



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Милена М. Јуришевић**

**Утицај новосинтетисаног лиганда (*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и метастазирање мишјег карцинома дојке и меланома**

**Докторска дисертација**

**Ментор др сци. мед. Гордана Д. Радосављевић, ванредни професор**

**КРАГУЈЕВАЦ, 2019. године**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Милена Јуришевић
Датум и место рођења: 26.02.1988. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Сарадник у звању асистента за ужу научну област Клиничка фармација, Факултет медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Утицај новосинтетисаног лиганда ( <i>O,O'</i> -диетил-( <i>S,S</i> )-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и метастазирање мишјег карцинома дојке и меланома
Број страница: 166
Број слика: 12
Број библиографских података: 468
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: др сци. мед. Гордана Радосављевић, ванредни професор
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 23.06.2016. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-1044/8 од 02.11.2016. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li><b>Доц. др Иван Јовановић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија и Онкологија</i>, председник</li><li><b>Доц. др Гордана Радић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска хемија</i>, члан</li><li><b>Проф. др Тибор Сабо</b>, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Опита и неорганска хемија</i>, члан</li><li><b>Проф. др Весела Радоњић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Клиничка фармација</i>, члан</li><li><b>Доц. др Марина Костић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармакологија и токсикологија</i>, члан</li></ol>
Комисија за одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li><b>Проф. др Иван Јовановић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија и Онкологија</i>, председник</li><li><b>Проф. др Гордана Радић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска хемија</i>, члан</li><li><b>Проф. др Тибор Сабо</b>, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Опита и неорганска хемија</i>, члан</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

Последњих деценија главно ограничење у лечењу канцера је првенствено повећана учесталост озбиљних нежељених реакција, као и све чешћи развој резистенције на хемотерапеутике. Управо ова ограничења наметнула су потребу за развојем нових терапијских једињења која показују већу ефикасност а мању токсичност. Услед успешне синтезе нових потенцијалих терапијских једињења на бази метала показано је да лиганд, етилендиамин-*N,N'*-диацетат типа, *O,O'*-диетил-(*S,S'*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP) испољава токсични ефекат на различитим ћелијским линијама карцинома. Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај DE-EDCP на раст и метастазирање мишићег карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10), као и да се расветли потенцијални механизам дејства. DE-EDCP показује туморицидни потенцијал на линије ћелија карцинома дојке мишева и људи, као и на ћелијску линију мишићег меланома. DE-EDCP значајно редукује раст карцинома дојке и показује јасан туморицидни капацитет који је одговоран за метастазирање тумора без очигледне системске токсичности. DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу што се огледа у способности да смањује експресију антиапоптотског протеина Bcl-2 и повећава експресију проапоптотског протеина Bax, као и ефекторске каспазе-3. Такође, примена DE-EDCP смањује експресију циклина D3, Ki-67 и повећава експресију p16, p21 и p27 што резултује задржавањем ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а тиме не само да инхибира пролиферацију туморских ћелија, већ вероватно додатно фацилитира њихову осетљивост на апоптозу. Још један додатни механизам којим DE-EDCP успорава прогресију карцинома дојке је редукација миграције туморских ћелија инхибицијом сигналног пута STAT3 који укључује NANOG и SOX2. Такође, системска примена DE-EDCP, осим што повећава инфлукс, подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност NK и NKT ћелија у туморској микросредини. Антитуморски ефекат DE-EDCP остварује на више различитих начина - фаворизује апоптозу истовремено инхибира пролиферацију туморских ћелија и појачава антитуморски имунски одговор, што указује на могућност коришћења DE-EDCP у експерименталној терапији карцинома.

## ABSTRACT

Pharmacological treatment of cancer is mostly limited by drug-toxicity and resistance. It has been noticed that organic ester ligand, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (named DE-EDCP) showed effective cytotoxic capacities against several human and mouse cancer cell lines. The aim of present study was to examine the ability of DE-EDCP to inhibit murine breast cancer (4T1) growth and progression, as well as melanoma (B16F10), and to explore possible molecular mechanisms. DE-EDCP exhibited significant tumoricidal activity on human and murine breast cancer cell lines. Further, marked reduction of murine breast cancer growth and progression, as well as melanoma, by DE-EDCP was shown. DE-EDCP exhibits fewer side-effects compared to cisplatin as a conventional chemotherapeutic. Results obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments indicate that DE-EDCP induces apoptosis and inhibits proliferation of 4T1 cells. DE-EDCP increases percentage of 4T1 cells in late apoptosis, expression of pro-apoptotic Bax and caspase-3, while decreases expression of anti-apoptotic Bcl-2. DE-EDCP treatment increased the percentage of TUNEL-positive nuclei and reduced Ki-67 expression in breast cancer tissue. DE-EDCP decreased expression of cyclin D3 and Ki-67, increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16, p21 and p27 and arrested 4T1 cells in G0/G1 cell cycle phase. Expression of STAT3 and downstream regulated molecules, NANOG and SOX2, was reduced in 4T1 cells after DE-EDCP treatment. DE-EDCP facilitated accumulation of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells and CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> NK cells in tumor microenvironment. In conclusion, DE-EDCP impairs breast cancer growth and progression by triggering cancer cell death and inhibition of cancer cell proliferation and by facilitating anti-tumor immunity. DE-EDCP might be of interest in the development of the new anticancer agent.

*Због несебичног залагања, подршке и великог разумевања током целокупне реализације ове докторске дисертације захвалност дугујем свом ментору, проф. др Гордани Радосављевић.*

*Проф. др Небојши Арсенијевићу захваљујем на указаном поверењу, идејама, сугестијама и несебичној помоћи.*

*Проф. др Ивану Јовановићу хвала на изузетној подршци и стручним саветима.*

*Велику захвалност дугујем доц. др Александру Арсенијевићу и проф. др Марији Миловановић на драгоценим смерницама и практичним саветима током експерименталног рада.*

*Мојој Невени Гајовић хвала на вишегодишњој несебичној стручној и пријатељској подршци која далеко преназилази оквире ове дисертације.*

*Хвала мојој породици на безусловној љубави, неизмерној подршци и разумевању.*

---

# Садржај

<b>1. Увод.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Биомедицинска примена комплекса платине .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Развој и фармаколошки аспекти деривата платине.....	2
1.1.1.1. Комплекси платине прве генерације.....	2
1.1.1.2. Комплекси платине друге и треће генерације .....	5
1.1.2. Деривати платине у терапији карцинома дојке и меланома.....	7
1.1.2.1. Деривати платине у терапији карцином дојке.....	7
1.1.2.2. Деривати платине у терапији меланома .....	9
<b>1.2. Механизми ћелијске смрти .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Некроза .....	11
1.2.2. Апоптоза .....	13
1.2.2.1. Протеини фамилије Bcl-2 укључени у регулацију апоптозе .....	17
1.2.3. Аутофагија.....	18
1.2.4. Атипични модели ћелијске смрти.....	19
<b>1.3. Ћелијски циклус.....</b>	<b>21</b>
1.3.1. G1/S фаза ћелијског циклуса .....	22
1.3.2. G2/M фаза ћелијског циклуса.....	23
<b>1.4. Утицај хемотерапеутика на ћелијску смрт .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5. Модулација ћелијског циклуса хемотерапеутицима .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6. Имуни одговор на туморске ћелије .....</b>	<b>29</b>
<b>1.7. Имуномодулаторни ефекти хемотерапије.....</b>	<b>32</b>
1.7.1. Утицај цитостатика на ћелије урођене имуности.....	32
1.7.2. Утицај цитостатика на ћелије стечене имуности .....	33
<b>1.8. Лиганди EDDA (етилендиамин-N,N'-диацетато) типа.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Циљ истраживања .....</b>	<b>38</b>
<b>3. Материјал и методе .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. O,O'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-амино-(3-</b>	
<b>-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP) .....</b>	<b>39</b>

<b>3.2. Ћелијске линије</b> .....	<b>39</b>
3.2.1. Линија ћелија мишјег карцинома дојке.....	39
3.2.2. Линије ћелија хуманог карцинома дојке.....	40
3.2.3. Линија ћелија мишјег меланома.....	41
<b>3.3. Испитивање цитотоксичког ефекта DE-EDCP</b> .....	<b>42</b>
3.3.1. МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) тест ...	42
3.3.2. LDH ( <i>Lactate dehydrogenase</i> ) тест.....	43
3.3.3. Анализа апоптотске смрти туморских ћелија помоћу <i>Annexin-a V</i> .....	44
<b>3.4. Анализа ћелијског циклуса</b> .....	<b>45</b>
<b>3.5. "Scratch" тест за анализу миграције ћелија</b> .....	<b>46</b>
<b>3.6. Анализа фенотипа 4Т1 туморских ћелија проточном цитометријом</b> .....	<b>46</b>
<b>3.7. Имунофлуоресценца</b> .....	<b>47</b>
<b>3.8. Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену</b> .....	<b>48</b>
3.8.1. Изолација рибонуклеинске киселине из 4Т1 ћелијске суспензије.....	48
3.8.2. Реверзна транскрипција РНК у комплементарну ДНК.....	49
3.8.3. Квантификација експресије гена.....	49
<b>3.9. Методе за испитивање антитуморске активности DE-EDCP <i>in vivo</i></b> .....	<b>51</b>
3.9.1. Експерименталне животиње.....	51
3.9.2. Експериментални модел карцинома дојке.....	51
3.9.3. Модел експерименталних метастаза меланома.....	53
<b>3.10. Израда патохистолошких препарата</b> .....	<b>54</b>
<b>3.11. Бојење хематоксилином и еозином</b> .....	<b>54</b>
<b>3.12. Верификација броја и величине метастатских колонија</b> .....	<b>55</b>
<b>3.13. Експресија Ki-67 и STAT3 у туморском ткиву</b> .....	<b>55</b>
<b>3.14. Евалуација апоптозе у туморском ткиву</b> .....	<b>56</b>
<b>3.15. Изолација ћелија из тумора дојке</b> .....	<b>57</b>
<b>3.16. Анализа популација мононуклеарних ћелија тумора помоћу проточне цитометрије</b> .....	<b>58</b>
3.16.1. Обележавање мембранских маркера на ћелијама.....	58
<b>3.17. Испитивање потенцијално токсичних ефеката DE-EDCP</b> .....	<b>59</b>

3.18. Статистичка обрада података .....	60
<b>4. Резултати .....</b>	<b>61</b>
4.1. DE-EDCP је ефикасан у убијању ћелија карцинома дојке и меланома .....	61
4.2. Антитуморска активност DE-EDCP у моделу мишићег карцинома дојке и меланома .....	66
4.2.1. DE-EDCP редукује раст и метастазирање карцинома дојке.....	66
4.2.2. DE-EDCP редукује метастазирање меланома у плућа .....	69
4.3. Утицај DE-EDCP на апоптозу туморских ћелија.....	71
4.3.1. DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу .....	71
4.3.2. У туморским ћелијама DE-EDCP смањује експресију Bcl-2 и истовремено повећава експресију Вах и каспазе-3 .....	76
4.4. DE-EDCP инхибира пролиферацију туморских ћелија.....	78
4.4.1. У туморским ћелијама DE-EDCP индукује застој у G0/G1 фази ћелијског циклуса .....	79
4.4.2. DE-EDCP смањује експресију циклина D3, а повећава експресију p16, p21 и p27 .....	81
4.5. DE-EDCP редукује експресију STAT3, NANOG и SOX2 у малигним ћелијама .....	85
4.6. DE-EDCP инхибира миграцију туморских ћелија .....	88
4.7. DE-EDCP индукује акумулацију NKT и NK ћелија у туморску микросредину и мења њихов функционални фенотип.....	90
4.8. Системска примена DE-EDCP показује мању токсичност у односу на цисплатину .....	97
<b>5. Дискусија .....</b>	<b>100</b>
5.1. Цитотоксичко дејство DE-EDCP на ћелије карцинома дојке и меланома	100
5.2. Утицај DE-EDCP на прогресију карцинома дојке и меланома миша .....	104
5.3. DE-EDCP индукује апоптотску смрт малигних ћелија .....	106
5.4. DE-EDCP зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази .....	108
5.5. DE-EDCP инхибира нисходну каскаду сигналног пута STAT3 у тумору ..	111
5.6. DE-EDCP подстиче инфлукс ефективних NKT и NK ћелија у туморску микросредину .....	114



5.7. DE-EDCP индукује мање системско оштећење у односу на цисплатину ...	118
6. Закључци .....	120
7. Скраћенице.....	121
8. Литература .....	123
9. ПРИЛОГ .....	170

## 1. Увод

Модалитети лечења тумора зависе од врсте тумора и стадијума болести. Терапијски приступи су разноврсни и укључују хирушку терапију, радиотерапију, хемотерапију, имунотерапију, генску циљану терапију, електрохемотерапију, криотерапију и криохирургију, фотодинамску и потпорну терапију. Обично се користи комбинација два или више терапијских приступа. Једна од основних системских облика лечења тумора је хемотерапија. Међутим, и даље је немогуће предвидети одговор тумора на примењене цитотоксичне лекове што понекад води до терапијског неуспеха. Овај неуспех је у последње време учестао услед неосетљивости туморских ћелија на терапију односно због развоја резистенције. Резистенција туморских ћелија се може иницијално испољити на примењену терапију због „урођене“ неосетљивости тумора што представља *de novo* резистенцију. Поред ове врсте резистенције, често се дешава да тумор испољи иницијалну осетљивост на терапију, али временом малигне ћелије могу да развију резистенцију на примењену терапију. Важна одлика туморских ћелија је нестабилни генотип који је одговоран за развој нових фенотипских варијанти које карактерише повећани метастатски потенцијал, као и неосетљивост на дејство цитотоксичних лекова са сличним механизмом дејства. Овакав вид резистенције је стечена или прилагођена резистенција. Клиничка неосетљивост тумора на цитотоксичне лекове може настати на више нивоа као што су промене на месту циљаног дејства лекова или промене у процесу интеракције лека са циљаним молекулима што индукује измене у фармакокинетичким параметрима примењених лекова. Поред изостанка жељеног ефекта ове промене углавном доприносе настанку нежељених реакција на примењене лекове. Повећана учесталост резистенције и/или нежељених дејстава лекова је основни разлог за предану посвећеност проналаску нових потенцијалних цитотоксичних лекова.

## 1.1. Биомедицинска примена комплекса платине

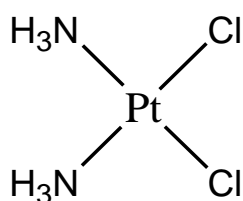
Терапијска примена метала у медицини датира скоро 5000 година уназад (1, 2). Биолошка активност лекова на бази метала лежи у њиховој способности везивања за велики број важних биолошких ентитета (протеине, ензими, хормоне итд.) (2). То потврђује чињеница да централни метални јони, који су носиоци позитивног наелектрисања, имају тенденцију да се везују за негативно наелектрисане биомолекуле (3, 4). Управо због те чињенице различити биолошки протеини и нуклеинске киселине, или њихови саставни делови, могу бити одлични лиганди за јоне метала. То је један од разлога зашто фармацеутска употреба металних комплекса има одличан потенцијал. Развој савремене медицинске неорганске хемије започет је открићем медицинских ефеката цисплатине (5, 6). Након тога уследио је период испитивања терапијске употребе широке палете комплекса метала (7-11). Разматран је велики број једињења различитих координационих стања и механизма цитотоксичног дејства у циљу открића нових антитуморских лекова (12, 13). Међутим, главни проблем у развоју комплекса метала као потенцијалних лекова јесте акумулација јона метала у организму, што за последицу има потенцијално опасне нежељене ефекате. Због тога је неопходно размотрити дистрибуцију и путеве елиминације комплекса метала, као и његову фармаколошку специфичност. Разумевање механизма дејства којим комплекси метала постижу своју активност је један од предуслова за њихову адекватну примену, као и за дизајн нових једињења.

### 1.1.1. Развој и фармаколошки аспекти деривата платине

#### 1.1.1.1. Комплекси платине прве генерације

Цисплатина ( $cis$ -[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP; Слика 1) синтетисана је у Италији 1844. године (14), међутим антитуморски ефекат овог комплекса платине(II) откривен је тек 1965. године (5, 6). Проучавајући ефекат електричних поља на раст и деобу *Escherichia-e coli*, уочено је да сунчева светлост, амонијум-хлорид и електрода платине заустављају деобу бактеријских ћелија. На почетку се сматрало да је изостанак деобе директна последица дејства електричног поља, међутим даљим анализама утврђено је да су у процесу електролизе, формиран мали комплекси платине и то *cis*-диаминодихлоридоплатине(II) која је носицал

антитуморске активности. Након овог сазнања *Rosenberg* и сарадници (15, 16) испитали су ефекат добијеног комплекса платине(II) у мишјем моделу саркома (sarcoma 180) и леукемије (L1210). Након доказане антитуморске активности, цисплатина је већ 1971. године уведена у прву фазу клиничких испитивања. Агениција за храну и лекове Сједињених америчких држава је 1978. године одобрила употребу цисплатине у лечењу карцинома тестиса и бешике (17). Данас се цисплатина успешно користи у терапији меланома, тумора тестиса, јајника, материце, бешике, главе, врата, дојке и плућа (18-20).



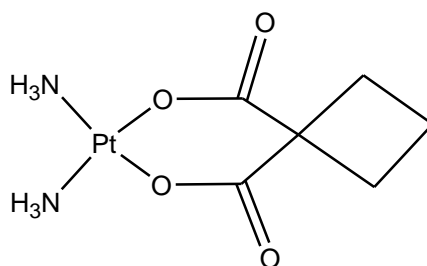
**Слика 1.** Хемијска структура цисплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Механизми антиканцерског дејства цисплатине подразумевају низ промена на нивоу једра и цитозоле (21). Као мали молекул, који садржи два хлоридо лиганда која представљају лако одлазеће лиганде и два чврсто везана аминокиселинска лиганда, цисплатина се интрацелуларно активира низом реакција које се заснивају на измени хлоридних лиганда молекулима воде (22). Након интравенске примене цисплатине, висока концентрација хлорида у плазми је одговорна за структурну неизмењеност молекула. Након што цисплатина доспе у ћелију, или простом дифузијом кроз ћелијску мембрану или активним транспортом помоћу 1. типа транспортера бакра *CTR1* (енгл. *cooper transporters type 1*), мања концентрација јона хлорида у цитоплазми узрокује брзу хидролизу цисплатине. Замена хлоридо лиганда молекулима воде ствара високо реактивне катјонске комплексе платине (22, 23). Настали молекули, моно- или диаква комплекси платине, склони су да интерагују са великим бројем цитоплазматских субстрата као што су глутатион, металотионеинин, метионин и протеини који у својој структури садрже цистеин (24). Индукција оксидативног стреса, која је последица ових интеракција, доприноси оштећењу ДНК (деоксирибонуклеинске киселине), али исто тако омогућава и инактивацију цисплатине цитопротективним антиоксидативним системом (25). Новонастали комплекси ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ ) или ( $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ )

када доспеју у једро ћелије формирају координативну ковалентну везу са атомима азота нуклеинских база ДНК, и то најчешће у позицији 7 имидазоловог прстена гуанина или аденозина (26-28). Током формирања оваквих веза настају монофункционални или дифункционални комплекси. Дифункционално везивање молекула цисплатине и ДНК, може настати везивањем новонасталих комплекса цисплатине за азоте гуанина или аденозина из истог ланца ДНК или пак између суседних ланаца ДНК. У 60% случајева цисплатина се кординише за суседне ланце ДНК и формира бифункционални макрохелат (26, 27). Овакве промене у структури ДНК које су последица везивања цисплатине инхибирају даљу транскрипцију и репликацију и следствено покрећу смрт ћелије (26-28). Иако цисплатина важи за потентан хемиотерапеутик њена примена праћена је бројним ограничењима. Антитуморски ефекат је дозно зависан, али повећање дозе је углавном праћено озбиљним нежељених реакцијама. Наиме, главни ограничавајући фактор у примени цисплатине је њена неселективност. Тако, цисплатина индукује ћелијску смрт не само туморских већ и других ћелија у организму што за последицу има нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, неутропенију, тромбоцитопенију, периферну неуропатију, ембриотоксичност или мутагеност. Сагледавањем хемијске структуре цисплатине може се закључити да је овај комплекс изузетно реактиван. Интересантно је да само 5-10% од укупне примењене дозе цисплатине интерагује са молекулом ДНК, остатак примењене дозе ступа у интеракције са молекулима који у својој структури поседују тио-групе (29). Заправо цисплатина већ у плазми може да интерагује са протеинима грађених од аминокиселина које садрже сумпор (метионин и цистеин), као што је на пример албумин. Поред тога, познато је да се цисплатина може везати и за фосфолипиде или фосфатидил серин у ћелијској мембрани а након хидролизе у цитоплазми може реаговати са бројним хемијским врстама, углавном са протеинима и аминокиселинама које имају слободне донорске *S* и *N* атоме, као што су јон карбоната, фосфати, глутатион или металотионеиним. Бројне интеракције смањују ефикасност и биоискористљивост овог комплекса платине(II) (28,30).

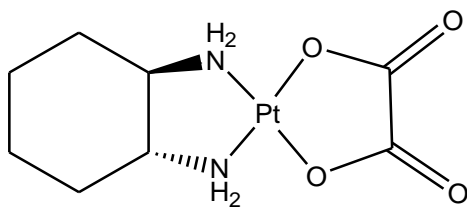
### 1.1.1.2. Комплекси платине друге и треће генерације

Поред тога што је ефикасност цисплатине условљена хемијском структуром и неселективношћу, убрзо је уочено да је туморицидно дејство овог хемиотерапеутика ограничено и брзом појавом резистенције туморских ћелија након поновљених доза (2). У циљу да се ови проблеми превазиђу, последњих тридесет година активно се ради на дизајну лекова на бази метала који би имали ефикасан цитотоксички потенцијал уз истовремено мањи број нежељених ефеката (30). Аналоги цисплатине друге и треће генерације синтетисани су са циљем да се смањи токсичност и/или повећа ефикасност цисплатине. Карбоплатина (1,1'-*cis*-циклобутилдикарбоксилатодиаминоплатина(II)), недаплатина (*cis*-гликолатодиамин-платина(II)) и оксалиплатина (*cis*-оксалато-*trans*-1,2-диаминоциклохексан-платина(II)) су једини аналоги који се до данас успешно користе у пракси (30-34). Карбоплатина од 1989. године, а оксалиплатина од 2002. године се успешно користе у већини земаља, док је употреба недаплатине дозвољена само у Јапану.



Слика 2. Хемијска структура карбоплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Карбоплатина уместо хлоридо лиганда има бидентатни цикло-турандикарбоксилатни лиганд (Слика 2) (30). Ове хемијске измене учиниле су да молекул карбоплатине буде инертнији у односу на цисплатину, што узрокује мање споредних реакција, а самим тим и бољи „безбедносни профил“. Има исте индикације за примену као и цисплатина, и може да се користи у терапији карцинома јајника, плућа, главе и врата. Од нежељених дејстава најчешће индукује мучнину и повраћање, као и мијелосупресорне ефекте. Промене у хемијској структури анулирале су развој нефротоксичности након примене карбоплатине, тако да се она може толерисати у већим дозама у односу на цисплатину (2, 30). За разлику од карбоплатине, оксалиплатина има другачији опсег индикација у односу на цисплатину.



**Слика 3.** Хемијска структура оксалиплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Оксалиплатина у својој структури уместо аминских поседује диаминоциклохексански лиганд (*dach*) што за последицу има ефикасну антитуморску активност нарочито на оне туморске ћелије које су резистенте на цисплатину (Слика 3) (31, 32). Уз то, оксалиплатина је аналог цисплатине који може да се примењује орално и данас се успешно користи у лечењу карцинома колона. Међутим, познато је да може да изазове неуропатију, замор, неутропенију, ототоксичност, мада је учесталост ових нежељених ефеката мања у поређењу са цисплатином. Недаплатина се од 1995. године успешно користи у лечењу карцинома плућа, једњака, главе и врата, док су повољни ефекти регистровани и код карцинома јајника и желуца (35-37). Документовано је да недаплатина има боље ефекте од карбоплатине, бољу растворљивост у води као и мању токсичност (нефротоксичност и мијелосупресију). У покушају да се смање нежељени ефекти, развијени су нови лекови: лобаплатина и хептаплатина (38). Многи аналози платине (пикоплатин, триплатин тетранитрат (BBR3464), сатраплатин (JM118), трансплатин, пириплатин) још увек су тема испитивања клиничких студија (39). Хронична мијелоидна леукемија, метастатски карцином дојке и карцином плућа су индикације за примену лобаплатине (40). Након употребе лабаплатине забележени су следећи нежељени ефекти: тромбоцитопенија, анемија, мучнина и повраћање. Међутим, примећена је мања вероватноћа развоја алопеције, нефро-, неуро- или ототоксичности после интравенске примене овог лека. Предност развоја хептаплатине се огледа у снажној антитуморској активности на ћелијама које одликује резистентност на цисплатину, па се ово једињење користи у лечењу карцинома желуца (41).

## 1.1.2. Деривати платине у терапији карцинома дојке и меланома

### 1.1.2.1. Деривати платине у терапији карцином дојке

Цисплатина и карбоплатина, као циклус-независни хемотерапеутици на бази платине, користе се у лечењу карцинома дојке (42-44). Мада је стопа смртности оболелих смањена за око 40% у односу на деведесете године прошлог века што је директна последица раног откривања и напредне фармацеутске стратегије, међутим карцином дојке је и даље водећи узрок смртности жена у свету (45). Поред хирушке интервенције и радиотерапије које су основа у лечењу карцинома дојке, хемотерапија такође игра важну улогу у терапији ове врсте тумора. Избор адекватног хемотерапеутика углавном зависи од подгрупе молекулске класификације карцинома дојке. Молекулска класификација карцинома дојке темељи се на експресионом профилу гена (46). Тако, карцином дојке је класификован у пет подгрупа на основу експресије рецептора за естроген (енгл. *Estrogene receptor, ER*) и прогестерон (енгл. *Progesterone receptor, PR*), као и Ki-67 и HER2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*): 1) луминални А тип који карактеришу позитивна експресија ER или PR и негативна експресија Ki-67 и HER2; 2) луминални В тип одликују или позитивна експресија ER или PR, уз позитивну експресију Ki-67 и одсуство молекула HER2; 3) карцином са прекомерном експресијом HER2 који не експримира ER и PR; 4) базалоидни је троструко негативан карцином који не експримира нити ER и PR, нити HER2 и 5) *Normal-like* подтип карцинома дојке, слично луминалном А типу, карактерише позитивна експресија ER и PR и негативна експресија Ki-67 и HER2, али има лошију прогнозу (45-47). Луминални А тип карцинома дојке чини више од 40% свих типова карцинома дојке, обично је праћен ниским хистолошким градусом и најбољом прогнозом. Карцином луминалног В типа обично има високи хистолошки градус и индекс пролиферације, као и лошију прогнозу у односу на луминални А тип. HER2-позитивни тип карцинома дојке карактерише висок хистолошки градус и индекс пролиферације. За овај тип карцинома карактеристична је амплификација гена за HER2 која резултује повећаном ћелијском пролиферацијом, ангиогенезом, инвазијом и метастазирањем, као и инхибицијом апоптозе (48-52). Базалоидни тип карцинома дојке чини око 15% свих карцинома дојке. Овај тип је обично повезан са лошијом прогнозом и мутацијама гена BRCA-1 (енгл. *Breast Cancer Gene 1*). Базалоидни тип карцинома дојке одликују висок пролиферативни капацитет туморских ћелија без адекватне



циљане терапије (48-52). У адјувантном лечењу карцинома дојке користе се антрациклински и неантрациклински режими, док се у системској терапији метастатске болести користе и комбинације других цитотоксичних лекова са таксанима (53, 54). У хормонској терапији раног карцинома дојке користе се тамоксифен и инхибитори ароматазе треће генерације. Класичан терапијски режим карцинома дојке представља комбинацију циклофосфамида, метотрексата и 5-флуороурацила. Код рецидивантног или метастатског карцинома дојке примењује се антрациклински комбиновани режим флуороурацила, епирубицина и циклофосфамида. HER2- позитивни тип карцинома дојке добро делује на тацелизумаб, моноклонско антитело специфично за HER2, које се може комбиновати са класичним хемотерапеутицима (55).

Деривати платине данас се најчешће користе у лечењу базалоидног типа карцинома дојке. Код пацијенткиња са метастатским карциномом дојке код којих су деривати платине самостално ординирани као прва терапијска линија њихова учинковитост је далеко већа у поређењу са њиховом применом код оболелих жена које су претходно лечене неким другим хемотерапеутиком (56, 57). Ефикасност цисплатине је била већа у поређењу са другим хемотерапеутицима, мада је примена овог лека била праћена бројним нежељеним реакцијама (58-63). Испитиван је и учинак комбинација деривата платине са другим цитостатицима, који је био посебно бољи од самосталне терапије код оболелих којима је претходно одриниран неки други хемотерапеутик (64). Изузетно добре резултате показала је комбинација деривата платине са таксанима (65-68). Употреба деривата платине са биљним алкалоидима (винорелбином) показала је добре резултате код оболелих особа који су претходно лечене антрациклинима и таксанима (64, 69-71). Комбинација цисплатине са етопозидом имала је умерену активност, а повећану токсичност (72-75). За разлику од других лекова, комбинација карбоплатине са етопозидом показала је бољу учинковитост када је коришћена као прва терапијска линија у поређењу са употребом код претходно лечених пацијентата (64, 76, 77). Сви резултати који осликавају учинковитост комбинација деривата платине са антрациклинима били су разочаравајући и оне као такве нису препоручене код метастатског карцинома дојке. Активност је била ограничена а токсичност висока (64). Код пацијенткиња са метастатским карциномом дојке кога одликује повећана експресија HER2, комбинација деривата платине и трастузумаба је обећавајућа уколико се користи као прва терапијска линија (78-80). Чини се да су ефикасност и токсичност слични уколико се користе цисплатина или карбоплатина (64). У терапији

базалоидног типа карцинома дојке комбинација таксана (доцетаксела и паклитаксела) са дериватима платине показује обећавајуће резултате. Такође, метастатски базалоидни тип карцинома дојке добро реагује на комбинацију цисплатине или карбоплатине са гемцитабином или фосфамидом. Неколико студија испитује ефекат комбинације цисплатине или карбоплатине са бевацизумабом, цетуксимабом, инипарибом или олапарибом код пацијенткиња са метастатским базалоидним типом карцинома дојке кога карактеришу мутације BRCA-1/2 (81-84).

#### *1.1.2.2. Деривати платине у терапији меланома*

Цисплатина и карбоплатина имају скромну активност у терапији метастатског меланома (85, 86). Меланом је најагресивнија форма тумора коже који потиче од малигно трансформисаних меланоцита (87). Интраепидермална пролиферација оваквих малигну хелија карактеристична је за рани стадијум меланома који је познат као фаза радијалог раста. Сматра се да у овој фази раста меланом углавном или нема или има веома слаб метастатски потенцијал зато што малигно трансформисани меланоцити пролазе кроз базалну мембрану између епидермиса и дермиса (88-91). Фаза вертикалног раста меланома се надовезује на фазу радијалног раста када малигни меланоцити инфилтрирају у дубље поткожне структуре. У овој фази запажена је појачана митотска активност и повећани метастатски потенцијал. Системска дисеминација у финалном стадијуму прогресије омогућава метастазирање меланома у различите органе (88-91). Подаци из литературе указују на то да је десетогодишње преживљавање пацијената са метастатским меланомом мање од 10% (92). Више од три деценије након првобитног одобрења Америчке агенције за храну и лекове, дакарбазин и даље представља златни стандард у лечењу меланома (85, 86). Висока доза интерлеукина-2 која се примењује у лечењу метастатског меланома и даље показују скромне резултате у пракси (85, 86). Бројни покушаји да се побољша преживљавање пацијената са метастатским меланомом, засновани су на модулацији постојеће терапије и показали су се неуспешним. Хемотерапеутици који се користе у лечењу меланома су углавном алкилирајући агенси (дакарбазин, темозоломид и деривати нитрозоуреје), деривати платине и цитостатици биљног порекла (винкрестин и винбластин). У терапији метастатског меланома самостална примена цисплатине показује корисне ефекте код мање од 10% лечених пацијената. Међутим, бољи учинак је примећен

уколико се примени комбинација високе дозе цисплатине и амифостина, мада ова терапијска опција неповољно утиче на преживљавање пацијената (93). Са друге стране код пацијената који су били на терапији карбоплатином забележена стопа одговора на терапију је 19% (94). Такође, каброплатина се примењује и у комбинацији са паклитакселом код пацијената са метастатским меланомом који су претходно лечени неким другим хемиотерапеутицима (95). Истовремена примена цисплатине, дакарбазина, кармустина и тамоксифена показује бољу ефикасност у односу на самосталну примену дакарбазина, али и већи број озбиљних нежељених ефеката (96-98). У последње време испитује се ефекат комбинације цисплатине, дакарбазина и винбластина (99, 100). Резултати друге фазе клиничког испитивања показују боље ефекте у поређењу да златним стандардом.

## 1.2. Механизми ћелијске смрти

Смрт ћелија настаје под утицајем различитих патолошких чинилаца, као што су физичке и/или хемијске ноксе, микроорганизми, али и због недостатка потребних нутријената када настаје неповрато оштећење ћелије. Међутим, поред овакве изазване, "случајне" смрти ћелија, постоји и физиолошка смрт ћелија која се запажа током ембрионалног развоја, диференцијације, као и у процесу развоја и регулације имунског система. Смрт ћелије може се класификовати на основу морфолошких промена које настају у ћелији (апоптоза, некроза и аутофагија), ензимских карактеристика (са и без укључивања нуклеаза или различитих класа протеаза, као што су каспазе, калпени, катепсини и трансглутаминазе), функционалних аспеката (програмирана или случајна, физиолошка или патолошка смрт) или имунских карактеристика (имуногени или не-имуногени) (101). Комитет за номенклатуру ћелијске смрти је 2005. године формулисао први круг препорука и од тада је у пољу истраживања ћелијске смрти направљен значајан напредак (102). Године 2009., овај комитет дао је предлог да се ћелија може сматрати мртвом ако показује неки од следећих биохемијских или морфолошких критеријума: 1) губитак интегритета ћелијске мембране, 2) фрагментацију једра и читаве ћелије и формирање дискретних (апоптотских) телашаца, и / или 3) телашце или фрагменти ћелије у *in vivo* систему су обухваћени суседном ћелијом (103).

На основу морфолошких критеријума у ћелијама сисара постоје три врсте ћелијске смрти: 1) апоптоза (I тип ћелијске смрти), 2) аутофагија (II тип ћелијске смрти) и 3) некроза (III тип ћелијске смрти). У последње време описани су и нови атипични модалитети ћелијске смрти у нади да ће нерегуларна, али униформна, номенклатура олакшати комуникацију међу научницима и на крају убрзати темпо открића (103).

### 1.2.1. Некроза

Некроза је тип ћелијске смрти која наступа услед немогућности ћелије да одговори на неки од нефизиолошких стимулуса, као што су механичка оштећења, токсини, вируси или хипоксија. Од апоптозе и аутофагије се разликује првенствено по рапидном губитку потенцијала ћелијске мембране или услед оштећења или промене функције јонских пумпи и канала. Некроза ћелије се морфолошки карактерише повећањем ћелијског волумена, бубрењем органела, руптуром ћелијске мембране и накнадно губитком интрацелуларног садржаја (104). Зато се овај тип ћелијске смрти углавном дефинише као пасиван процес који је последица метаболичке "катастрофе" која се огледа у брзом губитку аденозин трифосфата (енгл. *Adenosine triphosphate*, *ATP*) и праћена је инфламацијом (105). Дуго времена се некроза сматрала случајним, неконтролисаним типом смрти ћелије, али у последње време све је већи број доказа да је некротична ћелијска смрт фино регулисана низом сигналних путева и катаболичких механизма (104, 106). Наиме, запажено је да инхибиција догађаја који детерминишу и апоптозу и аутофагију за последицу има покретање некротичне ћелијске смрти. На пример, у случају примене инхибитора каспазе, показано је да рецептори смрти (TNF-R1, Fas/CD95 и TRAIL-R) и *Toll-like* рецептори (TLR3 и TLR4) могу да покрену некрозу ћелије (107, 108). Ћелијска смрт која је посредована TNFR1, Fas/CD95, TRAILR и TLR3 наизглед зависи од киназе RIP1 (енгл. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*, RIPK1) (109), а то је доказано блокадом и хемијском инхибицијом помоћу некростатина-1 (110-112). Неки аутори су предложили израз 'некроптоза' да би указали на регулисану некрозу. На биохемијском нивоу, некроптоза може бити дефинисана као врста ћелијске смрти која се може избећи инхибирањем RIPK1 (било путем генетичких или фармаколошких метода).

У покретање некротске смрти ћелија могу да буду укључени различити медијатори некрозе, мада је још увек нејасно како се они међусобно повезују. Овај тип ћелијске смрти може да буде узрокован инхибицијом митохондријалног респираторног ланца (113). Услед губитка трансмембранског потенцијала унутрашње митохондријалне мембране нестаје протонски градијент и отварају се митохондријалне поре. Отварање пора за последицу има престанак синтезе АТФ у току оксидативне фосфорилације. Иако се недостатак АТФ код оних ћелија које се брзо деле може надокнадити гликолизом, повећана активација протеина PARP1 (енгл. *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*, PARP1) која се среће код одређених ћелија у некрози, резултује инхибицијом гликолизе и последично смањењем синтезе АТФ, као и потпуним енергетским колапсом који води ћелију у смрт (114). Уз то, један од централних догађаја у некрози је повећана концентрација калцијума у цитоплазми (104, 115). Овај пораст који настаје било због ослобађања калцијума из ендоплазматског ретикулума или његовог уласка кроз ћелијску мембрану, индукује преоптерећење митохондрија, стварање пора у митохондријалној мембрани, као и активацију калцијум зависних протеаза (нпр. калпена и катепсина) без каспаза што деградирањем циљаних протеина покреће некрозу (116). Реактивни медијатори кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS) могу да буду укључени у развој некрозе. Оксидативни стрес који је посредован реактивним медијаторима кисеоника резултује деструкцијом макромолекула, укључујући ДНК, липиде и протеине (117). На оштећења ДНК, ћелија може реаговати хиперактивацијом протеина PARP1. Са друге стране, деструкција липида за последицу има губитак интегритета унутарћелијских мембрана и следствено ослобађање лизозомалних протеаза и повећање нивоа калцијума у ћелији (118). Оштећење ћелијске мембране узроковано претходно наведеним факторима прати изливање целокупног ћелијског садржаја у околну ткиво што за последицу има покретање инфламације и ткивно оштећење. До сада не постоји консензус о биохемијским променама на основу којих се недвосмислено може идентификовати некроза.

### 1.2.2. Апоптоза

Термин апоптоза уведен је први пут 1972. године као специфични морфолошки аспект смрти ћелије (118). Апоптоза, као 1. тип ћелијске смрти, обухвата низ молекулских догађаја који ћелију уводе у смрт, уз изостанак инфламације. Прво, дешава се губитак међућелијских веза што је праћено кондензацијом цитоплазматских протеина и смањењем волумена ћелије. Друго, хроматин се кондензује и настаје пикноза, а затим се деградира тако да једро добија изглед потковице. Треће, молекул ДНК се фрагментира, цитохром С се ослобађа из митохондрија, а ендоплазматски ретикулум постаје дилатиран. Затим следи балонирање (енгл. *blebbing*) ћелијске мембране што је праћено цепањем једра (119). Наступају и промене на мембрани апоптотске ћелије као што је транслокација фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну мембране што препознају макрофаги (120). Поред фосфатидилсерина, калретикулин је сигнал за препознавање апоптотске ћелије. Оваква ћелија се распарчава на мала, мембраном обавијена тела са или без хроматина која се називају апоптотска тела. На крају ова апоптотска тела фагоцитишу макрофаги и неутрофили (121). Одсуство инфламације је последица развоја апоптотских тела и изостанка изливања ћелијског садржаја у међућелијски простор као што је то случај код некрозе (Схема 1).

Активација протеолитичког система каспаза је централни догађај у апоптози (122). Каспазе чине групу аспартат-специфичних цистеин протеаза. Присутне су у свим ћелијама у неактивној форми проензима које се називају прокаспазе. Када се активирају, цепањем у оквиру унутрашњег протеолитичког места, индукују активацију других прокаспаза што покреће иреверзибилну протеолитичку каскаду која појачава апоптотски сигнални пут и последично убрзава ћелијску смрт. Фамилија каспаза разликују се по својим физиолошким улогама. Разликују се инфламацијске (каспаза-1, -4, -5 и -13) и апоптотске (каспаза-3, -6, -7, -8, -9 и -10) каспазе (123). Апоптотске каспазе обухватају иницијаторске каспазе (каспаза-2, -8, -9 и -10) одговорне за покретање протеолитичке каскаде, и ефекторске каспазе (каспаза-3, -6 и -7) које протеолитички секу ћелијске супstrate (124). Каспазе делују на ћелијске протеине који регулишу апоптозу, као и на ензиме укључене у регулацију како ћелијског циклуса тако и поправке ДНК.

Различити стимулуси могу покренути апоптозу. Одговор ћелије на апоптотски сигнал зависи од врсте и јачине стимулуса, фазе ћелијског циклуса, као и односа про- и анти-апоптотских протеина (125). Покретање апоптозе у ћелији је условљено активацијом једног од два главна пута апоптозе, а то су спољашњи или унутрашњи пут. Ова два пута су међусобно повезана и зна се да молекули ангажовани у једном могу да покрену и други сигнални пут. Уз то, апоптозу индукују и перфорини и гранзим-А или -В.

Ћелијска смрт индукована рецепторима смрти (спољашњи пут апоптозе).

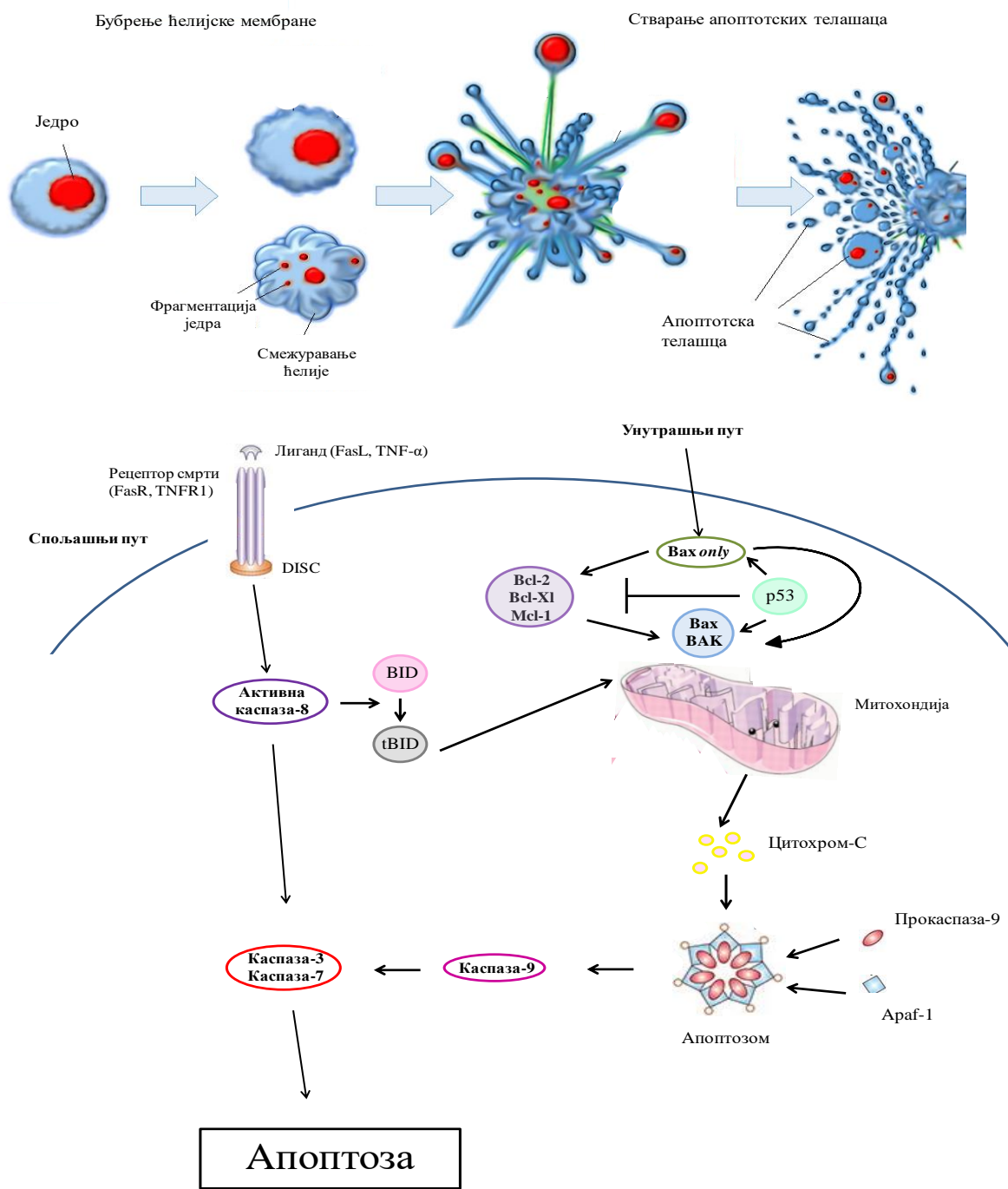
Спољашњи пут апоптозе се активира везивањем специфичних лиганата за одговарајуће површинске рецепторе односно за рецепторе смрти који припадају породици рецептора за TNF (енгл. *tumor necrosis factor*) (126). Овакви рецептори поседују домене смрти. Везивање лиганата за рецепторе смрти, као што су рецептори Fas (CD95), TNF и TRAIL (DR4) индукује конформационе промене у домену смрти и следствено регрутацију протеина и проензима (прокаспазе-8 и -10) при чему настаје комплекс DISC (енгл. *death inducing signalling complex*) (127-129). Настали комплекс активира каспазу-8 и -10 које затим покрећу протеолитичку каскаду и то активацијом каспазе-3, -6 и -7. За TNF рецептор 1 се везује адаптерски протеин TRADD (енгл. *TNFR1-associated death domain protein*), који је способан да веже различите протеине у активаном делу рецептора. Ако се активирани део веже за домене смрти FADD (енгл. *Fas-associated death domain*), активираће се прокаспаза-8 и следствена каскада ефекторских каспаза. Оштећење митохондрија у сигналном путу FasL/FasR посредовано је активацијом проапоптотског протеина Bid уз помоћ каспазе-8 и ово је један од примера укрштања спољашњег и унутрашњег пута апоптозе (Схема 1).

