 cells via activation of mitochondrial pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 2017;261:103-7.
260. Gil HN, Koh D, Lim Y, Lee YH, Shin SY. The synthetic chalcone derivative 2-hydroxy-3',5,5'-trimethoxychalcone induces unfolded protein response-mediated apoptosis in A549 lung cancer cells. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2018;28(17):2969–75.
261. Kamal A, Balakrishna M, Reddy VL, Riyaz S, Bagul C, Satyanarayana BM, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Benzo[d][1,3] Dioxol-5-yl Chalcones as Antiproliferating Agents. *Chem Biol Drug Des*. 2015;86:1267–84.
262. Ayati A, Bakhsaiesh TO, Moghimi S, Esmaeili R, Majidzadeh K, Safavi M, et al. Synthesis and biological evaluation of new coumarins bearing 2,4-diaminothiazole-5-carbonyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;155:483-91.
263. Phang C-W, Karsani SA, Sethi G, Abd Malek SN. Flavokawain C Inhibits Cell Cycle and Promotes Apoptosis, Associated with Endoplasmic Reticulum Stress and Regulation of MAPKs and Akt Signaling Pathways in HCT 116 Human Colon Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148775.
264. Wani ZA, Guru SK, Rao AVS, Sharma S, Mahajan G, Behl A, et al. A novel quinazolinone chalcone derivative induces mitochondrial dependent apoptosis and inhibits PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in human colon cancer HCT-116 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 2015:1-40.
265. Zhang L, Yang X, Li X, Li C, Zhao L, Zhou Y, et al. Butein sensitizes HeLa cells to cisplatin through the AKT and ERK/p38 MAPK pathways by targeting FoxO3a. *International Journal of Molecular Medicine*. 2015;36:957–66.
266. Yang PY, Hu DN, Lin IC, Liu FS. Butein Shows Cytotoxic Effects and Induces Apoptosis in Human Ovarian Cancer Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*. 2015;43(4):769-82.
267. Yang PY, Hu DN, Kao YH, Lin IC, Liu FS. Butein induces apoptotic cell death of human cervical cancer cells. *Oncology Letters*. 2018;16:6615–23.

268. Maioral MF, de Moraes ACR, Mascarello A, Delatorre LDC, Yunes RA, Nunes RJ, et al. Investigation of cellular mechanisms involved in apoptosis induced by a synthetic naphthylchalcone in acute leukemia cell lines. *Anti-Cancer Drugs*. 2016;27:738–47.
269. Ramirez-Tagle R, Escobar CA, Romero V, Montorfano I, Armisén R, Borgna V, et al. Chalcone-induced apoptosis through caspase-dependent intrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2).
270. Oh H, Yoon G, Shin JC, Park SM, Cho SS, Cho JH, et al. Licochalcone B induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma through the extrinsic- and intrinsic-signaling pathways. *International Journal of Oncology*. 2016;48:1749–57.
271. Orlikova B, Tasdemir D, Golais F, Dicato M, Diederich M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes Nutr*. 2011;6(2):125–47.
272. Winter E, Chiaradia LD, Silva AH, Nunes RJ, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB. Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. *Toxicol Vitro*. 2014;28(5):769–77.
273. Champelovier P, Chauchet X, Hazane-Puch F, Vergnaud S, Garrel C, Laporte F, et al. Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. *Toxicology in Vitro*. 2013;27:2305–15.
274. Song HS, Jang S, Kang SC. Bavachalcone from *Cullen corylifolium* induces apoptosis and autophagy in HepG2 cells. *Phytomedicine*. 2018;40:37–47.
275. Xu J, Xu X, Shi S, Wang Q, Saxton B, He W, et al. Autophagy-Mediated Degradation of IAPs and c-FLIPL Potentiates Apoptosis Induced by Combination of TRAIL and Chal-24. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016;117:1136–44.
276. Yang PY, Hu DN, Kao YH, Lin IC, Liu FS. Butein induces apoptotic cell death of human cervical cancer cells. *ONCOLOGY LETTERS*. 2018;16:6615-23.
277. Zhang YQ, Wen ZH, Wan K, Yuan D, Zeng X, Liang G, et al. A novel synthesized 3', 5'-diprenylated chalcone mediates the proliferation of human leukemia cells by regulating apoptosis and autophagy pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;106:794–804.
278. Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Butein activates autophagy through AMPK/TSC2/ULK1/mTOR Pathway to Inhibit IL-6 Expression in IL-1 $\beta$  Stimulated Human Chondrocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;49:932–46.
279. Yang X, Xie J, Liu X, Li Z, Fang K, Zhang L, et al. Autophagy induction by xanthoangelol exhibits anti-metastatic activities in hepatocellular carcinoma. *Cell Biochemistry and Function*. 2019;37:128–38.

280. Wang J, Qi Q, Zhou W, Feng Z, Huang B, Chen A, et al. Inhibition of glioma growth by flavokawain B is mediated through endoplasmic reticulum stress induced autophagy. *Autophagy*. 2018;14:2007–22.
281. Yang L, Song L, Zhao S, Ma C, Wu D, Wu YL. Isobavachalcone reveals novel characteristics of methuosis-like cell death in leukemia cells. *Chem Biol Interact*. 2019;304:131–8.