Ћелијска смрт услед губитка стимулуса за преживљавање (унутрашњи пут апоптозе). Апоптозу могу изазвати и бројни унутарћелијски сигнали а то су: одсуство фактора раста, хормона и цитокина, као и оштећење ДНК, вируси, кисеонични радикали и друго. На ове сигнале су осетљиви протеини у комплексу митохондријаних пора који отварају поменуте поре, што за последицу има губитак митохондријалног трансмембранског потенцијала и ослобађање различитих проапоптотских протеина у цитоплазму (130). Прву групу ових протеина чине циторхом С, Smac/DIABLO и серин протеаза HtrA2/Omi који активирају митохондријални пут апоптозе зависан од каспаза. Циторхом С може да веже и активира молекулу Araf-1 (енгл. *Apoptotic protease activating factor 1*) и прокаспазу-9 и на тај начин да индукује формирање апоптозома

који последично активира ефекторску каспазу-3. Са друге стране Smac/DIABLO и HtrA2/Omi подстичу апоптозу и то инхибицијом антиапоптотских протеина. Другу групу ових протеина чине AIF (енгл. *apoptosis inducing factor*), ендонуклеаза G (енгл. *endonuclease G*, EndoG) и CAD (енгл. *caspase-activated denase*, CAD) који представљају касни сигнал јер се ослобађају из митохондрија тек онда када ћелија 'одлучи' да умре. Независно од каспаза, AIF и EndoG се транслоцирају у једро, док се CAD пре ове транслокације активира под дејством каспазе-3 (130, 131). Када уђу у једро, ови протеини индукују фрагментацију ДНК. У случају да сигнал са рецептора није довољно снажан, може се покренути унутрашњи, митохондријални пут апоптозе који аплификује почетни сигнал са рецептора.

Апоптотска ћелијска смрт индукована перфоринима и гранзимима.  
Цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити могу да покрену апоптозу у циљаној ћелији индуковањем спољашњег пута апоптозе након интеракције FasL/FasR (132). Уз то, ове ћелије изазивају апоптотску смрт ћелије помоћу перфорина и гранзима (133). Перфорини су пептиди који формирају поре у ћелијској мембрани циљане ћелије кроз које улазе други макромолекули ослобођени из цитоплазматских гранула цитотоксичких Т лимфоцита (134). Међу излученим протеинима најважније су серин протеазе, гранзим А и гранзим В (135). Гранзим А индукује апоптотску ћелијску смрт независну од каспаза (133), док гранзим В активира каспазу-3, -7, -8 и -10 и разлаже ICAD (енгл. *Inhibitor of caspase-activated DNase*) (136). Такође, гранзим В може да користи митохондријални пут за појачавање сигнала смрти тако што индукује продукцију кисеоничних слободних радикала (ROS), разлагање Bid протеина и последично ослобађање цитохрома С (137, 138). Директном активацијом каспазе-3 прескаче се целокупна каскада и директно индукује апоптозу (133).





**Схема 1.** Механизми апоптозе (кориговано према: *Smith A et al. WikiJournal of Medicine 2017; 4(1):1-3* u *Kondratskyi A et al. Biochim Biophys Acta. 2015;1848(10 Pt B):2532-46*).

### 1.2.2.1. Протеини фамилије Bcl-2 укључени у регулацију апоптозе

Протеини фамилије Bcl-2 (енгл. *B cell leukemia/lymphoma 2*) контролишу ћелијску смрт првенствено директним интеракцијама које су укључене у регулацију пропустљивости спољашње мембране митохондрија (енгл. *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP). Отварање пора на MOMP покреће иререверзибилно ослобађање протеина интермембранског простора, што за последицу има активацију каспаза и коначно апоптозу. Неки протеини фамилије Bcl-2 имају инхибициони а други активациони ефекат на апоптозу. Активациони ефекат остварују проапоптотски протеини, као што су Вах (Вах, Вак и Вок) и BНЗ-*only* протеини (Bid, Vim, Puma, Noxa, Bad), док инхибициони ефекат остварију антиапоптотски протеини (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bag, Mcl-1, A1) (139). Баланс про- и антиапоптотских протеина у ћелији детерминише сензитивност ћелије на апоптотски стимулус и активацију унутрашњег пута апоптозе. У физиолошким условима антиапоптотски протеини везани су за спољашњу мембрану митохондрија где одржавају њену стабилност и непропустљивост. Антиапоптотски протеини неутралишу проапоптотске молекуле (140). Пропустљивост митохондријалне мембране и последично апоптоза, настаје услед инхибиције антиапоптотских протеина, као и активације проапоптотских Вах и Вак протеина под дејством BНЗ-*only* активатора. Дерепресорски BНЗ-*only* протеини (Puma, Bad, Noxa, Bmf и Bik/Bik) инхибирају антиапоптотске Bcl-2 протеине, али немају могућност активације Вах/Вак. С друге стране, активаторски BНЗ-*only* протеини (Bid и Vim) имају способност да чине и једно и друго (141). Услед ћелијског стреса активни облици BНЗ-*only* активатора директном интеракцијом индукују конформационе промене, димеризацију и инсерцију Вах и Вак у митохондријалну мембрану што узрокује формирање пора и повећану пропустљивост спољашње мембране митохондрија. Кроз ове поре цитохром С се ослобађа и улази у цитоплазму, где се везује за Аraf-1 и формира апоптозом што за последицу има активацију каспаза и коначно апоптозу (142). Антиапоптотски чланови Bcl-2 фамилије могу да се вежу за неке протеинске домене у саставу трансмембранских митохондријалиних пора и да на тај начин спрече пропустљивост мембране митохондрија.

### 1.2.3. Аутофагија

Аутофагија је катаболички механизам ћелијске деградације сопствених нефункционалних или непотребних цитоплазматских компоненти унутар лизозома. Аутофагија представља алтернативни извор енергије, као и привремени механизам преживљавања ћелије у одређеним ситуацијама (143). Разликују се три типа аутофагије а то су: микро-, макро и аутофагија посредована шаперонима (енгл. *Chaperone mediated autophagy, CMA*) (144-146). Микроаутофагија укључује неселективну пиноцитозу малих делова цитоплазме директном инвагинацијом мембране лизозома. Аутофагија посредована шаперонима је селективани процес деградације протеина који захтева присуство протеина Hsc-70 (енгл. *Heat shock cognate protein of 70 kDa*) које препознају шаперони (144, 145). Макроаутофагија подразумева испоруку цитоплазматског садржаја лизозому помоћу аутофагозома, који се спаја са лизозомом и формира структуру названу аутолизозом. Аутолизозом обавља ћелијску деградацију под утицајем киселих лизозомалних хидролаза (146). Аутофагозом настаје обухватањем ћелијског садржаја предодређеног за разлагање помоћу двоструке мембране чији се крајеви спајају. Процес аутофагије је регулисан сигналним путем PI3K/AKT/mTOR (PI3 киназа, енгл. *Phosphatidyl Inositol 3 kinase*; AKT- серин/треонин киназа која кад се активира PI3-киназом, активира mTOR (енгл. *mammalian target of Rapamycin*) који контролише доступност хранљивих састојака ћелији и ћелијски метаболизам (147). У одсуству фактора раста покренут је сигнални пут PI3K/AKT/TSC (енгл. *tuberous sclerosis complex*)/mTOR који активира аутофагију. У физиолошким условима, AKT киназа активира mTOR киназу и на тај начин инхибира аутофагију. Услед метаболичког или оксидативног стреса нарушен је однос аденозин монофосфат/аденозин трифосфат (енгл. *Adenosine monophosphate/Adenosine triphosphate*, AMP/ATP). Повећање односа AMP/ATP активира AMPK (енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*). Протеин AMPK индукује аутофагију директном инхибицијом mTOR киназе. У случају хипоксије и гладовања, киназа регулисана ванћелијским сигнаlima (енгл. *extracellular signalregulated kinase, ERK*) такође индукује аутофагију тако што инхибира mTOR киназу (147).

#### 1.2.4. Атипични модели ћелијске смрти

У последње време детерминисано је неколико атипичних модела ћелијске смрти:

Некроптоза омогућава програмирану ћелијску смрт независно од активације каспаза. Регулацију овог првооткривеног типа регулисане некрозе индукује фактор некрозе тумора- $\alpha$  (енгл. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ). Продукција TNF $\alpha$  стимулише експресију рецептора 1 за TNF $\alpha$ , па након везивања TNF $\alpha$  за поменути рецептор активирају се протеин киназе RIPK1 (енгл. *receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1*) и RIPK3 (енгл. *receptor interacting serine/threonine kinase 3*) и на тај начин се формира комплекс познат као некрозом. Некрозом затим фосфорилише пронекроптотски протеин MLKL (енгл. *mixed lineage kinase domain-like protein*) који се уграђује у липидни двослој ћелијске мембране што резултује ослобађањем ћелијског садржаја у ванћелијски простор (148).

“Митотска катастрофа” је тип смрти ћелија који се јавља или током или непосредно после дисрегулисане/неуспешне митозе и може да буде праћена морфолошким променама, укључујући микронуклеацију (хромозоми и/или хромозомски фрагменти нису равномерно распоређени између једара ћерка ћелија) и мултинуклеацију (присуство два или више једара са сличним или хетерогеним величинама, која произилазе из недовољног одвајања током цитокинезе). Овај модалитет ћелијске смрти може да води или у апоптозу или у некрозу (149).

Ентоза, првобитно описана као облик "ћелијског канибализма" код лимфобласта пацијената оболелих од Хунтингтонове болести, је нови модалитет смрти ћелије у којој једна ћелија обухвата једну од својих живих суседних ћелија, која затим умире унутар фагозома (150). Интересантно, ћелије које најчешће улазе у ентозу су ћелије хуманог карцинома дојке MCF-7, којима недостају и каспаза-3 и беклин-1, па су на тај начин релативно онеспособљене за апоптозу и аутофагију (151).

Аноиксис је у суштини модалитет ћелијске смрти по принципу апоптозе која је индукована губитком везивања на супстрат или за друге ћелије. Код овог специфичног облика апоптозе, молекулски механизми ове ћелијске смрти одговарају механизмима класичне апоптозе (152).

Екситотоксичност се у зависности од интензитета иницијалног стимулуса, наизглед преклапа са другим врстама смрти, као што су апоптоза и некроза и као критичан догађај укључује пропустљивост мембране митохондрија. Из ових разлога, а и због заједничких регулатора, као што су оксиди азота, екситотоксичност се не може сматрати посебним модалитетом ћелијске смрти. Карактеристична је за неуроне и настаје под утицајем екситаторних аминокиселина (глутамата) а праћена је повећаном концентрацијом калцијума у цитоплазми неурона што индукује ћелијску смрт (153).

Параптоза је тип програмиране ћелијске смрти која је индукована активацијом рецептора за инсулински фактор раста 1 (енгл. *insulin growth factor 1 receptor IGF1R*). Карактерише је изражена вакуолизација цитоплазме, бубрење митохондрија и ендоплазматичног ретикулума. Процес се одвија без кондензације хроматина и деградације ДНК, који представљају морфолошке карактеристике некрозе. Међутим, овај тип ћелијске смрти карактерише транслокација једног од фосфолипида, фосфатидилсерина са цитоплазматске ка спољашњој страни ћелијске мембране што је одлика апоптотске ћелијске смрти. Манифестације параптозе не могу спречити инхибитори каспаза (154).

Пиротоза је прво описана у макрофагама које инфицирају *Salmonella typhimurium*. Настаје услед повећаног осмотског притиска због новоформираних пора у ћелијској мембрани чије формирање зависи од активне каспазе-1 али не и активне каспазе-3 (155).

Пиронекроза је некротична ћелијска смрт макрофага које инфицира *Shigella*. У ову ћелијску смрт укључен је ASC (енг. *apoptosis-associated speck-like protein*) а повезана је са повећаним ослобађањем HMGB-1 (енгл. *High mobility group box 1 protein*), каспазе-1 и IL-1 $\beta$  (156).

### 1.3. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус обухвата низ строго регулисаних догађаја који резултује деобом ћелије. У ћелијском циклусу разликују се период интерфазе и период деобе. Интерфаза је период између две деобе и обухвата G1 (енгл. *Gap phase 1*), S (енгл. *Synthesis*), и G2 (енгл. *Gap phase 2*) фазу ћелијског циклуса. Током интерфазе ћелија расте и акумулира хранљиве материје потребне за митозу (енгл. *Mitosis*) и репликацију ДНК. Ћелије које су привремено или реверзибилно зауставиле деобу, улазе у стање мировања или G0 фазу где остатају дуже време, а неке чак и трајно. Ћелијски циклус је строго контролисан процес у чијој регулацији важну улогу играју циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа (157, 158). Циклини представљају групу протеина који имају сличну структуру и синтетишу се и деградирају циклично током различитих фаза ћелијског циклуса. Након синтезе, формирају комплекс са циклин зависним киназама (енгл. *cyclin dependent kinases*, Cdk). Циклин зависне киназе припадају фамилији серин/треонин киназа, и њихова активност, као и код циклина, расте и опада током ћелијског циклуса. Образац експресије различитих циклина варира са прогресијом ћелије кроз ћелијски циклус, а овај специфичан шаблон дефинисан је фазом ћелијског циклуса (157, 159). Идентификовано је најмање девет структурно повезаних Cdk (Cdk1- Cdk9), мада није за све дефинисана регулаторна улога у току ћелијског циклуса. До сада је идентификовано знатан број циклина (циклин А-циклин Т). Комплекси циклина и Cdk постају активни фосфорилацијом специфичних места на Cdk (160). Изоформе циклина D (циклин D1- D3) интерагују са Cdk2, -4, и -6 и омогућују напредовање кроз G1 фазу ћелијског циклуса. Асоцијација циклина Е са Cdk2 је активна на прелазу G1/S и усмерава улазак у S фазу ћелијског циклуса. Прогресија кроз S фазу посредована је комплексом циклин А/Cdk2, а комплекс циклин А и Cdk1 је од кључног значаја у G2 фази. Cdk1/циклин В је неопходан за покретање митозе. Поред тога, важну улогу у регулацији ћелијског циклуса остварују и одговарајући инхибитори циклин зависних киназа (инхибитори Cdk) који функционишу као негативни регулатори ћелијског циклуса и онемогућавају ћелијама да пређу у следећу фазу ћелијског циклуса (Схема 2). Класа инхибитора циклин зависних киназа Ink4, p16, p15, p18 и p19, везују и инхибирају циклин D-зависне киназе (Cdk2, -4 и -6). Друга група инхибитора циклин

зависних киназа CIP/Kip (енгл. *kinase inhibitor protein KIP*), p21, p27 и p57, негативно регулише комплексе циклин E/Cdk2 и циклин A/Cdk2 (161, 162).

### 1.3.1. G1/S фаза ћелијског циклуса

Иако се често назива фаза мировања, G0 фаза је у ствари прилично активна и њој ћелија може да испољи одређене функције и да расте. Улазак у ћелијски циклус (G1 фазу) је регулисан тачком ограничења - тачком преласка током које прогресија кроз ћелијски циклус не зависи од спољашњих стимулуса, као што су изложеност хранљивим састојцима или дејство митогена (163). За ову тачку се сматра да условљава поделу на рану и касну G1 фазу ћелијског циклуса. Протеин ретинобластома (енгл. *retinoblastoma tumor suppressor gene product*, Rb) регулише транзицију ћелије кроз G1/S фазу ћелијског циклуса. Ген Rb1 је тумор супресорски ген који је најпре идентификован у малигном тумору ретине. Фамилија Rb протеина броји три члана Rb/p105, p107 и Rb2/p130. У многим ткивима протеин Rb регулише пролиферацију и диференцијацију ћелија, као и апоптозу. Молекул pRb такође игра централну улогу у процесима диференцијације у различитим ткивима, укључујући очи, сочиво, мозак, периферни нервни систем, епидермис, меланоците, косу, мишиће и јетру. У активном стању, Rb је хипофосфорилиран и формира инхибициони комплекс са групом транскрипционих фактора познатих као E2F-DP (E2F-1, -2, и -3), чиме се контролише транзиција ћелије из G1 у S фазу. Формирање комплекса E2F-DP транскрипционих фактора са не- или хипо-фосфорилисаним „активним“ Rb онемогућава улазак у S фазу ћелијског циклуса. Активност Rb се модулише секвенцијалном фосфорилацијом помоћу Cdk4/6-Циклин D и Cdk2/Циклин E (164). Када Rb делимично фосфорилише комплекс Cdk4/6-Циклин D, Rb и даље остаје везан за E2F-DP, али овај транскрипциони фактор и даље може да транскрибује неке гене као на пример оне који су неопходни за синтезу циклина E (Схема 2). Циклин E се затим везује за Cdk2 и овај активни комплекс потпуно хиперфосфорилише Rb и на тај начин ослобађа комплекс E2F-DP и потпуно активира транскрипциони фактор E2F што коначно резултује експресијом гена за бројне протеине S фазе. Поред Rb, Cdk2 фосфорилише и друге супstrate укључене у репликацију ДНК (165). Уколико нису испуњени сви услови за успешну деобу, ћелијски циклус се зауставља и активирају се контролни механизми (*G1 checkpoint*). Током G1 фазе, ДНК се може оштетити зрачењем, хемијским,

физичким ноксама или оксидативним стресом. На почетку S фазе синтетише се циклин А који затим формира комплекс са Cdk2 што омогућава даљу прогресију кроз ову фазу ћелијског циклуса уз производњу других ензима и протеина укључених у синтезу ДНК (166). Прогресија кроз S фазу захтева активацију транскрипционог фактора E2F. Комплекс циклин А-Cdk2 стабилно се везује за E2F (167-169). Током касне S и током читаве G2 фазе, ћелије се припремају за митозу тако што повећавају ниво циклина- А и -В. Када се ниво циклина В повећа, он формира комплекс са Cdk1 у цитоплазми, где остаје до митозе, када прелази у једро. Повећана активност транскрипционог фактора p53 може да буде узрокована оштећењем ДНК током G1 фазе ћелијског циклуса што резултује повећаном синтезом инхибитора циклин зависних киназа, p21, који следствено инхибира комплексе циклина и циклин зависних киназа у G1 фази ћелијског циклуса. Молекул p53 може и да активира систем за поправку ДНК. Међутим, уколико је оштећење неповратно, p53 активира молекуле укључене у апоптозу било покретањем сигнала са Fas рецептора или помоћу фамилије протеина Bcl-2 (170, 171).

### 1.3.2. G2/M фаза ћелијског циклуса

G2 фаза ћелијског циклуса траје до уласка ћелије у митозу. Током ове фазе такође се синтетишу протеини кључни у процесу митозе, тако да инхибиција синтезе протеина током ове фазе може да спречи отпочињање ћелијске деобе. У G2 фази је број хромозома дуплиран, као и остале ћелијске компоненте. Током ове фазе синтетишу се и неопходни протеини и РНК (рибонуклеинска киселина) (172, 173). Прелазак ћелије из G2 у М фазу омогућују циклин-А2 и -В1, који се упарују са Cdk2 и Cdk1. Ови комплекси узрокују кондензацију хромозома и „распад“ једарне мембране. С обзиром на чињеницу да нема података о преживелим Cdk1<sup>-/-</sup> мишевима или Cdk1<sup>-/-</sup> ћелијама сматра се да Cdk1 представља есенцијални молекул (174). За разлику од свих других циклина, циклин А2, је потребан у двама фазама ћелијског циклуса, на прелазу G1/S и током митозе. Циклин- В1 и -В2 се везују за Cdk1 у растућим ћелијама. Циклин В2 је повећано експримиран током сперматогенезе (175). Циклин В1 може да компензује одсуство циклина В2. У случају дефекта у хромозомима активира се G2 контролна тачка, која супримира активност циклин В/Cdk1. Познато је да и протеин p53, активацијом p21 учествује у заустављању ћелијског циклуса у G2 фази (176).



Приликом оштећења молекула ДНК, ћелија се зауставља у било којој фази ћелијског циклуса, са циљем да се исправи ово оштећење или ћелија може да активира апоптотске механизме што последично уводи ћелију у смрт (170).

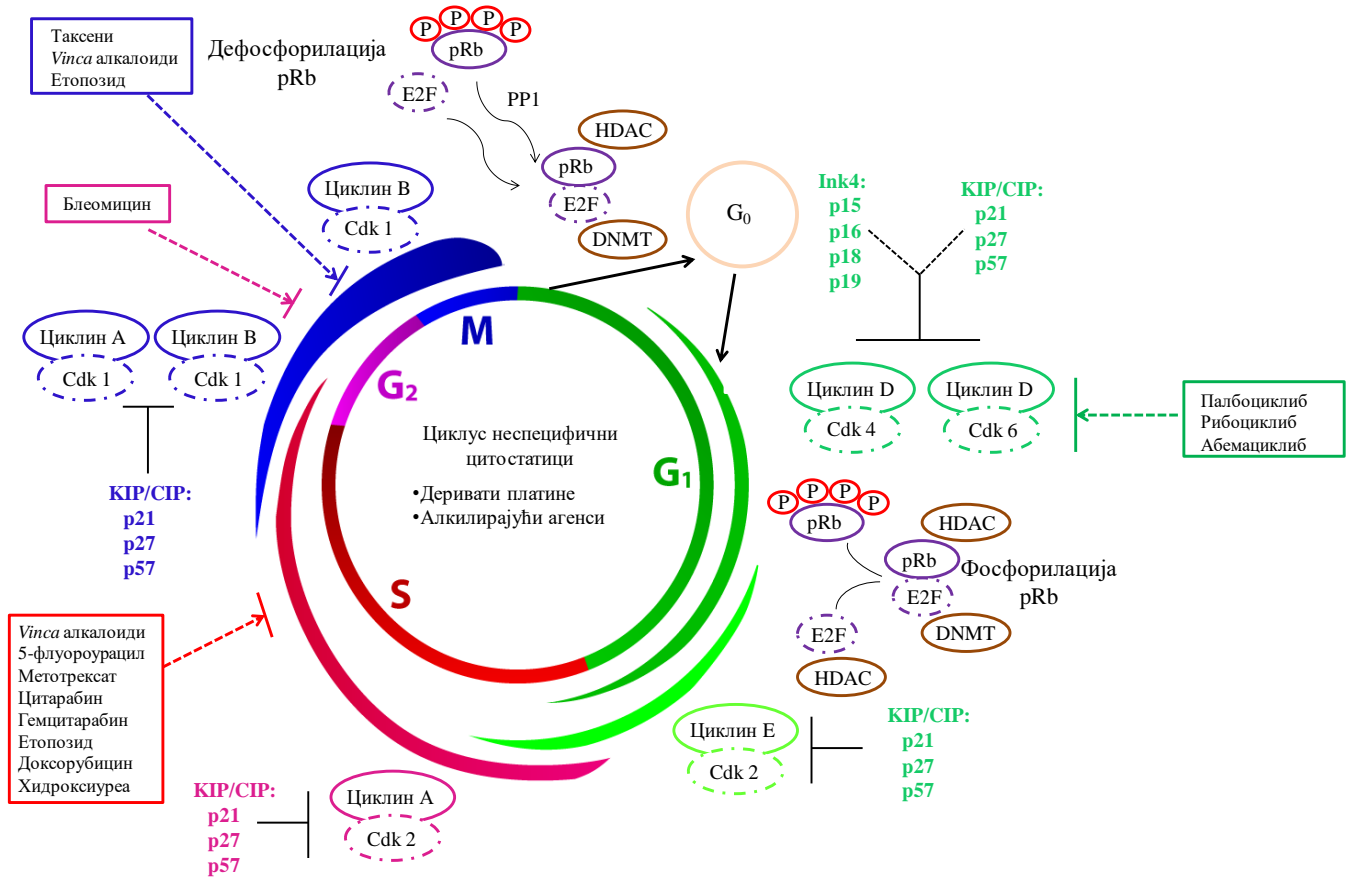


Схема 2. Фазе и контрола ћелијског циклуса

#### 1.4. Утицај хемотерапеутика на ћелијску смрт

Хемотерапија је и даље важан третман у терапији канцера, иако су још увек нејасни молекулски механизми одговорни за осетљивост или отпорност ћелија на хемотерапеутике у различитим врстама тумора. Стога је одређивање оптималног хемотерапеутског режима за одређени тип канцера комплексан и индивидуалан процес. На пример, карцином тестиса добро реагује на примену деривата платине, што резултира са око 80% излечених пацијената, док код пацијената који имају другу врсту

тумора, као што је карцином плућа стопа одговора на хемотерапију базирану на цитотоксичним дериватима платине је само 30%, остављајући преосталих 70% пацијената са мало или нимало терапијске користи и са великим бројем нежељених реакција (177). Већина хемотерапеутика узрокује оштећење ДНК и активира сложену сигналну мрежу која зауставља ћелијски циклус и/или индукује апоптозу (178, 179). Када се лекови који примарно индукују оштећење ДНК користе за лечење тумора, у неким клоновима туморских ћелија мења се експресија специфичних гена укључених у регулацију ћелијског циклуса или поправци ДНК. Ове измене могу индуковати отпорност туморских ћелија на лекове. Сходно томе, ефективност хемотерапеутика зависи од разлика у одговору на оштећење ДНК здравих и малигно измењених ћелија (180, 181). Стога, проучавање специфичних механизма отпорности и развој нових терапеутских стратегија су изузетно важни у побољшању ефикасности хемотерапеутика.

Једна од баријера за настанак малигно трансформисаних ћелија је апоптоза (182). Губитак контроле апоптозе туморским ћелијама омогућава да преживе дуже и обезбеђује им више времена за акумулацију генских мутација одговорних за повећану инвазивност и ангиогенезу тумора, као и непланску пролиферацију и смањену диференцијацију ћелија (183). Постоји више начина како туморске ћелије могу да избегну апоптозу: или је инхибирана функција каспазе или је онемогућено покретање апоптозе (184). Повећана експресија антиапоптотских протеина Bcl-2 и губитак Bax и/или Bak су најчешћи механизми избегавања апоптозе. У основи ових поремећаја је најчешће мутација тумор супресорског гена p53, која се детектује код 50% оболелих од канцера. Мутације гена за Bcl-2 такође олакшавају генезу тумора. Прекомерна експресија протеина Bcl-2 је регистрована у више од половине свих врста канцера (183, 184). Оваква експресија протеина Bcl-2 резултира повећаном отпорношћу туморских ћелија на апоптотске стимулусе индуковане цитостатицима (185).

Хемиотерапеутици делују на процес ћелијске смрти код хемосензитивних тумора. Сматра се да цитотоксични лекови који се тренутно користе у лечењу малигнома, као што су етопозид, цитарабин, циклофосфамид, доксорубицин и метотрексат, делују тако што инхибирају топоизомеразу II (етопозид), ДНК-полимеразу (цитарабин), антагонизују фолну киселину (метотрексат), инхибирају унакрсно повезивање (циклофосфамид) и интеркалацију ДНК (доксорубицин) (184). Иако су примарно мете деловања лекова прилично различите, постало је очигледно да

цитотоксичност изазвана леком коначно узрокује апоптозу. Диспептид је инхибитор хистон деацетилазе који у ћелијама мултиплог мијелома смањује експресију гена за Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1 (186). Неколико истраживања је указало на способност цитотоксичних лекова да активирају тумор супресорски ген p53. Исход активације протеина p53 је или апоптоза или заустављање ћелијског циклуса (187, 188). Бројне студије су указале на могућност неких лекова да изазову апоптозу тако што подстичу синтезу CD95L, који се затим везује за CD95 рецептор (189, 190). У третману различитих тумора са цитотоксичним лековима као што су доксорубицин, цисплатина, метотрексат, цитарабин и етопозид примећена је повећана експресија иРНК (информационе рибонуклеинске киселине) за синтезу CD95 и CD95L (191). Код леукемија или солидних тумора, укључујући неуробластом, хепатобластом, медулобластом, карцином колона и дојке цитотоксични лекови индукују експресију CD95L који аутокринно и паракринно изазивају самоубиство ћелије након везивања за његов рецептор (192, 193). Неки цитостатици индукују апоптозу тако што повећавају пропустљивост мембране митохондрија и ослобађање цитохрома C у цитоплазму (193).

Уколико је претерано активирана аутофагија може да буде и механизам преживљавања ћелија након што хемотерапеутици искажу терапијско дејство (194, 195). Антрациклини адриамицин, даунорубицин и епирубицин индукују аутофагију у туморским али и нетрансформисаним ћелијама. Индукована аутофагија у зависности од типа ћелија, али и врсте и концентрације хемиотерапеутика, може имати цитопротективну или цитотоксичку улогу (196-198).

Неки типови онколошке терапије могу да изазову смрт туморских ћелија некрозом. У ове лекове се убрајају ДНК алкализујућа једињења као што су MNNG (енгл. *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*) (199) и тамоксифен (200, 201). Ресвератрол као и неке компоненте традиционалне кинеске медицине потенцијално изазивају смрт туморских ћелија некрозом (202-204).

## 1.5. Модулација ћелијског циклуса хемотерапеутицима

Познато је да се цитостатици могу поделити у две групе на основу њиховог деловања на одређену фазу ћелијског циклуса. Циклус-неспецифичним цитостатицима сматрамо оне лекове чији ефекат не зависи од фазе ћелијског циклуса тако да могу да делују у свим фазама ћелијског циклуса (206, 207). Такви су на пример сви алкилирајући агенси који се због поседовања алкил радикала лако везују за атоме азота у пиринским и пиримидинским базама нуклеинских киселина што за последицу има унакрсно везивање два ланца ДНК или погрешно упаривање база и коначно смрт ћелије. Поред алкилирајућих агенаса у групу циклус-неспецифичних цитостатика убрајују се и деривати платине, неки лекови из групе деривата нитрозоуре и групе антибиотика (208). Циклус- специфични цитостатици су они који своје дејство испољавају у одређеној фази ћелијског циклуса. Такви цитотоксични лекови су на пример винкрестин и винбластин који делују само на ћелије у митози. Наиме, ови алкалоиди из биљке *Vinca rosea* се директно везују за тубулин и спречавају његову уградњу у митотско вретено (209). На ћелије у митози делују још и таксени, као и етопозид. На ћелије у G2 фази ћелијског циклуса делује блеомицин. Највећи број цитостатика делује на ћелије у S фази ћелијског циклуса а то су 5-флуороурацил, метотрексат, хидроксиуреа, доксорубицин, гемцитабин, цитарабин и други. Карактеристика циклус-специфичних цитостатика је да после одређеног времена постижу плато, што значи да се линеарна повезаност између примењене дозе и оствареног ефекта губи. Неки од цитотоксичних лекова као што су инхибитори топоизомеразе испољавају своје дејство и на ћелије у S и G2 фази ћелијског циклуса, док таксени делују на ћелије у G2 и M фази ћелијског циклуса (210) (Схема 2).

У последње време терапија различитих врста тумора се заснива на инхибицији Cdk што зауставља ћелијски циклус и последично може изазвати и апоптозу (211, 212). За разлику од здравих, туморске ћелије карактерише непланска пролиферација. Оваква пролиферација је последица или инактивације инхибитора циклин зависних киназа или прекомерне експресије циклина. На пример, редукција инхибитора циклин зависне киназе, p16, резултује непрекидном ћелијском пролиферацијом. Губитак функције p16 детектован је код разних малигнома, укључујући меланом, карцином плућа, дојке и колоректалне регије (213). Супротно, прекомерна експресија циклина D1 је удружена

са генезом и прогресијом карцинома дојке (214, 215). Из свега наведеног развила се идеја о употреби инхибитора циклин зависних киназа као нових антитуморских лекова. Ова једињења могу инхибирати циклин зависне киназе директно или индиректно. Флавопиридол је инхибитор циклин зависних киназа који може да заустави ћелијски циклус у бројним линијама туморских ћелија (216, 217). Показано је да се везује и директно инхибира Cdk1, Cdk2, Cdk4 и Cdk6. Употреба флавопиридола повезана је и са селективном индукцијом апоптоске смрти ћелија, нарочито у линијама хематопоетских ћелија (218, 219). Уз то, инхибира антиапоптоске молекуле, укључујући Bcl-2, XIAP, Mcl-1 и фосфо-сурвивин (218, 220). R-росковитин је други инхибитор Cdk који је испитиван у клиничким студијама. Овај аналог пурина инхибира Cdk1, -2, -5, -7, -8 и -9. Инхибиција Cdk2 коју остварује овај лек је јача у односу на инхибицију Cdk1 (221). Примена овог аналога пурина инхибира раст туморских ћелија и фацитира апоптозу и то активацијом p53 молекула и редукцијом експресије антиапоптоског протеина Mcl-1 (222). И поред регистрованог електролитног дисбаланса и/или гастроинтестиналних тегоба, на крају друге фазе клиничких испитивања уочено је да примена овог лека значајно побољшава преживљавање оболелих (223). Данас се испитује ефекат комбинација овог лека са другим хемотерапеутицима, као и његов ефекат у лечењу реуматоидног артритиса. Три инхибитора Cdk4/6, палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб, данас су у различитим фазама клиничког испитивања (Схема 2). Палбоциклиб је скорије препоручен за лечење ER-позитивног/HER2-негативног метастатског карцинома дојке код пацијенткиња у постменопаузи (224). Употреба овог терапеутика зауставља ћелијски циклус у G1 фази и смањује експресију Ki-67. Изазива умор, неутропенију, тромбоцитопенију и анемију. Рибоциклиб је одобрен за лечење метастатског ER-позитивног/HER2-негативног карцинома дојке код жена у постменопаузи. Овај лек подстиче дефосфорилацију молекула Rb, зауставља ћелијски циклус у G1 фази и смањује експресију Ki-67 (225). Данас се испитује његов ефекат у лечењу меланома, лимфома и неуробластома. Примена рибоциклиба праћена је појавом леукопеније, анемије, мучнине и повраћања. Абемациклиб се од својих претходника разликује по томе што има способност проласка кроз крвномождану баријеру (226). Такође, UCN-01 (7-хидроксистауроспорин) је аналог стауроспорина који се изолује из врсте *Streptomyces* и представља селективни инхибитор протеин киназе C (227). UCN-01 зауставља ћелијски циклус у G1 и S фази, тако што инхибира дефосфорилацију Cdk1 Cdk2 што резултује дефосфорилацијом молекула Rb. Нажалост, код већине испитаника

у клиничким фазама испитивања овог лека забезежено је присуство хипергликемије. Бриостатин 1 је нови потенцијални лек који свој антитуморски потенцијал остварује индукцијом p21 и инактивацијом Cdk2 (228).

## 1.6. Имушки одговор на туморске ћелије

Имушки систем игра важну улогу у превенцији настанка и раста тумора. Ћелије имушког система откривају и уклањају микроорганизме на два начина, директним контактом и солубилним медијаторима којима остварују интеракције са различитим ћелијама домаћина. На тај начин се спречава стварање хроничног инфламацијског окружења погодног за генезу тумора (229). Осим у одбрани од микроорганизма, имушки систем игра важну улогу и у елиминацији оштећених и малигно трансформисаних ћелија (230). Туморске ћелије исказују молекуле које имушки систем препознаје и елиминише их својим ефекторским механизмима. Ћелије имушког система препознају тумор-специфичне (молекуле јединствене за туморске ћелије), као и тумор-асоциране антигене, односно молекуле нормалних ћелија с тим што је њихова експресија на туморским другачија у односу на нетрансформисане ћелије (231). Под имушким надзором подразумева се физиолошка способност имушког система да препозна клонове малигно трансформисаних ћелија и уклони их пре него што се успостави малигни тумор, као и да убија малигне ћелије након његовог развоја. Механизми елиминације туморских ћелија подразумевају координисану интеракцију ефекторских механизма урођене и стечене имуности (232).

Познато је да највећи део леукоцитног инфилтрата многих тумора чине тумор-асоцирани макрофаги (енгл. *Tumor-associated macrophages*, TAMs). Макрофаги, као професионални фагоцити, део су урођене имуности, мада познато је да играју значајну улогу и у ефекторским механизмима стечене имуности. Разликују се класично активирани (M1) и алтернативно активирани (M2) макрофаги (233, 234). M1 макрофаги убијају туморске ћелије, ослобађају проинфламацијске цитокине и активирају антитуморски имушки одговор (235). M2 макрофаги уклањају мртве ћелије, индукују ангиогенезу, ремоделовање и поправку оштећеног ткива, али могу и да инхибирају функцију M1 макрофага (236, 237). Познато је да је у карциному дојке акумулација

TAMs у позитивној корелацији са ангиогенезом и лошим прогностичким исходом (238).

NK ћелије (енгл. *Natural Killer cells*) заузимају важно место у елиминацији туморских ћелија и у контроли ширења тумора. Као компонента урођене имуности, ове ћелије доприносе регресији тумора и елиминацији хематогених метастаза (239). При сусрету са инфицираним или малигно трансформисаним ћелијама, NK ћелије се активирају и брзо остварују цитолитичку активност (240, 241). Ове ћелије представљају и спону између урођеног и стеченог имунитета, тако што секретују цитокине и хемокине којима могу да покрену или усмере стечени имунски одговор (242). Активност NK ћелија зависи од баланса инхибиционих и активационих рецептора. Овај баланс одређује селективно дејства NK ћелија и резултује ефикасним убијањем туморских, али не и неизмењених ћелија домаћина. Активациони и инхибициони рецептори препознају различите лиганде. Активациони рецептори NK ћелија (нпр. NKG2D, NKp30 и NKp46) препознају измењене лиганде које експримирају туморске или инфициране ћелије, док инхибициони рецептори препознају МНС молекуле I класе (243, 244). Након активације NK ћелије индукују апоптозу која је последица испоручивања цитолитичких молекула, перфорино и гранзима B, у циљану ћелију (245). Такође, NK ћелије могу да индукују перфорин независну апоптозу помоћу лиганда смрти (246). Везивање лиганда смрти (нпр. FasL) за рецептор смрти (Fas) индукује тримеризацију рецептора. Оваква тримеризација активира адаптерске протеине FADD (енгл. *Fas- Associated- Death- Domain- Protein*) (247) који активирају каспазу-8 а затим ефекторске каспазе, као што је каспаза 3 што све заједно циљану ћелију уводи у апоптозу. NK ћелије могу да се помоћу рецептора FcγRIIIA или CD16A вежу и за ћелије карцинома дојке које су обележене IgG. Овај феномен се зове цитотоксичност зависна од антитела (248). NK ћелије експримирају и бројне *toll-like* рецепторе који служе као сензори молекулских образаца оштећених ћелија (енгл. *Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMPs) у туморској микросредини што подстиче ефекторску функцију ових ћелија (249). И поред инфлукса великог броја NK ћелија у туморску потку, ове ћелије могу да буду локално или систематски супримиране. Туморицидна активност NK ћелија може да буде лимитирана физичким карактеристикама, хемијским или биолошким факторима.

NKT ћелије (енгл. *Natural Killer T cells*) играју значајну улогу како у урођеном тако и у стеченом имунском одговору. Ове ћелије препознају гликолипидне антигене презентоване у склопу молекула CD1d на површини ћелије (250). Продукују широк сет имунорегулаторних цитокина (251). Тако секретују IFN- $\gamma$  који појачава фагоцитну способност макрофага и активира NK ћелије и CD8<sup>+</sup> Т лимфоците (252, 253). Слично NK ћелијама, NKT ћелије могу директно да убију циљану ћелију тако што узрокују апоптозу која је зависна од перфорина (254). Продукција цитокина у активираним NKT ћелијама за последицу има појачану цитотоксичку активност ових ћелија, снажан антитуморски имунски одговор, као и прекид имуносупресије. Резултати претклиничких и клиничких студија указују да активација NKT ћелија егзогеним гликолипидима супримира раст тумора (нпр. карцином дојке, плућа и колона, и меланом) (255, 256). Активно се испитују антитуморски терапијски приступи засновани на коришћењу NKT ћелија.

Налаз Т лимфоцита у потки тумора може се сматрати и добрим и лошим прогностичким знаком. Цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити индукују смрт туморске ћелије или помоћу перфорина и гранзима или лиганада смрти (257). Помагачки CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити (енгл. *T helper*, Th) помажу у активацији CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита које онда ефикасно лизирају туморске ћелије. Помагачки Т лимфоцити продукују различите цитокине којима обављају различите ефекторске функције.

На цитотоксичну активност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита утичу и регулаторни Т лимфоцити. Регулаторни Т лимфоцити помажу туморима да избегну антитуморски имунски одговор (258, 259). Своју супресивну активност остварују различитим механизмима укључујући инхибицију сазревања антиген-презентујућих ћелија и секрецију инхибиционих молекула (260, 261). Уз то, смањују цитотоксичку активност NK и NKT ћелија (262-264).

Туморске ћелије на разне начине избегавају механизме урођене и стечене имуности, као што су имуноселекција и имуносубверзија. Имуноселекција оставља простор мање имуногеним, толерогеним и неимуногеним варијантама туморских ћелија да наставе раст. Имунски систем елиминише само имуногене малигне ћелије. Имуносубверзија представља бројне и разноврсне механизме избегавања активне локалне и системске одбране домаћина. Ослобођањем различитих фактора малигне ћелије утичу на диференцијацију, матурацију и функцију дендритских ћелија (265) као



и алтернативну активацију макрофага у и око тумора. Затим, ове ћелије урођене имуности даљом продукцијом имуносупресивних цитокина и простангладина продубљују супресију имунског одговора (266).

## 1.7. Имуномодулаторни ефекти хемотерапије

Новије студије јасно показују да исход хемотерапије не зависи само од њихове способности да директно убијају туморске ћелије, већ и од способности хемотерапеутика да стимулишу имунски одговор против тумора (267).

### 1.7.1. Утицај цитостатика на ћелије урођене имуности

Забележено је да различити цитотоксични лекови мењају активност макрофага, дендритских ћелија и НК ћелија. Код оболелих од карцинома дојке употреба цитостатика изменила је имунски одговор који зависи од НК ћелија. Недавно је показано да примена циклофосфамида у ниској дози дужи временски период стимулише антитуморски имунски одговор посредован НК ћелијама у терминалном стадијуму болести (268). У различитим туморским моделима циклофосфамид је индуковао повећан инфлукс НК ћелија, дендритских ћелија и макрофага у туморску микросредину (269, 270). У моделу карцинома панкреаса, комбинована терапија 5-флуороурацилом и IFN- $\alpha$  повећава број тумор-инфилтришућих цитотоксичких NKG2D<sup>+</sup> НК ћелија (271). Деплеција НК ћелија помоћу циклофосфамида, антителима усмереним на NK1.1 или NK1.2 молекула значајно смањује уклањање циркулишућих туморских ћелија и повећава број метастатских колонија у плућима и јетри након интравенске апликације туморских ћелија карцинома дојке, али и других епителних ткива (272-275). Такође, циклофосфамид у ниској дози фаворизује развој M1 макрофага што за последицу има повећану продукцију кисеоничних радикала, IL-6 и IL-12 и активацију урођеног имунског одговора (276). У моделу меланома миша комбиновани третман са циклофосфамидом, винкристином и доксорубицином прати акумулација тумор-асоцираних макрофага поларизованих у M1 фенотип (277). Показано је да се у кокултивацији са макрофагима сензитивност туморских ћелија на циклофосфамид и цисплатину повећава. Међутим, у кокултивацији са макрофагима

сензитивност хуманих ћелија карцинома оваријума на дејство 5-флуороурацила опада (278). Паклитаксел може да директно стимулише цитотоксички ефекат TAMs и да помоћу IL-12 и TNF- $\alpha$  активира дендритске ћелије, NK ћелије и цитотоксичке Т лимфоците што следствено инхибира прогрессију тумора (279, 280). Међутим, повећан инфлукс TAMs у микросредину карцинома дојке миша и болесница под утицајем паклитаксела ограничио је ефекте цитотоксичне терапије (281, 282).

#### 1.7.2. Утицај цитостатика на ћелије стечене имуности

Третман оболелих од карцинома са интензивном хемотерапијом индукује смањење броја свих популација лимфоцита, а нарочито В лимфоцита (283). Поређењем ефеката епирубицина (епирубицин, 5-флуороурацил и циклофосфамид) и доксорубицина (доксорубицин, 5-флуороурацил и циклофосфамид) у популацији оболелих од карцинома дојке запажен је битан пораст цитотоксичких Т лимфоцита и NK ћелија, као и драстичан пад В лимфоцита у крви (284). Третман са поновљеним циклусима гемцитабина узроковао је супресију хуморалног али и целуларног имунског одговора (285). Овај ефекат је изостао након појединачне дозе гемцитабина (286). Терапија 5-флуороурацилом код оболелих од карцинома колоне индуковала је хуморални имунски одговор (287).

Бројне студије училе су позитивне ефекте цитостатика на Т ћелијски имунски одговор. Повећана стопа преживљавања мишева са карциномом оваријума након терапије доксорубицином или цисплатином праћена је активацијом имунског одговора у којима централно место заузимају CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити (288). И код оболелих од резистентног карцинома оваријума, цисплатина и паклитаксел у ниској дози остварују адекватну терапијску ефикасност захваљујући активацији CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и секрецији IL-2 и IFN- $\gamma$  (289). 5-флуороурацил индукује пораст CD8<sup>+</sup> лимфоцита који секретују IFN- $\gamma$  (290). Повећан инфлукс CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у туморску микросредину езофагеалног карцинома забележен је након третмана са 5-флуороурацилом и цисплатином (291). У експерименталним моделу аденокарцинома и фибросаркома третман са доксорубицином индуковао је пролиферацију CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у лимфним чворовима, као и секрецију IFN- $\gamma$  (292).

Нарушен баланс између цитокина типа Th1 и Th2 које унутар тумора продукују помагачки CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити може да се регулише неким цитостатацима. Код

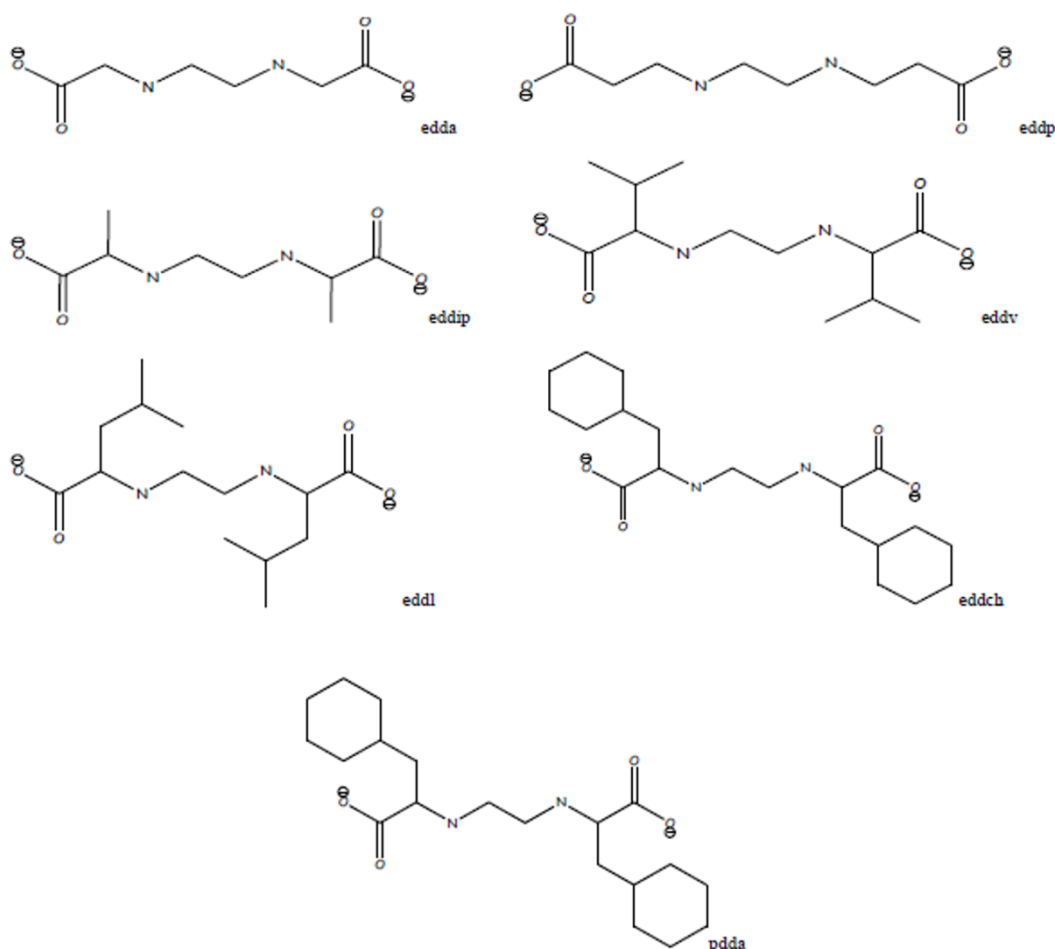
оболелих од карцинома плућа, паклитаксел повећава заступљеност циркулишућих CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који секретују IFN- $\gamma$ , као и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који секретују IL-2 и на тај начин поларизује антитуморски имунски одговор у правцу Th1 лимфоцита (293). У експерименталном моделу леукемија и меланома примена циклофосфамида индукује секрецију Th1 цитокина (IL-2 и IFN- $\gamma$ ) али инхибира секрецију Th2 цитокина (IL-4 и IL-10) (294). Циклофосфамид је у овим моделима узроковао пораст Th1 и Th17 лимфоцита у слезини (295).

### 1.8. Лиганди EDDA (етилендиамин-N,N'-диацетато) типа

Због бројних нежељених дејстава цисплатине која су углавном дозно зависна још 1973. године установљена су правила која се првенствено односе на хемијску структуру комплекса, а која би требало да олакшају развој идеалног комплекса метала са истим или бољим цитотоксичним потенцијалом у поређењу са златним стандардом, као и бољом толеранцијом (2). Наиме, да би одређени комплекс метала остварио жељену цитотоксичку активност неопходно је да буде неутралан, одлазећи лиганди би требало да буду у *cis* положају, амински лиганди би требало да буду секундарни или терцијарни амини, и комплекс платине би требало да има две *cis* орјентисане амино групе (181). Хемијски гледано, у комплексима платине, разликују се лако одлазећи и стални лиганди, при чему сваки од лиганада учествује у успостављању адекватне биолошке активности. Стални лиганди су јаким везама везани за централни јон метала и остају нетакнути у комплексу који се формира при интеракцији са молекулом ДНК. Сматра се да су ови лиганди носиоци антитуморског дејства комплекса метала, али битни су и у развоју резистенције туморских ћелија на лек. Управо манипулацијом хемијске структуре сталних лиганада превазилази се резистенција туморских ћелија на комплексе метала. Класичан пример је оксалиплатина која делује на туморске ћелије карцинома колоне за које је познато да су резистентне на дејство цисплатине (32). Одлазећи лиганди су они који су slabим хемијским везама везани за централни јон метала. Неопходни су за хидролизу комплекса у цитоплазми и имају утицај на стабилност молекула, као и на развој нежељених дејстава новосинтетисаних комплекса. Пример је карбоплатина која уместо хлоридо лиганда има циклобутандикарноксилни лиганд који индукује мањи број споредних реакција у

цитоплазми и не показује нефротоксичност која је карактеристична за цисплатину (30). Како обе групе лиганата утичу на ефикасност комплекса, али и на липофилност и растворљивост, као и учесталост нежељених реакција, јасно је да је последњих година хемијском манипулацијом синтетисан велики број нових лиганата.

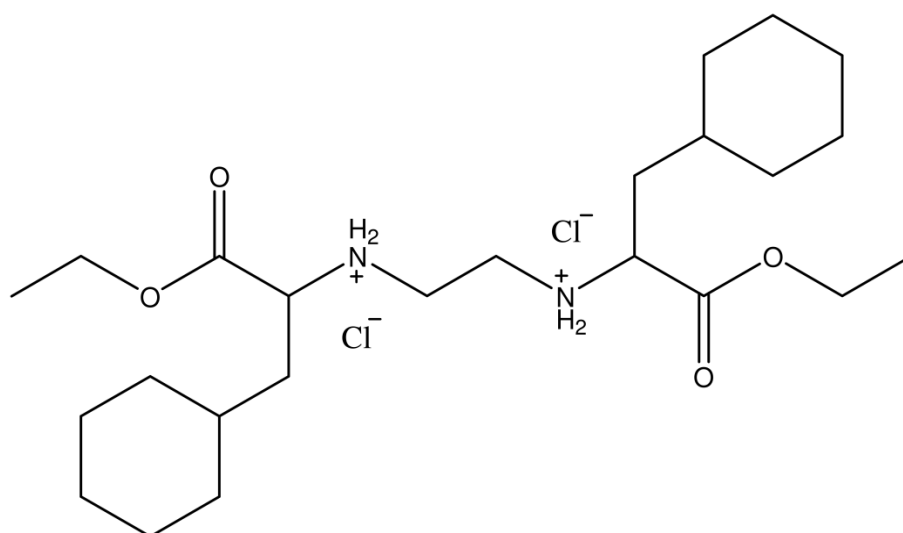
На почетку истраживања деривата платине као антиканцерских лекова, мање пажње је посвећено комплексима аминокарбоксилатних лиганата. Године 1964. *Liu* (296) је први показао координацију етилендиамин-*N,N'*-диацетата (енгл. *ethylenediamine-N,N'-diacetic acid*, *edda*) са платином (II). Током наредних година истраживање комплекса са *edda* лигандима привукло је пажњу, углавном због способности лиганата да делују као доноси електрона што може утицати на хемијске и физичке особине комплекса. Лиганди *edda* типа су етилендиамин или пропилендиамин дикарбоксилне киселине и њихови ести (Слика 4).



**Слика 4.** Хемијске структуре основних лиганата типа *edda* (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Анализа антитуморксе активности најпре комплекса платине, а затим и комплекса рутенијума, злата, бабра, галијума са лигандима edda типа, указује на то да лигандни имају удео у антитуморском потенцијалу комплекса (297). Прва серија лиганата edda типа која је показала цитотоксички ефекат који је чак већи од комплекса тешких метала са истим лигандима јесте серија *n*-алкил естара-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил) пропанске киселине.

Аминокиселина, *S*-2-амино-3-циклохексилпропанска киселина у облику хидрохлорида, била је полазна супстанца за синтезу шест нових лиганата. Након дехидрохлоровања полазне аминокиселине и неутрализације воденим раствором натријум-хидроксида, формиран је етилендиамински мост између два аминокиселинска остатка. На тај начин је добијен *S,S*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропанска киселина дихидрохлорид. Даља естерификација је урађена стандардном методом помоћу тионил-хлорида (298). Хлађењем филтрата добијен је бели талог у облику *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (Слика 5) (298, 299). Синтетисана супстанца окарактерисана је стандардним спектроскопским методама, инфрацрвеном спектроскопијом, NMR (енгл. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC) спектроскопијом и масеном спектрометријом (298, 299).



Слика 5. Хемијска структура DE-EDCP (енгл. *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride)

Приликом анализе цитотоксичког ефекта синтетисаних *O,O'*-диалкил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат платина(II)/(IV) комплекса и њихових одговарајућих лиганата *in vitro* примећено је да *O,O'*-диетил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP) самостално показује туморицидну активност на неколико линија туморских ћелија (298-300). Претпоставља се да је, у зависности од врсте тумора, туморицидни потенцијал DE-EDCP резултат индукције или апоптозе или некрозе малигних ћелија (298-300). Међутим, и даље остаје отворено питање који су молекулски механизми одговорни за антитуморску активност DE-EDCP.

## 2. Циљ истраживања

Основни циљ истраживања је да се испита утицај *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (DE-EDCP) на прогресију карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10) миша и да се расветле механизми његове потенцијалне антитуморске активности.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. одредити туморицидни капацитет DE-EDCP на више линија малигних ћелија: мишји карцином дојке (4T1), хумани карцином дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468) и меланом миша (B16-F10)
2. утврдити утицај DE-EDCP на прогресију тумора (4T1 и B16-F10) одређивањем времена појављивања и величине примарног тумора, као и броја и величине метастатских колонија
3. испитати молекулске механизме проапоптотске и антипролиферативне активности DE-EDCP у туморским ћелијама
4. испитати да ли и у којој мери DE-EDCP показује имуномодулаторни ефекат
5. испитати потенцијалне токсичне ефекте испитиваног једињења

### 3. Материјал и методе

#### 3.1. *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP)

Као један од нових диаминских лиганата комплекса платине(II) и (IV) (298), диетил естар, *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (означен као DE-EDCP, енгл. *O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride*) синтетисан је на Хемијском факултету Универзитета у Београду.

#### 3.2. Ћелијске линије

##### 3.2.1. Линија ћелија мишјег карцинома дојке

Линија ћелија мишјег карцинома дојке 4T1 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CRL-2539), добијена је од спонтано насталог карцинома дојке BALB/C миша (301). Користи се као експериментални модел који одговара IV стадијуму карцинома дојке. Након имплантације ћелија директно у млечну жлезду дојке миша, 4T1 ћелије брзо расту и локално формирају тумор који има способност брзог метастатског ширења. Хематогене метастазе се најпре очекују у плућима, а касније између 3. и 6. недеље и у јетри, костима и мозгу.

Туморске ћелије 4T1 су култивисане у комплетном медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са 10% феталног говеђег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 2mmol/l L-глутамин (енгл. *L-glutamine*), 100U/mL пеницилина, 100µg/mL стрептомицина и 1mmol/l неесенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Малигне ћелије су узгајане у асептичним условима, у инкубатору на 37°C са 5% CO<sub>2</sub>. У *in vivo* експериментима коришћене су ћелије у десетој пасажи.

Непосредно пре *in vivo* и *in vitro* експеримената, субконфлуентне 4T1 ћелије (~80%), у логаритамској фази раста, одвајене су са дна флашка (BD Falcon)



краткотрајним третирањем са раствором 0.25% трипсина и 0.02% EDTA (енгл. *ethylenediaminetetraacetic acid*) (PAA Laboratories GmbH) раствореног у PBS (енгл. *Phosphate Buffered Saline*; PAA Laboratories GmbH) у трајању од 1 минута. Ћелије су затим опране у комплетном медијуму са додатком 10% FBS како би се инактивисао трипсин и спречило оштећење ћелија. Ћелије су затим центрифугиране на 125g, 10 минута. Њихова вијабилност је процењена помоћу виталне боје, трипан плаво. Трипан плаво дифундује само у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док ћелије са интактном мембраном остају необојене (302). Само она ћелијска суспензија која садржи више од 95% вијабилних ћелија је коришћена у експериментима.

### 3.2.2. Линије ћелија хуманог карцинома дојке

Ћелијске линије изоловане из хуманог карцинома дојке 51-годишње особе женског пола које су коришћене у овом истраживању су MDA-MB-468 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, HTB-132, USA) и MDA-MB-231 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, HTB-26, USA). Обе ћелијске линије одговарају III стадијуму аденокарцинома дојке.

MDA-MB-468 је адхерентна ћелијска линија која је изолована из карцинома дојке жена. Ћелије ове линије су троструко негативне, односно не експримирају молекулу HER2, као ни рецепторе за естроген и прогестерон. Са друге стране, познато је да ове ћелије исказују EGFR (енгл. *Epidermal growth factor receptor*) и повећано експримирају маркер пролиферације, Ki-67. Немају изражен метастатски потенцијал и добро реагују на терапију (303).

MDA-MB-231 је имортализована адхерентна ћелијска линија изолована из метастатског карцинома дојке жена беле расе. По морфологији ове ћелије су сличне фибробластима коже, вретенасте су и изузетно инвазивне. Одликује их брз и прогресиван раст. Троструко су негативне, односно не експримирају рецепторе за естроген, прогестерон и не исказују HER2. У овој хуманој линији забележена је благо смањена експресија клаудина-3, -4 и -7, Е-кадхерина и Ki-67. Одликује их изражен метастатски потенцијал (303). Стога, ова ћелијска линија представља агресивни тип карцинома дојке која је резистентна на различите модалитете терапије.

Туморске ћелије MDA-MB-468 и MDA-MB-231 су култивисане у медијуму DMEM који садржи 10% FBS и инкубиране у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, засићеној воденом паром на температури 37°C.

### 3.2.3. Линија ћелија мишјег меланома

Ћелијска линија мишјег меланома B16 је добијена од спонтаног тумора коже C57BL/6 мишева. *Fidler* је сингеним C57BL/6 мишевима интравенски убризгао линију туморских ћелија B16 (F0) како би изоловао варијетет ћелија меланома са израженим метастатским потенцијалом (304). Након две до три недеље изловане су туморске ћелије из плућних метастаза мишева и на тај начин *in vivo* селекцијом добијена је прва генерација туморских ћелија која је означена као B16-F1 (са ниским метастатским потенцијалом). Добијена B16-F1 ћелијска линија је култивисана а затим опет убризгана мишевима соја C57BL/6. Поступак је понављан и након десет циклуса изолован је варијетет меланома B16-F10 са највећим метастатским потенцијалом. На метастатски потенцијал утиче и стопа стварања субпопулације ћелија са метастатским фенотипом која је већа код B16-F10 него код B16-F1 (305). Такође је показано да за разлику од B16-F1, B16-F10 карактерише већа продукција простагландина D<sub>2</sub> одговорног за агрегацију туморских ћелија са тромбоцитима (306). Поред највећег метастатског потенцијала, B16-F10 ћелијска линија одликује се и већим степеном резистанције на конвенционалну хемотерапију (307). B16-F10 најпре метастазира у плућа а касније и у јетру, мозак, лимфне чворове, јајнике и надбубрежне жлезде.

Туморске ћелије B16-F10 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, CRL-6475, USA) су култивисане у DMEM медијуму који садржи 10% FBS и инкубиране у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, засићеној воденом паром на температури од 37°C. У *in vivo* експериментима коришћене су ћелије у шестој пасажи.

### 3.3. Испитивање цитотоксичког ефекта DE-EDCP

#### 3.3.1. МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) тест

МТТ тест служи за индиректно одређивање вијабилности ћелија. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma–Aldrich, Munich, Germany), је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама са тетразолијум бромидом се редукује до љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења (МТТ) до формазана, директно пропорционална броју живих ћелија. Кристали формазана растворљиви су у DMSO (енгл. *Dimethyl sulfoxide*) што омогућава спектрофотометријску квантификацију интензитета љубичасте боје на таласној дужини од 595nm. Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци.

Малигне ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка на претходно описан начин, и при анализи су искључене мртве ћелије тј. ћелије обојене трипан плавим. Након што је припремљена ћелијска суспензија густине  $3 \times 10^4$  ћелија/ml, у микротитар плоче са 96 бунара сипано је по 100µl ћелијске суспензије (3000 ћелија по бунару). Након инкубације од 24 часа у стандардним условима, медијум је одливен, а затим су малигне ћелије излагане DE-EDCP или цисплатини у опсегу концентрације од 0.49µM до 1000µM (укупна запремина сваког бунара била је 100µl) у различитом временском периоду (24 часа или 48 часова). Након третмана туморских ћелија са DE-EDCP или цисплатином сви бунари микротитар плоче су испражњени и у сваки бунар је додато по 100µl медијума са 20% МТТ раствора (5mg/1ml у PBS). Плоче су инкубиране наредна 4 часа у стандардним условима. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки бунар је сипано по 150µl DMSO (Sigma Aldrich, Немачка) и 20µl глицинског пуфера (pH-10.5) Оптичка густина (OD) одређена је на таласној дужини од 595nm, на *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната помоћу формуле (308):

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E-B)/(K-B) \times 100$$

E-ћелије третиране испитиваним супстанцама (DE-EDCP или цисплатина) (апсорбанца); B- контрола-бленк (апсорбанца); K- нетретиране ћелије (апсорбанца).

Вредности апсорбанце фармаколошки различито третираних ћелија су поређене са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија услед дејства DE-EDCP или референтног цитостатика цисплатине. Вијабилност ћелија је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

### 3.3.2. LDH (*Lactate dehydrogenase*) тест

Лактат дехидрогеназа тест се заснива на мерењу активности ензима ослобођеног након нарушавања интегритета ћелијске мембране. LDH је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу ћелијске мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. Активност LDH ензима у супернатанту третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Принцип LDH теста заснива се на две оксидо-редукционе реакције. У првој ензимској реакцији LDH редукује  $NAD^+$  до  $NADH + H^+$  оксидацијом лактата до пирувата; а у другој реакцији наступа реоксидација  $NADH + H^+$  у  $NAD^+$  при чему се тетразолијум хлорид редукује у црвено-наранџасто обојени формазан.

Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Количина ослобођеног LDH директно корелира са количином створеног формазана па је интензитет боје директно пропорционалан броју мртвих ћелија. Интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 450 до 500nm.

Малигне ћелије су излагане 24 часа DE-EDCP или референтном цитостатику цисплатини, а испитани су ефекти 8 различитих разблажења, при чему је свако разблажење анализирано у трипликату, у три независна експеримента. Малигне ћелије су припремљене за LDH тест на исти начин као и за МТТ тест, разлика је само у медијуму за култивацију који садржи 1% FBS због високе активности лактат дехидрогеназе у серуму. За LDH тест коришћене су три контроле: 1) активност

ензима у самом медијуму; 2) спонтано ослобађање лактат дехидрогеназе из ћелија, ћелије су излагане само медијуму; 3) максимално ослобађање лактат дехидрогеназе из одређеног ћелијског типа, ћелије су третиране 1% тритоном X који пермеабелизује ћелијску мембрану.

Након 24 сата излагања малигних ћелија DE-EDCP или цисплатини, микротитар плоче су центрифугиране на 250g, 4 минута, а затим је супернатант пребачен у нове микротитар плоче. У 50µl пребаченог супернатанта додато је по 100µl радног раствора LDH кита *In Vitro Toxicology Assay Kit (Lactic Dehydrogenase based)* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Плоче су остављене 30 минута у мраку на собној температури, а затим је у сваки бунар микротитар плоче додато по 15µl 1N хлороводоничне киселине у циљу заустављања реакције. Оптичка густина узорака мерена је на 490nm на мултифункционалном читачу *Zenyth 3100*.

Процент мртвих ћелија је израчунат на основу формуле (309):

$$\% \text{ мртвих ћелија} = \frac{(E-B)}{((T-B)-(K-B))} \times 100$$

Е-ћелије третиране са DE-EDCP или референтним цитостатиком цисплатином (апсорбанца); Б-активност ензима у медијуму (апсорбанца); Т-ћелије третиране са тритоном X (апсорбанца); К-отвор са нетретираним ћелијама (апсорбанца).

### 3.3.3. Анализа апоптотске смрти туморских ћелија помоћу *Annexin-a V*

Протеин *Annexin V* има способност везивања за фосфатидил серин у саставу ћелијске мембране. Међутим, у касној фази апоптозе и у некротичном типу ћелијске смрти нарушава се интегритет ћелијске мембране, што неким молекулима, као што је пропидијум јодид (енгл. *propidium iodide*, PI), омогућава везивање за ДНК у ћелији (310). На основу експресије *Annexin V* и PI разликују се: *Annexin V PI* ћелије - живе ћелије, *Annexin V<sup>+</sup>PI* ћелије које су у раној фази апоптозе, *Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>* ћелије које су у касној фази апоптозе а *Annexin V<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>* ћелије су некротичне ћелије (311).

У експоненцијалној фази раста малигне ћелије 4T1 су пресејане у нове флашкове. Када су ћелије достигле конфлуентност од 70%, медијум је замењен медијумом са додатком DE-EDCP или цисплатине у концентрацији од 31.25µM или 62.5µM. Контролне ћелије нису фармаколошки третиране и у овим флашковима

медијум је замењен свежим комплетним медијумом. Након 24 сата инкубације ћелије су опране у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање *Annexin-a V* (10X пуфер: 0.1M HEPES, pH 7.4; 1.4M NaCl; 25mM CaCl<sub>2</sub>) до густине 1.000.000 ћелија/ml. У 100µl такве суспензије додато је по 5µl *Annexin-a V-FITC* (BD Pharmingen, San Diego, California, USA) и 5µl *PI* (50µg/ml PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка). После истека инкубације од 15 минута на собној температури и у мраку, у сваки узорак је додато по 400µl 1X пуфера. Анализирано је 20000 догађаја на *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

### 3.4. Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености 4T1 малигних ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса коришћен је кит *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA). Овај кит се у живим ћелијама користи за анализу ДНК. Након што поменута боја лако прође кроз ћелијску мембрану и веже се за молекуле ДНК, на основу емитавања флуоресцентног сигнала који је пропорционалан количини ДНК ћелија одређује се проценат ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

Након постизања конфлуентности у флашковима од 70-80%, 4T1 малигне ћелије су третиране са DE-EDCP или цисплатином, у концентрацијама од 31.25µM и 62.5µM, као и са свежим медијумом (контрола) 3 часа или 12 часова, у стандардним условима. Након истека инкубације, малигне ћелије су опране у комплетном медијуму. Ћелије су након тога ресуспендоване у густини од  $5 \times 10^5$  ћелија/ml. За даљу анализу је одмерено 0.5ml ћелијске суспензије у коју је додат 1µl *Ruby* боје. Узорци су након тога инкубирани 30 минута на температури од 37°C, ван домашаја светлости. За анализу ћелијског циклуса коришћен је проточни цитометар *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

### 3.5. "Scratch" тест за анализу миграције ћелија

"Scratch" тест је коришћен за анализу миграције туморских ћелија *in vitro*. Сматра се да у одређеном проценту овај тест oponaша миграцију туморских ћелија *in vivo* (312, 313). У плоче са 6 бунара у трипликату засејане су 4T1 ћелије и гајене су до постизања конфлуентног монослоја. Стерилним наставком за микропипету направљен је ожиљак у сваком од бунара. Након тога, ћелије су опране PBS а затим је додат чист медијум, или медијум са DE-EDCP или цисплатином. Ћелије су третиране са DE-EDCP или цисплатином у ниској нетоксичној концентрацији од 15.63 $\mu$ M. Након замене медијума уследила је инкубација у стандардним условима. Промене у ћелијском кретању су снимане у 0, 4, и 15. часу након замене медијума, помоћу инвертног микроскопа. Сlike су анализиране уз помоћ *Image J* софтвера (314).

### 3.6. Анализа фенотипа 4T1 туморских ћелија проточном цитометријом

Након 24. часовне инкубације са DE-EDCP или цисплатином у концентрацији од 31.25 $\mu$ M или у чистом медијуму (контролне ћелије), 4T1 ћелије су опране хладним PBS и ресуспендоване у комплетном медијуму тако да је густина ћелијске суспензије била  $2 \times 10^6$  ћелија/ml. Малигне ћелије су затим фиксиране и пермеабилисане помоћу кита (*Fixation and Permeabilization Kit*, BD Bioscience). Након инкубације од 20 минута на температури од 4°C, ћелије су опране у *BD Perm/Wash™ Buffer*-у (BD Bioscience) и центрифугиране на 125g, 10 минута. Супернатант је одливан, а 4T1 ћелије су даље бојене на два начина. Како су антитела за STAT3 (IC1799G, Novus Biologicals, San Diego, USA) и Ki-67 (11-5698-82, eBioscience, San Diego, USA) примарна антитела која су већ обележена флуорохромом (FITC), претходно фармаколошки различито третиране као и нетретиране 4T1 ћелије су инкубиране са поменутиим антителима 20 минута на температури од 4°C. Након тога ћелије су опране у *BD Perm/Wash™ Buffer*-у (BD Bioscience), центрифугиране и ресуспендоване у 250 $\mu$ l пуфера за бојење. Други начин бојења подразумевао је да третиране и нетретиране 4T1 ћелије буду инкубиране 20 минута на температури од 4°C уз додатак примарног антитела за циклин D3 (ab28283, Abcam Cambridge, United Kingdom), циклин E (MA5-14336, Thermo fisher scientific, USA), p16 (ab211542, Abcam Cambridge, United Kingdom), p21 (ab188224,

Abcam Cambridge, United Kingdom) и p27 (ab215434, Abcam Cambridge, United Kingdom). Ћелије су након истека инкубације опране на исти начин и додатно инкубиране под истим условима са секундарним антителом (*goat anti-mouse IgG FITC* (ab6785 Abcam Cambridge, United Kingdom) или *donkey anti-rabbit IgG* (ab150073 Abcam Cambridge, United Kingdom). Након поновног центрифугирања, ћелијски талог је ресуспендован у 250µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA). Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* програма (Tree Star).

### 3.7. Имунофлуоресценца

Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских молекула флуоресцентним бојама. Техника се заснива на специфичном везивању антитела за антиген. Антитело је обележено флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије, а детектује се флуоресцентним микроскопом (315). Малигне ћелије су инкубиране са DE-EDCP, или цисплатином, у концентрацији од 31.25µM у трајању од 24 часа.

Имунофлуоресценца је рађена према поступку описаном у студији *Karimian H.* и сарадника (316). У микротират плочама са 6 бунара на покривне плочице сипано је  $8 \times 10^4$  4T1 ћелија у финалној запремини од 2ml, и инкубирано 72 часа у асептичним условима у инкубатору на 37°C са 5% CO<sub>2</sub>. Након истека инкубације, медијум је аспириран из свих отвора. У бунаре са контролним (нетретираним) ћелијама додато је 2ml новог комплетног медијума а у остале бунаре 2ml комплетног медијума који садржи одговарајућу концентрацију (од 31.25µM) DE-EDCP или цисплатине. Ћелије су инкубирне још 24 часа у стандардним условима. Након истека инкубације медијум је аспириран из свих бунара и ћелије су опране са PBS. У асептичним условима додат је раствор за фиксирање (4% параформалдехид у PBS) и узорци су инкубирани 20 минута на собној температури. Ћелије су по истеку инкубације опране а затим је на ћелије нанет екстракциони раствор (хладан метанол). Након поновног прања нането је по кап примарног антитела специфично за Bcl-2 (sc-783, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA), Bax (sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA) или активну каспазу-3 (NB100-56113, Novus Biologicals, UK). Након инкубације од 60 минута у влажној комори, на испрана и



обрисана предметна стакла сипано је секундарно антителио (*goat anti-rabbit IgG FITC* (Ab6717-1, Abcam, Cambridge, United Kingdom)) и уследио је период инкубације од 45 минута у влажној комори у мраку. Вишак секундарног антителя је испран а затим су предметна стакла обрисана тако да су само исечци остали влажни. За визуализацију плаво обојених једара коришћена је DAPI (енгл. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) боја. Препарати су остављани преко ноћи да се осуше и након тога посматрани на флуоресцентном микроскопу (Olympus BX 51) на филтерима одређених таласних дужина и увећавању 200X.

### **3.8. Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену**

#### **3.8.1. Изолација рибонуклеинске киселине из 4T1 ћелијске суспензије**

За изолацију укупне рибонуклеинске киселине у суспензији туморских ћелија коришћен је тризол реагенс, који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата. 4T1 ћелије култивисане су у стандарним условима. 24 часа пре почетка експеримента методом случајног избора одабране су ћелијске суспензије које су третиране са DE-EDCP или цисплатином у концентрацији од 31.25 $\mu$ M. Последњу, контролну групу чиниле су ћелије које су гајене само у комплетном медијуму. Свака испитивана група имала је по 4 независна узорка. Након култивације 4T1 туморских ћелија у комплетном медијуму, добијена ћелијска суспензија је механички хомогенизована у 1ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution*, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) помоћу ручног хомогенизатора. Након механичког хомогенизовања, хомогенат је пребачен у епрувете (Eppendorf, Hamburg, Germany) и инкубиран 5 минута на собној температури, а затим центрифугиран 10 минута на 12000rpm на 4°C. У супернатант је додато 100 $\mu$ l бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, BCP, Sigma Aldrich), Узорци су добро вортексовани и инкубирани 15 минута на собној температури. Након инкубације узорци су центрифугирани 20 минута на 12000rpm на 4°C. Центрифугирањем су се јасно издвојиле три фракције: горња (водена) фракција у којој је РНК, доња фракција са протеинима и липидима и интермедијарна фракција у којој је ДНК. Садржај овог воденог слоја је пребачен у нове епрувете у које је додато 500 $\mu$ l расхлађеног изопропил алкохола. Узорци су благо вортексовани, инкубирани 15

минута на собној температури и затим центрифугирани 8 минута на 12000rpm на 4°C. После одливања супернатанта талог у којем се налази РНК је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500g у 1ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Осушени талог је растворен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water*, *Applied Biosystems*). Концентрација и пречишћеност РНК одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280nm помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer* (Eppendorf, Hamburg, Germany).

### 3.8.2. Реверзна транскрипција РНК у комплементарну ДНК

Процес реверзне транскрипције изведен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), према упутству произвођача. Транскрипција је изведена по следећој процедури: 10µl узорка који садржи 2µg укупне РНК изоловане из 4Т1 ћелијске суспензије инкубиран је са 10µl главне мешавине (енгл. *Master mix*). *Master mix* је садржао: 2µl пуфера (енгл. *RT Buffer*), 0.8µl *dNTP Mix*-а, 2µl хексамера (енгл. *Random Hexamer Primer*), 1µl реверзне транскриптазе (енгл. *Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) и 3.2µl воде која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease-free H<sub>2</sub>O*). На растворени узорак РНК додат је *Master mix*, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C. Реакција је заустављена грејањем 5 минута на 85°C, а узорци су затим охлађени на 4°C (*Mastercycler® ep realplex*, Eppendorf, Hamburg, Germany). Овако добијена комплементарна ДНК коришћена је за квантификацију експресије гена, која је у раствору стању чувана на 4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

### 3.8.3. Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија гена од интереса. Реакција qRT-PCR је изведена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (Eppendorf, Hamburg, Germany) коришћењем микротитар плоча са 96 места (*Twin. tec. real time PCR plates 96*, Eppendorf). Реакциона смеша у волумену од 20µl по бунару садржала је: 2µl узорка комплементарне ДНК, 10µl *Master mix* (*Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)*, Applied Biosystems), 2µl смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и

„reverse“) и 6µl воде која не садржи нуклеазе. Затим су плоче прелепљене адхезивном фолијом (Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf), центрифугиране 1 минут на 3000rpm и смештене у qRT-PCR апарат (Mastercycler® ep realplex). Реакције qRT-PCR је изведена по следећој температурној шеми: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Прајмери који су коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у Табели 1.

	Sense (5' to 3')	Antiense (5' to 3')
<b>Bax</b>	ACACCTGAGCTGACCTTG	AGCCCATGATGGTTCTGATC
<b>Bcl-2</b>	GTGGTGGAGGAACCTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
<b>Caspase-3</b>	AAATTCAAGGGACGGGTCAT	ATTGACACAATACACGGGATCTGT
<b>STAT3</b>	GGCATTCGGGAAGTATTGTCG	GGTAGGCGCCTCAGTCGTATC
<b>Cyclin D3</b>	CCGTGATTGCGCACGACTTC	TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG
<b>NANOG</b>	AAGCAGAAGATGCGGACTGT	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
<b>SOX2</b>	AAAGGGTTCTTGCTGGGTTT	AGACCACGAAAACGGTCTTG
<b>β-actin</b>	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT

Табела 1. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.

Релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле одређена је компаративном Ct (енгл. *Cycle threshold*, Ct) методом ( $\Delta\Delta Ct$ ) (317). Просечне Ct вредности контролних трипликата ( $\beta$ -актин) су одузете од просечних Ct вредности трипликата гена од интереса и на тај начин је добијен  $\Delta Ct$ , док је релативна експресија гена изражена као  $2^{-\Delta Ct}$ . Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, нетретиране 4T1 малигне ћелије, која је арбитрално подешена на 1.

### 3.9. Методе за испитивање антитуморске активности DE-EDCP *in vivo*

#### 3.9.1. Експерименталне животиње

Истраживања су спроведена на мишевима женског пола чистог соја BALB/C, као и мишевима оба пола C57BL/6, старости од 8 до 12 недеља. У испитивања су укључене животиње усклађене старости и телесне масе, као и пола, између експерименталних група.

Мишеви су узети из Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије (ВМА) у Београду и одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Животиње су чуване према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла). Спроведено истраживање одобрила је Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-10873 од 22.10.2015. године.

#### 3.9.2. Експериментални модел карцинома дојке

Мишевима соја BALB/C малигне ћелије 4Т1 убризгане су субкутано у млечну жлезду у дози од  $3 \times 10^4$  ћелија у 50 $\mu$ l DMEM, а која је оптимизирана у предекспериментима. Непосредно пре инокулације, вијабилност туморских ћелија је одређена помоћу трипан плавог и само оне ћелијске суспензије које садрже више од 95% вијабилних ћелија су коришћене за апликацију.

Након палпирања тумора (5. дана експеримента) мишевима је интраперитонеално апликован DE-EDCP, у дози од 10mg/kg који је ресуспендован у 500 $\mu$ l физиолошког раствора (0,9% NaCl), по режиму пет узастопних доза, два дана паузе, а затим је апликован још један циклус од пет појединачних дневних доза. Другој експерименталној групи мишева као референтни цитостатик цисплатина (енгл. *cis-diamminedichloroplatinum*, CDDP; Sigma–Aldrich, Munich, Germany) је интраперитонеално убризгана у дози од 3mg/kg, три пута недељно (укупно девет доза). Трећу експерименталну групу чинили су мишеви који су третирани само физиолошким раствором након појаве палпабилног тумора (Схема 3).

## BALB/C

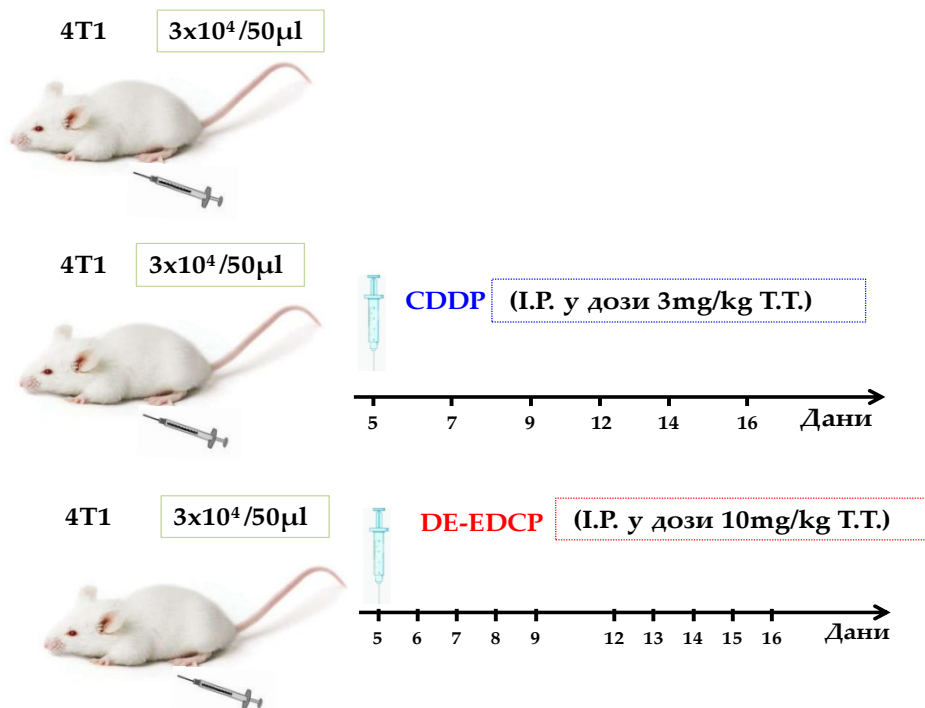


Схема 3. Ортогоски експериментални модел карцинома дојке и примена биоактивних супстанци

Сви мишеви су жртвовани 36. дана након убризгавања туморских ћелија, а исечци плућа и јетре су обојени хематоксилином и еозином.

### Одређивање величине примарног тумора

Раст тумора је свакодневно праћен палпацијом тумора, док је његова величина одређивана морфометријски коришћењем нониуса. Запремина тумора је израчуната према формули (318):

$$V(\text{mm})^3 = (L \times W^2)/2$$

L-највећи пречник; W-најмањи пречник

### 3.9.3. Модел експерименталних метастаза меланома

За индукцију експерименталних метастаза меланома интравенски су убризгане ћелије меланома (B16-F10) у латералну репну вену C57BL/6 мишева у дози  $5 \times 10^4$  ћелија у  $200 \mu\text{l}$  DMEM. Мишеви су затим случајним узорковањем подељени у три експерименталне групе. Почевши од другог дана експеримента, прва експериментална група мишева је третирана са DE-EDCP. DE-EDCP је убризгаван интраперитонеално у дози од  $10 \text{mg/kg}$  ресуспендованог у  $500 \mu\text{l}$  физиолошког раствора и то у пет узастопних доза. Након паузе од два дана поновљен је циклус од пет доза. Друга експериментална група била је на третману дакарбазином почевши од другог дана експеримента у дози од  $70 \text{mg/kg}$ , сваког другог дана. Трећу експерименталну групу чинили су мишеви који су третирани само физиолошким раствором (Схема 4).

Четрнаестог дана после убризгавања малигних ћелија, мишеви су жртвовани а исечци плућа и јетре су обојени хематоксилином и еозином.

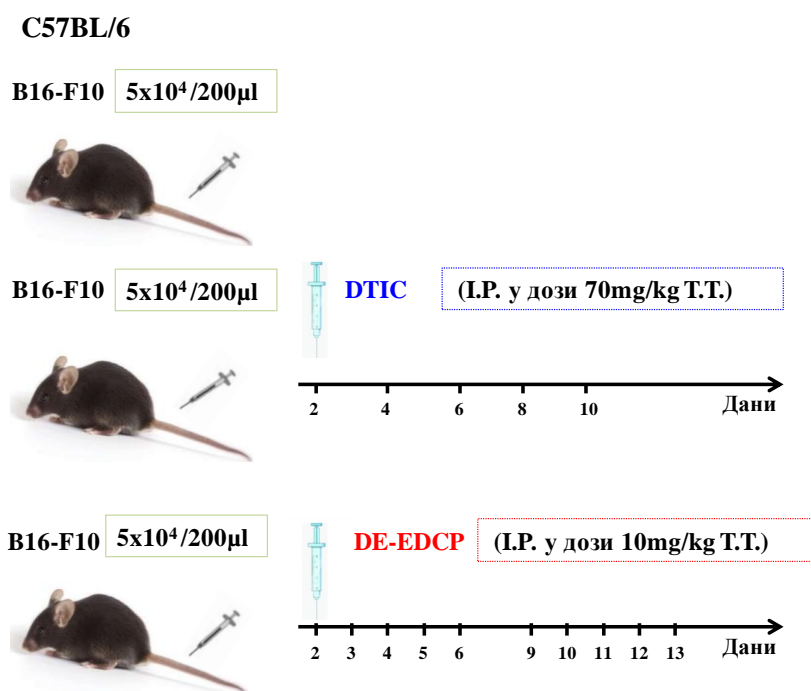


Схема 4. Индукција експерименталних метастаза меланома и примена биоактивних супстанци

### 3.10. Израда патохистолошких препарата

Непосредно након изолације, ткива изолованих органа су фиксирана у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени препарати дебљине 5 $\mu$ m. За хистолошку анализу су коришћени ткивни пресеци са пет нивоа на међусобном растојању од 25 $\mu$ m (од сваког миша су анализирана по 5 ткивних исечка и то сваки 3. ткивни пресек). Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

### 3.11. Бојење хематоксилином и еозином

Уследило је бојење криостатских ткивних пресека методом хематоксилин-еозин (енгл. *hematoxylin-eosin*, H&E). На почетку су плочице са ткивним пресецима пуферисане у пуферу формалдехида 10 секунди, онда опране у текућој води а затим потопљене 2 минута у *Mayer*-ов хематоксилин (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Потом су ткивни исечци испирани минут у текућој води и најзад су бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) у трајању од 1. минута. Након бојења уследила је дехидратација исечака како би се у њима уклонила вода. Исечци су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре 1 минут у 85% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања када су исечци потопљени 50 секунди у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На ткивне исечке нанет је Канада балзам (енгл. *Canada balsam*, (Centrohem, Србија)) и прекривени су покровним стаклима. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Japan) након 24. часовног сушења.

### 3.12. Верификација броја и величине метастатских колонија

Тридесетишестог дана после убризгавања туморских ћелија BALB/С мишеви, односно четрнаестог дана након убризгавања туморских ћелија С57BL/6 мишеви, су жртвовани, а исечци претходно поменутих ткива су обојени Н&Е. Метастатске колоније су верификоване у плућима и јетри BALB/С мишева. Метастазе су верификоване само у плућима С57BL/6 мишева и то као метастатске колоније са карактеристичном браон-црном пигментацијом и као метастатска "жаришта" са увећаним вишеједарним ћелијама, јасно ограничена од околног плућног ткива.

У овој студији је семиквантитативно одређивани просечан број метастаза по мишу, као и величина метастатских колонија и то одређивањем процента метастатског подручја у плућима или јетри. Процентуална заступљеност метастатских колонија одређивана је помоћу *Image J* софтвера (319). Добијени резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка.