## 8. Листа ознака и скраћеница

**X1** - (E)-1-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X2** - (E)-1-(3,4-диметоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X3** - (E)-1-(4-етокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X4** - (E)-1-(4-изопропокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X5** - (E)-1-(3-метокси-4-пропоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X6** - (E)-1-(4-бутокси-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**X7** - (E)-1-(4-(бензилокси)-3-метоксифенил)-5-метилхекс-1-ен-3-он

**ДХЗ** - дехидрозингерон

**cisPt** - цисплатина

**HeLa** (ATCC® CCL-2™) - хумани карцином цервикса, ћелијска линија

**HCT-116** (ATCC ® CCL-247™) - хумани карцином колона, ћелијска линија

**MDA-MB-231** (ATCC® HTB-26™) - хумани аденокарцином дојке, ћелијска линија

**MRC-5** (ATCC ® CCL-171™) - хумани фибробласти плућа, ћелијска линија

**МТТ** - колориметријски тест

**Annexin V-FITC** - Annexin V-флуоресцеин изотиоцијанат

**7-AAD** - 7-аминоактиномицин Д

**flow** - проточна цитометрија

**DNK** - дезоксирибонуклеинска киселина

**RNK** - рибонуклеинска киселина

**МАРК** - митоген активиран протеин киназни пут

**PI3K/AKT/mTOR** - фосфатидилинозитол-3-киназни пут

**TP53** - тумор супресорски ген

**p53** - транскрипциони фактор

**RAS** - онкоген

**DED** - домен ефектора смрти

**CARD** - домен регрутовања каспаза

**FADD** - Fas удружен домен смрти

**TRADD** - рецептор фактора некрозе тумора

**TNF** - фактор некрозе тумора

**DISC** - комплекс за сигнализацију смрти

**dATP** - деоксиаденозинтрифосфат

**Apaf-1** - фактор активирања апоптотске протеазе

**ROS** - реактивне кисеоничне врсте

**NADP** - никотинамид аденин динуклеотид фосфат

**DMEM** - ћелијски медијум

**DMSO** - диметил-сулфоксид

**CQ** - хлорокин

**anti-Bcl-2** (*mhbcl01, Life technologies*) – антитело за анти-апоптотични протеин

**anti-caspase-3** (#9661, *Cell signaling Technology*) – антитело за каспазу-3

**anti-Bax** (*N20, sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc*) – антитело за про-апоптотични протеин

**FBS** - фетални говеђи серум

**PBS** - фосфатни пуфер

## БИОГРАФИЈА

Кандидат Јован Луковић рођен је 13.05.1986. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу „Станислав Сремчевић“ 2001. године у Крагујевцу. Средњу школу, Прву крагујевачку гимназију, смер математички завршио је у Крагујевцу 2005. године. Интегрисане академске студије хемије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу завршио је у децембру 2013. године са просечном оценом 8.59. Школске 2014/2015. године уписао је Академске докторске студије, смер Клиничка и експериментална биохемија, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит положио је септембра 2017. године са оценом 10.

Кандидат Јован Луковић први је аутор три научна рада (два рада М20 категорије и један рад М50 категорије) и ко-аутор једног научног рада М20 категорије:

### **М20: М23 – 2 рада**

1. Luković J, Milosavljević Z, Mitrović M, Anđelković M, Zelen I, Stanojević Pirković M, Nikolić I. Antitumor effect of mifepristone on human endometrial stromal cell line. *Vojnosanit Pregl.* 2019;1-18. doi.org/10.2298/VSP190226104L. 2019;1–18. M23
2. Luković J, Mitrović M, Popović S, Milosavljević Z, Stanojević-Pirković M, Anđelković M, et al. Antitumor effects of vanillin based chalcone analogs in vitro. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2020;77(1):57–67. doi: 10.32383/appdr/112786. M23
3. Stanojević-Pirković M, Marija Anđelković M, Luković J, Zelen I, Milosavljević Z, Mitrović M, Jurišić V, Nikolić I. UV irradiation induces apoptosis in the human endometrial stromal cell line (ThESC). *JBUON.* 2020;25(3):1541-46.

### **М50: М51 – 1 рад**

1. Luković J, Zelen I, Čanović P, Mitrović M, Zarić M, Nikolić I. Antitumor Effect of the Chalcone Analogue, (E) -1- (4-Ethoxy-3-Methoxyphenyl) -5- Methylhex-1-en-3-One on HeLa Cell Line. *Serbian J Exp Clin Res.* 2019;0(0):1–7. doi: 10.2478/SJECR-2018-0048.M51

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Луковић Јован изјављујем да докторска

дисертација под насловом:

Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла

која је одбрањена на Факултету наука

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2020 године,

---

потпис аутор

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Луковић Јован

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Испитивање *in vitro* антитуморског ефекта и механизма деловања аналога халкона на ћелије тумора хуманог порекла

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.



припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу , 2020 године,

---

потпис аутора

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

---