### 3.13. Експресија Ki-67 и STAT3 у туморском ткиву

Експресија Ki-67 и фосфорилисане форме STAT3 у ткиву карцинома дојке испитана је имунохистохемијски, коришћењем анти-Ki-67 анитела (*rabbit anti-mouse Ki-67 antibody* (ab66155, Abcam, Cambridge, United Kingdom)) или анти-STAT3 антитела (*(phospho Y705) antibody* (ab76315, Abcam, Cambridge, United Kingdom)). Ткиво је 24 часа фиксирано у 10%-тном неутралном, пуферизованом формалину и калуљено у парафину. Резови дебљине 4-5 $\mu$ м, су монтирани на високо адхерентне плочице *SuperFrost*<sup>®</sup> и сушени на температури од 56°C у току 60 минута. Како би се обавила депарафинизација и рехидратација, као што је раније описано, ткивни пресци „провлачени“ су кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Фиксација ткива у формалину, као и калуљење ткивних узорака у парафину изазивају конфигурацијске промене протеина и формирање интермолекулских веза које маскирају антигене и смањују ефекат имунохистохемијског бојења. Поступком ослобађања, обнавља се примарна конфигурација антигена уклањањем нежељених интермолекулских веза. Демаскирање антигена је обављено у микроталасној пећници (Samsung MG23F301TAS,



Seoul, South Korea) у 0,1 М цитратном пуферу (рН 6.0) на 96°C, у трајању од 20 минута. По обављеном „кувању“, плочице са ткивним пресецима су 5 минута испирание дестилованом водом. Како би се блокирао ефекат ендogene пероксидазе и елиминисало неспецифично бојење, плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоникпероксида (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), у трајању од 10 минута. Након испирања дестилованом водом, плочице су пласиране у кивете са PBS. Ткивни пресеци су инкубирани са раствором примарног антитела, у трајању од 60 минута. По истеку инкубације, плочице су испирание у PBS, а затим је нането секундарно антитело (*Rb-Specific HRP/AEC Detection IHC Kit*; Abcam Cambridge, United Kingdom). После испирања уследило је бојење са Mayer-овим хематоксилином.

Процент ћелија које исказују Ki-67 или фосфолирисану форму STAT3 у свим испитиваним групама одређен у пет случајно одабраних видних поља (на увеличању 400X). Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација процента позитивних ћелија (320).

### 3.14. Евалуација апоптозе у туморском ткиву

За TUNEL (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) методу коришћени су парафински исечци мишјег карцинома дојке испитиваних група (по четири примарна тумора по групи) дебљине 5µm, којима је урађена депарафинизација и рехидратација ткива. Затим су исечци примарног карцинома потопљени у расхлађени ацетон 8 минута, а након тога испрани 2 пута по 5 минута у PBS. На сваки ткивни исечак је затим нането по 50µL мешавине за TUNEL реакцију (450µL Label solution, 50µL enzyme solution), а затим је уследила инкубација од 60 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку. Након инкубације препарати су испирани у PBS. На ткивне исечке нането је по 50µL POD (енгл. *anti fluorescein antibody, Fab fragment from sheep, conjugated with peroxidase*) конвертера, након чега је уследила инкубација од 30 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку. Затим су препарати испирани у PBS-у, и на сваки препарат је нането 50-100µL DAB (енгл. *3, 3'-diaminobenzidine*) супстрата. Након инкубације од 10 минута на собној температури, уследило је троструко испирање у PBS, бојење хематоксилином и еозиномом и на овако обојене ткивне исечке је нанета по једна кап глицерола, а онда су препарати

прекривени покровном љуспицом. Заступљеност туморских ћелија са TUNEL-позитивним једром квантификован је у пет случајно изабраних видних поља (на увеличању 400X), а подаци су сумирани као средња вредност процента позитивних ћелија  $\pm$  стандардна девијација (четири тумора по групи) (321).

### 3.15. Изолација ћелија из тумора дојке

Осамнаестог дана након апликације 4T1 ћелијске суспензије ( $3 \times 10^4$  ћелија) у млечну жлезду мишевима свих претходно наведених експерименталних група, BALB/C мишеви су жртвовани. Након жртвовања, мишевима је изолован тумор који је затим уситњен маказама и након тога неколико пута испиран са PBS. Уситњени тумори су потом ресуспендовани у 5ml медијума за дигестију који садржи 1mg/ml колагеназе тип I, 1mM EDTA у 10ml RPMI (енгл. *Roswell Park Memorial Institute medium*) коме је додато 2% FBS. Дигестија тумора се одвија у трајању од два сата на 37°C уз мешање на шејкеру. Након дигестије, ћелије су центрифугиране 5 минута на 300g, а након што је супернатант одливен пипетом на талог је додато 10ml претходно загрејаног трипсина. Након додавања трипсина уследила је инкубација у трајању од 3 минута на 37°C. По истеку инкубације узорци су центрифугирани 10 минута на 300g. Након центрифугирања и одливања супернатанта на талог је пипетом додато 2.5ml претходно припремљене и загрејане дезоксирибонуклеазе I (енгл. *Deoxyribonuclease I, DNase*) (10 $\mu$ g/ml). Након инкубације од 1 минута на 37°C, у епрувете је додато 7ml комплетног медијума и садржај је центрифугиран 10 минута на 300g. Из епрувета је супернатант одливен пипетом, а потом је додато 5ml комплетног медијума и садржај је пропуштен кроз ћелијско сито. Након што је добијени садржај центрифугиран 10 минута на 300g, ћелије су ресуспендоване у 0.5ml комплетног медијума. На овај начин добијена је суспензија појединачних тумор инфилтришућих леукоцита.

### 3.16. Анализа популација моноклеарних ћелија тумора помоћу проточне цитометрије

Субпопулација лимфоцита и акцесорских ћелија примарног тумора анализирани су проточном цитометријом 0. и 18. дана од апликације 4Т1 туморских ћелија.

#### 3.16.1. Обележавање мембранских маркера на ћелијама

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулације моноклеарних ћелија изолованих из тумора коришћена су анти-мишја моноклонска антитела (Табела 2). На  $5 \times 10^5$  ћелија ресуспендованих у 50 $\mu$ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD Biosciences) додата је одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација моноклеарних ћелија.

Сва антитела за површинско бојење коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Суспензија тумор-инфилтришућих леукоцита је краткотрајно вортексована и инкубирана 20 минута у мраку на температури од 4°C. По истеку инкубације, ћелије су опране у хладном пуферу (енгл. *Staining Buffer*, BD) и онда су центрифугиране 5 минута на 400g. Након одливања супернатанта талог ћелија је ресуспендован у 250 $\mu$ l пуфера. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру *FACSCalibur* (BD Biosciences) помоћу *CELLQUEST* софтвера (BD). Подаци су анализирани коришћењем *FlowJo* (Tree Star) софтвера.

НАЗИВ	КЛОН	ИЗОТИП	ПРОИЗВОЂАЧ
<b>Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 anti-mouse CD3e</b>	145-2C11	IgG1 κ	BD Pharmingen
<b>PerCP anti-mouse CD49b</b>	HMα2	Armenian Hamster IgG	Biolegend
<b>FITC anti-mouse Fas Ligand (CD178)</b>	MFL3	Armenian hamster IgG	eBioscience
<b>PE anti-mouse KLRG1</b>	2F1	IgG	eBioscience
<b>PE anti-mouse CD279</b>	J43	IgG2 κ	BD Pharmingen
<b>PE anti-mouse CD152</b>	UC10-4B9	Armenian hamster IgG	eBioscience
<b>PE anti-mouse CD314 (NKG2D)</b>	C7	IgG	eBioscience

Табела 2. Примарно конјугована моноклонска антителиа

### 3.17. Испитивање потенцијално токсичних ефеката DE-EDCP

Мишеви оба соја, експерименталних и контролних група су жртвовани и узета им је крв из трбушне аорте која је центрифугирана 20 минута/12000rpm/4°C. Серум је издвојен за сваког појединачног миша ради одређивања концентрације трансаминаза (аспартат трансаминазе (енгл. *Aspartate transaminase, AST*) и аланин трансаминазе (енгл. *Alanine transaminase, ALT*)) као и концентрације урее и серумског креатинина. Концентрације трансаминаза, урее и серумског креатинина су одређене помоћу специфичних колориметријских китова: *mouse AST ELISA* кит, *mouse ALT ELISA* кит (Elabscience), *Urea Assay* кит (Abcam) и *Creatinine ELISA* кит (BioSciences).

### 3.18. Статистичка обрада података

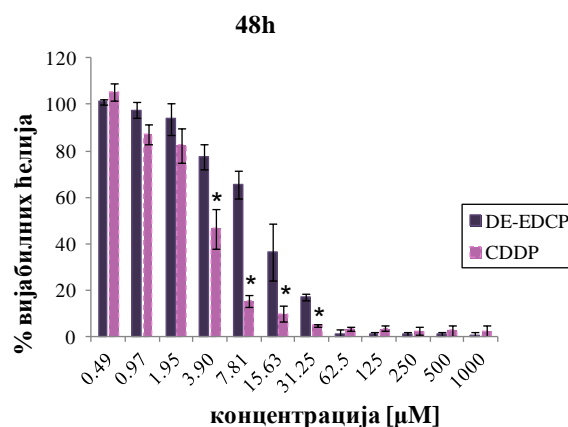
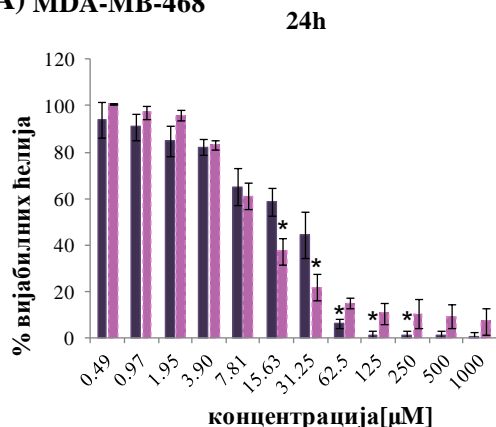
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитана правилност расподеле добијених вредности коришћењем *Shapiro-Wilk* теста. Уколико су вредности имале правилну расподелу коришћен је параметарски *Student's t* тест, док се неправилна расподела поредила помоћу непараметарског *Mann-Whitney* теста. Резултати експеримента су изражени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (SD) или стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи  $p < 0.05$ .

## 4. Резултати

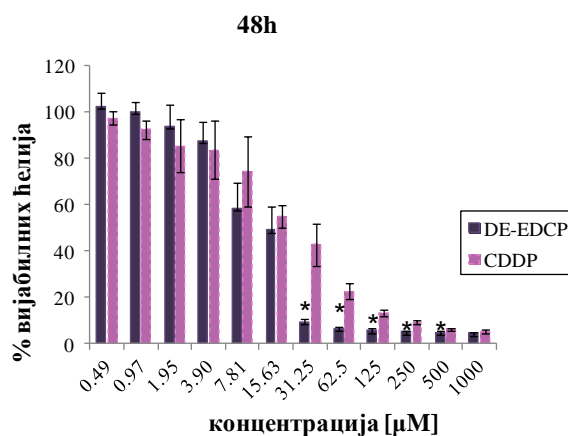
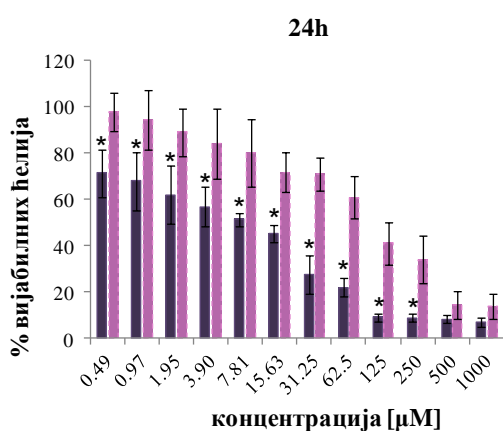
### 4.1. DE-EDCP је ефикасан у убијању ћелија карцинома дојке и меланома

Са циљем да се испита туморицидни потенцијал DE-EDCP, најпре је МТТ тестом анализирана вијабилност ћелија карцинома дојке хуманог и мишјег порекла, као и ћелија меланома миша након 24. и 48. часовног излагања DE-EDCP у двоструко растућој концентрацији. Како би се упоредила цитотоксичка активност испитиване супстанце, коришћена је цисплатина као референтно једињење. Добијени налаз указује да DE-EDCP редукује вијабилност свих тестираних линија туморских ћелија на дозно зависан начин. Примећује се да је туморицидна активност DE-EDCP на варијанти хуманог карцинома дојке MDA-MB-468 значајно мања у односу на цисплатину у ниским концентрацијама од 15.63 $\mu$ M и 31.25 $\mu$ M (након 24 часа) и 3.90-31.25 $\mu$ M (након 48 часа), што се види на Графикону 1А. Међутим, DE-EDCP у вишим концентрацијама (62.5-1000 $\mu$ M) остварује снажнији туморицидни потенцијал у поређењу са цисплатином након 24. часовног третмана ћелија (Графикон 1А). Када је реч о осетљивости друге варијанте хуманог карцинома дојке MDA-MB-231 након 24. часовног третмана јасно се види да је цитотоксичка активност DE-EDCP на ове ћелије битно већа у односу на цисплатину у опсегу концентрација 0.49-250 $\mu$ M. Уз то, уочава се да су MDA-MB-231 ћелије осетљивије на 24. часовни третман са DE-EDCP у односу на туморске ћелије MDA-MB-468. На крају, запажа се да је вијабилност ћелија MDA-MB-231 значајно мања након 48. часовног третмана са DE-EDCP него са цисплатином и то у опсегу концентрација 31.25-500 $\mu$ M (Графикон 1Б).

**A) MDA-MB-468**



**Б) MDA-MB-231**

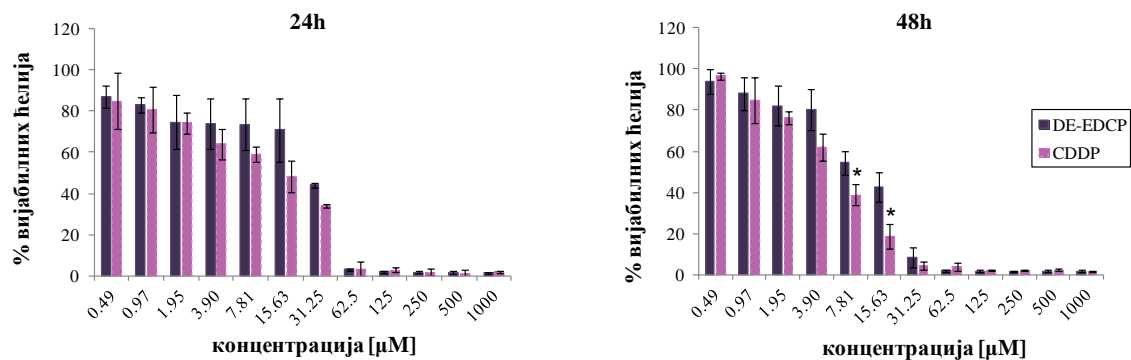


**Графикон 1. Цитотоксичка активност DE-EDCP на линијама ћелија хуманог карцинома дојке је дозно зависна.** Вијабилност туморских ћелија MDA-MB-468 (A) и MDA-MB-231 (Б) је одређена MTT тестом након 24. и 48. часовне инкубације са DE-EDCP и цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP). Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента ± стандардна девијација, а сваки од експеримента је одрађен у трипликату. (*Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ )

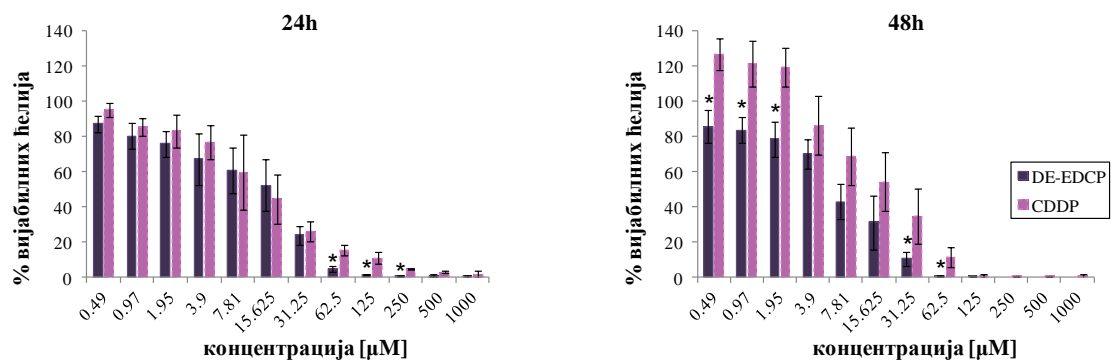
На Графикону 2 приказана је осетљивост ћелија метастатског мишићег карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10) на токсично дејство DE-EDCP. После 24. часовног третмана туморских ћелија 4T1, цитотоксички ефекат DE-EDCP и цисплатине је готово идентичан у опсегу концентрација 62.5-1000μM, и штавише овакав ефекат је остварен и у нижим концентрацијама (0.49-3.9μM) (Графикон 2A). Продужавањем времена третмана на 48 часова уочава се да DE-EDCP редукује вијабилност 4T1 ћелија приближно исто као цисплатина, изузев у концентрацији од 7.8μM и 15.63μM када је цитотоксичко дејство DE-EDCP на ћелије слабије у односу на цисплатину (Графикон 2A). Када се пореди вијабилност ћелија B16-F10 варијанте меланома након 24. часовног третмана јасно се види да је цитотоксичност DE-EDCP приближно слична

цисплатини у нижим концентрацијама, док је у нешто вишим концентрацијама (62.5 $\mu$ M-250 $\mu$ M) туморицидни потенцијал DE-EDCP значајно снажнији у односу на цисплатину (Графикон 2Б). Међутим, после 48. часовног третмана ћелија, DE-EDCP показује бољи цитотоксички капацитет у односу на цисплатину у опсегу концентрација 0.49-62.5 $\mu$ M, док је у концентрацији од 125 $\mu$ M и више забележена апсолутна смртност туморских ћелија.

#### А) 4Т1



#### Б) V16-F10



**Графикон 2. Цитотоксички потенцијал DE-EDCP на линији ћелија мишјег карцинома дојке и меланома.** Вијабилност туморских ћелија 4Т1 (А) и V16-F10 (Б) је одређена МТТ тестом после 24. и 48. часовне инкубације са DE-EDCP и цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP). Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента  $\pm$  стандардна девијација, а сваки од експеримента је одрађен у трипликату (*Mann-Whitney U* тест; \*  $p < 0.05$ ).

Затим је одређена вредност IC<sub>50</sub> (концентрација супстанце ( $\mu$ M) која инхибира преживљавање циљаних ћелија за 50%) након 24. и 48. часовног деловања DE-EDCP или цисплатине на панел линија туморских ћелија коришћених у овој студији (Табела 3).



IC <sub>50</sub> ± SD (μM)			
Линија туморских ћелија		Једињење	
		DE-EDCP	CDDP
MDA-MB-468	24 h	16.52±2.78	16.68±1.83
	48 h	15.58±2.94	5.01±1.03
MDA-MB-231	24 h	5.14±0.63	66.01±0.69
	48 h	17.45±3.33	20.71±0.32
4T1	24 h	12.90±0.75	10.59±0.36
	48 h	12.03±2.86	7.97±0.56
B16-F10	24 h	9.94±5.18	13.38±5.82
	48 h	6.83±1.89	16.91±8.04

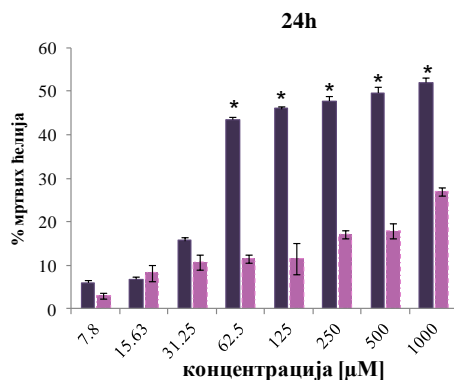
**Табела 3.** Концентрације DE-EDCP и цисплатине (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) које инхибирају преживљавање различитих циљаних ћелија за 50% након 24. и 48. часовне инкубације. Вредности IC<sub>50</sub> су приказане као средња вредност ± стандардна девијација.

У случају третираних туморских ћелија 4T1, B16-F10 и MDA-MB-468 запажа се да су IC<sub>50</sub> вредности DE-EDCP и цисплатине биле приближно једнаке и да се са продужавањем третмана (након 48 часова) вредност IC<sub>50</sub> DE-EDCP мање-више не мења (Табела 3). Ако се пак пореди ефекат испитиване супстанце на MDA-MB-231 ћелијама након 24 часа, забележена IC<sub>50</sub> DE-EDCP је била чак 12 пута мања од IC<sub>50</sub> цисплатине што указује да је ова линија карцијома дојке хуманог порекла сензитивнија на 24. часовно дејство DE-EDCP у поређењу са референтним хемотерапеутиком. Међутим, продужавањем времена третмана (након 48 часова) ова драстична разлика у антитуморском ефекту се губи и осетљивост туморских ћелија MDA-MB-231 на DE-EDCP се смањује и постаје приближно иста као на цисплатину.

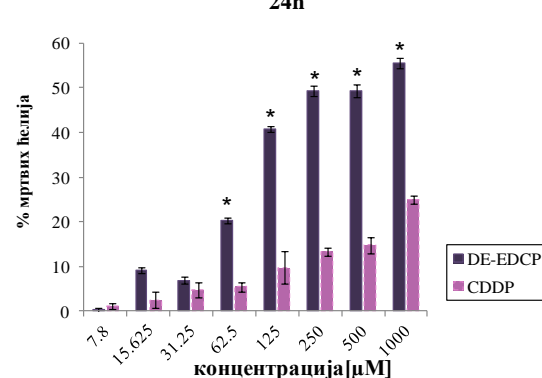
У наредним експериментима је додатно потврђена дозно зависна цитотоксичка активност DE-EDCP на 4T1 и B16-F10 ћелијама помоћу LDH теста. LDH тест се

заснива на мерењу активности цитоплазматског ензима лактат дехидрогеназе, а који се ослобађа из ћелија у супернатант само када је интегритет ћелијске мембране нарушен. Као што се види на Графикону 3А, под утицајем DE-EDCP, у опсегу концентрације од 62.5 до 1000 $\mu$ M, забележен је драстичан пораст са 15.67% на 52.02% мртвих 4Т1 ћелија које су ослободиле LDH након 24. часовног третмана. С друге стране, излагање туморских ћелија цисплатини у истом опсегу концентрација резултовало је мањим порастом процента мртвих ћелија, са 10.73% на 26.89%, у односу на испитивано једињење. Слично резултатима добијеним МТТ тестом, анализа цитототоксичког капацитета DE-EDCP помоћу LDH теста имплицира да је В16-F10 варијанта меланома релативно осетљивија на DE-EDCP у поређењу са 4Т1 ћелијама карцинома дојке. Резултати јасно показују да DE-EDCP у концентрацији почев од 31.25 до 1000 $\mu$ M индукује битно већи пораст са 6.95% на 55.53% мртвих ћелија, док је третман са цисплатином у истим концентрацијама резултовао мањим порастом процента мртвих ћелија В16-F10 (са 4.87% на 24.9%) у односу на DE-EDCP (Графикон 3Б).

А) 4Т1



Б) В16-F10



**Графикон 3. DE-EDCP повећава проценат мртвих ћелија мишијег карцинома дојке и меланома на дозно зависан начин.** Резултати LDH теста након култивације 4Т1 (А) и В16-F10 туморских ћелија (Б) у присуству DE-EDCP и цисплатине (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у временском периоду од 24 часа. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента, а сваки од експеримента је рађен у трипликату (*Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ ).

Познато је да ћелије са дезинтегрисаном ћелијском мембраном улазе у некрозу и/или у касну фазу апоптозе и да се углавном детектују помоћу LDH теста, док се МТТ тестом региструју промене у активности митохондријалних ензима што се дешава рано у процесу апоптозе. У складу са тим, на основу налаза значајне туморицидне активности испитиваног једињења добијеног помоћу МТТ и LDH теста може се констатовати да DE-EDCP највероватније узрокује како апоптотску тако и неапоптотску/некротску смрт 4Т1 и В16-F10 малигних ћелија.

## 4.2. Антитуморска активност DE-EDCP у моделу мишијег карцинома дојке и меланома

Након што је показано да DE-EDCP поседује изражен цитотоксички капацитет на малигним ћелијама 4T1 и B16-F10, следећи корак у истраживању је био да се испита да ли и у којој мери DE-EDCP утиче на прогресију карцинома дојке и меланома миша.

### 4.2.1. DE-EDCP редукује раст и метастазирање карцинома дојке

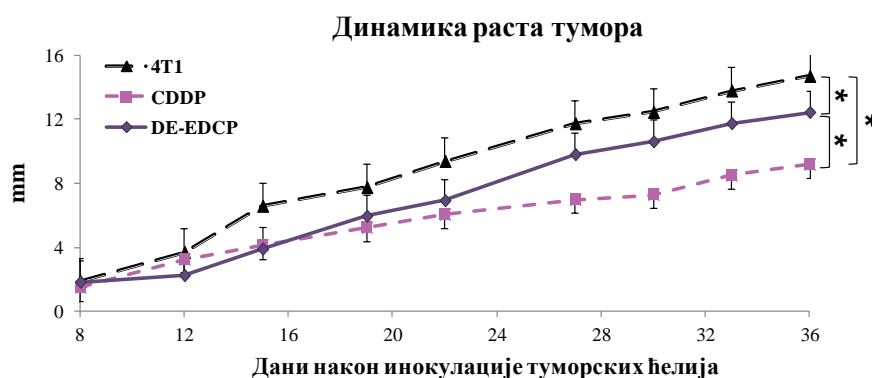
Мишевима чистог соја BALB/C имплантиран је карцином дојке тако што је  $3 \times 10^4$  4T1 ћелија инокулисано ортотопски у млечну жлезду. Палпабилни тумор код свих мишева регистрован је 5. дана након убризгавања малигних ћелија, када је једна група мишева подвргнута краткотрајном третману са DE-EDCP (у трајању од 12 дана) на следећи начин: испитивано једињење је интраперитонеално апликовано у дози од 10mg/kg телесне масе узастопно 5 дана, након чега су уследила 2 дана паузе, а затим у наредних 5 дана је уследио други терапијски циклус. Друга група мишева је третирана са цисплатином која је део стандардних терапијских протокола за лечење солидних тумора, укључујући и карцином дојке, и то у дози од 3mg/kg телесне масе, 3 пута недељно (укупно 9 доза). Следећу групу су чинили мишеви са карциномом дојке који нису потврднути фармаколошком третману.

На Гарфикону 4А приказана је динамика раста карцинома дојке током 36 дана од убризгавања туморских ћелија и уочава се да је код мишева који су третирани са DE-EDCP средња вредност пречника тумора значајно мања него у групи нетретираних мишева. Ако се пореде ефекти деловања испитиване супстанце и цисплатине као стандардног цитостатика, запажа се да је до 22. дана од убризгавања туморских ћелија, DE-EDCP имао сличан ефекат на раст карцинома дојке као и цисплатина. Од тог дана и поред бољег ефекта цисплатине, јасно се уочава да се претходно забележена разлика у дијаметру тумора одржава све до краја експеримента између групе мишева третираних са DE-EDCP и нетретираних мишева.

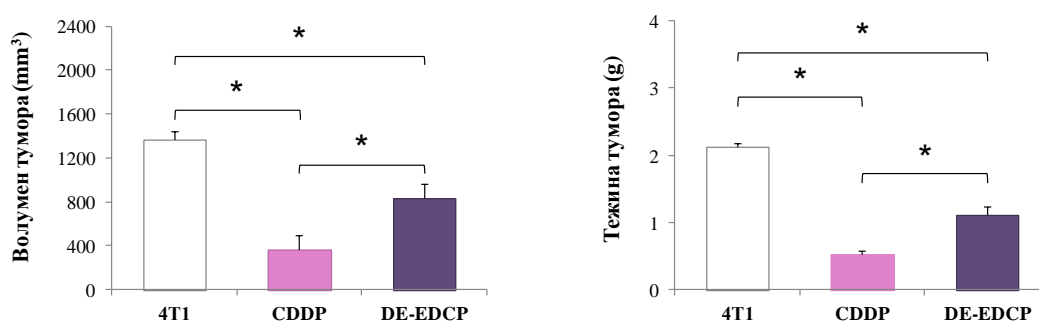
Сви мишеви су жртвовани 36. дана након апликације 4T1 ћелија када су измерени укупан волумен и тежина тумора. Региструје се статистички значајно

смањење волумена и тежине тумора у мишева третираних са DE-EDCP у односу на нетретирану групу (Графикон 4Б). Уз то, резултати показују и да је цисплатина била најефикаснија у редукцији волумена и тежине тумора.

А)



Б)

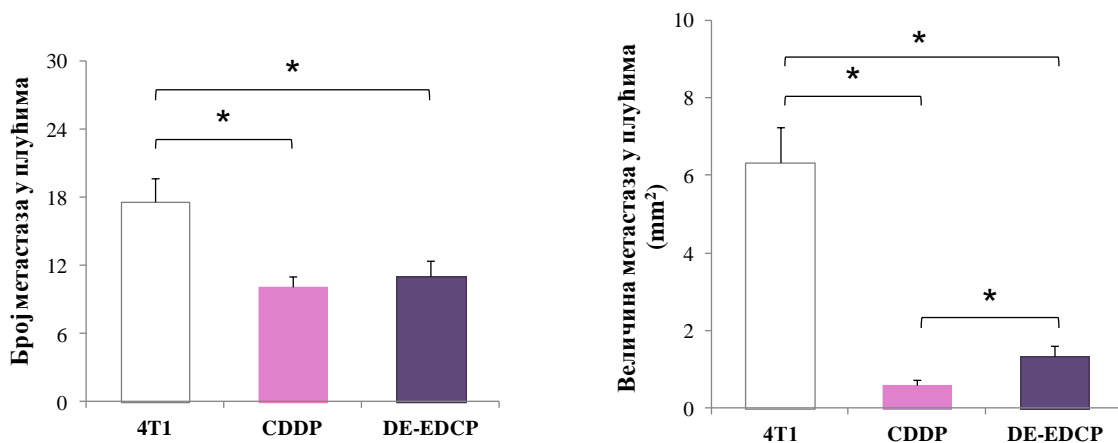


**Графикон 4. DE-EDCP успорава раст карцинома дојке.** А) Динамика раста карцинома дојке у мишева третираних са DE-EDCP, цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) и фармаколошки нетретираних мишева. Б) Волумен и тежина карцинома дојке у мишева третираних са DE-EDCP, цисплатином (CDDP) и фармаколошки нетретираних мишева (8 мишева по групи, *Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ )

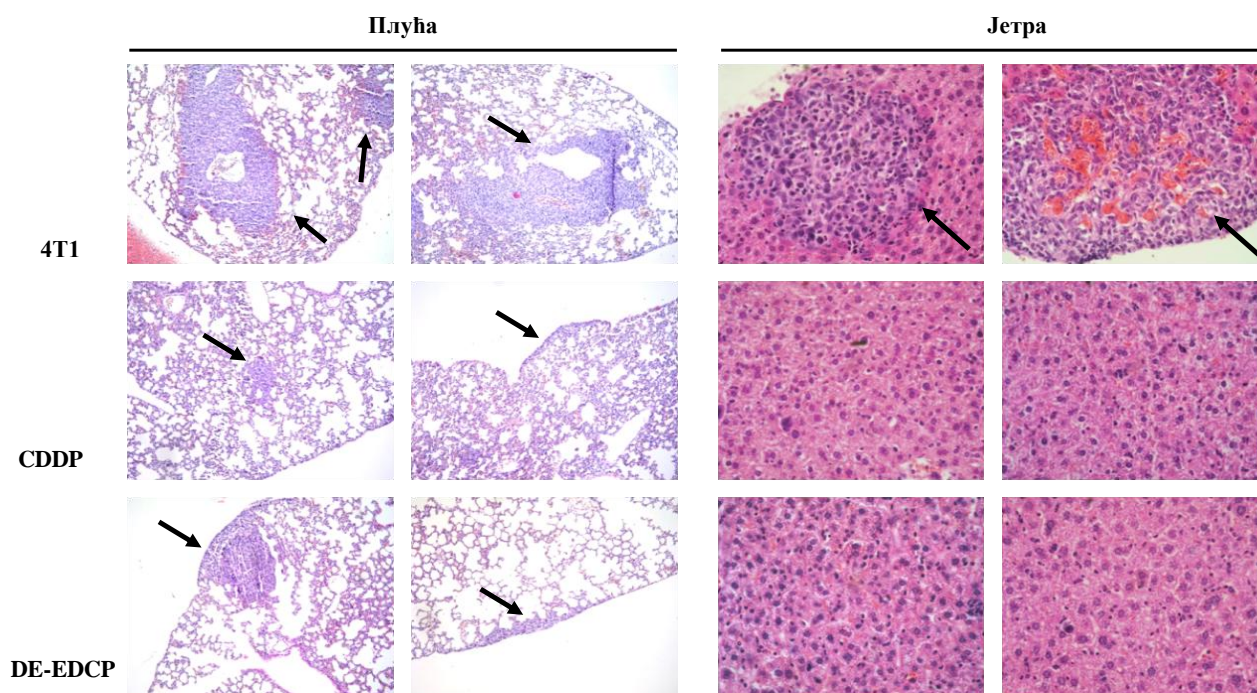
У циљу верификације метастаза анализирани су исечци ткива плућа и јетре који су обојени хематоксилином и еозином. Тридесетшестог дана експеримента, у свим испитиваним групама мишева, регистрована су спонтано успостављена метастатска жаришта у плућима. Међутим, број метастаза у мишева третираних са DE-EDCP је био око 1.6 пута, односно 1.7 пута мањи у групи мишева третираних са цисплатином, у односу на нетретирану групу што се види на Графикону 5. Није забележена статистички значајна разлика у броју метастатских колонија у плућима мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином. Даља анализа величине метастатских жаришта указала је да DE-EDCP значајно редукује величину метастаза у плућима (Графикон 5). Другим речима, у плућима мишева третираних са DE-EDCP величина

метастатских колонија је око 4.8 пута мања у поређењу са метастазама нетретираних мишева. С друге стране, у групи мишева третираних цисплатином величина метастаза је 10.55 пута мања него у нетретираној групи. Иако цисплатина значајно не утиче на број метастаза у поређењу DE-EDCP, примећује се је да овај цитостатик ефикаснији у редукуји величине метастатских колонија у плућима.

Када је реч о појави метастаза у јетри, рефрактерност на успостављање метастатских жаришта је битно израженија у групи мишева третираних како са DE-EDCP тако и са цисплатином. Другим речима, у групи мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином нису регистроване метастатске колоније, док су у чак 42% (3/7) нетретираних мишева детектоване метастазе у јетри (Слика 6).



**Графикон 5. DE-EDCP редукује број и величину метастатских колонија карцинома дојке у плућима.** Број и величина спонтано развијених метастатских колонија карцинома дојке у плућима мишева третираних са DE-EDCP, цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP), као и код фармаколошки нетретираних мишева (8 мишева по групи, *Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ )



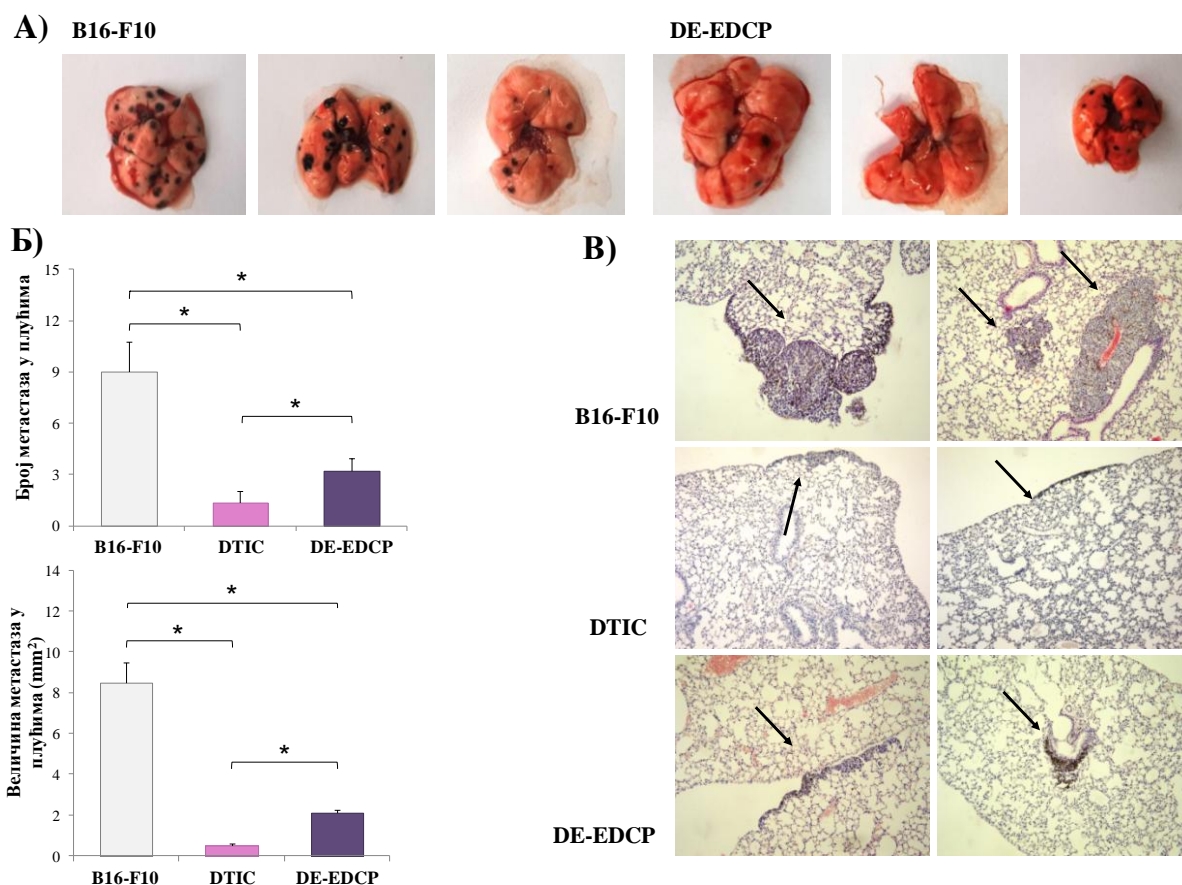
**Слика 6. DE-EDCP омета спонтани развој метастатских колонија у плућима и јетри.** Представљени су репрезентативни хистолошки исечци ткива плућа и јетре нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева (оригинално увећање 100X и 400X).

#### 4.2.2. DE-EDCP редукује метастазирање меланома у плућа

Следећи корак је био да се утврди да ли DE-EDCP утиче и на успостављање хематогених метастаза меланома. У ту сврху,  $5 \times 10^4$  туморских ћелија B16-F10 је убризгано у латералну репну вену сингених мишева соја C57BL/6. Другог дана након апликације малигних меланоцита мишеви су методом случајног избора подељени у три групе. Једну групу су чинили мишеви третирани DE-EDCP на исти начин као што је претходно описано. У другој групи мишеви су подвргнути третману референтним цитостатиком у лечењу меланома дакарбазином у дози од 70mg/kg телесне масе, сваког другог дана (укупно 5 доза). Следећу групу су представљали нетретирани мишеви са меланомом.

Мишеви су жртвовани 14. дана након апликације B16-F10 туморских ћелија када је и утврђивано постојање, број и величина хематогених метастаза. Као што се види на Графикону 6А, у плућима мишева који су подвргнути третману са DE-EDCP регистровано је мање видљивих метастатских жаришта, карактеристичне браон-црне пигментације, него у плућима нетретираних мишева. Такође, утврђено је да су се код свих нетретираних мишева развиле хематогене метастазе у плућима, док је инциденца

метастазирања меланома у групи мишева третираних са DE-EDCP износила 76.92% (10/13), односно 53.84% (7/13) у групи мишева третираних са дакарбазином.



**Графикон 6. DE-EDCP значајно редукује број и величину метастаза меланома у плућима.** А) Макроскопски приказ плућа испитиваних група мишева 14. дана од апликације ћелија B16-F10 варијанте меланома; Б) Број и величина метастатских колонија у плућима мишева третираних са DE-EDCP, дакарбазином (енгл. *Dacarbazine*, DTIC) и фармаколошки нетретираних мишева (13 мишева по групи, *Mann-Whitney U* тест;  $*p<0.05$ ); В) Репрезентативни хистолошки исечци ткива плућа нетретираних и различито фармаколошки третираних мишева (оригинално увећање 100X).

Мада је референтни цитостатик остварио бољи антимастистатски ефекат, на Графикону 6Б и 6В се јасно види да су број и величина метастаза били значајно мањи у групи третираној са DE-EDCP у поређењу са нетретираним мишевима.

На крају, поред плућа изолована је јетра и патохистолошком анализом ткивних исечака је утврђено да је у свим испитиваним групама изостала колонизација метастатских меланоцита у овом органу.

На основу свих добијених налаза може се закључити да је код мишева који су третирану DE-EDCP значајно успорен како раст тако и метастазирање тумора.

### 4.3. Утицај DE-EDCP на апоптозу туморских ћелија

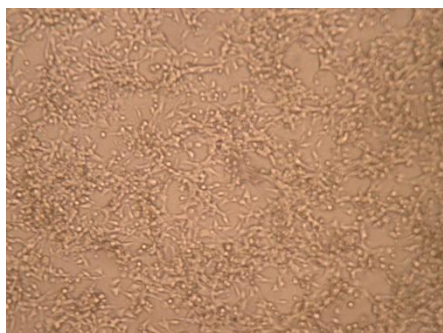
Следећи циљ ове студије је био да се дефинишу механизми укључени у инхибицију прогресије тумора под утицајем DE-EDCP. Да би се утврдило на који начин испитивано једињење остварује антитуморску активност сви наредни експерименти спроведени су на 4T1 малигним ћелијама. Најпре је анализиран утицај DE-EDCP на индукцију апоптозе, као и на експресију кључних молекула који регулишу овај процес.

#### 4.3.1. DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу

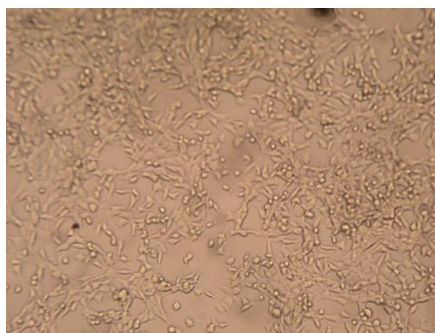
Под инвертним светлосним микроскопом прво је регистровано да је DE-EDCP изазвао значајне морфолошке промене у 4T1 ћелијама, нарочито у вишим концентрацијама (62.5 $\mu$ M и 125 $\mu$ M) што се види на Слици 7. За разлику од нетретираних туморских ћелија које су имале типичан облик и формирале конфлуентна огњишта, ћелије третиране са DE-EDCP су биле упадљиво мање густине и са измењеном морфологијом, односно заокруљене и неадхерентне. Уз то, јасно се уочава да је овакав ефекат DE-EDCP на туморске ћелије дозно зависан. Добијени налаз морфолошких промена у туморским ћелијама које су последица деловања DE-EDCP је подстакао да се детаљније дефинише тип ћелијске смрти.



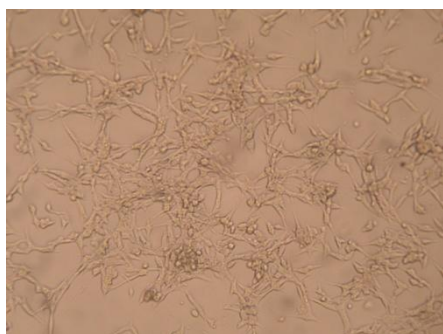
**Нетретиране 4T1 ћелије**



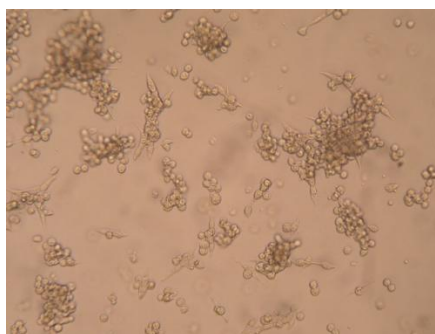
**DE-EDCP (31.25µM)**



**DE-EDCP (62.5µM)**



**DE-EDCP (125µM)**



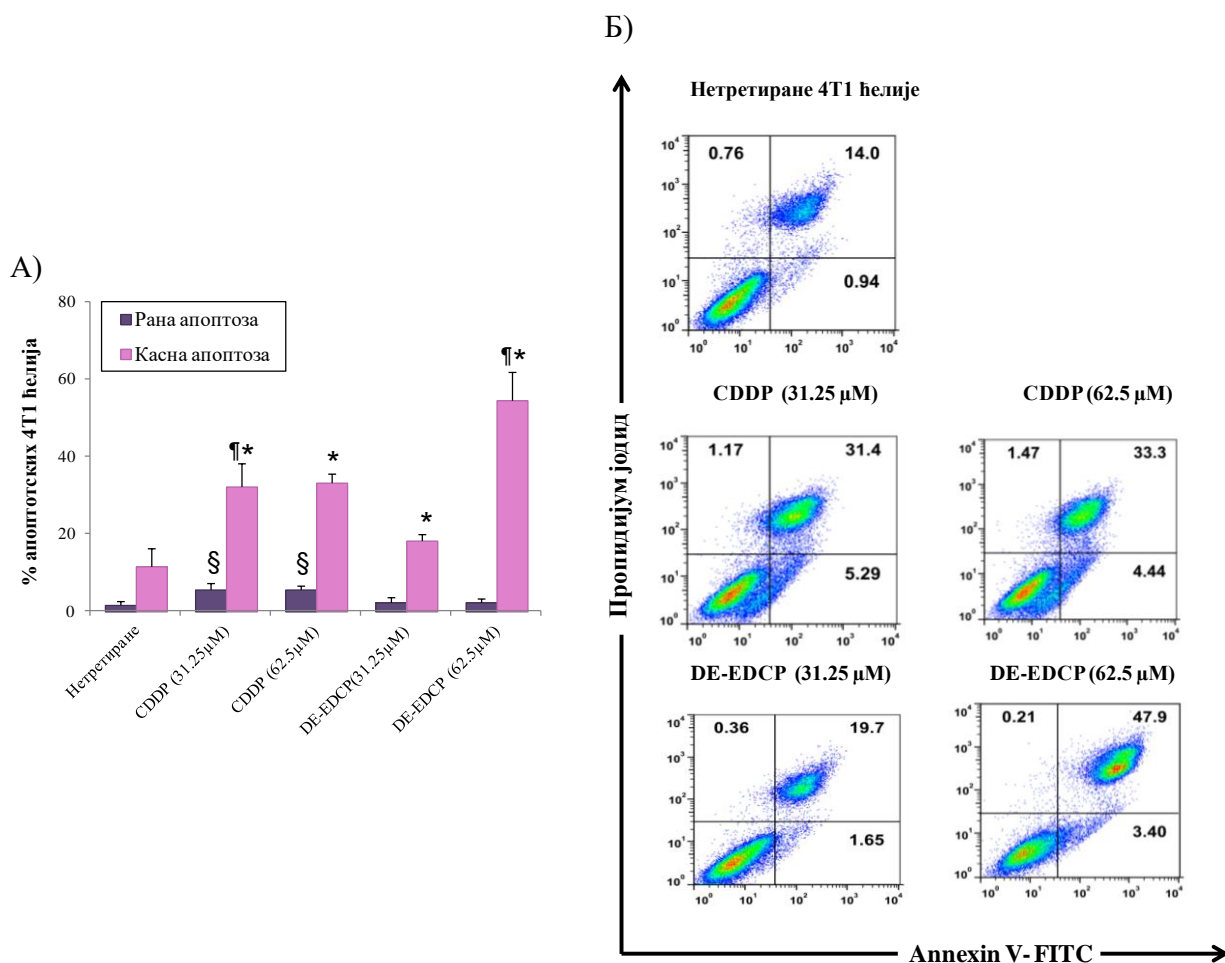
**Слика 7. Туморске 4Т1 ћелије изложене DE-EDCP подлежу морфолошким променама.** Туморске ћелије мишјег карцинома дојке које су 24 часа изложене DE-EDCP у двоструко растућим концентрацијама се морфолошки разликују у односу на нетретиране ћелије. Промене у ћелијској морфологији су посматране под инвертним микроскопом.

С обзиром на чињеницу да је индукција апоптозе у туморским ћелијама најчешћи механизам деловања за већину лекова примењивих у терапији малигнома, било је од интереса да се детерминише способност DE-EDCP у индукцији апоптозе. У ту сврху, туморске ћелије су 24 сата изложене DE-EDCP или цисплатини у концентрацији од 31.25µM и 62.5µM. Обележавањем овако третираних ћелија уз помоћ анексина V коњугованог флуоресцентном бојом и пропидијум јодида, анализирана је њихова процентуална заступљеност у различитим фазама апоптозе.

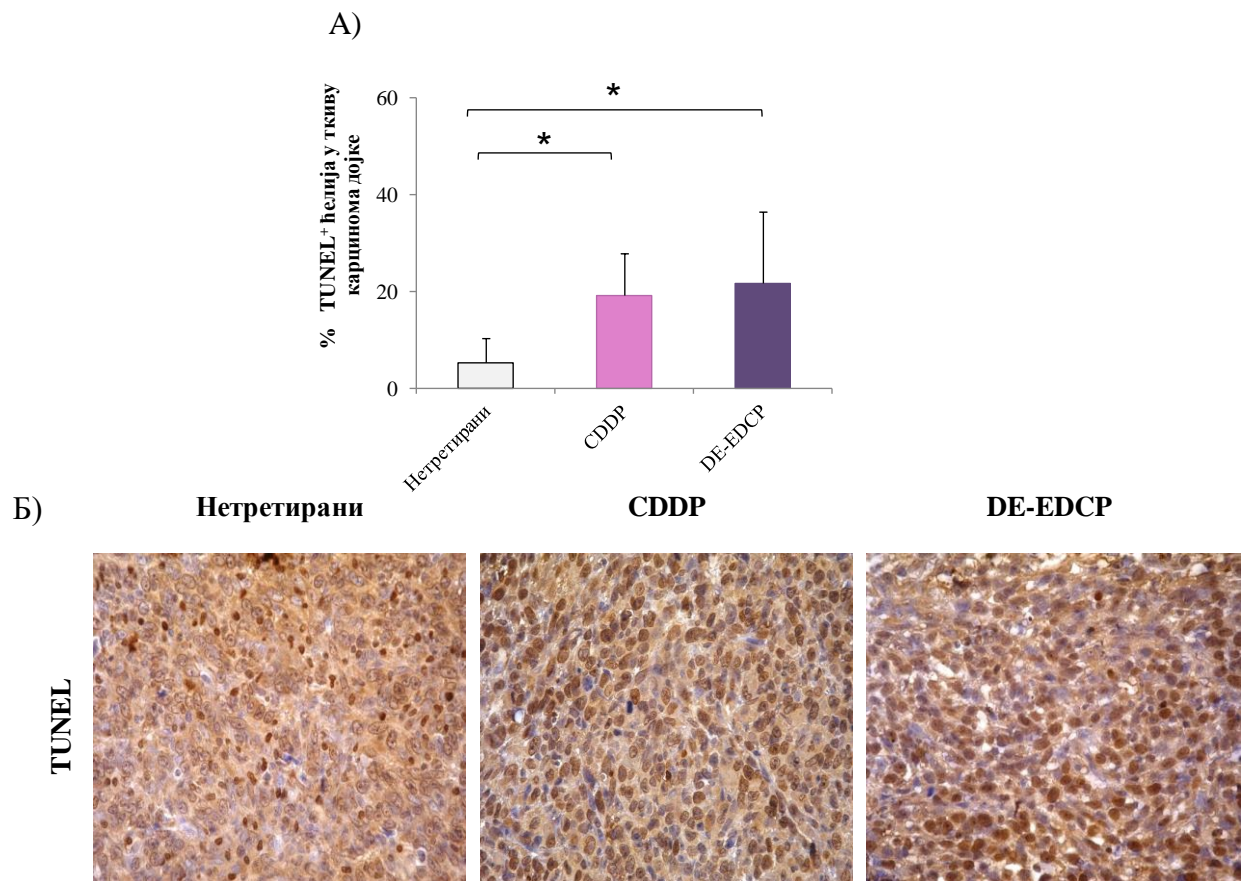
Резултати јасно показују да DE-EDCP, као и цисплатина, индукује значајно повећање процента апоптотских ћелија и то у касној фази апоптозе у односу на нетретиране ћелије (Графикон 7). С друге стране, највећи проценат ћелија у раној апоптози детектован је након њиховог излагања цисплатини. Региструје се да је у нижој концентрацији (31.25µM) цисплатина ефикаснија у индукцији касне апоптозе у поређењу са DE-EDCP. Међутим, највећи проценат ћелија у касној апоптози забележен је управо након њиховог излагања DE-EDCP у вишој концентрацији од 62.5µM. Другим речима, DE-EDCP је у концентрацији од 62.5µM индуковао пораст процента

касно апоптотских 4T1 ћелија који је био приближно двоструко већи у односу на ћелије изложене цисплатини у истој концентрацији (Графикон 7).

Проапоптотски капацитет DE-EDCP је потврђен и TUNEL методом којом је детектована фрагментација ДНК изазвана апоптозом у самој туморској потки карцинома дојке. При томе је коришћен семиквантитативни скор систем базиран на проценту малигних ћелија са јасно обојеним браон једром (означене као TUNEL<sup>+</sup> ћелије). У складу са претходним налазом, уочен је битан пораст процента апоптотских малигних ћелија у ткиву карцинома дојке мишева третираних са DE-EDCP, као и цисплатином, а који је био чак 4 пута већи у поређењу са нетретираном групом. Добијени резултати су приказани и илустровани на Графикону 8А и Б.



**Графикон 7. DE-EDCP изазива апоптогску смрт ћелија карцинома дојке миша (4Т1).** А) Проточном цитометријом је анализирана заступљеност 4Т1 ћелија у различитим фазама апоптозе. Након што су 4Т1 ћелије 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP), у концентрацији од 31.25µM и 62.25µM, детектован је поцентат ћелија у раној и касној фази апоптозе. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест;  $p < 0.05$  \*нетретиране vs. DE-EDCP или CDDP третиране 4Т1 ћелије; <sup>¶</sup>DE-EDCP vs. CDDP третиране ћелије; <sup>§</sup>CDDP vs. нетретиране или DE-EDCP третиране ћелије); Б) Репрезентативни дот плотови 4Т1 туморских ћелија после 24. часовног излагања DE-EDCP или цисплатини (CDDP) у концентрацији од 31.25µM и 62.5µM. Туморске ћелије су обележене *Annexin*-ом V (*Ann V*) и пропидијум јодидом (енгл. *Propidium iodide*, PI) (*Ann V*<sup>+</sup> PI туморске ћелије су у раној фази апоптозе, *Ann V*<sup>+</sup> PI<sup>+</sup> ћелије су у касној фази апоптозе, *Ann V*<sup>-</sup> PI<sup>+</sup> су некротске ћелије).



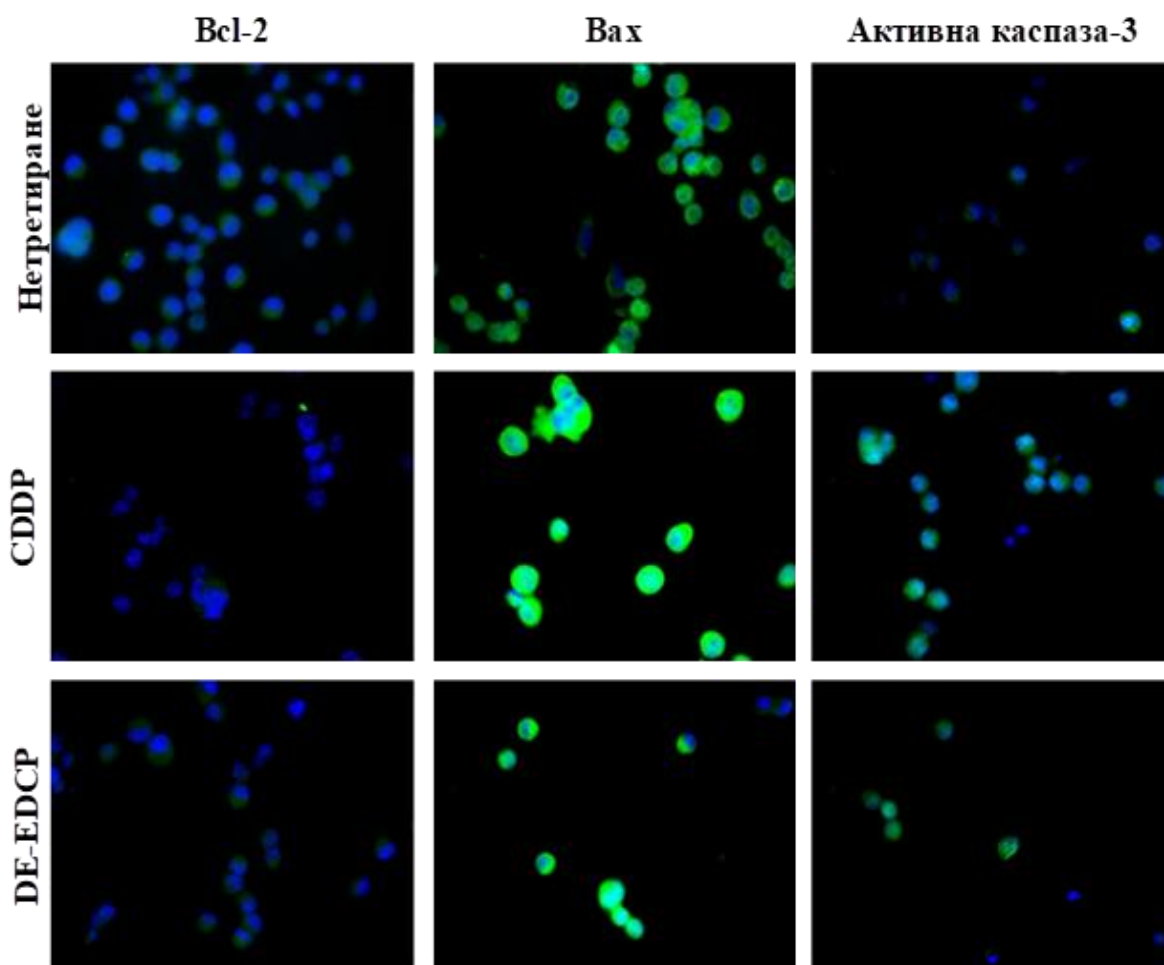
**Графикон 8. DE-EDCP фаворизује апоптозу туморских ћелија.** А) Након жртвовања мишева 36. дана од убризгавања 4Т1 малигнућ ћелија детектована је фрагментација ДНК туморских ћелија изазвана апоптозом у карциному дојке помоћу TUNEL методе. Одређен је проценат TUNEL-позитивних ћелија у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест; \*  $p < 0.05$ ); Б) Репрезентативни исечци ткива тумора у којима се уочавају TUNEL-позитивне ћелије при чему су узете у обзир само ћелије чија су једра јасно браон обојена (оригинално увећање 400X).

4.3.2. У туморским ћелијама DE-EDCP смањује експресију Bcl-2 и истовремено повећава експресију Вах и каспазе-3

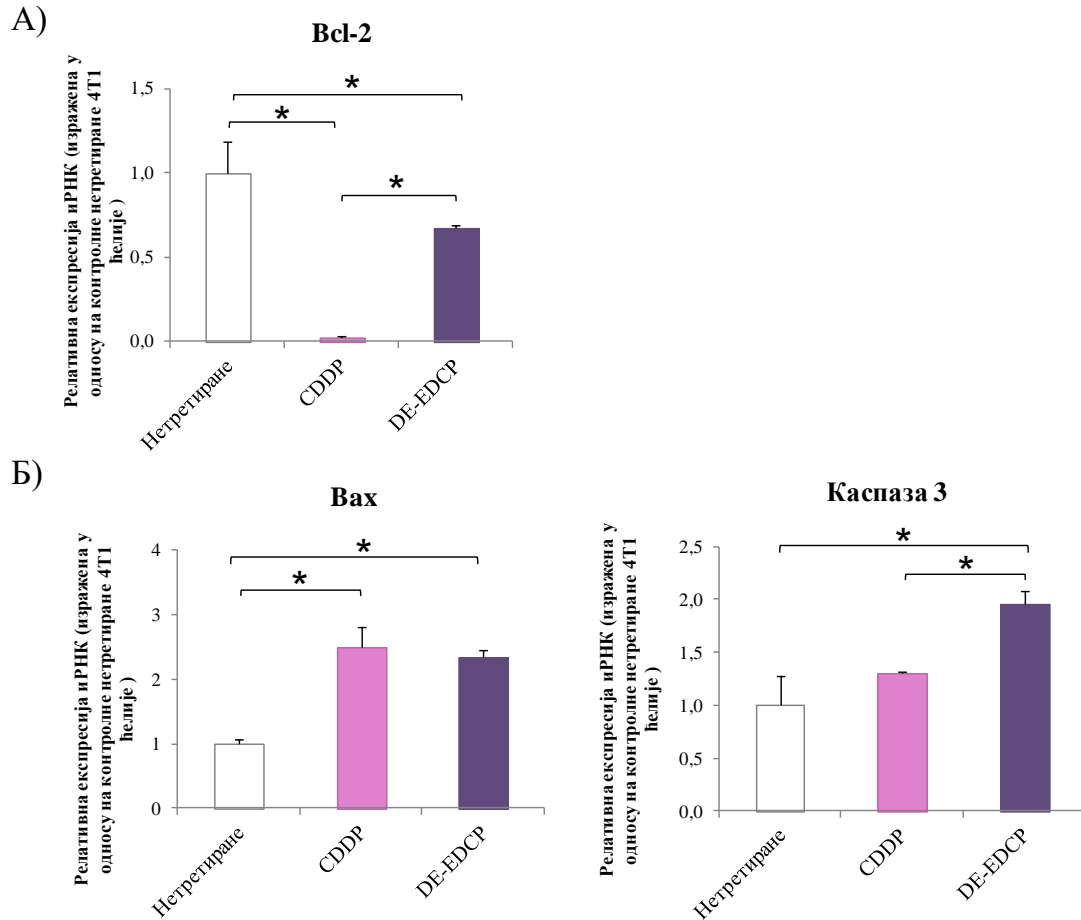
У циљу ближег дефинисања механизма апоптозе третираних туморских ћелија, анализиран је утицај DE-EDCP на експресију кључних молекула који регулишу процес апоптозе, као што су Bcl-2, Вах и активна форма каспазе-3.

Најпре је методом имунофлуоресценције регистрована умерено смањена експресија антиапоптотског протеина Bcl-2 у туморским ћелијама 4T1 које су 24 часа изложене дејству DE-EDCP у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 8), док је најнижа експресија овог протеина забележена у ћелијама третираним са цисплатином. Супротно, када је посматрана експресија проапоптотског Вах молекула и активне форме ефекторске каспазе-3, јасно се види да је експресија ових молекула у туморским ћелијама битно виша након излагања DE-EDCP или цисплатини у односу на нетретиране 4T1 ћелије.

Квантитативна анализа експресије информационе РНК (иРНК) за Bcl-2, Вах и каспазу-3 помоћу RT-PCR методе је у складу са претходним налазом експресије ових молекула на нивоу протеина. На Графикону 9 се јасно види да је третман са DE-EDCP, као и са цисплатином, узроковао значајно повећање експресије иРНК за Вах у 4T1 ћелијама у односу на нетретиране ћелије. Додатно значајни пораст експресије иРНК за каспазу-3 је забележен након примене DE-EDCP, али не и цисплатине, у поређењу са нетретираним малигним ћелијама. Примећује се и да је експресија иРНК за каспазу-3 била виша у ћелијама након третмана са DE-EDCP него после третмана са цисплатином. С друге стране, експресија иРНК за Bcl-2 је битно смањена под утицајем DE-EDCP, а нарочито под утицајем цисплатине (Графикон 9А).



**Слика 8.** Анализа експресије про- и анти-апоптотских протеина у туморским ћелијама 4Т1 методом имунофлуоресценције. У туморским ћелијама након 24. часовног третмана са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 $\mu$ M, анализирана је експресија Bcl-2, Bax и активне форме каспазе-3 коришћењем специфичних антитела обележених флуоресцентном бојом (зелено) док су једра обележена помоћу DAPI (плаво) (оригинално увећање 200X).



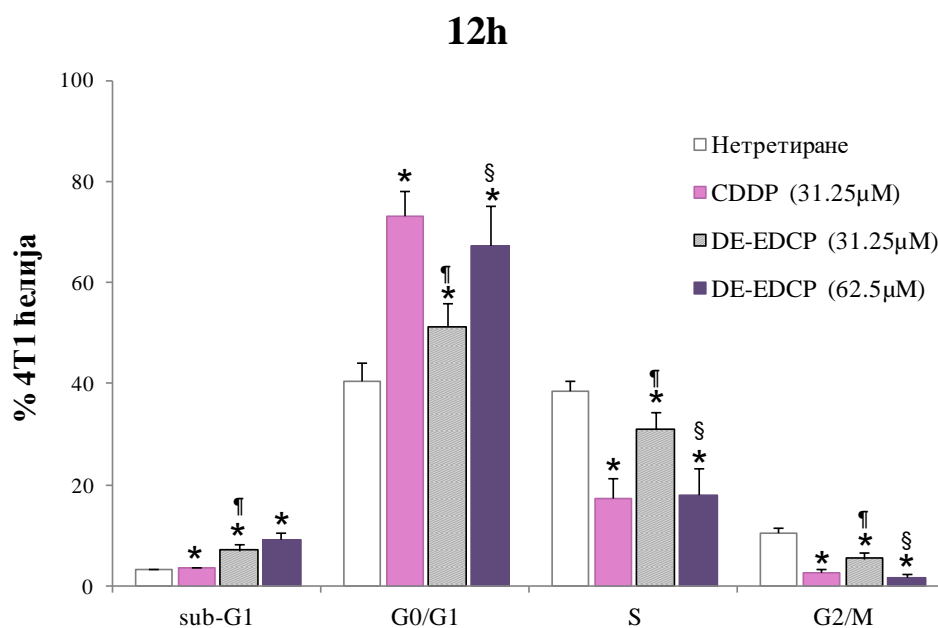
**Графикон 9. DE-EDCP мења експресију информационе РНК за синтезу про- и анти-апоптотских молекула у туморским ћелијама 4Т1. А) Експресија иРНК за Bcl-2 је значајно смањена у 4Т1 ћелијама након излагања DE-EDCP; Б) Третман са DE-EDCP значајно повећава експресију иРНК за Bax и каспазу-3 у туморским ћелијама. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација и изражени у односу на контролу (нетретиране 4Т1 ћелије) која је арбитрално сведена на јединичну вредност. (*Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ).**

#### 4.4. DE-EDCP инхибира пролиферацију туморских ћелија

Непланска пролиферација је једна од главних одлика малигнућ ћелија, тако да је заустављање ћелијског циклуса још једна важна стратегија у борби против тумора. Након што је утврђен проапоптотски потенцијал DE-EDCP, у наредним експериментима испитан је и његов утицај на прогресију ћелијског циклуса у туморским ћелијама.

#### 4.4.1. У туморским ћелијама DE-EDCP индукује застој у G0/G1 фази ћелијског циклуса

Проточном цитометријом детерминисан је профил ћелијског циклуса односно анализирана је процентуална заступљеност малигних ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса након њиховог 12. часовног излагања DE-EDCP у концентрацији од 31.25 $\mu$ M и 62.5 $\mu$ M, или цисплатини у концентрацији од 31.25 $\mu$ M. Слично цисплатини, третман са DE-EDCP нарочито у вишој концентрацији индукује значајну акумулацију 4T1 ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у односу на нетретиране ћелије (Графикон 10). Уз то, забележено је значајно смањење процента ћелија у S и у G2/M фази након оба фармаколошка третмана. С друге стране, уочава се и да је третман са DE-EDCP у обе концентрације индуковао битан пораст процента ћелија у суб-G1 фази, а која представља фракцију апоптотских ћелија.

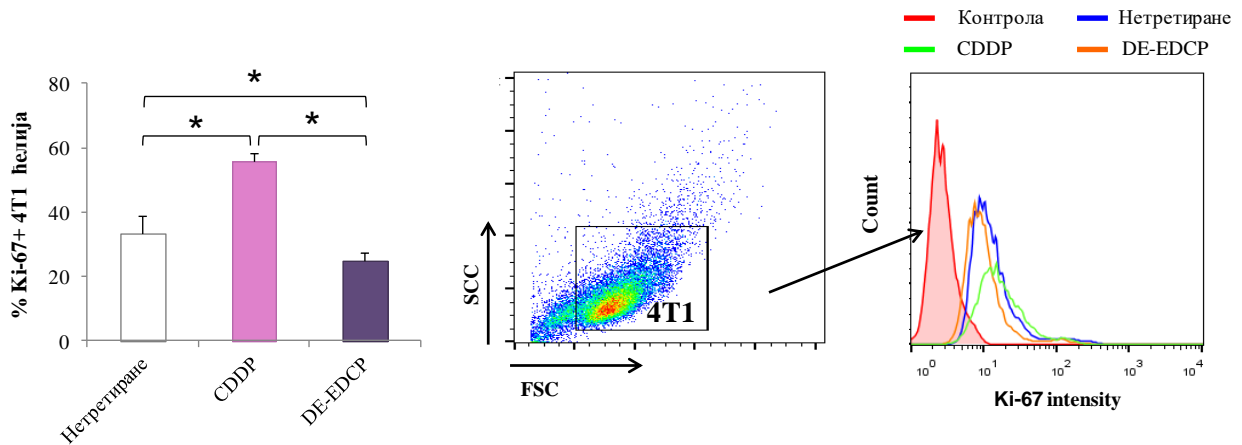


**Графикон 10. DE-EDCP зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази.** Туморске ћелије 4T1 су 12 часова третиране са DE-EDCP у концентрацији од 31.25 $\mu$ M и 62.25 $\mu$ M или са цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 $\mu$ M, а затим су обојене *Ruby* бојом. Проточном цитометријом је анализирана заступљеност туморских ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест;  $p < 0.05$ : \*нетретиране ћелије vs. ћелије третиране са DE-EDCP или CDDP; §ћелије третиране са DE-EDCP vs. CDDP; §§ ћелије третиране са DE-EDCP у нижој vs. вишој концентрацији)

Подаци добијени проточном цитометријом указују на значајно мањи проценат 4T1 ћелија које исказују маркер пролиферације Ki-67 после 24. часовног третмана са DE-EDCP (24.97% $\pm$ 2.42) у односу на нетретиране ћелије (33.43% $\pm$ 5.28), а нарочито



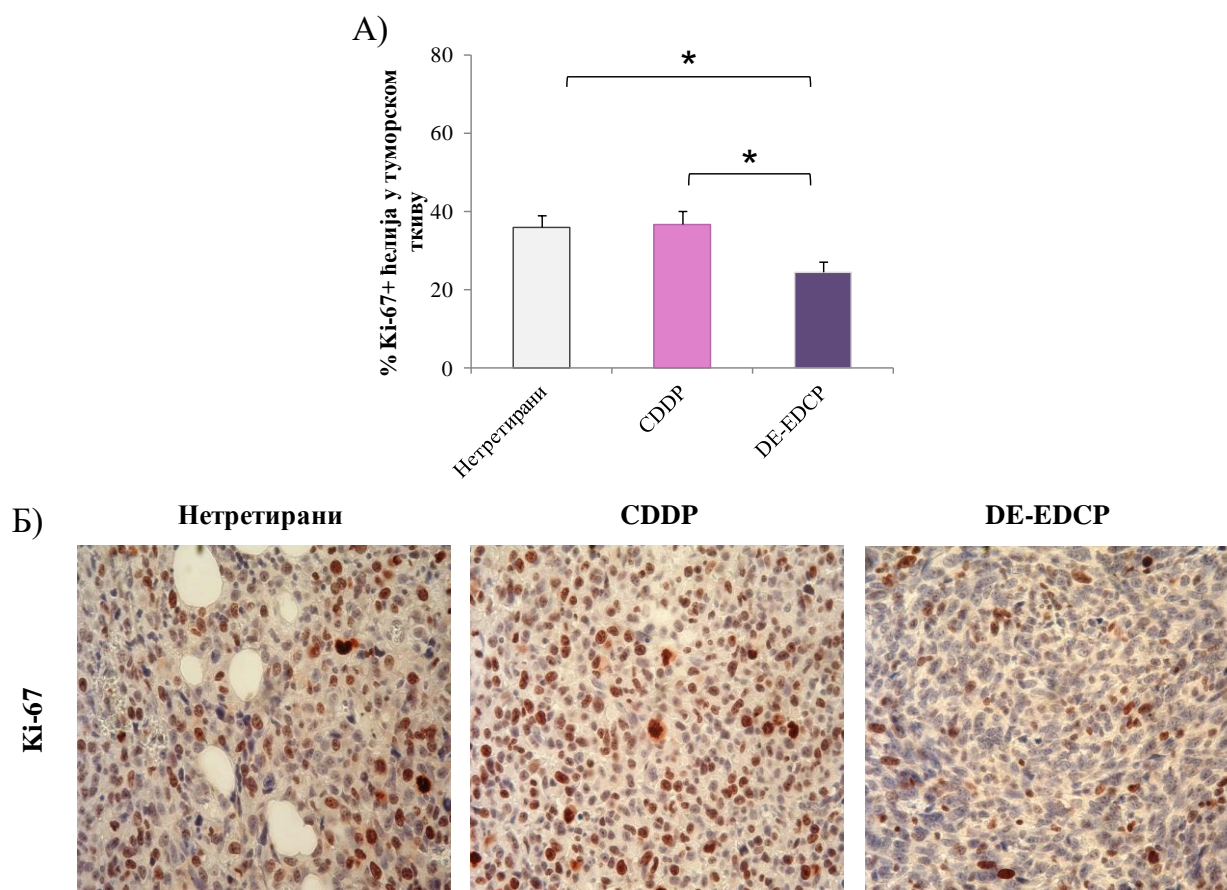
ћелије које су биле изложене цисплатини ( $55.77\% \pm 2.70$ ) (Графикон 11). Уз то, регистрован је драстичан пораст експресије овог маркера неочекивано на ћелијама које су третиране са цисплатином.



**Графикон 11. DE-EDCP смањује проценат малигнућелија које експримирају Ki-67.** Туморске ћелије 4T1 ћелије су 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од  $31.25\mu\text{M}$ , а затим је проточном цитометријом одређиван проценат 4T1 ћелија које експримирају Ki-67. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ). Репрезентативни хистограм показује експресију Ki-67 на малигнућелијама.

У даљем истраживању анализирана је експресија Ki-67 и у ткиву карцинома дојке мишева. Уочава се да је у ткиву карцинома дојке мишева третираних са DE-EDCP проценат малигнућелија које исказују Ki-67 значајно смањен у односу на групу нетретираних, као и цисплатином третираних мишева (Графикон 12). Није забележена статистички значајна разлика у процентуалној заступљености малигнућелија које експримирају Ki-67 у туморском ткиву нетретираних и цисплатином третираних мишева.

Овакав налаз упућује на то да у малигнућелијама DE-EDCP инхибира прогресију ћелијског циклуса и то заустављањем у G0/G1 фази што последично може да додатно фацилитира апоптозу ових ћелија.

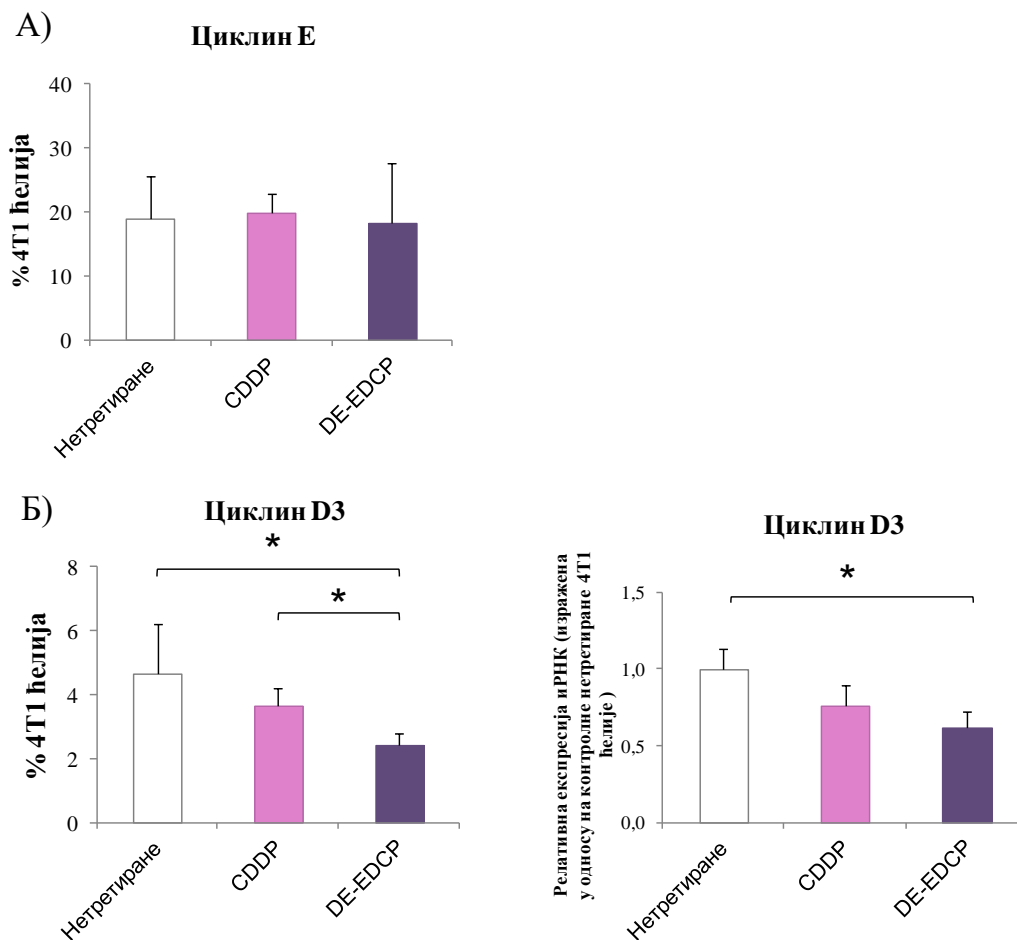


**Графикон 12. DE-EDCP смањује експресију Ki-67 у ткиву карцинома дојке.** А) Тридесетистог дана експеримента, BALB/C мишеви који су фармаколошки различито третирани су жртвовани а затим је имунохистохемијском методом анализирана експресија Ki-67 у ткиву карциному дојке. Одређен је проценат малигнућ ћелија које исказују Ki-67 у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ). Б) Репрезентативни исечци ткива тумора у којима се уочавају туморске ћелије које експримирају Ki-67 при чему су узете у обзир само оне ћелије чија су једра црвено обојена (оригинално увећачање 400X).

#### 4.4.2. DE-EDCP смањује експресију циклина D3, а повећава експресију p16, p21 и p27

Са циљем детаљнијег расветљавања улоге у прогресији ћелијског циклуса испитиван је утицај DE-EDCP на експресију циклина- E и -D, као и инхибитора циклин зависних киназа (p16, p21 и p27) који су сви заједно укључени у регулацију овог процеса.

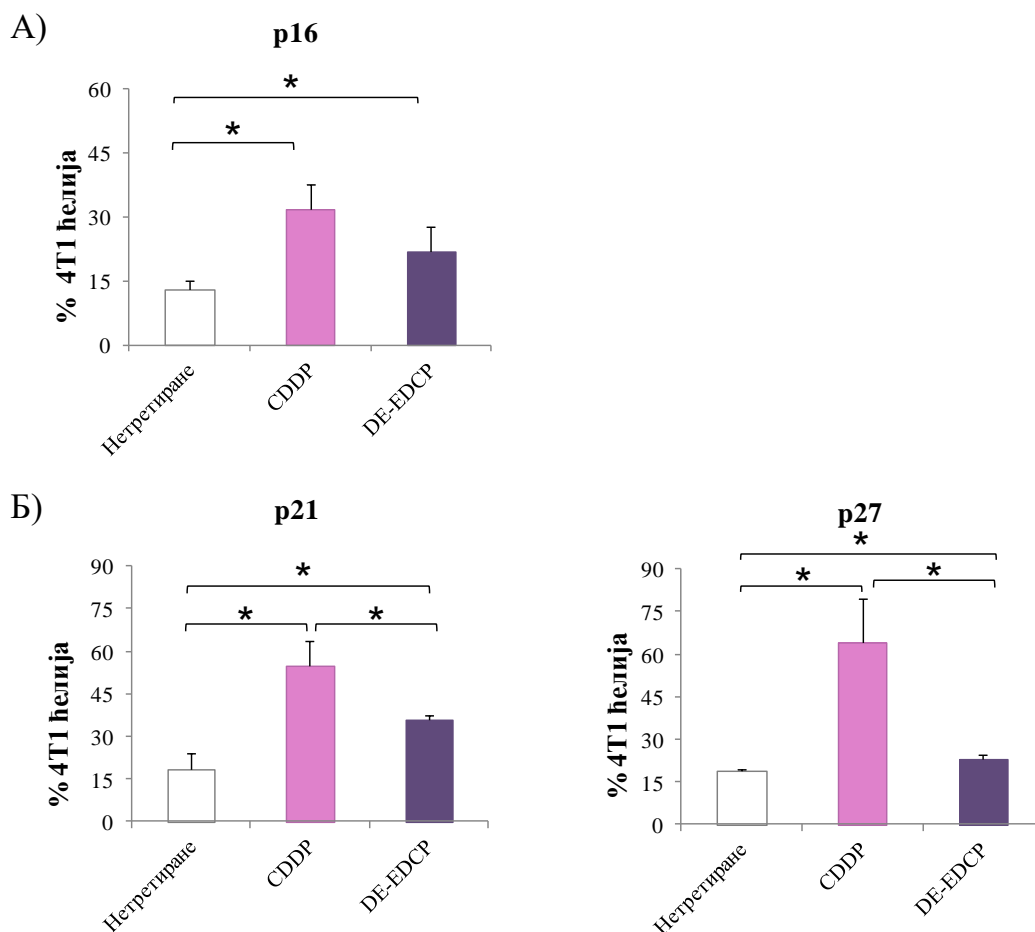
Након 24. часовног третмана ћелија са DE-EDCP или са цисплатином у концентрацији од  $31.25\mu\text{M}$  није забележена промена у експресији циклина E у туморским ћелијама (Графикон 13).



**Графикон 13. DE-EDCP смањује експресију циклина D3 на нивоу протеина и информационе РНК.** Након што су 4T1 ћелије 24 часа третирани са DE-EDCP или са цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 $\mu$ M, проточном цитометријом је анализиран проценат 4T1 ћелија са експресијом молекула који подстичу прогресију ћелијског циклуса. А) DE-EDCP не утиче на експресију циклина E на 4T1 ћелијама. Б) Третман са DE-EDCP смањује проценат 4T1 ћелија које експримирају протеин циклин D3 (леви панел). RT-PCR методом је анализарана експресија циклина D3 на нивоу информационе РНК. Третман ћелија са DE-EDCP битно смањује експресију иРНК за синтезу циклина D3 (десни панел). Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација, на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ ).

Ако се пореди експресија циклина D3, јасно се види да је DE-EDCP значајно смањио проценат 4T1 ћелија које експримирају овај циклин (2.4% $\pm$ 0.37) у поређењу са ћелијама третираним са цисплатином (3.64% $\pm$ 0.56), а нарочито у односу на популацију нетретираних ћелија (4.64% $\pm$ 1.59) (Графикон 13Б). Додатно, за разлику од цисплатине која није утицала на експресију овог молекула на нивоу иРНК, јасно се уочава значајно смањење експресије иРНК за синтезу циклина D3 после третмана са DE-EDCP у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 13Б).

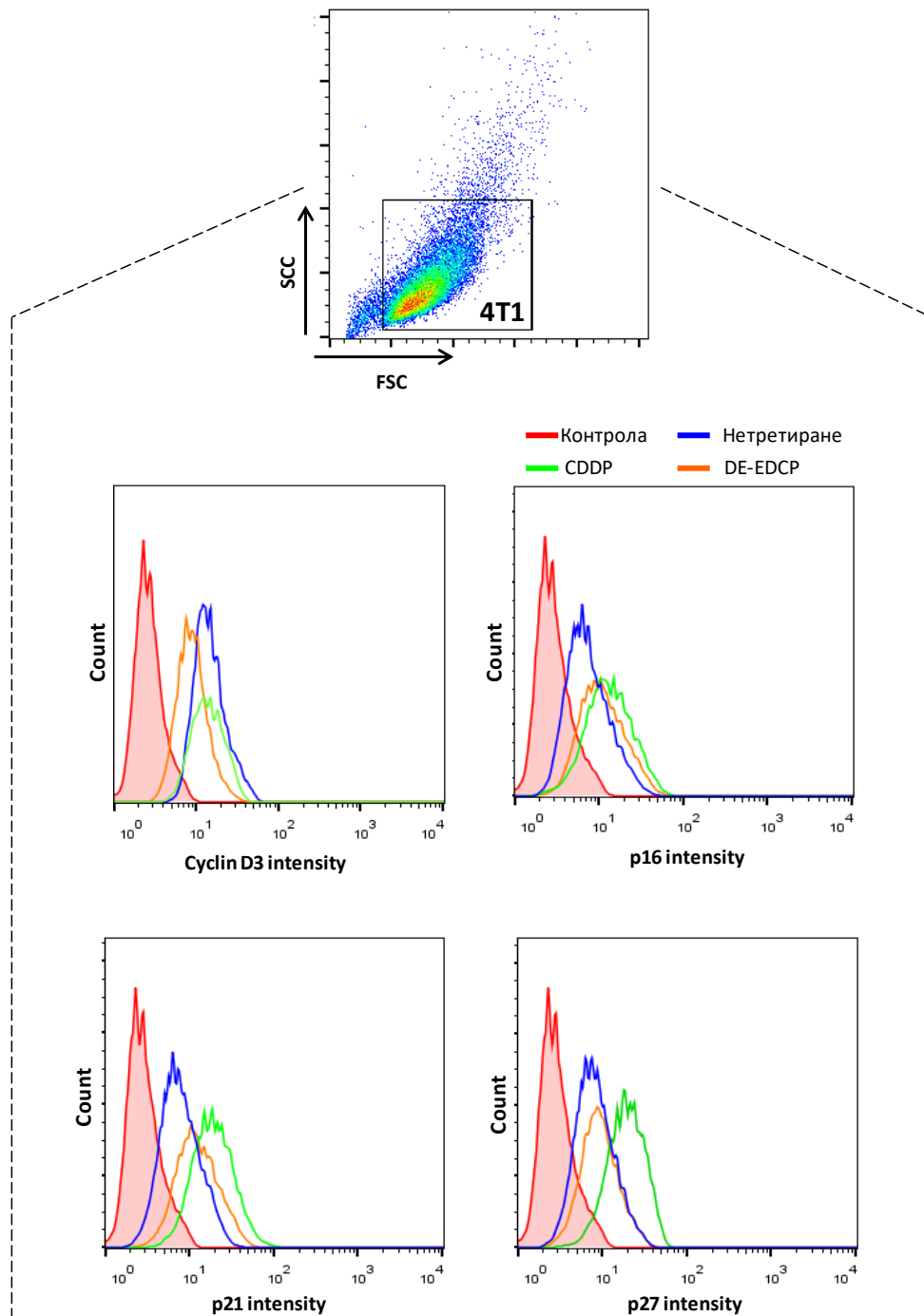
На Графикону 14А уочава се да је проценат ћелија које експримирају p16 био значајно повећан након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним 4Т1 ћелијама. Уз то, примећује се и да третман са DE-EDCP, али и са цисплатином, битно повећава експресију p21 и p27 у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 14Б). Ако се пореди ефекат DE-EDCP и цисплатине на експресију ова два инхибитора ћелијског циклуса, уочава се да цисплатина индукује значајно већи пораст процента ћелија које експримирају p21 и p27 него DE-EDCP.



**Графикон 14. DE-EDCP повећава проценат 4Т1 ћелија које експримирају инхибиторе циклин зависних киназа.** Након што су 4Т1 ћелије 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 $\mu$ М, проточном цитометријом је анализирана заступљеност 4Т1 ћелија које експримирају p16, p21 и p27; А) DE-EDCP повећава проценат 4Т1 малигнућих ћелија које експримирају p16 (А) p21 и p27 (Б); Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; \* $p < 0.05$ ).

Приказани резултати указују да DE-EDCP остварује и антипролиферативну активност на туморске ћелије тако што у њима инхибира прогресију ћелијског циклуса

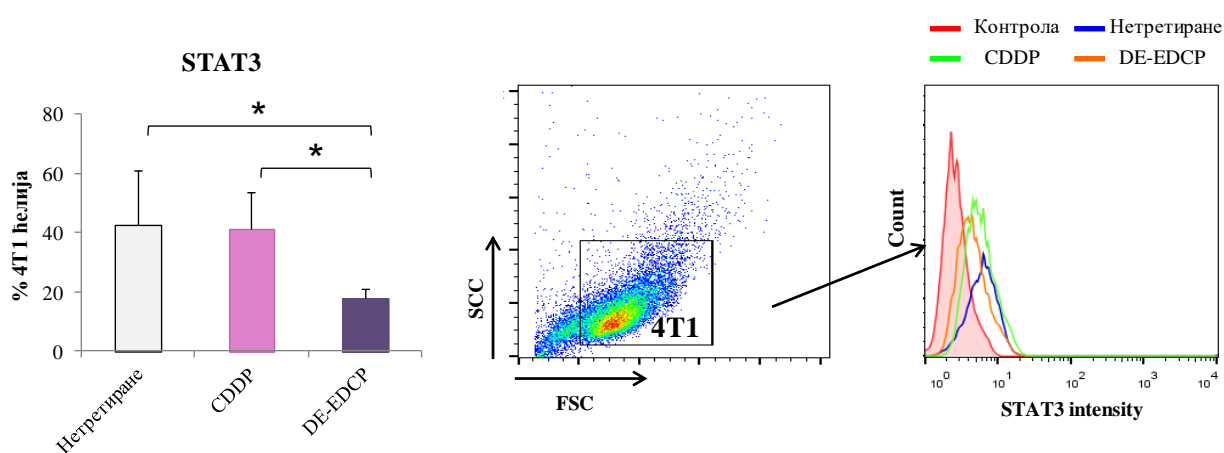
у G0/G1 фази што је вероватно последица смањења експресије циклина D3 и повећања експресије инхибитора циклин зависних киназа, p16, p21 и p27.



Слика 9. Репрезентативни хистограми експресије циклина D3 и инхибитора циклин зависних киназа (p16, p21 и p27) у 4T1 малигним ћелијама.

#### 4.5. DE-EDCP редукује експресију STAT3, NANOG и SOX2 у малигним ћелијама

Узимајући у обзир да STAT3 игра важну улогу у различитим процесима прогресије тумора, у студији је анализиран и утицај DE-EDCP на експресију овог транскрипционог фактора у малигним ћелијама. Подаци добијени проточном цитометријом указују на драстично смањен проценат 4T1 ћелија које експримирају STAT3 након 24. часовног излагања DE-EDCP у поређењу са популацијом нетретираних ћелија, као и ћелија третираних са цисплатином што се види на Графикону 15.



**Графикон 15. DE-EDCP смањује проценат малигнућелија које експримирају STAT3.** Туморске 4T1 ћелије су 24 часа изложене DE-EDCP или цисплатини (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25  $\mu$ M и проточном цитометријом је одређиван проценат туморских ћелија које експримирају STAT3. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ). Репрезентативни хистограма показује експресију STAT3 на селектованим малигним ћелијама.

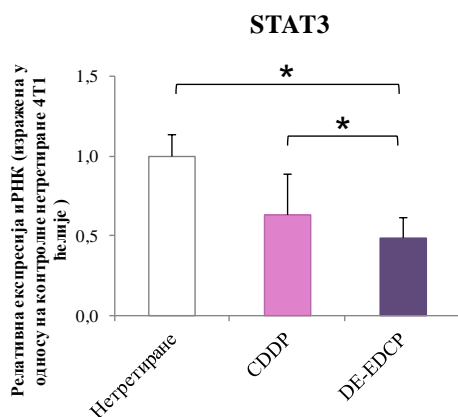
У складу са претходним налазом, детектовано је битно смањење експресије иРНК за синтезу STAT3 у туморским ћелијама након третмана са DE-EDCP у односу на нетретиране ћелије, као и ћелије третиране са цисплатином (Графикон 16А).

На основу ових налаза очигледно је да DE-EDCP има способност да у туморским ћелијама редукује експресију транскрипцијског фактора STAT3, како на нивоу протеина тако и на нивоу информационе РНК, што је подстакло да се детаљније анализира нисходна регулација сигналног пута STAT3.

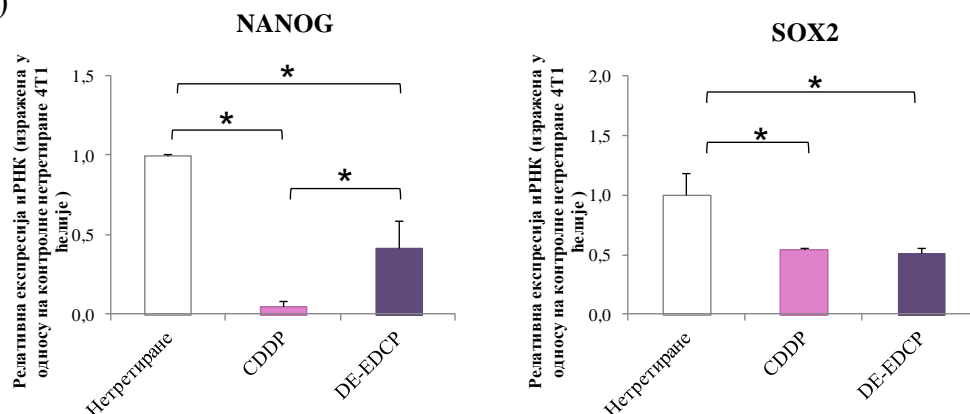
На Графикону 16Б приказана је експресија иРНК за синтезу NANOG и SOX2 који су један од нисходних мета STAT3. Уочава се да DE-EDCP, а нарочито

цисплатина, значајно смањује експресију иРНК за NANOG у малигним ћелијама. Експресија иРНК за SOX2 је такође била битно снижена у ћелијама након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним ћелијама, и примећује се да је њихов ефекат био приближно исти (Графикон 16Б).

А)



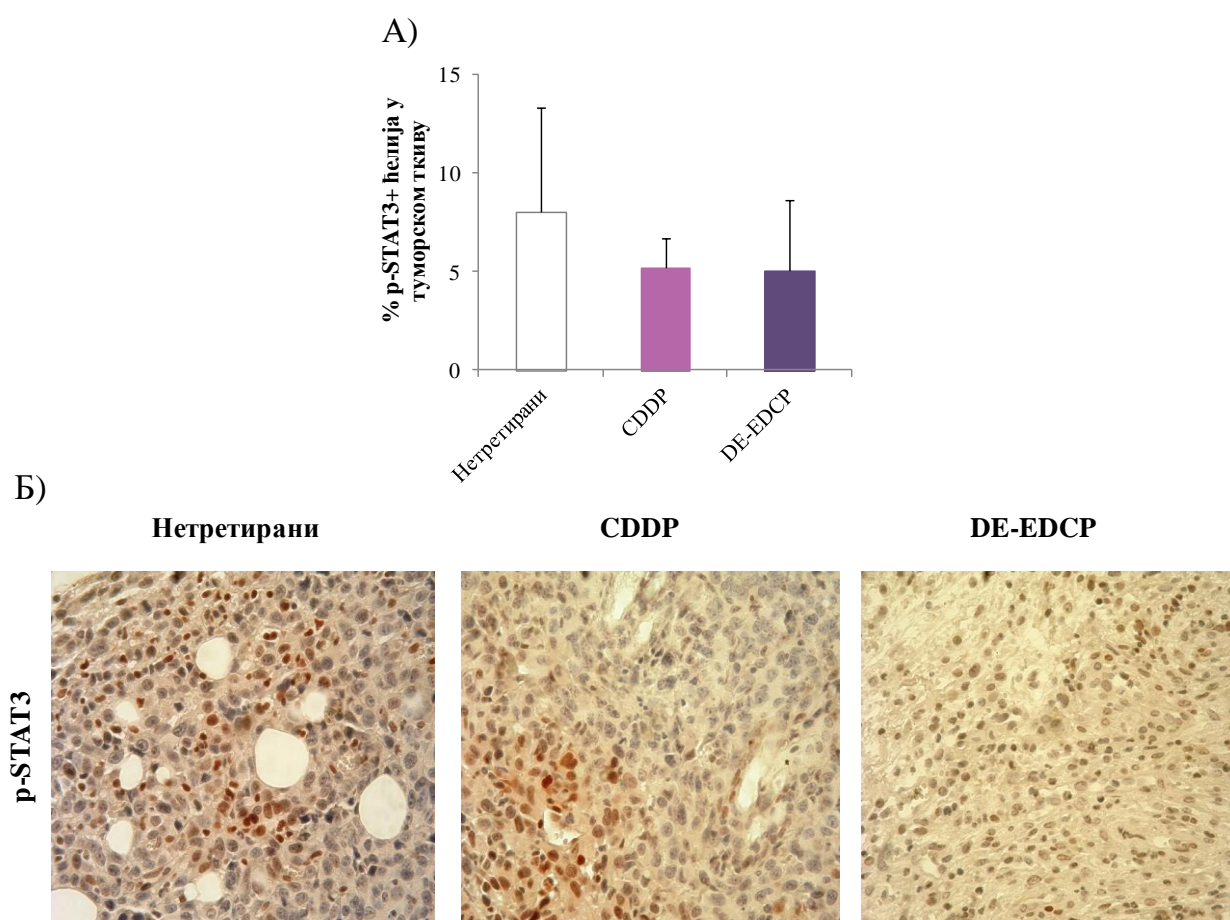
Б)



**Графикон 16. DE-EDCP смањује експресију иРНК за синтезу STAT3, NANOG и SOX2 у малигним ћелијама.** Туморске ћелије 4Т1 су 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 $\mu$ М. RT-PCR методом анализирана је експресија иРНК за синтезу STAT3, NANOG и SOX2 у ћелијама свих испитиваних група. А) Експресија иРНК за синтезу STAT3 у малигним 4Т1 ћелијама је снижена након третмана са DE-EDCP; Б) DE-EDCP смањује експресију иРНК за синтезу NANOG и SOX2 у малигним ћелијама. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација и изражени су у односу на контролу (нетретиране 4Т1 ћелије) која је арбитрално сведена на јединичну вредност (*Mann–Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ).

На крају је у ткиву карцинома дојке анализирана експресија фосфорилисане форме STAT3 (енгл. *Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, pSTAT3). Примећује се да је процентуална заступљеност малигнућелија које исказују pSTAT3 у туморском ткиву мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином

смањена у односу на нетретирану групу, али ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 17).



**Графикон 17. DE-EDCP значајно не мења процентуалну заступљеност малигнућ ћелија које исказују фосфорилисану форму STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева.** А) Након жртвовања фармаколошки различито третираних BALB/C мишева, 36. дана експеримента имунохистохемијском методом је процењена експресија фосфорилисане форме STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева. Одређен је проценат малигнућ ћелија које исказују pSTAT3 у туморском ткиву у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Подаци су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ). Б) Репрезентативни пресеци ткива карцинома дојке у којима се запајају туморске ћелије са црвено обојеним једром (оригинално увећачање 400X).

На основу приказаних резултата може се констатовати да DE-EDCP редукује експресију STAT3 у малигнућ ћелијама што резултује смањеном експресијом NANOG и SOX2 и да тако на још један начин инхибира прогресију тумора.

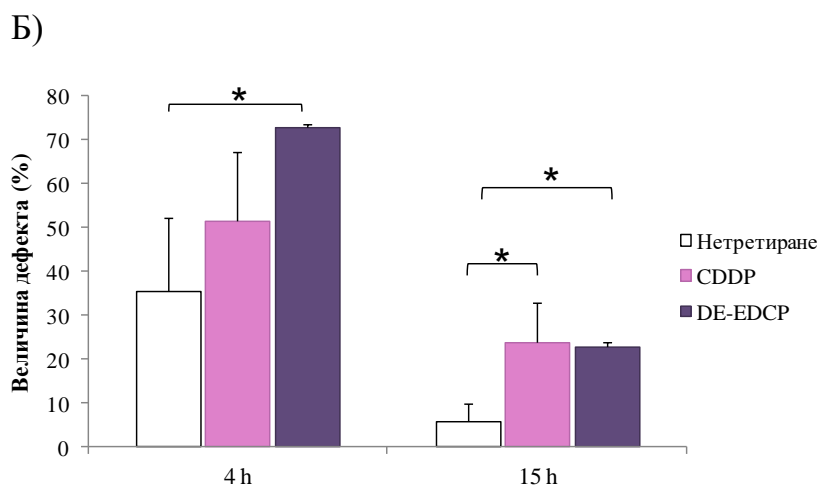
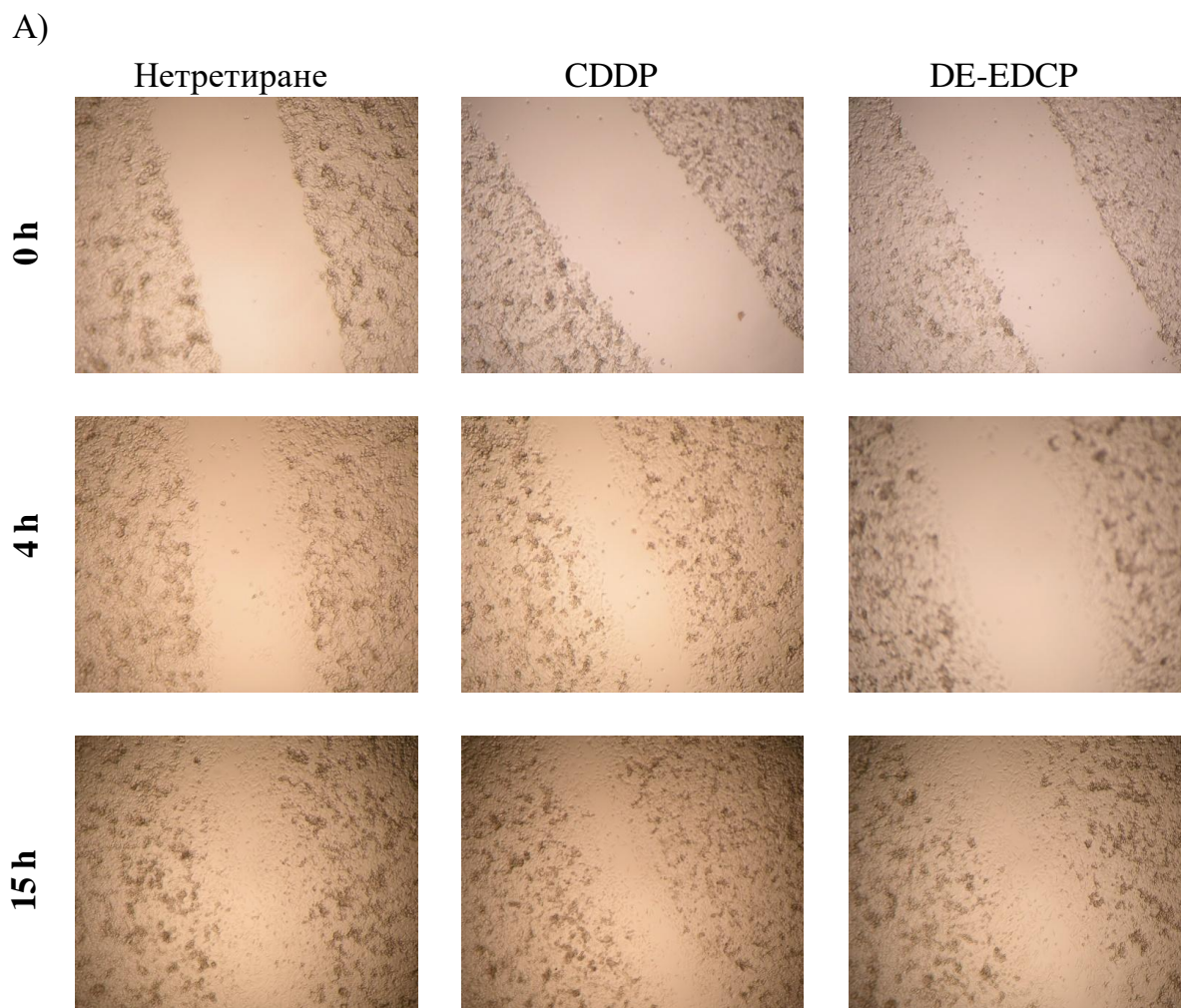


#### 4.6. DE-EDCP инхибира миграцију туморских ћелија

С обзиром на чињеницу да миграција туморских ћелија представља први корак у инвазивно-метастатској каскади (322), у даљем току истраживања је процењен ефекат DE-EDCP на миграциони потенцијал туморских ћелија 4T1 помоћу "*wound healing*" теста при чему је коришћена нетоксична концентрација (15.63 $\mu$ M) испитиване супстанце.

На Графокуму 18А јасно се види да су контролне нетретиране 4T1 ћелије несметано мигрирале. Ова њихова миграторна способност је видљива већ након 4 часа, док су ћелије након 15 часова готово у потпуности прекриле претходно фомирану "повреду" односно празан регион. Међутим, уочава се да је DE-EDCP битно редуковао миграцију туморских ћелија већ након 4 часа, у односу на нетретиране ћелије, и овај инхибициони ефекат на миграцију се одржао и после 15 часова инкубације. За разлику од испитиване супстанце, третман са цисплатином је статистички значајно инхибирао миграцију циљаних ћелија тек након 15 часова у поређењу са нетретираним ћелијама. Добијени резултати су приказани и илустровани на Графикуму 18А и Б.

На основу добијеног налаза може се констатовати да DE-EDCP у нетоксичној концентрацији ефикасно смањује миграцију туморских ћелија што вероватно представља алтернативни антиметастатски механизам.



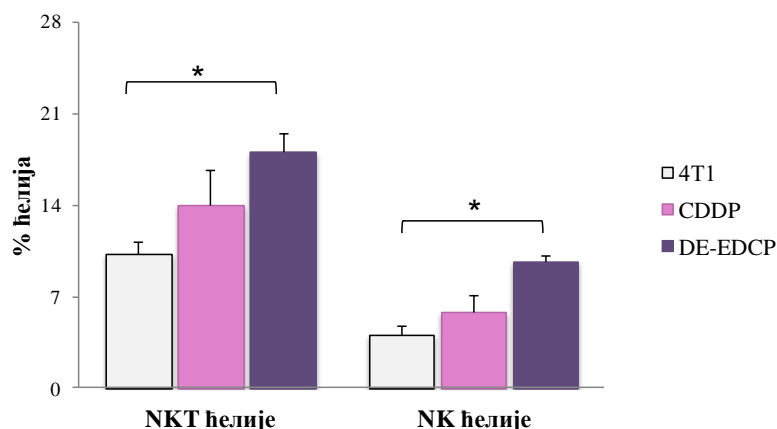
**Графикон 18. DE-EDCP инхибира миграцију туморских ћелија.** Малигне ћелије 4T1 засејане су у плоче са 6 бунара и када је формиран конфлуентни слој ћелија дно бунара је загребано стерилним наставком микропипете. Након тога ћелије су 4 и 15 часа инкубирани са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP) у концентрацији од  $15.63\mu\text{M}$ ; А) Миграција нетретираних и третираних ћелија DE-EDCP или цисплатином (CDDP) је посматрана под инвертним микроскопом; Б) Величина индуковане повреде или празног простора анализирана је и изражена у односу на 100% дефекта у тренутку формирања повреде. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; \*  $p < 0.05$ ).

#### 4.7. DE-EDCP индукује акумулацију NKT и NK ћелија у туморску микросредину и мења њихов функционални фенотип

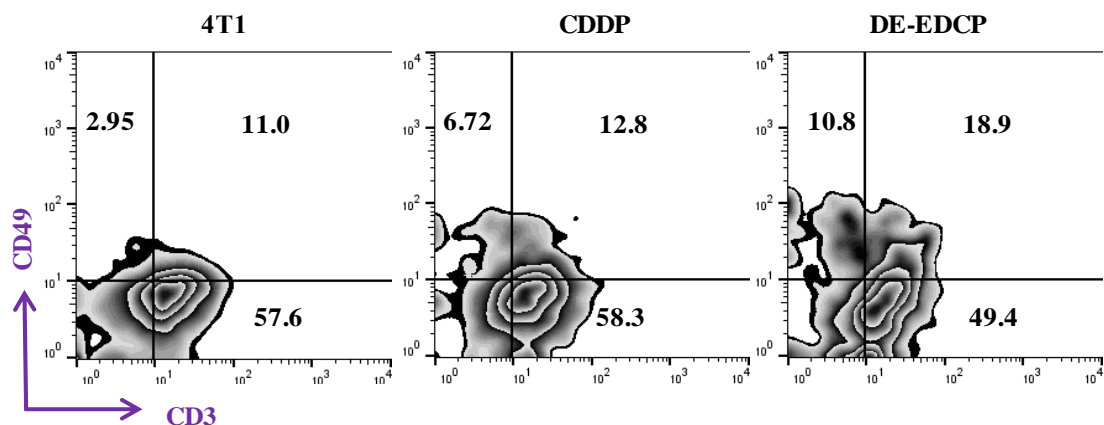
Већ дуже време постоје покушаји да се имунски систем, "финим подешавањем", искористи као "моћно оружје" у борби против тумора. Узимајући у обзир да ћелије урођене имуности, а нарочито NK ћелије, заузимају централно место у контроли раста и метастазирања карцинома дојке (323, 324), у даљем току истраживања анализиран је утицај DE-EDCP на функционални статус NKT и NK ћелија у туморској микросредини.

У оквиру популације мононуклеарних ћелија, изолованих из ткива карцинома дојке мишева 18. дана од инокулације 4T1 ћелија, проточном цитометријом је анализирана заступљеност, као и фенотип NKT и NK ћелија.

Значајно повећање процента  $CD3^+CD49^+$  NKT и  $CD3^-CD49^+$  NK ћелија забележено је у туморској микросредини мишева третираних DE-EDCP у односу на нетретиране мишеве, што се види на Графикону 19. Примећује се и да третман са цисплатином није битно изменио заступљеност тумор-инфилтришућих NKT и NK ћелија.



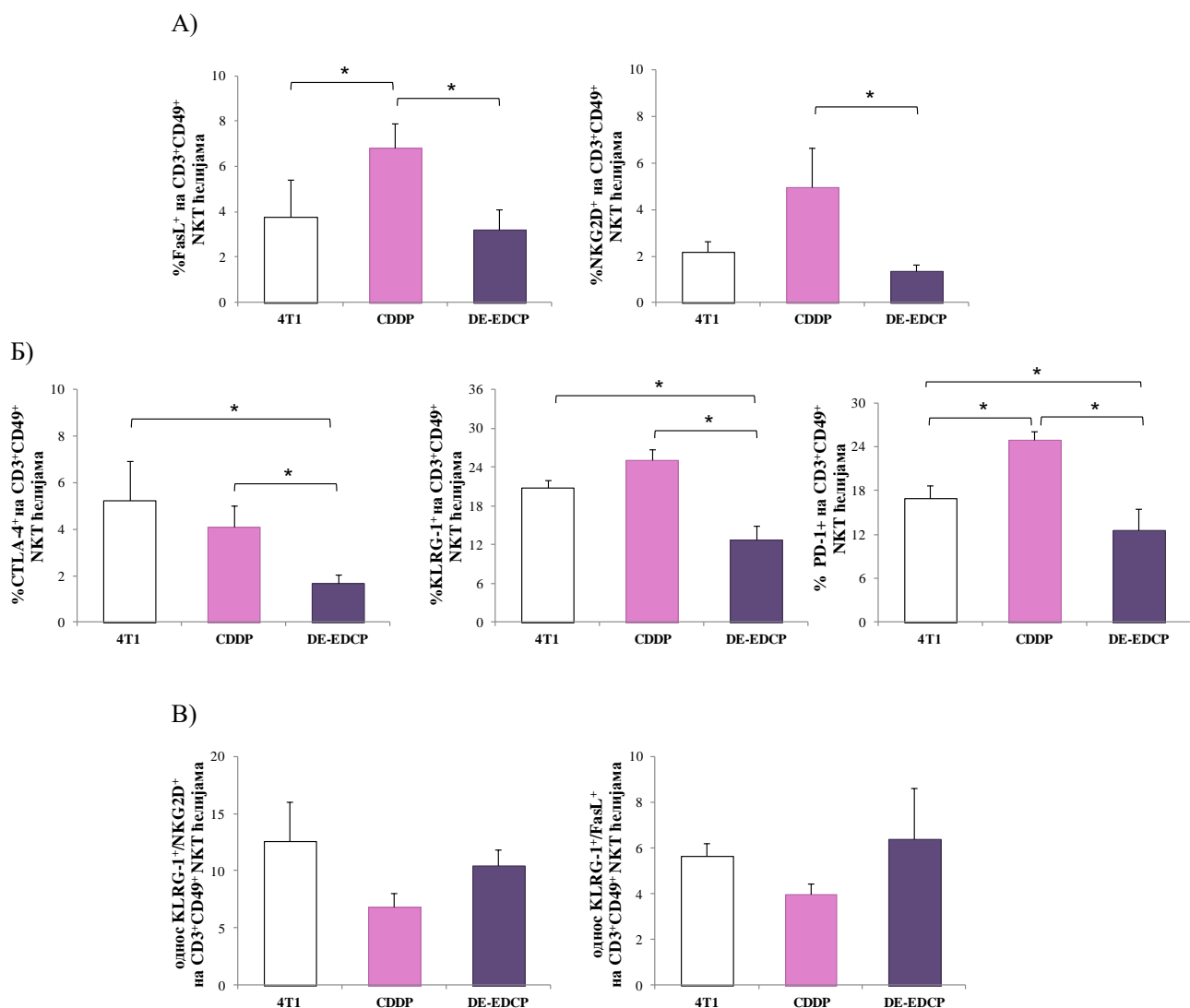
**Графикон 19. DE-EDCP подстиче инфлукс NKT и NK ћелија у туморску микросредину карцинома дојке.** Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат  $CD3^+CD49^+$ NKT и  $CD3^-CD49^+$ NK ћелија изолованих из туморског ткива нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева. Код мишева третираних са DE-EDCP забележено је повећање процента тумор-инфилтришућих NKT и NK ћелија у односу на нетретиране мишеве. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  стандардна грешка (Mann–Whitney U тест;  $*p<0.05$ ).



Слика 10. Репрезентативни дот плотови CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT ћелија и CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> NK ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

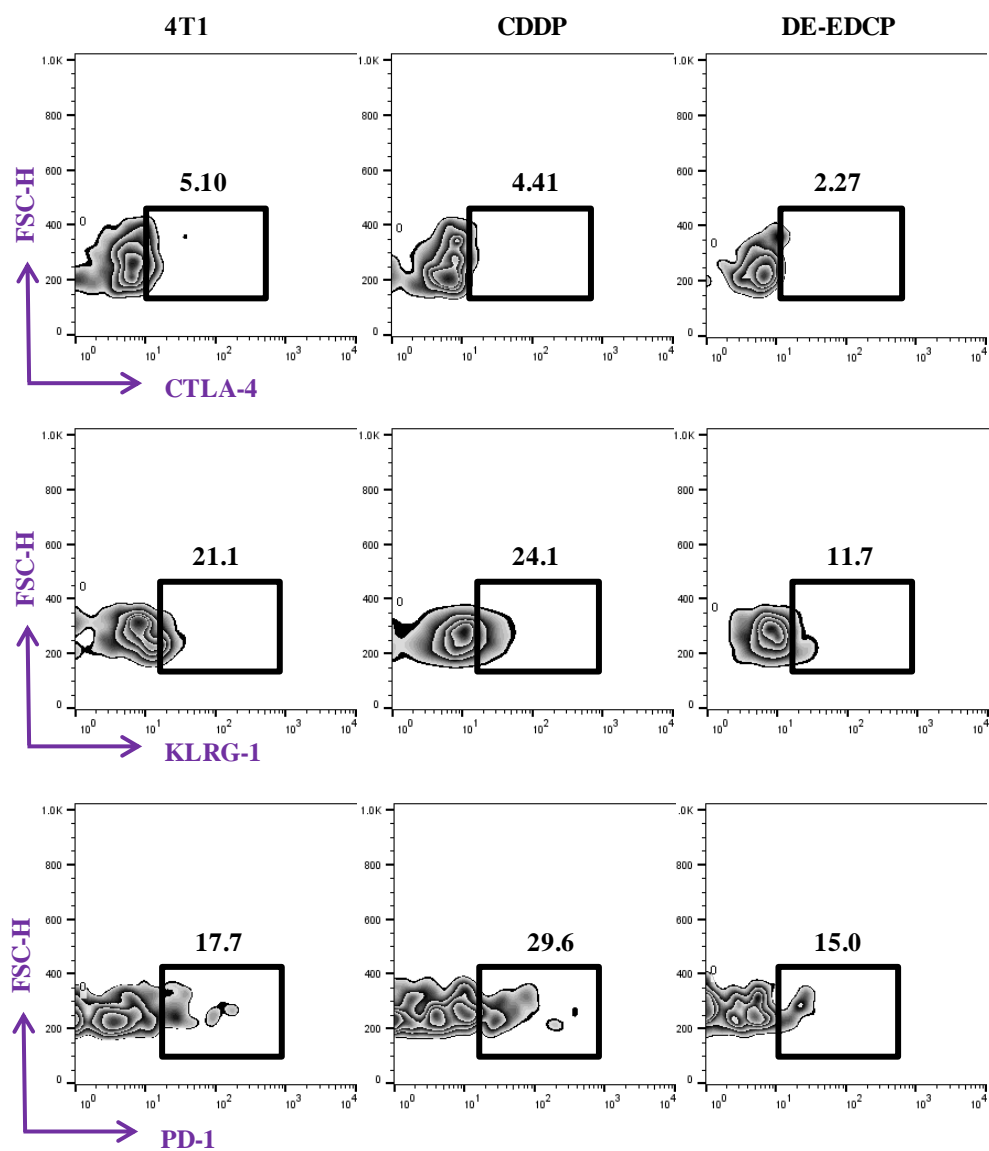
Анализом фенотипа NKT ћелија утврђено је незнатно или благо смањење експресије активационих рецептора FasL и NKG2D на NKT ћелијама у туморској микросредини мишева третираних са DE-EDCP у поређењу са нетретираним мишевима (Графикон 20А). Међутим, у групи мишева која је третирана са цисплатином запажа се пораст процента FasL<sup>+</sup> NKT и NKG2D<sup>+</sup> NKT ћелија који достиже статистички значајност у односу на мишеве третиране са DE-EDCP (Графикон 20А). С друге стране, када се пореди експресија инхибиционих рецептора CTLA-4, KLRG-1 и PD-1 уочава се да је проценат CTLA-4<sup>+</sup> NKT, KLRG-1<sup>+</sup> NKT и PD-1<sup>+</sup> NKT у тумору мишева подвргнутих третману са DE-EDCP значајно мањи него у групи нетретираних, као и са цисплатином третираних мишева. Овакав налаз сугерише на то да DE-EDCP спречава експресију инхибиционих рецептора на NKT ћелијама и на тај начин блокира "анергију" ових ћелија.

Даља анализа функционалног фенотипа NKT ћелија показује да не постоји статистички значајна разлика у односу инхибициони наспрам активационим рецепторима на овим ћелијама (Графикон 20В).



**Графикон 20.** Третман мишева са DE-EDCP смањује заступљеност анергичних NKT ћелија у туморској микросредини карцинома дојке. Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат тумор-инфилтришућих NKT ћелија које експримирају активационе (A) и инхибиционе (B) рецепторе. Код мишева третираних DE-EDCP забележен је значајно мањи проценат CTLA-4<sup>+</sup>, KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup>NKT ћелија у односу на нетретиране мишеве. B) Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на NKT ћелијама у карциномима дојке мишева. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка (*Mann-Whitney U* тест; \*  $p < 0.05$ ).

CD3+CD49+ NKT ћелије

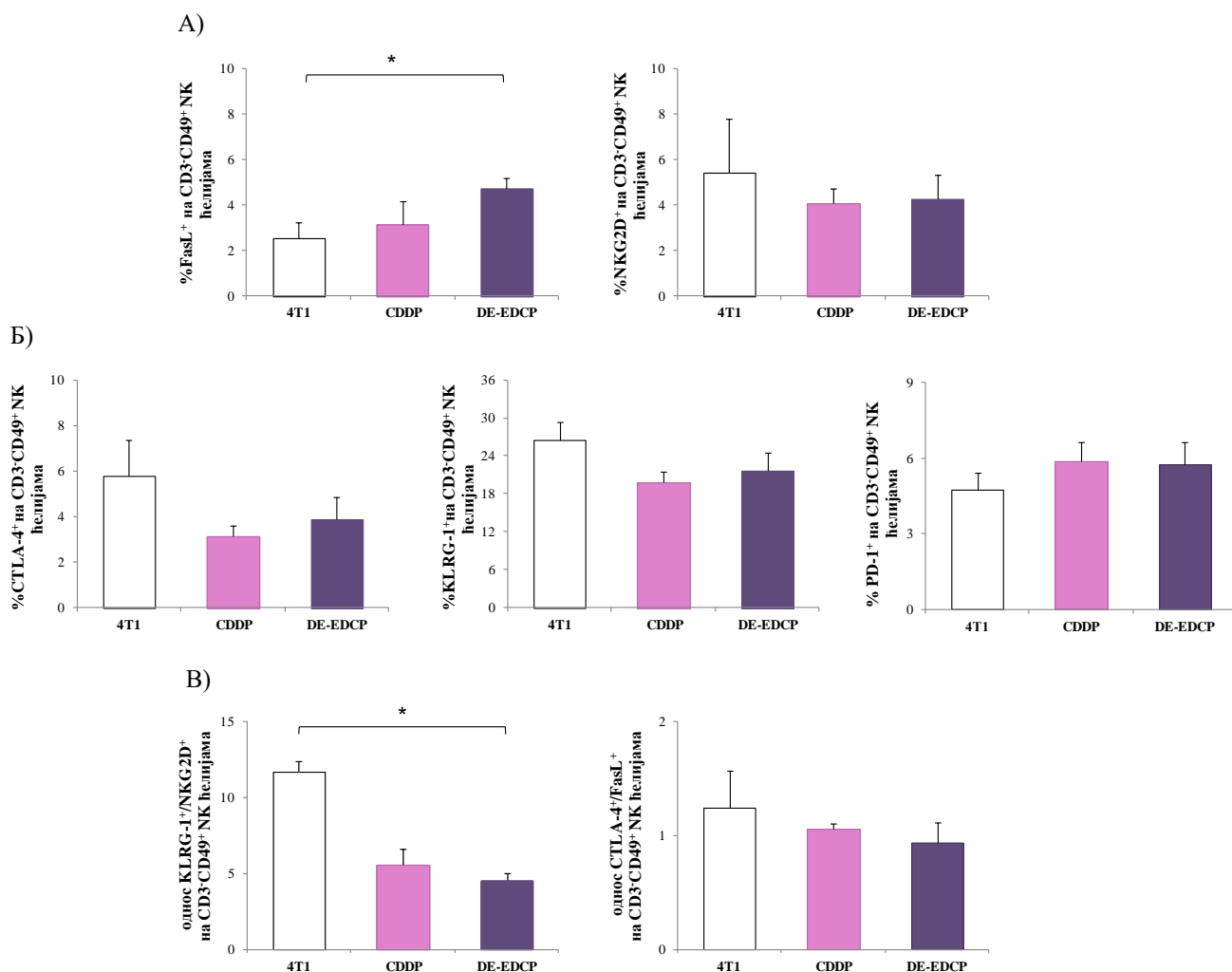


Слика 11. Репрезентативни дот плотови CTLA-4<sup>+</sup>, KLRG-1<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> NKT ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

На Графикону 21А уочава се да је на НК ћелијама експресија неких активационих рецептора измењена под утицајем DE-EDCP: проценат FasL<sup>+</sup> НК ћелија у тумору мишева третираних са DE-EDCP је битно повећан у односу на нетретиране мишеве, док је процентуална заступљеност NKG2D<sup>+</sup> НК ћелија неизмењена. Уз то, примећује се смањење експресије инхибиционих рецептора CTLA-4 и KLRG-1 на тумор- инфилтришућим НК ћелијама у мишева третираних DE-EDCP, али ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 21Б). Процент PD-1<sup>+</sup> НК ћелија у тумору мишева третираних DE-EDCP је незнатно повећан у односу на нетретиране мишеве.

Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на НК ћелијама указује да је однос KLRG-1<sup>+</sup>/NKG2D<sup>+</sup> на НК ћелијама у тумору мишева третираних DE-EDCP значајно мањи у односу на нетретиране мишеве (Графикон 21В). Није забележена разлика у односу друга два контрарегулаторна молекула, CTLA-4/FasL, на НК ћелијама између испитиваних група (Графикон 21). За разлику од ефекта на NKT ћелијама, цисплатина није утицала на фенотип НК ћелија.

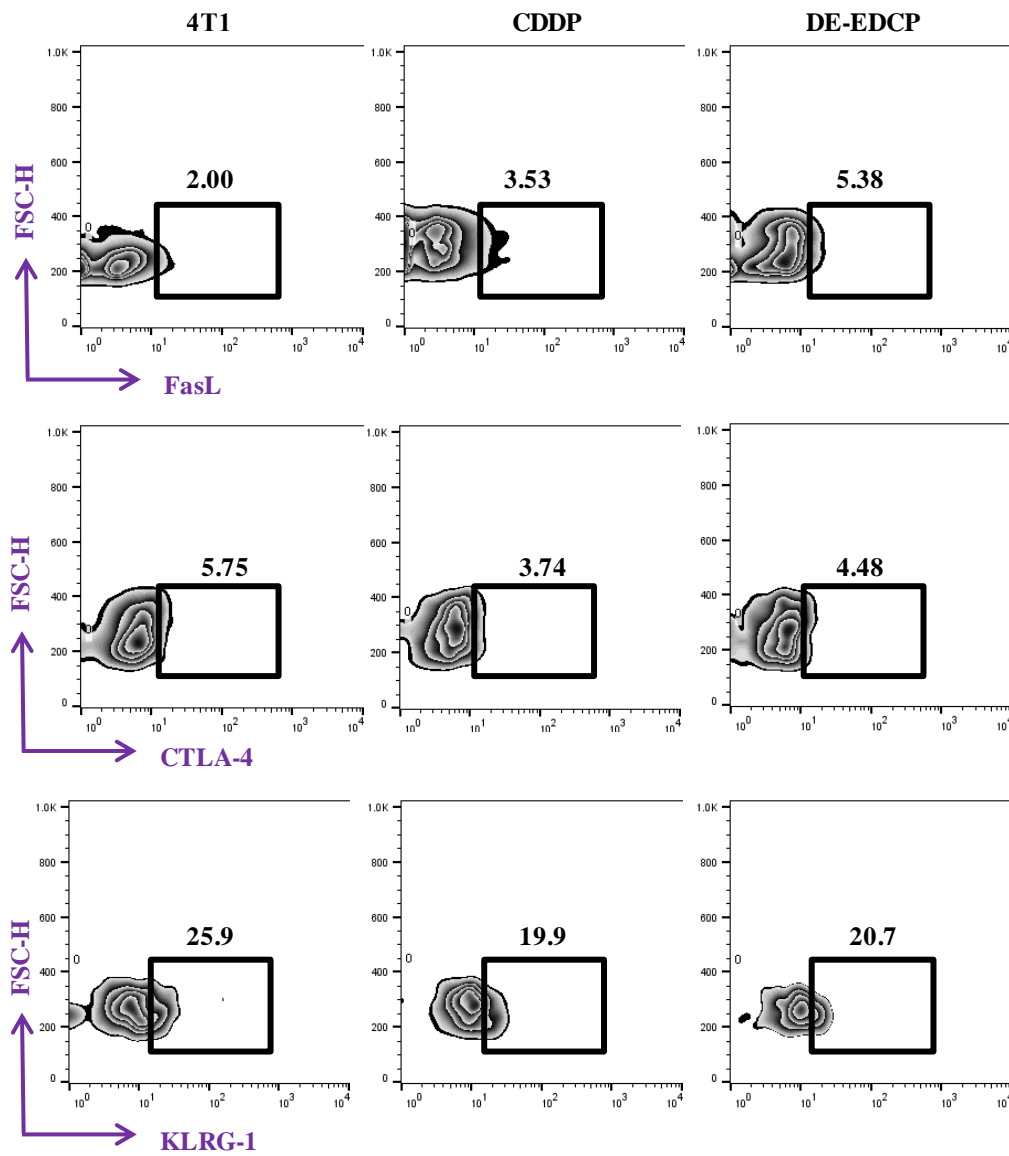
На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP појачано регрутује ефективне NKT и НК ћелије у туморску микросредину.



**Графикон 21. DE-EDCP повећава заступљеност FasL<sup>+</sup> NK ћелија у туморској микросредини карцинома дојке.** Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат тумор-инфилтришућих NK ћелија које експримирају активационе (A) и инхибиционе (B) рецепторе. Код DE-EDCP третираних мишева забележен је значајно већи проценат FasL<sup>+</sup> NK ћелија у односу на нетретиране мишеве. B) Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на NK ћелијама у карциному дојке мишева. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка (*Mann–Whitney U* тест; \*  $p < 0.05$ ).



CD3-CD49+ NK ћелије

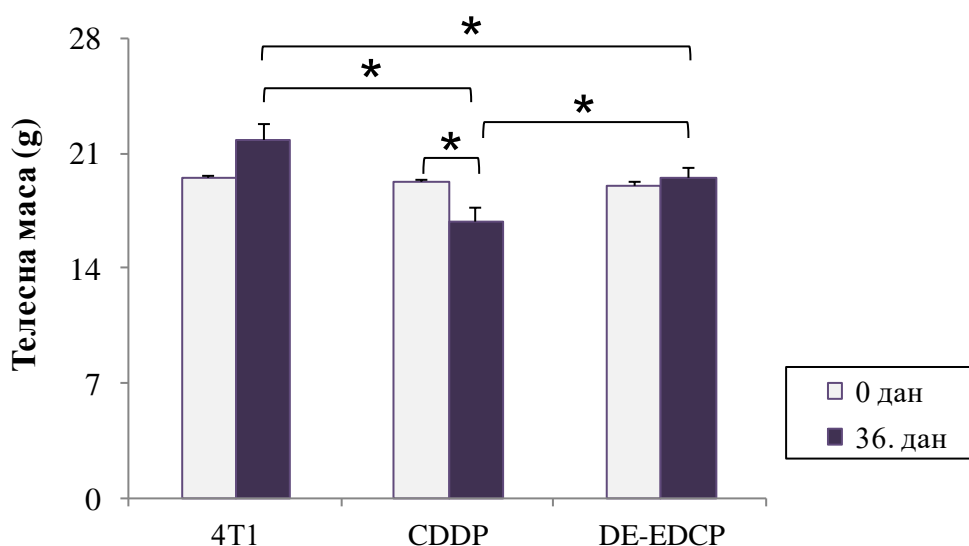


Слика 12. Репрезентативни дот плотови FasL<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup> и KLRG-1<sup>+</sup> NK ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

#### 4.8. Системска примена DE-EDCP показује мању токсичност у односу на цисплатину

Потенцијални токсични ефекат системске примене DE-EDCP је процењен на основу следећих параметара: телесне масе, серумске концентрације урее, креатинина и трансaminaза, као и патохистолошке анализе ткивних исечака органа третираних мишева.

Телесна маса мишева свих испитиваних група је анализирана 0. и 36. дана након инокулације туморских ћелија 4T1, што је приказано на Графикону 22. Примећује се да системска примена DE-EDCP значајно редукује телесну масу мишева 36. дана од инокулације туморских ћелија. Међутим, овакав губитак телесне масе је био јасно мањи него током третмана са цисплатином. Другим речима, мишеви који су били подвргнути третману са цисплатином изгубили су око 22% своје телесне масе, за разлику од мишева третираних са DE-EDCP код којих је губитак износио око 10% у поређењу са групом нетретираних мишева. Уз то, у групи мишева третираних са цисплатином уочава се значајно смањење телесне масе 36. дана у односу 0. дан експеримента и овај губитак је износио 12.4%.

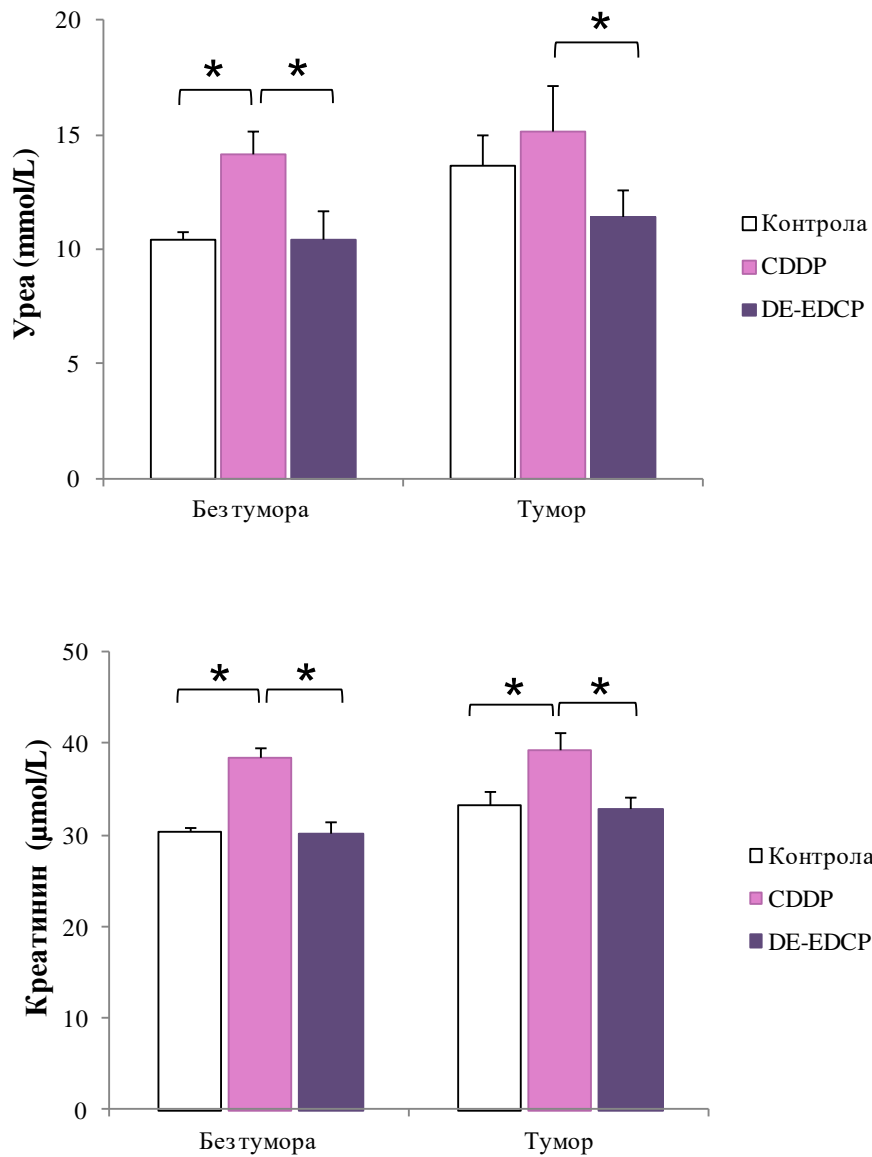


Графикон 22. Промене у телесној маси третираних мишева 0. и 36. дана након инокулације 4T1 туморских ћелија. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (12-14 мишева по групи). (Mann-Whitney U тест; \*  $p < 0.05$ ).

На Графикону 23 приказана је концентрација урее и креатинина, као параметара бубрежне функције, у серуму мишева са и без тумора након третмана са DE-EDCP или са цисплатином. За разлику од цисплатине која је узроковала значајан пораст, уочава се да је концентрација урее и креатинина неизмењена у серуму мишева без тумора након третмана са DE-EDCP. Додатно, региструје се да је у групи мишева са тумором након третмана са DE-EDCP, концентрација урее значајно нижа у односу на мишеве који су третирани са цисплатином, док је концентрација креатинина неизмењена у односу на нетретирани мишеве. Овакав налаз упућује на то да DE-EDCP нема токсични ефекат на бубреге.

Није регистрована значајна разлика у концентрацији трансминаза, ALT (енгл. *Alanine transaminase*) и AST (енгл. *Aspartate transaminase*) (подаци нису приказани) што имплицира на то да испитивано једињење не делује хепатотоксично. Хистолошке промене нису примећене у органима мишева који су били третирани DE-EDCP, укључујући јетру, бубреге, плућа, црева, слезину и желудац (подаци нису приказани).

Добијени подаци указују на то да DE-EDCP има релативно мање нежељене ефекте у односу на цисплатину.



**Графикон 23. DE-EDCP не делује нефротоксично.** Концентрације урее и креатинина у серуму различито третиранх мишева са и без тумора одређене су 36. дана експеримента. Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  стандардна девијација (8-12 мишева по групи; *Mann-Whitney U* тест;  $*p < 0.05$ ).

## 5. Дискусија

Последњих деценија главно ограничење у лечењу канцера је првенствено повећана учесталост озбиљних нежељених реакција, као и све чешћи развој резистенције на хемотерапеутике. Управо ова ограничења наметнула су потребу за развојем нових терапијских једињења која показују већу ефикасност а мању токсичност.

У овој докторској дисертацији су испитивани антитуморски ефекти диетилестра DE-EDCP у моделу мишјег карцинома дојке и меланома, као и потенцијални механизми његовог деловања.

### 5.1. Цитотоксичко дејство DE-EDCP на ћелије карцинома дојке и меланома

У новијим истраживањима посебно место заузимају комплекси метала са диам(м)инским лигандима. Успешно је синтетисан велики број лиганада типа *edda* (етилендиамин-*N,N'*-диацетат), као и њихови одговарајући комплекси метала (325-331). Лиганди *edda* типа су етилендиамин или пропилендиамин дикарбоксилне киселине и њихови естри (332, 333). Приликом анализе биолошке активности синтетисаних *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат платина(II)/(IV) комплекса и њихових одговарајућих лиганада, уочено је да један од лиганада показује значајну антитуморску активност (298, 299). Испитиван је цитотоксички ефекат *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид лиганада (R= H, метил, етил, *n*-пропил, *n*-бутил), као и њихових одговарајућих комплекса платине(IV), при чему је забележена значајна цитотоксичка активност *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (DE-EDCP) и његовог одговарајућег комплекса платине(IV) на линијама малигних ћелија глиома (U251 глиом људи и С6 глиом пацова), фибросаркома L929 и меланома миша В16 (298). Генерално, ова антитуморска активност DE-EDCP била је приближно једнака или чак ефикаснија у односу на цисплатину. Када се пореди осетљивост свих наведених линија туморских

ћелија, запажа се да је меланом миша B16 најосетљивији на дејство DE-EDCP. Уз то, на основу добијених IC<sub>50</sub> вредности уочено је да су ови малигни меланоцити чак четири пута осетљивији на DE-EDCP него на дејство цисплатине. Анализа механизма ћелијске смрти упућује на то да како одговарајући комплекс платине(IV) тако и његов лиганд узрокује смрт туморских ћелија која не одговара у потпуности ниједном типу ћелијске смрти, мада је најсличнија некрози (298). Такође, испитиван је и токсички ефекат *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат лиганада (R= H, метил, етил, *n*-пропил, *n*-бутил) на бројне линије ћелија леукемије (HL-60, REN, MOLT-4, KG-1, JVM-2 и K-562) (299, 300). Највећи токсички ефекат показао је диетилестар DE-EDCP (299, 300). Уочено је да је DE-EDCP ефикаснији у индукцији ћелијске смрти акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) (299, 300), док је на осталим линијама леукемија његов туморицидни капацитет био незнатно мањи у поређењу са референтним цитостатиком цисплатином. Миљковић и сарадници (334) су забележили да лиганд ди-*n*-пропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид, сличне хемијске структуре као и DE-EDCP, у комплексу са платином(IV) поседује изражену цитотоксичку активност на туморске ћелије, а на мононуклеарним ћелијама показује мањи ефекат.

У актуелној студији је по први пут детерминисан туморицидни потенцијал DE-EDCP на различитим линијама ћелија карцинома дојке. Регистровано је да DE-EDCP остварује значајну цитотоксичку активност на ћелијама карцинома дојке миша (4T1), као и људи (MDA-MB-468 и MDA-MB-231) која је дозно зависна (Графикон 1 и 2). На основу добијених IC<sub>50</sub> вредности након 24. и 48 часовног третмана може се закључити да је туморицидни ефекат DE-EDCP на мишјим малигним ћелијама 4T1 приближно једнак ефекту цисплатине (Табела 3). Добијени резултати су у складу са налазом друге студије који указује да су туморске ћелије мишјег фибросаркома L929 подједнако осетљиве на DE-EDCP и цисплатину (298). Уз то, уочава се и да су након 24. часовног третмана линије ћелија карцинома дојке хуманог порекла осетљивије на DE-EDCP него на референти хемиотерапеутик, цисплатину (Графикон 1 и Табела 3). Мада варијанте аденокарцинома дојке људи, MDA-MB-468 и MDA-MB-231, представљају јединствен подтип метастатског тумора, које не експримирају рецепторе ER, PR и HER2, туморске ћелије MDA-MB-231 додатно одликује већи метастатски потенцијал, као и слабија осетљивост на хемиотерапеутике, а нарочито на цисплатину (303). Након 24. часовног третмана туморских ћелија MDA-MB-468 забележено је да DE-EDCP има исти

цитотоксички ефекат као и цисплатина, а који се са продужавањем времена третмана (након 48 часова) смањује у односу на цисплатину. Додатно, на основу добијених  $IC_{50}$  вредности испитиване супстанце регистровано је да је цитотоксички потенцијал DE-EDCP након 24. часовног излагања варијанте карцинома дојке MDA-MB-231 са високим метастатским капацитетом чак око 12 пута већи у поређењу са референтним цитостатиком (Табела 3). Међутим, продужавањем времена третмана (након 48 часова) ова осетљивост туморских ћелија MDA-MB-231 на DE-EDCP се смањује и постаје приближно иста као на цисплатину. У другим студијама у којима је анализиран утицај комплекса платине(IV) и њихових одговарајућих лиганата, укључујући и DE-EDCP, на вијабилност различитих линија туморских ћелија хуманог порекла забележени су слични резултати, мада дозно зависни ефекат није испитиван. Тако, на основу  $IC_{50}$  вредности констатовано је да су ћелије глиома (298) и леукемија (KG-1, JVM-2 и K-562) људи подједнако осетљиве на DE-EDCP и на цисплатину након 24. часовног третмана (300). Документовано је да је хумана линија акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) чак двоструко осетљивија на дејство DE-EDCP у поређењу са цисплатином (299, 300). Супротно, запажено је да су ћелије карцинома плућа људи (H460) отпорније на дејство DE-EDCP у односу на цисплатину (299). Другим речима, на основу  $IC_{50}$  вредности закључено је да је туморицидна активност DE-EDCP четири пута мања у односу на цисплатину. Слично, регистрована је и смањена осетљивост хумане линије акутне лимфобластне леукемије (MOLT-4) на дејство DE-EDCP, при чему је  $IC_{50}$  вредност за DE-EDCP била двоструко већа у односу на цисплатину (300).

С обзиром да су малигни меланоцити значајно резистентни на конвенционалне хемотерапеутике (335), испитан је и утицај DE-EDCP на вијабилност B16-F10 варијанте мишијег меланома. Уочава се да је цитотоксичка активност DE-EDCP дозно зависна не само на туморске ћелије карцинома дојке, већ и на B16-F10 варијанту меланома. Поређењем  $IC_{50}$  вредности DE-EDCP и конвенционалног хемотерапеутика, региструје се да је туморицидни потенцијал DE-EDCP приближно идентичан цисплатини након 24. часовног третмана ћелија. Међутим, при продужавању ћелијског третмана (од 48 часова), вредност  $IC_{50}$  DE-EDCP је смањена и чак је и око 2.5 пута мања у поређењу са цисплатином. У другој студији у којој је испитан утицај комплекса платине(IV) и њихових одговарајућих лиганата (298), забележена вредност  $IC_{50}$  након 24. часовне инкубације B16 туморских ћелија са DE-EDCP је слична  $IC_{50}$  вредности која је добијена у актуелном истраживању. Недавно су Исаковић и сарадници (336)

испитивали утицај DE-EDCP на вијабилност B16-F10 варијанте меланома миша након 24. часовног третмана. Вредности IC<sub>50</sub> DE-EDCP добијене коришћењем различитих тестова цитотоксичности, као што су AcP, MTT и SRB тест, су такође у складу са налазом ове студије.

У овој студији цитотоксички потенцијал DE-EDCP на ћелијама 4T1 и B16-F10 додатно је потврђен LDH тестом који мери активност лактат дехидрогеназе. Овај ензим се ослобађа из ћелија тек након лизе ћелијске мембране што одговара или некротичној смрти ћелија или касној фази апоптозе (337, 338). У актуелном истраживању запажено је значајно ослобађање лактат дехидрогеназе из обе линије туморских ћелија након 24. часовног третмана са DE-EDCP у опсегу концентрација 31.25-1000μM (Фигура 3). Овај пораст процента мртвих малигних меланоцита миша које су ослободиле лактат дехидрогеназу након излагања DE-EDCP компатибилан је са налазом друге студије (336). Мање ослобађање лактат дехидрогеназе из туморских ћелија након третмана са цисплатином у нижим концентрацијама је у складу са претпоставком да цисплатина доминантно индукује апоптозу односно тип ћелијске смрти коју одликује очуван интегритет ћелијске мембране (339). С друге стране, повећан проценат мртвих ћелија које ослобађају лактат дехидрогеназу након третмана са цисплатином у вишим концентрацијама је у складу са резултатима ранијег истраживања (340-342) и сугеришу на могућност да цисплатина у вишој дози од 31.25μM индукује промене које су карактеристичне за некрозу. Наиме, у зависности од степена ћелијског оштећења индукованог цисплатином, некроза се може десити или директно или индиректно као последица недовршеног апоптотског програма (339). Уколико се добијени ефекат испитиваног једињења пореди са цисплатином, може се уочити да је ослобађање лактат дехидрогеназе након третмана са DE-EDCP два пута веће у ћелијама карцинома дојке миша, односно три пута веће у ћелијама мишјег меланома у односу на цисплатину (Графикон 3). Ови резултати имплицирају да DE-EDCP свој цитотоксички ефекат вероватно остварује и директним нарушавањем интегритета ћелијске мембране. Постоји могућност да је присуство ћелија са нарушеним интегритетом ћелијске мембране последица тзв. секундарне некрозе, сходно томе да у *in vitro* условима не постоје фагоцити, па ћелије у којима је покренут апоптотски процес подлежу секундарној некрози због немогућности њиховог уклањања фагоцитима. Показано је да комплекс платине(IV) и DE-EDCP узрокује некротичну смрт ћелија солидних тумора (глиома) а која је последица повећане продукције слободних кисеоничних радикала и



нарушавање интегритета ћелијске мембране (298). Изгледа да DE-EDCP у комплексу са платином(II) или платином(IV) може покренути најмање два типа смрти у малигним ћелијама, апоптозу или некрозу.

Добро је познато да ћелије са дезинтегрисаном ћелијском мембраном улазе у некрозу и/или у касну фазу апоптозе и да се углавном детектују помоћу LDH теста, док се промене у активности митохондријалних ензима које се дешавају рано у процесу апоптозе региструју МТТ тестом. У складу са тим, у овој студији, на основу налаза значајне туморицидне активности испитиваног једињења добијеног помоћу МТТ и LDH теста, може се констатовати да DE-EDCP највероватније узрокује како апоптотску тако и неапоптотску/некротску смрт и 4Т1 и В16-Ф10 малигних ћелија.

## **5.2. Утицај DE-EDCP на прогресију карцинома дојке и меланома миша**

Налази новијих епидемиолошких студија указују на то да канцер постаје један од "главних убица" широм света (343). Узимајући у обзир ову чињеницу, данас се спроводе бројна истраживања у циљу проналажења нових антитуморских лекова који ће спречити раст и метастазирање канцера уз минималналне нежељене последице. Претходно изнети налази актуелне студије јасно упућују на то да DE-EDCP поседује изражен туморицидни потенцијал, што је подстакло да се даље испита да ли је DE-EDCP значајни кандидат у експерименталној терапији различитих врста солидних тумора.

Користећи ортотопски сингени модел мишјег карцинома дојке, анализиран је утицај DE-EDCP на раст и метастазирање тумора. Важан налаз ове студије сугерише на то да DE-EDCP има способност да значајно успори прогресију карцинома дојке код оних мишева који су подвргнути "терапеутском" режиму и то тек након што су развили палпабилни тумор. Уочава се да DE-EDCP има потенцијални терапијски учинак у карциному дојке узимајући као параметар волумен и масу тумора (Графикон 4), као и број и величину метастатских колонија (Графикон 5 и Слика 6). Резултати новијег истраживања такође указују на то да DE-EDCP значајно редукује раст В16-Ф10 варијанте мишјег меланома (336). Наиме, забележено је значајно смањење масе (за око 25%) и величине (за око 50%) меланома у мишева који су третирани са DE-EDCP у поређењу са нетретираним групом (336). У актуелној студији уочено је да је до 22. дана

од убризгавања 4T1 туморских ћелија DE-EDCP имао сличне ефекте на раст тумора као и референтноо једињење, цисплатина (Графикон 4A). Од тог дана и поред бољег ефекта цисплатине, уочава се да претходно регистрована разлика у дијаметру тумора се одржава све до краја експеримента између групе мишева третираних са DE-EDCP и нетретиране групе. Овакав релативно бољи ефекат цисплатине у односу на DE-EDCP може бити последица евентуалних разлика у фармакокинетичким параметрима ова два једињења. За цисплатину се добро зна да постиже дуготрајније ефекте услед дужег задржавања у организму (344-348), док фармакокинетичка својства DE-EDCP још увек нису расветљена. Претпоставља се да је то један од разлога дуготрајнијег антитуморског потенцијала цисплатине у односу на DE-EDCP. Мишеви обе групе фармаколошки су третирани до 18. дана од инокулације 4T1 туморских ћелија, а жртвовање је уследило 36. дана експеримента. Тог дана, мерењем масе и волумена тумора региструје се да DE-EDCP значајно редукује раст карцинома дојке у поређењу са нетретираном групом, али је тај ефекат значајно мањи у односу на цисплатину (Графикон 4). Међутим, DE-EDCP и цисплатина су остварили готово идентичан ефекат у редукацији броја спонтано успостављених метастатских жаришта у плућима (Графикон 5). Интересантно је запажање да је код мишева третираних са DE-EDCP или са цисплатином битно изражена рефрактерност на успостављање метастаза у јетри. Другим речима, у третираним мишевима нису детектоване метастатске колоније, док у групи нетретираних чак код 42.1% мишева су забележене метастазе у јетри.

Познато је да меланом у узрапредованом стадијуму има изузетно варијабилан и непредвидив ток и да може да метастазира готово у сваки орган и ткиво. Прогноза пацијената са метастатским меланомом је лоша, са 5-годишњом стопом преживљавања између 5-19%. На ову стопу преживљавања оболелих утичу локација и број метастаза (249). Користећи модел мишјег метастатског меланома, анализиран је ефекат примене DE-EDCP на прогресију меланома и хематогено метастазирање. При томе, мишеви су подвргнути "терапеутском" третману другог дана од интравенске апликације B16-F10 туморских ћелија. Мада није уочена статистички значајна разлика у инциденци метастазирања у плућима у односу на нетретирану групу мишева, DE-EDCP је смањило учесталост метастазирања за око 30%. Међутим, забележено је да DE-EDCP значајно редукује број и величину хематогених метастаза у плућима у поређењу са нетретираним мишевима (Графикон 6). Метастатске промене у јетри нису забележене ни у једној од испитиваних група. Примећује се и да је антиметастатски потенцијал

DE-EDCP слабији од ефекта дакарбазина, златног стандарда, који се користи у лечењу ове врсте тумора (Графикон 6).

На основу претходно изнетих налаза студије може се закључити да DE-EDCP показује јасан туморицидни капацитет који је одговоран за успорен раст и метастазирање тумора. Даљим испитивањима у моделу карцинома дојке покушано је расветљавање механизма којима DE-EDCP успорава прогресију тумора.

### **5.3. DE-EDCP индукује апоптотску смрт малигну хелија**

Зна се да су дисрегулација апоптозе и пролиферације хелија кључни у развоју канцера. Поремећај у регулацији апоптозе је одговоран не само за раст и метастазирање тумора, већ је у блиској вези и са резистенцијом малигну хелија на цитостатике (350-352).

Након регистрованих морфолошких промена 4T1 туморских хелија које су уследиле после излагања DE-EDCP (Слика 7), испитивани су унутархелијски догађаји који су карактеристични за апоптозу. Апоптоза, као тип хелијске смрти која је потенцијално индукована DE-EDCP, најпре је процењена на основу екстернализације фосфатидил серина на површини хелијске мембране туморских хелија. Другим речима, типична промена карактеристична за апоптотску смрт хелије је траслокација фосфатидил серина са унутрашње на спољашњу страну хелијске мембране. У актуелној студији је анализирана процентуална заступљеност 4T1 хелија у различитим фазама апоптозе тако што су туморске хелије обележене са анексином V и пропидијум јодидом. Регистровано је да DE-EDCP значајно повећава проценат апоптотских хелија и то у касној фази апоптозе и овај ефекат је дозно зависан (Графикон 7). С друге стране, највећи проценат хелија у раној апоптози детектован је након њиховог излагања цисплатини. Са повећавањем концентрације уочено је да DE-EDCP индукује двоструко већи проценат туморских хелија у касној фази апоптозе у поређењу са цисплатином. Подаци из литературе сугеришу да комплекс кога граде платина(IV) и DE-EDCP индукује некрозу, док комплекс платине(II) и DE-EDCP узрокује рану и касну апоптозу у хелијама хумане линије акутне промијелоцитне леукемије (299).

Прекиди дволанчане ДНК и њена следствена фрагментација су једна од одлика апоптозе. Како би се проценио ефекат DE-EDCP на апоптотску смрт туморских ћелија и у самој потки карцинома дојке, примењена је TUNEL метода којом се откривају прекинути ланци ДНК у једру апоптотских ћелија. Уочава се да је DE-EDCP узроковао значајан пораст апоптотских односно TUNEL-позитивних малигних ћелија. Уз то, примењено је да је овакав проапоптотски ефекат испитиваног једињења био сличан цисплатини (Графикон 8).

Ћелија поседује софистициран систем који строго регулише апоптозу. Овај систем укључује породицу протеина Bcl-2 која обухвата бројне анти- и про-апоптотске молекуле, и благе промене у њиховој динамичкој равнотежи резултују или инхибицијом или покретањем "суицидалног" програма у ћелији (353, 354). Тако на пример, Вах служи као фацилитатор апоптозе, док с друге стране Bcl-2 је антиапоптотски протеин који неутралише функцију Вах у иницијацији ћелијске смрти (355). Повећана експресија Bcl-2 је документована у многим солидним туморима, укључујући карцином дојке, простате, плућа, желуца и јајника што сугерише на онкогени потенцијал овог протеина (356). С обзиром да естрогени повећавају експресију Bcl-2 у карциному дојке (357), позитивна експресија овог протеина може да укаже на функционалну активност рецептора за естроген код ове врсте тумора (356, 358). С друге стране, смањена експресија проапоптотског молекула Вах у колоректалном карциному, као и у метастатском карциному дојке, је удружена са краћим преживљавањем оболелих (359, 360). Супротно, повећање експресије Вах резултује успореним растом карцинома дојке (361). Осим што су укључени у генезу различитих врста тумора, повећана експресија молекула Bcl-2 и Вах утиче и на ефикасност хемотерапије код карцинома дојке. Сматра се да Bcl-2 индукује повећану хеморезистенцију туморских ћелија, док проапоптотски протеин Вах повећава осетљивост ћелија на антитуморску терапију (359, 362). У актуелној студији је регистровано да у третираним туморским ћелијама 4T1, DE-EDCP значајно смањује експресију антиапоптотског Bcl-2 и истовремено повећава експресију проапоптотског Вах, како на нивоу протеина тако и на нивоу иРНК (Слика 8 и Графикон 9).

Активација каспаза је финални корак у процесу апоптозе (363). У оквиру породице каспаза, од посебног интереса је активација каспазе-3 која катализује специфичну разградњу многих кључних целуларних протеина што за последицу има ћелијску аутодеструкцију (363). Примењена је повећана експресија активне форме

каспазе-3 у третираним туморским ћелијама (Слика 8). Ако се пак пореди експресија овог молекула на нивоу иРНК у туморским ћелијама након излагања DE-EDCP или цисплатини, уочава се да је само DE-EDCP индуковао битан пораст експресије иРНК за каспазу-3. Штавише, експресија иРНК за каспазу-3 је била значајно виша у ћелијама третираним са DE-EDCP него после третмана са цисплатином (Графикон 9). Сматра се да у апоптотској машинерији каспаза-3 представља једну од главних "егзекутора" ћелије (364). Активацијом каспазе-3 покреће се читав сет догађаја који за последицу има "самоубиство" ћелије укључујући активацију ендонуклеаза које разграђују ДНК, и иницирају кондензацију хроматина. Коначан исход свих наведених догађаја је руптура ћелије и формирање апоптотских тела (365). Резултати другог истраживања такође потврђују апоптотски ефекат DE-EDCP на леукемијским ћелијама HL-60 што се огледа у деполаризацији унутрашње мембране митохондрија, екстернализацији фосфатидил серина и фрагментацији ДНК (300). Додатно, показано је да комплекс платине(II) и DE-EDCP покреће апоптозу у овим ћелијама и то тако што активира иницијаторске каспазе, каспазу-8 и каспазу-9 (299).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу што се огледа у способности да смањује експресију антиапоптотског Bcl-2 и повећава експресију проапоптотског протеина Вах. Коначни исход измењеног баланса између ових молекула је повећана пропустљивост митохондријалне мебрране што следствено узрокује апоптозу која зависи од каспазе-3.

#### **5.4. DE-EDCP зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази**

Заустављање машинерије у G0/G1, S или у G2/M фази ћелијског циклуса, које не само што омета пролиферацију туморских ћелија већ их уводи и у апоптозу, представља заједнички механизам цитотоксичности за многе конвенционалне антиканцерске лекове (366, 367). У актуелној студији је забележено да DE-EDCP повећава заступљеност 4T1 ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса и овај антипролиферативни ефекат је дозно зависан (Графикон 10). Ова акумулација ћелија у G0/G1 фази праћена је смањењем процента туморских ћелија у S и у G2/M фази ћелијског циклуса. Уочава се и да цисплатина у нижој концентрацији остварује сличан ефекат као и DE-EDCP у вишој концентрацији. Добијени налаз сугерише на то да DE-

EDCP индукује застој туморских ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса и следствено зауставља припремање енергије и материјала за репликацију ДНК. Другим речима, овакав прекид ћелијског циклуса у G0/G1 фази вероватно је разлог драстичног смањења процента 4T1 ћелија у S и у G2/M фази након третмана са DE-EDCP. Прекид ћелијског циклуса у G0/G1 фази може да иницира повећану осетљивост туморских ћелија на апоптозу (368). Уочено је да је DE-EDCP узроковао повећану заступљеност и ћелија које се налазе у суб-G1 фази, а које представљају фракцију апоптотских ћелија. Ово је интересантно запажање јер је добро познато да су регулација ћелијског циклуса и апоптотске машинерије кључни у прогресији тумора (369, 370). Познато је да неки антиканцерски лекови као што су цефалохромин или еуфон инхибирају пролиферацију туморских ћелија тако што у њима заустављају ћелијски циклус у G0/G1 фази (371, 372), док палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб функционишу као инхибитори Cdk4/6 и у последњих пар година успешно се користе у лечењу метастатског карцинома дојке код пацијенткиња у постменопаузи (224-226).

Ki-67, као широко коришћени маркер пролиферације ћелија, тесно је повезан са регулацијом ћелијског циклуса али његова улога у овом процесу и даље није довољно расветљена (373). Овај нуклеарни протеин је експримиран у свим активним фазама ћелијског циклуса, изузев у G0 и раној G1 фази (373, 374). Из тог разлога, Ki-67 се користи као прогностички биомаркер и метастатски предиктор у различитим врстама малигнома људи (375-377). Повећана експресија Ki-67 у ткиву која се региструје након спроведене неoadјувантне терапијске процедуре доводи се у везу са лошијом прогнозом болести, као и са потребом за измену терапијског протокола (378). У овој студији је детектован мањи проценат 4T1 ћелија који исказују Ki-67 након излагања DE-EDCP у односу на нетретиране ћелије, као и на ћелије третиране са цисплатином (Графикон 11). Ова смањена експресија Ki-67 у 4T1 ћелијама које су третиране са DE-EDCP вероватно је резултат заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 фази и повећане експресије протеина p16, инхибитора комплекса Cdk4/Cdk6, што је и претходно забележено у немалигним и малигним ћелијама (379). Уз то, резултати недавно публиковане студије указују да је Ki-67 одговоран за резистенцију малигних ћелија на дејство хемотерапеутика што је последица одржавања нише туморских матичних ћелија (380). Ова сазнања имплицирају да Ki-67 може да буде атрактивна мета у лечењу канцера. Неочекивано, регистрован је и драстичан пораст експресије Ki-67 на туморским ћелијама након третмана са цисплатином (Графикон 11). У складу са

претходним налазом, уочено је да DE-EDCP битно редукује експресију Ki-67 и у ткиву карцинома дојке, али није забележена разлика у експресији Ki-67 у туморском ткиву цисплатином третираних и нетретираних мишева (Графикон 12). Налаз повећане процентуалне заступљености туморских ћелија које исказују Ki-67 након третмана са цисплатином *in vitro* је вероватно резултат компензаторне пролиферације која је индукована апоптозом (381). Ову претпоставку подржавају претходно приказани резултати актуелног истраживања који упућују да цисплатина у нижој концентрацији од 31.25 $\mu$ M је ефикасна у индукцији апоптозе 4T1 туморских ћелија.

Прогресију ћелијског циклуса регулишу три групе протеина: циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа (382). У наредним експериментима испитиван је механизам задржавања туморских ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса након излагања DE-EDCP. Постоје 2 главне врсте циклина у G1 фази, а то су циклин- D и -E (176). Ови циклини омогућују прогресију ћелијског циклуса кроз G1 фазу и то тако што циклин D интерагује са Cdk4 или Cdk6 и укључен је у регулацију ране G1 фазе, док циклин E формира комплекс са Cdk2 који је неопходан за завршетак G1 и иницијацију S фазе (176, 383-385). Повећана експресија циклина E скраћује транзицију туморских ћелија из G1 у S фазу што убрзава ћелијски циклус и резултује непланском ћелијском пролиферацијом, и коначно убрзаним растом тумора (386, 387). Претходно је показано да су циклин-D1 и -D3 повећано исказани у линијама ћелија карцинома дојке људи, као и у примарним лезијама инвазивног карцинома дојке (388). Уз наведено, у карциному дојке који исказује ErbB2 регистровано је да је експресија циклина D3 много већа у односу на циклин D1, као и да циклин D3 може да компензује губитак циклина D1 код ове врсте тумора (388). Транскрипциони фактор E1AF подстиче прогресију ћелијског циклуса у карциному дојке тако што повећава транскрипцију циклина D3 (389). Показано је да рапамицин индукује прекид ћелијског циклуса у карциному дојке који исказује HER2 у G1 фази и то тако што дестабилизује и последично редукује експресију протеина циклина D3 (390). Након третмана са DE-EDCP или са цисплатином није забележена промена у експресији циклина E у туморским ћелијама 4T1 (Графикон 13A). Међутим, DE-EDCP је значајно смањио проценат туморских ћелија које исказују циклин D3 у поређењу са ћелијама третираним са цисплатином, а нарочито са нетретираним ћелијама (Графикон 13B). Додатно, за разлику од цисплатине која није утицала на експресију овог молекула

на нивоу иРНК, забележено је значајно смањење експресије иРНК за синтезу циклина D3 после третмана са DE-EDCP у односу на нетретирани ћелије (Графикон 13).

С обзиром да је редукција активности инхибитора циклин зависних киназа један од фактора који доприноси непланској пролиферацији, још једна могућа стратегија у инхибицији пролиферације туморске ћелије је индукција експресије ових молекула која би могла да стопира ћелијски циклус у G0/G1 фази и следствено раст тумора (391). Разликују се две породице инхибитора циклин зависних киназа, а то су: 1) породица Ink4a специфичних инхибитора Cdk (p16, p15, p18 и p19) и 2) породица молекула Cip/Kip коју чине p21, p27, и p57 (370, 392). У актуелном истраживању уочено је да третман са DE-EDCP узрокује значајан пораст процента ћелија које експримирају p16, p21 и p27 (Графикон 14). Ако се пореди ефекат DE-EDCP и цисплатине на експресију инхибитора ћелијског циклуса, запажа се да је способност DE-EDCP да повећа експресију p21 и p27 мања у односу на цисплатину. Познато је да p16 специфично инхибира комплексе које граде Cdk4 или Cdk6 са циклином D у раној G1 фази ћелијског циклуса (161). За разлику од p16, p21 функционише као универзални инхибитор циклин зависних киназа (393), док p27 блокира формирање или активност комплекса које чине циклин A са Cdk2, циклин E са Cdk2 или циклин D са Cdk4 (161, 394).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP смањује експресију циклина D3 и повећава експресију p16, p21 и p27 што резултује задржавањем ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а тиме не само да инхибира пролиферацију туморских ћелија, већ вероватно додатно фацилитира њихову осетљивост на апоптозу.

### **5.5. DE-EDCP инхибира нисходну каскаду сигналног пута STAT3 у тумору**

Молекул STAT3 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) припада породици транскрипционих фактора (381, 395). Овај молекул је конститутивно активан у свим подтипovima карцинома дојке, а најчешће код троструко негативних карцинома дојке, односно оних карцинома који не експримирају молекул HER2, као ни рецепторе за естроген и прогестерон (396, 397). Студије које су засноване на генетској и фармаколошкој модулаци активности STAT3 пружиле су



убедљив доказ о значајној улози STAT3 у бројним процесима који су критични у прогресији карцинома дојке, укључујући ћелијску пролиферацију, апоптозу, ангиогенезу, антитуморски имунски одговор и метастазирање тумора (398). Из тог разлога, сматра се да је STAT3 један од значајних циљаних мета у терапији канцера. Тако, показано је да смањена активност STAT3 резултује заустављањем ћелијског циклуса у G0/G1 фази и индукцијом апоптозе (399). У актуелном истраживању уочено је да DE-EDCP у 4T1 туморским ћелијама значајно смањује експресију STAT3, на нивоу протеина и информационе РНК, у поређењу са нетретираним или цисплатином третираним ћелијама (Графикон 15 и 16). Резултати ранијег истраживања указују да је постраскрипцијско "утишавање" протеина STAT3 у 4T1 ћелијама помоћу мале интерферирајуће РНК (енг. *small interfering RNA*, *siRNA*) за последицу имало комплетну блокаду експресије *Twist* протеина и онкопротеина с-Мус, што коначно инхибира раст тумора и успостављање метастаза (400). Сходно томе, чини се да DE-EDCP своју антитуморску активност у карциному дојке остварује између осталог и смањењем експресије STAT3 и то на нивоу протеина и гена.

Претпоставља се да су SOX2 и NANOG кључни протеини нисходне регулације сигналног пута STAT3 у канцеру (401). Молекули SOX2 и NANOG представљају транскрипционе факторе и служе као маркери туморских матичних ћелија (енгл. *cancer stem cells*, CSCs) (402-405). Такође, сматра се да су SOX2 и NANOG критични фактори у одржавању карактеристика CSCs, као што су способност самообнављања, метастазирања и резистенције на хемотерапеутике (405, 406). Аберантна експресија протеина NANOG је документована у различитим врстама тумора (407), укључујући карцином дојке (404) и обично је удружена са смањеним преживљавањем оболелих, као и са чешћом појавом рецидива (405, 406). Повећана експресија SOX2 је забележена код лоше диферентованог карцинома дојке и удружена је са лошим исходом болести (408, 409). Уз наведено, експресија SOX2 је инверзној вези са експресијом рецептора за хормоне, естроген и прогестерон, код ове врсте тумора. У спроведеној студији уочава се да DE-EDCP, а нарочито цисплатина, значајно редукују експресију иРНК за NANOG у 4T1 малигним ћелијама (Графикон 16). Уз то, експресија иРНК за SOX2 је битно снижена у туморским ћелијама након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним ћелијама, и примећује се да је њихов ефекат био приближно исти. Редукована експресија гена за ова два транскрипциона фактора неопходних за очување "матичности" ћелија је праћена смањењем експресијом Ki-67 у 4T1 ћелијама

третираним са DE-EDCP што је у сагласности са резултатима претходног истраживања које сугерише на то да Ki-67 игра значајну улогу у одржавању туморских матичних ћелија (380). *Chen* и сарадници (410) показали су да инхибиција експресије NANOG у ембрионалним матичним ћелијама миша за последицу има повећање процентуалне заступљености како ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса тако и апоптотских ћелија. Недавно је показано да NANOG повећава и пролиферацију фибробласта тако што регулише транскрипцију гена за p27 (411). Редукција експресије SOX2 у ћелијама карцинома панкреаса узрокује инхибицију ћелијског раста тако што зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази и повећава експресију инхибитора циклин зависних киназа, p21 и p27 (412).

Активација транскрипционог фактора STAT3 углавном зависи од фосфорилације JAK киназама (енгл. *Janus kinase*). Тако фосфорилисани молекули STAT3 формирају активне димере који се затим концентришу у једру где регулишу транскрипцију циљаних гена (413-415). У складу са претходним налазом да DE-EDCP значајно смањује експресију STAT3 на нивоу протеина и иРНК у туморским ћелијама *in vitro*, забележен је сличан тренд смањења процента туморских ћелија које експримирају фосфорилисану форму STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева третираних са DE-EDCP у поређењу са нетретираним мишевима, мада ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 17). Резултати скоријег истраживања упућују на то да постранскрипцијско "утишавање" протеина STAT3 у линији ћелија карцинома грлића материце помоћу siRNA резултује смањеном експресијом иРНК за SOX2 и NANOG (401). У складу са свим изнетим, може се констатовати да DE-EDCP инхибира прогресију тумора тако што редукује експресију STAT3 у малигним ћелијама што резултује смањеном експресијом критичних протеина нисходне регулације овог сигналног пута, NANOG и SOX2.

Ћелијска миграција је предуслов за инвазију и метастазирање малигнућ ћелија (416) и самим тим може бити још једна потенцијална мета у терапији тумора. У складу са тим, у спроведеном истраживању испитиван је и ефекат DE-EDCP на миграциони капацитет туморских ћелија 4T1 за које је добро познато да имају висок метастатски потенцијал (417) Регистровано је да DE-EDCP, у ниској односно нетоксичној концентрацији (15.63 $\mu$ M), ефикасно инхибира миграцију туморских ћелија (Графикон 18). Овакав ефекат на миграторну способност 4T1 ћелија може се посматрати и у светлу смањене експресије сигналног пута STAT3 под утицајем DE-EDCP. Наиме, подаци из литературе упућују на то да STAT3 игра значајну улогу у инвазији и

покретљивости ћелија (418). На пример, комплетна инхибиција експресије STAT3 ограничила је пролифераторну и миграторну способност MCF-7 ћелија карцинома дојке људи (419). Показано је да експресија NANOG и SOX2 такође може утицати на миграцију туморских ћелија. Тако, прекомерна експресија NANOG подстиче миграцију и инвазију MCF-7 ћелија (420). Слично, NANOG регулише миграцију ћелија карцинома јајника (421). Регистровано је да постраскрипцијско "утишавање" протеина SOX2 помоћу siRNA спречава миграцију ћелија карцинома дојке људи MDA-MB-231 (422). Из свега наведеног, може се закључити да DE-EDCP редукује миграцију туморских ћелија и то инхибицијом сигналног пута STAT3 који укључује NANOG и SOX2 што представља још један додатни механизам којим DE-EDCP успорава прогресију карцинома дојке.

#### **5.6. DE-EDCP подстиче инфлукс ефективних NKT и NK ћелија у туморску микросредину**

Подаци из литературе указују на то да конвенционална хемотерапија, не само што индукује смрт туморских ћелија и/или спречава њихову пролиферацију, већ и успешно кооперира са имунским системом у ерадикацији тумора (423). Генерално, сматра се да хемотерапеутици могу стимулисати одбрамбене механизме домаћина на два начина, Прво, неки лекови изазивају оне специфичне промене које умирујуће туморске ћелије чине видљивим имунском систему. Друго, неки хемотерапеутици изазивају пролазну деплецију лимфоцита што је праћено обнављањем пула имунских ћелија, прекидају имуносупресију индуковану тумором и директно или индиректно активирају ефикасне механизме антитуморског имунског одговора (424). Показано је да цисплатина може да подстакне снажан имунски одговор против мишјег меланома тако што повећава заступљеност имунопотентних дендритских ћелија с једне стране и елиминише мијелоидне супресорске ћелије с друге стране (425). У моделу карцинома јајника уочено је да примена доксорубицина или цисплатине значајно продужава преживљавање мишева што у великој мери зависи од повећане активности CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита (426). Цисплатина и паклитаксел у ниској дози синергистички делују и оптимално активирају тумор-специфичне CD8<sup>+</sup> Т лимфоците на тај начин што индукују секрецију IL-2 и IFN- $\gamma$  (289). Код мишева који су третирани са цисплатином и 5-

флуороурацилом регистрован је повећан инфлукс и помагачких и цитотоксичких Т лимфоцита у туморску микросредину езофагеалног карцинома (291). Деривати платине и дакарбазин стимулишу антитуморску активност НК ћелија тако што на туморским ћелијама повећавају експресију лиганда за активациони рецептор NKG2D што последично појачава туморицидни потенцијал НК ћелија, а повећавају и синтезу IFN- $\gamma$  (427).

Резултати ранијег истраживања сугеришу да DE-EDCP инхибира продукцију IFN- $\gamma$  и IL-17 у мононуклеарним ћелијама мишева и пацова *in vitro* (298). Међутим, до сада није испитана улога DE-EDCP у "обликовању" антитуморског имунског одговора. У актуелној студији је показано да DE-EDCP индукује повећан инфлукс ћелија урођене имуности, CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> NK и CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT ћелија, у туморску микросредину мишијег карцинома дојке за који је добро познато да је слабо имуногени тумор (Графикон 19). С друге стране, цисплатина је узроковала умерену акумулацију ових ћелија у туморску микросредину која није достигла статистичку значајност, што не искључује могућност да цисплатина у овом моделу остварује антитуморски ефекат другим (не)имунским механизмима. НК ћелије су ефекторски лимфоцити урођене имуности који заузимају важно место у одбрани од тумора. НК ћелије инфилтришу солидни тумор и тако доприносе повољној прогнози оболелих особа (428). Поред НК ћелија, активирани NKT ћелије су такође укључене у елиминацију туморских ћелија било директно или индиректно ангажовањем других ћелија имунског система (429-431). Недавно је откривена веза између броја тумор-инфилтришућих NKT ћелија и бољег клиничког исхода код оболелих од карцинома главе и врата (432). NKT ћелије брзо реагују на стимулусе и представљају важан извор бројних цитокина и хемокина којима модулирају механизме како урођене тако и стечене имуности (433).

Поред тога што повећава инфлукс NKT и НК ћелија у туморску микросредину, добијени подаци указују на то да DE-EDCP утиче и на њихов функционални фенотип. Добро је познато да ове ћелије, а нарочито НК ћелије, директно елиминишу циљане туморске ћелије на најмање два начина, помоћу перфорина и гранзима, као и ангажовањем рецептора смрти. Рецептор смрти Fas интерагује са својим лигандом, FasL, и ова интеракција индукује тримеризацију рецептора што каскадно активира најпре протеин FADD (енг. *Fas-associated death domain protein*) а затим каспазу-8 која је укључена у покретању апоптозе у циљаној туморској ћелији (434, 435). У

спроведеном истраживању DE-EDCP повећа експресију FasL на NK, али не и на NKT ћелијама, и вероватно на тај начин појачава туморицидни капацитет NK ћелија (Графикон 20 и 21). У прилог овој претпоставци је претходни налаз да третман са DE-EDCP повећава заступљеност апоптотских (TUNEL<sup>+</sup>) туморских ћелија у ткиву карцинома дојке (Графикон 8). Познато је да NKT ћелије могу да директно елиминишу оне туморске ћелије које експримирају молекул CD1d (436). Међутим, постоје налази да 4T1 ћелије минимално експримирају овај молекул (437). Стога, у овом моделу тумора NKT ћелије највероватније нису директно укључене у елиминацију 4T1 ћелија. Резултати ранијег истраживања сугеришу да NKT ћелије продукују IL-2 којим могу додатно да стимулишу NK ћелије да ефикасно убију и оне туморске ћелије које су резистентне на директну елиминацију NKT ћелијама (438). Када је реч о улози цитотоксичких Т лимфоцита у 4T1 варијанти мишијег карцинома дојке, подаци из литературе су опречни. Док неки аутори описују да су CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити и IFN- $\gamma$  кључни у ерадикацији 4T1 ћелија (437), други сматрају да у овом моделу карцинома дојке цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити нису од кључног значаја у антитуморском имунском одговору (323, 439). Ћелије урођене имуности, а нарочито NK ћелије, заузимају централно место у контроли раста и метастазирања слабо имуногене 4T1 варијанте мишијег карцинома дојке (323, 439). На основу свега наведеног може се констатовати да је ефикасна антитуморска активност DE-EDCP делом последица и значајне стимулације механизма урођене имуности. Другим речима, повећана акумулација тумор-инфилтришућих NK ћелија, као и повећана експресија FasL на NK ћелијама под утицајем DE-EDCP омогућава интеракцију Fas-FasL што следствено узрокује апоптотску смрт туморских ћелија. Иако на основу анализе експресије активационих рецептора није потврђен туморицидни фенотип NKT ћелија, претпоставља се да DE-EDCP подстиче продукцију циктокина у овим ћелијама што вероватно додатно појачава туморицидни капацитет NK ћелија. Све наведено заједно би могло да буде додатни механизам којим DE-EDCP инхибира прогресију карцинома дојке.

Рецептор KLRG1 (енгл. *Killer Cell Lectin-like Receptor G1*) је трансмембрански молекул који припада породици С-типа лектинских рецептора. Овај инхибициони рецептор углавном експримирају NK ћелије, цитотоксички Т лимфоцити и дуго живуће ефекторске NKT ћелије (440, 441). Сматра се да овај молекул регулише хомеостазу и сазревање NK ћелија (442). Регистровано је да је повећана експресија

рецептора KLRG1 у корелацији са смањеним пролиферативним капацитетом NK ћелија (442, 443), као и са њиховом повећаном апоптозом (444). У овој студији је забележено да DE-EDCP значајно смањује проценат KLRG1<sup>+</sup> NKT ћелија, али не и KLRG1<sup>+</sup> NK ћелија у туморској микросредини (Графикон 20 и 21). Анализа односа инхибиционог наспрам активационог рецептора на NK ћелијама указује да је однос KLRG-1<sup>+</sup>/NKG2D<sup>+</sup> на NK ћелијама у тумору мишева третираних са DE-EDCP значајно смањен (Графикон 21B) што вероватно сугерише на очуваност цитотоксичног потенцијала NK ћелија код ових мишева. Инхибициони рецептор PD-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1*, PD-1) је контролни молекул који регулише и ограничава имунски одговор, а исказан је на површини ефекторских ћелија, укључујући Т лимфоците, NK и NKT ћелије (445-447). Стимулација NKT ћелија  $\alpha$ -галактоцерамидом индукује повећану експресију PD-1 на NKT ћелијама што за последицу има анергију оваквих ћелија (448, 449). Забележено је да примена DE-EDCP спречава експресију PD-1 на NKT ћелијама у туморској микросредини и на тај начин задржава респонзивност ових ћелија (Графикон 20). Површински протеин CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*, CTLA-4) је други контролни молекул који игра кључну улогу у "гашењу" имунског одговора и у одржавању имунске хомеостазе (450-453). Експримиран је на тумор-инфилтришућим NK ћелијама мишева и важан је за успостављање толеранције на туморске ћелије (452) У овом истраживању уочава се да је DE-EDCP такође смањио проценат анергичних тумор-инфилтришућих CTLA-4<sup>+</sup> NKT ћелија (Графикон 20). У експерименталном моделу меланома и неких карцинома дојке показано је да блокада и PD-1 и CTLA-4, као и комбинована блокада оба молекула, је у великој мери ефикасна у терапији тумора (454-456).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP инхибира прогресију мишјег карцинома дојке што је последица како директних ефеката испитиване супстанце на туморске ћелије тако и појачаног антитуморског имунског одговора. Дакле, DE-EDCP осим што повећава инфлукс, подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност NK и NKT ћелија у туморској микросредини.

## 5.7. DE-EDCP индукује мање системско оштећење у односу на цисплатину

Цисплатина, као први примењен антитуморски лек на бази метала, има широку примену у пракси која је нажалост праћена честим озбиљним нежељеним дејствима, а то су нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност и губитак телесне тежине (346). Углавном се излучује урином, а има тенденцију и да се акумулира у бубрезима. Тако, концентрација цисплатине у тубулима бубрега је чак 5 пута већа у односу на њену концентрацију у крви (348, 457). Једна од најчешћих нежељених реакција цисплатине је оштећење бубрега. Цисплатина изазива нефротоксичност на дозно зависан начин, и разликују се акутна и хронична нефротоксичност. Ово нежељено дејство не зависи само од дозе примењеног лека, већ и од других фактора као што су пол, старост и хипоалбуминемија (458). Резултати епидемиолошке студије указују на то да инциденца нефротоксичности изазване цисплатином износи око 20-30% (459). Иако је ово нежељено дејство цисплатине добро познато, механизми нефротоксичности и даље нису у потпуности расветљени (347, 460, 461). Сматра се да цисплатина узрокује оштећења бубрега различитим механизмима, који укључују оксидативни стрес, апоптозу, инфламацију и фибриногенезу. Познато је да цисплатина у високој дози узрокује некрозу ћелија проксималних тубула, док у ниској дози изазива апоптотску смрт ћелија (462). Повећано стварање ROS (енгл. *Reactive oxygen species*) индуковано цисплатином за последицу има директно оштећење структуре тубула. Ово повећано стварање ROS под утицајем цисплатине је резултат активације глукозо-6-фосфат-дехидрогеназе (463), повећане интрацелуларне концентрације калцијума (464) и инхибиције активности ензима антиоксидационе заштите SOD (енгл. *superoxide dismutase*) и глутатион-пероксидазе (465, 466). Коначни исход оштећења тубула је бубрежна инсуфицијенција која се обично манифестује током друге недеље од примене лека. Уз то, висока или понављане ниске дозе цисплатине могу погоршати или узроковати иреверзибилну бубрежну инсуфицијенцију (467,468).

Поред тога што је забележен очигледан антитуморски ефекат, уочава се да се DE-EDCP у терапијској дози од 10mg/kg (укупно 10 доза) добро толерише *in vivo* у односу на цисплатину која је примењена у дози од 3mg/kg (укупно 9 доза) (Графикон 22 и 23). Регистровано је да DE-EDCP индукује значајно мањи губитак телесне масе у

односу на цисплатину. Другим речима, мишеви који су били подвргнути третману са цисплатином изгубили су око 22% своје телесне масе, за разлику од мишева третираних DE-EDCP код којих је губитак износио око 10% у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 22). Нефротоксичност ефективне терапијске дозе DE-EDCP је процењена одређивањем концентрације урее и креатинина у серуму. За разлику од цисплатине која је индуковала битан пораст, концентрација креатинина и урее је неизмењена након примене DE-EDCP у поређењу са нетретираним животињама (Графикон 23) што упућује на то да испитивано једињење не изазива оштећење бубрега. Овакво одсуство нефротоксичности може бити последица хемијске структуре DE-EDCP. Познато је да цисплатина, хемотерапеутик на бази метала, има ниску стопу излучивања и следствено се дуже задржава у организму, чиме постиже дуготрајне ефекте, а између осталог може да изазове и нефротоксичност (344-348). Међутим, фармакокинетичка својства DE-EDCP и даље нису позната. Претпоставља се да се DE-EDCP, због своје органске хемијске структуре, прогресивно не акумулира у ћелијама што резултује потенцијално мањим нежељеним ефектима. На основу добијених резултата може се закључити да DE-EDCP не индукује оштећење бубрега и да изазива мањи губитак телесне масе у односу на цисплатину што имплицира да је испитивано једињење релативно безбедно за системску примену.

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP остварује значајну антитуморску активност и то са минималним нежељеним реакцијама у поређењу са цисплатином. Туморицидна и антипролиферативна активност испитиване супстанце сугерише на могућност коришћења DE-EDCP у експерименталној терапији тумора.



## 6. Закључци

На основу анализе добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. DE-EDCP показује туморицидни потенцијал на све тестиране линије туморских ћелија: хуманог карцинома дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468), мишјег карцинома дојке (4T1) и мишјег меланома (B16-F10) и овакав потенцијал је сличан референтном хемотерапеутику
2. Мишеви третирани са DE-EDCP су релативно отпорни на прогресију карцинома дојке и меланома
3. Директно дејство DE-EDCP на туморске ћелије има највећи удео у антитуморској активности испитиване супстанце и огледа се у способности да индукује апоптозу и да инхибира прогресију ћелијског циклуса
4. DE-EDCP у туморским ћелијама смањује експресију антиапоптотског Bcl-2 и повећава експресију проапоптотског протеина Вах што следствено узрокује активацију ефекторске каспазе-3 и апоптозу
5. DE-EDCP повећава експресију p16, p21 и p27 и истовремено редукује експресију циклина D3 и Ki-67 у малигним ћелијама што за крајњу последицу има заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази
6. DE-EDCP редукује малигни потенцијал туморских ћелија тако што инхибира нисходну каскаду сигналног пута STAT3 која укључује SOX2 и NANOG
7. DE-EDCP успорава миграцију метастатских туморских ћелија
8. DE-EDCP стимулише механизме урођене имуности тако што подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност NK и NKT ћелија у туморској микросредини
9. DE-EDCP показује мању токсичност у односу на цисплатину

## 7. Скраћенице

Скраћеница	Појашњење
<b>AIF</b>	фактор индукције апоптозе (енгл. <i>Apoptosis inducing factor</i> )
<b>ALT</b>	аланин трансминаза (енгл. <i>Alanine transaminase</i> )
<b>AMP</b>	аденозин-монофосфат (енгл. <i>Adenosine monophosphate</i> )
<b>Araf-1</b>	активациони фактор апоптотских протеаза-1 (енгл. <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> )
<b>AST</b>	аспартат трансминаза (енгл. <i>Aspartate transaminase</i> )
<b>ATCC</b>	америчка колекција ћелијских култура (енгл. <i>American Type Culture Collection</i> )
<b>ATP</b>	аденозин-трифосфат (енгл. <i>Adenosine triphosphate</i> )
<b>BAX</b>	протеин X повезан са Bcl2 (енгл. <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
<b>Bcl-2</b>	B-ћелијски лимфом 2 (енгл. <i>B-cell lymphoma 2</i> )
<b>BCP</b>	<i>1-Bromo-3-chloropropane</i>
<b>BH3, BID</b>	проапоптотски протеин, члан Bcl2 фамилије (енгл. <i>BH3 interacting-domain death agonist</i> )
<b>BRCA</b>	тумор супресорски ген (енгл. <i>Breast cancer</i> )
<b>CDDP</b>	цисплатина (енгл. <i>cis-diamminedichloridoplatinum(II)</i> )
<b>Cdk</b>	циклин зависне киназе (енгл. <i>Cyclin dependent kinases</i> )
<b>CMA</b>	аутофагија посредована шеперонима (енгл. <i>Chaperone mediated autophagy</i> )
<b>CTR1</b>	транспортер бакра тип 1 (енгл. <i>Cooper transpoters type 1</i> )
<b>DAB</b>	<i>3, 3'-diaminobenzidine</i>
<b>DAMPs</b>	молекулски обрасци повезани са оштећењем ћелија (енгл. <i>Damage-associated molecular patterns</i> )
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DE-EDCP</b>	<i>O,O'</i> -диетил-( <i>S,S</i> )-етилендиамин- <i>N,N'</i> -ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид
<b>DMEM</b>	медијум за култивацију ћелија (енгл. <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> )
<b>DMSO</b>	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
<b>DNase</b>	деоксирибонуклеаза I (енгл. <i>Deoxyribonuclease I</i> )
<b>DNK</b> <b>ДНК</b>	деоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>EDDA</b>	етилендиамин- <i>N,N'</i> -диацетат (енгл. <i>ethylenediamine- N,N'-diacetic acid</i> )
<b>EDTA</b>	етилендиамино-тетрасирћетна киселина (енгл. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EndoG</b>	ендонуклеаза G (енгл. <i>Endonuclease G</i> )
<b>ER</b>	рецептор за естроген (енгл. <i>Estrogene receptor</i> )
<b>ERK</b>	екстрацелуларним сигналом регулисана киназа (енгл. <i>Extracellular signal regulated kinase</i> )
<b>FADD</b>	протеин са доменом смрти везан за FAS рецептор (енгл. <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> )
<b>FAS</b> <b>(CD95, FasR)</b>	рецептор смрти из породице рецептора за фактор некрозе тумора
<b>FasL</b>	лиганд за FAS
<b>FBS</b>	фетални говеђи серум (енгл. <i>Fetal bovine serum</i> )
<b>H&amp;E</b>	хематоксилин-еозин (енгл. <i>Hematoxylin-eosin</i> )
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	водоник-пероксид (енгл. <i>Hydrogen peroxide</i> )
<b>HER2</b>	хумани епидермални фактор раста-2 (енгл. <i>Human epidermal growth factor</i> )

	<i>receptor-2)</i>
<b>HMGB-1</b>	протеин високе мобилности групе B1 (енгл. <i>High mobility group box 1</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>The half maximal inhibitory concentration</i>
<b>ICAD</b>	инхибитор каспазом активиране DNазе (енгл. <i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i> )
<b>IFN-γ</b>	интерферон- γ (енгл. <i>Interferon-γ</i> )
<b>IGF1R</b>	рецептор за инсулину сличан фактор раста-1 (енгл. <i>Insulin-like growth factor-1</i> )
<b>IL</b>	интерлеукин (енгл. <i>Interleukin</i> )
<b>iRNK иPHK</b>	информациона рибонуклеинска киселина (енгл. <i>Messenger Ribonucleic acid (RNA)</i> )
<b>JAK</b>	JUN N-терминална киназа (енгл. <i>Janus kinase</i> )
<b>KLRG1</b>	инхибиторни рецептор (енгл. <i>Killer Cell Lectin-Like Receptor G1</i> )
<b>LDH</b>	лактат дехидрогеназа (енгл. <i>Lactate dehydrogenase</i> )
<b>MHC</b>	главни комплекс ткивне подударности (енгл. <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>MNNG</b>	<i>N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine</i>
<b>MOMP</b>	перемеабилитација спољашње митохондријалне мембране (енгл. <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> )
<b>mTOR</b>	<i>mamalian target of Rapamycin</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
<b>NANOG</b>	транскрипциони фактор (енгл. <i>Homeobox protein NANOG</i> )
<b>NK ћелије</b>	урођено убилачке ћелије (енгл. <i>Natural killer cells</i> )
<b>NKG2D</b>	активациони рецептор (енгл. <i>Natural Killer Group 2, Member D</i> )
<b>NKT ћелије</b>	урођено убилачке Т ћелије (енгл. <i>Natural killer T cells</i> )
<b>OD</b>	оптичка густина (енгл. <i>Optical density</i> )
<b>PBS</b>	фосфатни пуфер (енгл. <i>Phosphate-buffered saline</i> )
<b>PI</b>	пропидијум јодид (енгл. <i>Propidium iodide</i> )
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidyl Inositol 3 kinase</i>
<b>PR</b>	рецептор за прогестерон (енгл. <i>Progesterone receptor</i> )
<b>qRT-PCR</b>	метода квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. <i>Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>Rb</b>	протеин ретинобластома (енгл. <i>Retinoblastoma protein</i> )
<b>RIPK</b>	протеинска киназа везана за рецептор (енгл. <i>Receptor-interacting protein kinases</i> )
<b>RNK PHK</b>	рибонуклеинска киселина (енгл. <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>ROS</b>	реактивни медијатори кисеоника (енгл. <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>SD</b>	стандардна девијација (енгл. <i>Standard deviation</i> )
<b>SE</b>	стандардна грешка мерења (енгл. <i>Standard error of mean</i> )
<b>SOX2</b>	транскрипциони фактор (енгл. <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> )
<b>STAT3</b>	транскрипциони фактор (енгл. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> )
<b>TAMs</b>	макрофаги повезани са тумором (енгл. <i>Tumor-associated macrophages</i> )
<b>Th лимфоцити</b>	помагачки Т лимфоцити (енгл. <i>T helper</i> )
<b>TNF</b>	фактор некрозе тумора (енгл. <i>Tumor necrosis factor superfamily</i> )
<b>TRADD</b>	протеин са доменом смрти везан за TNFR1 (енгл. <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i> )
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>

## 8. Литература

1. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev* 1999; 99: 2201-3.
2. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2006; 1(1): 1-22.
3. Sadler PJ, Li H, Sun H. Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord Chem Rev* 1999; 185-186: 689-709.
4. Kaim, W, Schwederski, B. *Bioinorganic chemistry: Inorganic element in the chemistry of life*, Wiley: Stuttgart, 1993; 363-384.
5. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965; 205: 698-699.
6. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds - a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222: 385-386.
7. Sakurai H, Kojima Y, Yoshikawa Y, Kawabe K, Yasui H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord Chem Rev.* 2002; 226: 187-198.
8. Li H, Sun H. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16(1-2): 74-83.
9. Ali H, van Lier JE. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev.* 1999; 99: 2379-2450.
10. Louie AY, Meade TJ. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem Rev.* 1999; 99: 2711-2734.
11. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999; 99: 2269-2292.
12. Grunicke H, Doppler W, Helliger W, Hermann BJ, Hofmann J, Lindner H, Puschendorf B. Tumor biochemistry as basis for advances in tumor chemotherapy. *Arch Geschwulstforsch.* 1986; 56(3): 193-201.
13. Zhukova OS, Dobrynin IaV. Current results and perspectives of the use of human tumor cell lines for antitumor drug screening. *Vopr Onkol.* 2001; 47: 706-9.

14. Kauffman G. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev.* 2010; 54(4): 250.
15. Rosenberg B, Van Camp L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res.* 1970; 30: 1799-1802.
16. Kociba R, Sleight SD, Rosenberg B. Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cisdiamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep.* 1970; 54: 325-328.
17. Galanski M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1: 285-295.
18. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008; 6(1): 1-18.
19. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park).* 2009; 23(6): 488-496.
20. Ali I, Wani W, Saleem K, Haque A. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2013; 13: 296-306.
21. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7265-7279.
22. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2467-98.
23. Yang XL, Wang AH. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(3): 181-215.
24. Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev.* 2006; 106: 2224-2248
25. Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1806: 172-182.
26. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry.* 1985; 24(3): 707-713.

27. Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N7-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl](2+)-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(25): 5846-5851.
28. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 645-662.
29. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4): 307-2.
30. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52(12): 1855-1865.
31. Armand JP, Bolgie V, Raymond E, Fizazi K, Faivre S, Ducreux, M. Oxaliplatin in colorectal cancer: an overview. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 96-104.
32. Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin. Oncol.* 2002; 29: 11-20.
33. Alberto EM, Lucas MFA, Pavelka M, Russo N. The secondgeneration anticancer drug nedaplatin: a theoretical investigation on the hydrolysis mechanism. *J Phys Chem B.* 2009; 113: 14473-14479.
34. Van Meerten E, Eskens FA, van Gameren EC, Doorn L, van der Gaast A. First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase II study. *Br J Cancer.* 2007; 96: 1348–1352.
35. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 2075-2094.
36. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010; 39:8113-8127.
37. Nafees M, Zijian G. Metal-basd anticancer chemotherapeutic agents. *Current opinion in chemical biology.* 2014; 19: 144-153.

38. Hamilton G, Olszewski U. Picoplatin pharmacokinetics and chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Drug Evaluations*. 2013; 9 (10): 1381-1390.
39. Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues, Satraplatin and picoplatin. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2007; 16: 1009-1021.
40. Welink J, Boven E, Ver morken JB, Gall HE, Vijgh WJF. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clin. Cancer Res*. 1999; 5: 2349-2358.
41. Lee JW, Park JK, Lee SH, Kim SY, Cho YB, Kuh HJ. Antitumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*. 2006; 17: 377-384.
42. Petrelli F, Barni S, Bregni G, de Braud F, Di Cosimo S. Platinum salts in advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 160(3): 425-437.
43. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev*. 2004; 30(1): 53-81.
44. Chen X, Lu P, Wu Y, Wang DD, Zhou S, Yang SJ, Shen HY, Zhang XH, Zhao JH, Tang JH. MiRNAs-mediated cisplatin resistance in breast cancer. *Tumour Biol*. 2016; 37(10): 12905-12913.
45. McCutcheon S, Cardoso F. Challenges in optimizing care in advanced BC patients: results of an international survey linked to the ABC1 consensus conference. *Breast*. 2015; 24: 623-629.
46. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011; 16(Suppl 1): 61-70.
47. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5(1): 5-23.
48. Schnitt J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010; 23: 6-4.

49. Geyer C, Rodrigues N, Weigelt B, Reis-Filho S. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19: 39-53.
50. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009; 11: S11.
51. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360: 790-800.
52. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol*. 2008; 61(5): 553-60.
53. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(8): 1275-81.
54. Harris EER. Precision Medicine for Breast Cancer: The Paths to Truly Individualized Diagnosis and Treatment. *Int J Breast Cancer*. 2018; 2018: 4809183.
55. Porter K, Rosenzweig MQ. Current and Emerging Therapies for HER2-Positive Women With Metastatic Breast Cancer. *J Adv Pract Oncol*. 2017; 8(2):164-168.
56. Kolaric K, Roth A. Phase II clinical trial of cis-dichlorodiammine platinum (cis-DDP) for antitumorogenic activity in previously untreated patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1983; 11: 108-112.
57. Sledge Jr GW, Loehrer PJ, Sr BJ, Roth LH. Cisplatin as firstline therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1988; 6: 1811-1814.
58. Yap HY, Salem P, Hortobagyi GN, Bodey GP Sr, Buzdar AU, Tashima CK, Blumenschein GR. Phase II study of cis-dichlorodi - a mineplatinum(ii) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rep*. 1978; 62: 405-408.
59. Ostrow S, Egorin M, Aisner J, Bachur N, Wiernik PH. High-dose cis-diamminedichloro-platinum therapy in patients with advanced breast cancer: pharmacokinetics, toxicity, and therapeutic efficacy. *Cancer Clin Trials*. 1980; 3: 23-27.
60. Forastiere AA, Hakes TB, Wittes JT, Wittes RE. Cisplatin in the treatment of metastatic breast carcinoma: a prospective randomized trial of two dosage schedules. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 243-247.



61. Martino S, Samal BA, Singhakowinta A, Yoshida S, Mackenzie M, Jain J, Vaitkevicius VK: A phase II study of cis-diamminedichloroplatinum II for advanced breast cancer. Two dose schedules. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1984; 108: 354-356.
62. Bajorin D, Bosl GJ, Fein R. Phase I trial of escalating doses of cisplatin in hypertonic saline. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 1589-1593.
63. Ramnath N, LoRusso P, Simon M, Martino S. Phase II evaluation of cisplatin and WR2721 for refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 1997; 20: 368-372.
64. Shamseddine AI, Farhat FS. Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer. *Chemotherapy.* 2011; 57(6): 468-487.
65. Frasci G, Comella P, D'Aiuto G, Budillon A, Barbarulo D, Thomas R, Capasso I, Casaretti R, Daponte A, Caponigro F, Gravina A, Maiorino L, Carateni G, Gentile A, Comella G. Weekly paclitaxel-cisplatin administration with G-CSF support in advanced breast cancer. A phase II study. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49: 13-26.
66. Hsu C, Huang CS, Chao TY, Lu YS, Bu CF, Chen MM, Chang KJ, Cheng AL. Phase II trial combining paclitaxel with 24-hour infusion cisplatin for chemotherapy-naive patients with locally advanced or metastatic breast carcinoma. *Cancer.* 2002; 95: 2044-2050.
67. Maiche AG, Jekunen AP, Kaleva-Kerola J, Blanco Sequeiros G. High response rate with a lower dose of paclitaxel in combination with cisplatin in heavily pretreated patients with advanced breast carcinoma. *Cancer.* 2000; 88: 1863-1868.
68. Rosati G, Riccardi F, Tucci A, De Rosa P, Pacilio G. A phase II study of paclitaxel/cisplatin combination in patients with metastatic breast cancer refractory to anthracyclinebased chemotherapy. *Tumori.* 2000; 86: 207-210.
69. Ray-Coquard I, Biron P, Bachelot T, Guastalla JP, Catimel G, Merrouche Y, Droz JP, Chauvin F, Blay JY. Vinorelbine and cisplatin (CIVIC regimen) for the treatment of metastatic breast carcinoma after failure of anthracycline- and/or paclitaxel-containing regimens. *Cancer.* 1998; 82: 134-140.
70. Shamseddine AI, Taher A, Dabaja B, Dandashi A, Salem Z, El Saghir NS. Combination cisplatin-vinorelbine for relapsed and chemotherapy-pretreated metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 1999; 22: 298-302.

71. Gunel N, Akcali Z, Yamac D, Onuk E, Yilmaz E, Bayram O, Tekin E, Coskun U. Cisplatin plus vinorelbine as a salvage regimen in refractory breast cancer. *Tumori*. 2000; 86: 283-285.
72. Remick SC, Chmura M, Bromberg C, Sporn J, Healey B, Hilstro J, DeConti RC, Horton J, Ruckdeschel JC, Harper GR: Concurrent 72- hour continuous infusion of etoposide and cisplatin in metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1996; 19: 125-131.
73. Fried G, Stein ME, Haim N. Clinical activity of cisplatin and prolonged oral administration of etoposide in previously treated, anthracycline- resistant, metastatic breast cancer patients: a phase II study. *Med Pediatr Oncol*. 2000; 34: 10-13.
74. Braybrooke JP, Levitt NC, Joel S, Davis T, Madhusudan S, Turley H, Wilner S, Harris AL, Talbot DC. Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase IIalpha expression. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 4682-4688.
75. Icli F, Akbulut H, Uner A, Yalcin B, Baltali E, Altinbas M, Coskun S, Komurcu S, Erkisi M, Demirkazik A, Senler FC, Sencan O, Buyukcelik A, Boruban C, Onur H, Zengin N, Sak SD. Cisplatin plus oral etoposide (EoP) combination is more effective than paclitaxel in patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines: a randomized phase III trial of Turkish Oncology Group. *Br J Cancer*. 2005; 92: 639-644.
76. Deltetto F, Durando A, Camanni M, Pesola D, Sberveglieri M, Arese P, Massobrio M. Carboplatin plus etoposide regimen in advanced breast cancer. A phase II study. *Eur J Gynaecol Oncol*. 1997; 18: 185-187.
77. van der Gaast A, Bontenbal M, Planting AS, Kok TC, Splinter TA. Phase II study of carboplatin and etoposide as a first line regimen in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 1994; 5: 858-860.
78. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 1994; 9: 1829-1838.
79. Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC, Lopez- Larraza DM, Shawver LK, Hurd SD, Stewart SJ. p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human

- breast carcinoma cells: Association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res.* 1994; 54: 3758-3765.
80. Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (herceptin). *Semin Oncol.* 2001; 28: 1-12.
  81. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364: 205-214.
  82. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 2010; 376: 235-244.
  83. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 17079–17084.
  84. Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, Holstege H, Liu X, van Drunen E, Beverloo HB, Smith GC, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Jonkers J. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 3916-3925.
  85. Yang J, Manson DK, Marr BP, Carvajal RD. Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Ther Adv Med Oncol.* 2018; 10: 1758834018757175.
  86. Singh S, Zafar A, Khan S, Naseem I. Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. *Life Sci.* 2017; 174: 50-58.
  87. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23: 746-759.
  88. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969; 29(3):705-727.

89. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23(31): 8048-8056.
90. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(24): 1893-1904.
91. Abramova L, Slingluff CL Jr, Patterson JW. Problems in the interpretation of apparent "radial growth phase" malignant melanomas that metastasize. *J Cutan Pathol.* 2002; 29(7): 407-414.
92. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635-3648.
93. Glover D, Glick JH, Weiler C, Fox K, Guerry D. WR-2721 and high-dose cisplatin: An active combination in the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 574-578.
94. Evans LM, Casper ES, Rosenbluth R. Phase II trial of carboplatin in advanced malignant melanoma. *Cancer Treat Rep.* 1987; 71: 171-172.
95. Rao RD, Holtan SG, Ingle JN, Croghan GA, Kottschade LA, Creagan ET, Kaur JS, Pitot HC, Markovic SN. Combination of paclitaxel and carboplatin as second-line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer.* 2006; 106: 375-382.
96. Del Prete SA, Maurer LH, O'Donnell J, Forcier RJ, LeMarbre P. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat Rep.* 1984; 68: 1403-1405.
97. Lattanzi SC, Tosteson T, Chertoff J, Maurer LH, O'Donnell J, LeMarbre PJ, Mott L, DelPrete SA, Forcier RJ, Ernstoff MS. Dacarbazine, cisplatin and carmustine, with or without tamoxifen, for metastatic melanoma: 5-year follow-up. *Melanoma Res.* 1995; 5: 365-369.

98. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2745-2751.
99. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer.* 1989; 64:2024-2029.
100. Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC, Papadopoulos N. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol.* 1996; 7: 827-835.
101. Melino G. The Sirens' song. *Nature.* 2001; 412(6842): 23.
102. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005; 12 (Suppl 2): 1463-1467.
103. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differ.* 2009; 16(1): 3-11.
104. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 37-4.
105. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006; 20(1): 1-15.
106. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 1371-1387.
107. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Schon CA, Marquis RW, Bertin J, Mocarski ES. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem.* 2013; 288(43): 31268-31279.

108. He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(50):20054-20059.
109. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000; 1: 489-495.
110. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005; 1: 112-119.
111. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 313-321.
112. Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, Vandenabeele P. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ*. 2002; 9: 981-994.
113. Ohgoh M, Shimizu H, Ogura H, Nishizawa Y. Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem*. 2000; 75(3): 925-933.
114. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 931-933.
115. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett*. 2005; 579(15): 3287-3296.
116. Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med*. 2008; 8: 207-220.
117. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev*. 2007; 87: 99-163.
118. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257.

119. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3-11.
120. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 1995; 5(1): 21-26.
121. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death & Differentiation.* 2012; 19(5): 735-742.
122. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000; 157(5): 1415-1430.
123. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009; 284(33): 21777-21781.
124. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 1): 1-9.
125. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012; 45(6): 487-498
126. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
127. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995; 82(3): 349-352.
128. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005; 54(7): 1024-1033.
129. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology.* 2013; 87(7): 1157-1180.
130. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology.* 2013; 14(1): 32.

131. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2015; 1219: 1-9.
132. Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol.* 2003; 15(3): 167-176.
133. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
134. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10): 735-747.
135. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004; 167(3): 457-468.
136. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998; 391(6662): 96-99.
137. Jacquemin G, Margiotta D, Kasahara A, Bassoy EY, Walch M, Thiery J, Lieberman J, Martinvalet D. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death Differ.* 2015; 22(5): 862-874.
138. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(6): 401-409.
139. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007; 26(9): 1324-1337.
140. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(1): C45-51.
141. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem.* 2014; 115: 632-640.
142. Yoshihide T, Shigeomi S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis.* 2007; 12: 835-840.
143. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007; 21(22): 2861-2873.
144. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 1): 7-18.



145. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(12): 2420-2434.
146. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy.* 2008; 4(4): 510-512.
147. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(9): 1516-1523.
148. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008; 4: 313-332.
149. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 1153-1162.
150. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* 2007; 131: 966-979.
151. Le Bot N. Entosis: cell death by invasion. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 1346.
152. Grossmann J. Molecular mechanisms of 'detachment-induced apoptosis Anoikis' Apoptosis. 2002; 7: 247-260.
153. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 552-556.
154. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 14376-14381.
155. Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol.* 2000; 38: 31-40.
156. Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe.* 2007; 2: 147-159.
157. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 295-312.

158. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transition. *Journal of Cell Science*. 2012; 125: 4703-4711.
159. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 1995; 11: 211-219.
160. Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell*. 1998; 9(9): 2545-2560.
161. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12):1501-1512,
162. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23(36): 9408-9421.
163. Pardee AB. A restriction point control for normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71: 1286-1290.
164. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1: 222-231.
165. Elledge SJ, Harper JW. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1377: M61-M70.
166. Ford HL, Pardee AB. The S-phase: Beginning, middle, and end—A perspective. *J Cell Biochem*. 1998; 30(suppl 31): 1-7.
167. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG Jr, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*. 1994; 78(1):161-172.
168. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnicka-Worms H. Cyclin A/Cdk2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 8420-8431.
169. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene*. 1995; 10(2): 229-236.

170. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003; 36(3): 165-175.
171. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggregates accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(46): 27986-28000.
172. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14(5): 297-306.
173. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(11): 785-797.
174. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16(3): 311-321.
175. Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 4344-4349.
176. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Gelman IH, Sudol M, eds. *Genes & Cancer*. 2010; 1(11): 1124-1131.
177. Socinski MA. Cytotoxic chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: A review of standard treatment paradigms. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 4210-4214.
178. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006; 444: 633-637.
179. Alimbetov D, Askarova S, Umbayev B, Davis T, Kipling D. Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6): pii: E1690.
180. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461: 1071-1078.

181. Silverman AP, Bu W, Cohen SM, Lippard SJ. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(amine)(cyclohexylamine)]<sup>2+</sup> bound to a dodecamer DNA duplex. *J Biol Chem.* 2002; 277(51): 49743-49749.
182. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 150845.
183. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer.* 2015; 112: 957-962.
184. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55(3):178-194.
185. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(6): 401-410.
186. Rosato RR, Almenara JA, Kolla SS, Maggio SC, Coe S, Giménez MS, Dent P, Grant S. Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interaction. *Molecular Cancer Therapy* 2007; 6: 692- 702.
187. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 20): 4077-4085.
188. Hoe KK, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 217-236.
189. Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Mol Oncol.* 2013; 7(3): 334-345.
190. Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, Hughes D, Kleinerman ES. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. *Cancer Res.* 2012; 72: 908-916.
191. Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, Jiang X, He C, Hyjek E, Zhang J. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun.* 2012; 2: 688.

192. Shaffiey F, Cross E, Sathyanarayana P. Mir-590 is a novel STAT5 regulated oncogenic miRNA and targets FasL in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013; 122: 3811-3811.
193. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(4): 603-619.
194. Banerji V, Gibson SB. Targeting metabolism and autophagy in the context of haematologic malignancies. *Int J Cell Biol*. 2012; 2012: 595976.
195. Ishdorj G, Li L, Gibson SB. Regulation of autophagy in hematological malignancies: role of reactive oxygen species. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53: 26-33.
196. Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, van Rooyen J, Engelbrecht AM. Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237: 219-226.
197. Sun WL, Chen J, Wang YP, Zheng H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy*. 2011; 7: 1035-1044.
198. Di X, Shiu RP, Newsham IF, Gewirtz DA. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77: 1139-1150.
199. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*. 2004; 18(11): 1272-1282.
200. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Harkonen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis*. 2005; 10(6): 1395-1410.
201. Zheng A, Kallio A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signalregulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology*. 2007; 148(6): 2764-2777.
202. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of noncanonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15(8): 1318-1329.

203. Li L, Han W, Gu Y, Qiu S, Lu Q, Jin J, Luo J, Hu X. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res.* 2007; 67(10): 4894-4903.
204. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, Luo J, Hu X. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(5): 1641-1649.
205. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(5): 1552-1564.
206. Malhotra V, Perry MC. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther.* 2003; 2(4 Suppl 1) :S2-4.
207. Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM. Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J Cell Biochem.* 1994; 54(4): 440-452.
208. Oronsky BT, Reid T, Knox SJ, Scicinski JJ. The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology.* 2012; 5(4): 226-229.
209. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM, Collina S. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018; 28(17): 2816-2826.
210. Zehnder A, Graham J, Antonissen G. Update on Cancer Treatment in Exotics. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2018; 21(2): 465-509.
211. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science.* 1994; 266: 1821-1828.
212. Harper J, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6: 56-64.
213. Shahjehan WA, Laird P, DeMeester T. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Ann Surg.* 2001; 234:10-20.
214. Sutherland R, Musgrove E. Cyclin D1 and mammary carcinoma: New insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res.* 2002; 4:14-17.

215. Buckley M, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove EA, Sutherland RL. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*. 1993; 8: 2127-2133.
216. Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ. Potent inhibition of cdc2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 201: 589-595.
217. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56 (13): 2973-2978.
218. Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia cell lines. *Blood*. 1997; 90:4307-4312.
219. Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, Flinn IW, Diehl LF, Sausville E, Grever MR. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence of functional p53. *Blood*. 1998; 92(10): 3804-3816.
220. Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res*. 1999; 59(18): 4634-4641.
221. Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C. A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer*. 2007; 96(1): 29-37.
222. Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS. Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene*. 2004; 23(2): 446-456.
223. Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. Phase I evaluation

- of seliciclib (*R*-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer*. 2010; 46(18): 3243-3250.
224. Dhillon S. Palbociclib: first global approval. *Drugs*. 2015; 75(5): 543-551.
225. Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, Chakraborty A, Matano A, Dobson JR, Crystal AS, Parasuraman S, Shapiro GI. A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(23) :5696-5705.
226. Sanchez-Martinez C, Gelbert LM, Shannon H, De Dios A, Staton BA, Ajamie RT, Sawada G, Wishart G, Raub T. Abstract B234: LY2835219, A potent oral inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) that crosses the blood-brain barrier and demonstrates in vivo activity against intracranial human brain tumor xenografts. International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics; 2011 Nov 12-16; San Francisco, CA. Philadelphia (PA): AACR; *Mol Cancer Ther* 2011; 10(11 Suppl): Abstract nr B234.
227. Takahashi I, Saitoh Y, Yoshida M. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C: Purification, physico-chemical properties, structural determination and biological activities. *J Antibiot*. 1989; 42(4): 571-576.
228. Asiedu C, Biggs J, Lilly M, Kraft AS. Inhibition of leukemic cell growth by the protein kinase C activator bryostatin-1 correlates with the dephosphorylation of cyclin-dependent kinase 2. *Cancer Res*. 1995; 55(17): 3716-3720.
229. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(1): 24-37.
230. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1137-1146.
231. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11): 991-998.
232. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Res*. 2006; 66(11): 5527-5536.
233. Hanahan, D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012; 21(3): 309-322.



234. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23(11): 549-555.
235. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451-483.
236. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5): 1065-1073.
237. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5): 1105-1109.
238. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56(20): 4625-4629.
239. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7(5): 704-710.
240. Vujanovic NL, Basse P, Herberman RB and Whiteside TL. Antitumor Functions of Natural Killer Cells and Control of Metastases. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1996; 9: 394-408.
241. Cooper, MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22(11): 633-640.
242. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 2002; 32(2): 1205-1211.
243. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 2008; 9(5): 495-502.
244. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology.* 2009; 126(4): 449-457.
245. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo A, Fremont D, Yokoyama W.

- Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. PNAS. 2002; 99(13): 8826-8831.
246. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science. 1994; 265(5171): 528-530.
247. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. Embo J. 1995; 14(22): 5579-5588.
248. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. J Cell Physiol. 2003; 195(3): 346-355.
249. Roda JM, Parihar R, Carson WE, III. CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. J Immunol. 2005; 175(3):1619-1627.
250. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. Science. 1995; 268(5212): 863-865.
251. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol. 2007; 25: 297-336.
252. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. J Immunol. 1999; 163(9): 4647-4650.
253. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- $\gamma$  Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. J Immunol. 2007; 178(9): 5899-5911.
254. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, Bossi G, Salio M, Denkberg G, Reddington F, Tarlton A, Reddy BG, Schmidt RR, Reiter Y, Griffiths GM, van der Merwe PA, Besra GS, Jones EY, Batista FD, Cerundolo V. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. J Exp Med. 2007; 204(5): 1131-1144.
255. Teng MWL, Westwood JA, Darcy PK, Sharkey J, Tsuji M, Franck RW, Porcelli SA, Besra GS, Takeda K, Yagita H, Kershaw MH, Smyth MJ. Combined natural killer T-

- cell based immunotherapy eradicates established tumors in mice. *Cancer Res.* 2007; 67(15): 7495-7504.
256. Hayakawa Y, Rovero S, Forni G, Smyth MJ.  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *PNAS.* 2003; 100(16): 9464-9469.
257. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest.* 2006; 86(3): 231-245.
258. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133(5): 775-787.
259. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7): 490-500.
260. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016; 28(8): 401-409.
261. Togashi Y, Nishikawa H. Regulatory T cells: molecular and cellular basis for immunoregulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017; 410: 3-27.
262. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N. TGF- $\beta$  1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004; 172(2): 834-842.
263. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 2003; 63(15): 4516-4520.
264. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 172(8): 4676-4680.
265. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer.* 2005; 5(4): 263-274.
266. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* 2005; 65(8): 3437-3446.
267. Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2018; 1417(1): 104-115.

268. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T-cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(5): 641-648.
269. Liu P, Jaffar J, Hellstrom I, Hellstrom KE. Administration of cyclophosphamide changes the immune profile of tumor-bearing mice. *J Immunother.* 2010; 33(1): 53-59.
270. Doloff JC, Waxman DJ. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res.* 2012; 72(5): 1103-1115.
271. Khallouf H, Marten A, Serba S, Teichgraber V, Buchler MW, Jager D, Schmidt J. 5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. *J Immunother.* 2012; 35(3): 245-253.
272. Riccardi C, Santoni A, Barliozzari T, Pucceti P, Herberman RB. In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int. J. Cancer* 1980; 25(4): 475-486.
273. Wiltrout RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM Jr, Talmadge JE. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol.* 1985; 134(6): 4267-4275.
274. Gorelik E, Wiltrout RH, Okumura K, Habu S, Herberman RB. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* 1982; 30(1): 107-112.
275. Hanna N, Burton RC. Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo. *J Immunol.* 1981; 127(5): 1754-1758.
276. Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Zemelka M, Ptak W. Influence of cyclophosphamide and its metabolic products on the activity of peritoneal macrophages in mice. *Pharmacol Rep.* 2009; 61(3): 550-557.
277. Buhtoiarov IN, Sondel PM, Wigginton JM, Buhtoiarova TN, Yanke EM, Mahvi DA, Rakhmilevich AL. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. *Immunology.* 2011; 132(2): 226-239.

278. Potapov SL, Korman DB, Shamaev VI, Ershova RB, Makarov OV. Sensitivity of clonogenic cells of human ovarian ascitic cancer to antitumor drugs. *Arch Geschwulstforsch.* 1988; 58(2): 99-104.
279. Park S, Kang S, Chen X, Kim EJ, Kim J, Kim N, Kim J, Jin MM. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials.* 2013; 34(2): 598-605.
280. Javeed A, Ashraf M, Riaz A, Ghafoor A, Afzal S, Mukhtar MM. Paclitaxel and immune system. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 38(4): 283-290.
281. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher W, Wadhvani N, Keil S, Junaid S, Rugo H, Hwang ES, Jirström K, West B, Coussens L. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011; 1: 54-67.
282. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, Bell-McGuinn KM, Zabor EC, Brogi E, Joyce JA. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* 2011; 25(23): 2465-2479.
283. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood.* 1994; 84(7): 2221-2228.
284. Wijayahadi N, Haron MR, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother.* 2007; 19(6): 716-723.
285. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 2002; 62(8): 2353-2358.
286. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(18): 6713-6721.
287. Shebzukhov YV, Koroleva EP, Khlgatian SV, Lagarkova MA, Meshcheryakov AA, Lichinitser MR, Karbach J, Jager E, Kuprash DV, Nedospasov SA. Humoral immune response to thymidylate synthase in colon cancer patients after 5-FU chemotherapy. *Immunol Lett.* 2005; 100(1): 88-93.

288. Kim JE, Jang MJ, Lee JI, Chung YH, Jeong JH, Hung CF, Kim D.. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4+ T-cells in peritoneal space. *J Immunother.* 2012; 35(1): 1-13.
289. Chang CL, Hsu YT, Wu CC, Lai YZ, Wang C, Yang YC, Wu TC, Hung CF. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res.* 2013; 73(1): 119-127.
290. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T-cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010; 70(8): 3052-3061.
291. Predina JD, Judy B, Aliperti LA, Fridlender ZG, Blouin A, Kapoor V, Laguna B, Nakagawa H, Rustgi AK, Aguilar L, Aguilar-Cordova E, Albelda SM, Singhal S. Neoadjuvant *in situ* gene-mediated cytotoxic immunotherapy improves postoperative outcomes in novel syngeneic esophageal carcinoma models. *Cancer Gene Ther.* 2011; 18(12): 871-883.
292. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011; 71(14): 4809-4820.
293. Zhang L, Dermawan K, Jin M, Liu R, Zheng H, Xu L, Zhang Y, Cai Y, Chu Y, Xiong S. Differential impairment of regulatory T-cells rather than effector T-cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol.* 2008; 129(2): 219-229.
294. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res.* 2007;13 (2 Pt 1):644-653.
295. Moschella F, Valentini M, Arico E, Macchia I, Sestili P, D'Urso MT, Alessandri C, Belardelli F, Proietti E. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide. *Cancer Res.* 2011; 71(10): 3528-3539.

296. Liu CH. Some Homo- and Heteropolynuclear Chelates. *Inorg. Chem.* 1964; 3(5): 678-680
297. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of  $[PtL_4Cl_2] \cdot H_2O$  where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem.* 2001; 83(2-3): 91-100.
298. Lazic JM, Vucicevic L, Grguric-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem.* 2010; 5(6): 881-889.
299. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S. Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: Comparison of the representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(2): 262-271.
300. Misirlic-Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovic U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, Markovic I. Cyclohexyl Analogues of Ethylenediamine Dipropanoic Acid Induce Caspase-Independent Mitochondrial Apoptosis in Human Leukemic Cells. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(4): 931-939.
301. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 285(5): 1377-1383.
302. Carlsson G, Ekelund E, Stigsson L, Hafstrom L. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann Chir Gynaecol.* 1983; 72(4): 187-191.
303. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(4): 215.
304. Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol.* 1973; 242(118): 148-149.

305. Hill RP, Ling V. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science*. 1984; 224(4652):998-1001.
306. Fitzpatrick FA, Stringfellow DA. Prostaglandin D2 formation by malignant melanoma cells correlates inversely with cellular metastatic potential. *PNAS*. 1979; 76(4): 1765-1769.
307. Cillo C, Dick JE, Ling V, Hill RP. Generation of drug-resistant variants in metastatic B16 mouse melanoma cell lines. *Cancer Res*. 1987; 47(10): 2604-2626.
308. Nikolic M, Mijajlovic M, Jevtic V, Ratković Z, Novakovic S, Bogdanovic G, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2016; 1116: 264-271.
309. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, Arsenijevic N, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic V. In vitro and in vivo anti-tumor effects of selected platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2017; 22(6): 807-817.
310. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016; 2016(7): pdb.prot087163.
311. Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1998; 217(1-2): 61-70.
312. Jiang Q, Pan Y, Cheng Y, Li H, Liu D, Li H. Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Oncol Rep*. 2016; 36(1): 253-262.
313. Xu L, Deng X. Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem*. 2006; 281(7): 4457-4466.
314. Valaee S, Yaghoobi MM, Shamsara M. Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174486



315. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38610-38618.
316. Karimian H, Mohan S, Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Razavi M, Arya A, Kamalidehghan B, Ali HM, Noordin MI. *Tanacetum polycephalum* (L.) schultz-bip. Induces mitochondrial-mediated apoptosis and inhibits migration and invasion in MCF7 cells. *Molecules.* 2014; 19:9478-950.
317. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.
318. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7(14): 18106-18115.
319. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, Muratore A, Bartolini A, Barone V, Ribero D, Monti M, Bovino P, Sun J, Giavazzi R, Asioli S, Cassoni P, Capussotti L, Pucci P, Bugatti A, Rusnati M, Pasqualini R, Arap W, Bussolino F. A complex of  $\alpha 6$  integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. *EMBO Mol Med.* 2012; 4(11): 1156-1175.
320. Sznajder JJ. Retraction: Inhibition of nonneuronal  $\alpha 7$ -nicotinic receptor for lung cancer treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(11): 1456.
321. Xue M, Ge Y, Zhang J, Wang Q, Hou L, Liu Y, Sun L, Li Q. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS One* 2012; 7(8): e43483.
322. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 2006; 108: 327-334.
323. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 2011; 41(7): 1902-1912.
324. Dewan MZ, Terunuma H, Ahmed S, Ohba K, Takada M, Tanaka Y, Toi M, Yamamoto N. Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother.* 2005; 59 (Suppl 2): S375-379.

325. Sabo T, Grguric-Sipka S, Trifunovic S. Transition metal complexes with edda-type ligands-a review. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. 2002; 32: 1661-1717.
326. Pantelić N, Stanojković TP, Zmejkovski BB, Sabo T, Kaludjerovic G. In vitro anticancer activity of gold(III) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid. *Eur J Med Chem*. 2015; 90: 766-774.
327. Pantelić N, Zmejkovski BB, Trifunović-Macedoljan J, Savić A, Stanković D, Damjanović A, Juranić Z, Kaluđerović GN, Sabo TJ. Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem*. 2013; 128: 146-153.
328. Kaluđerović GN, Mijatović SA, Zmejkovski BB, Bulatović MZ, Gómez-Ruiz S, Mojić MK, Steinborn D, Miljković DM, Schmidt H, Stošić-Grujičić SD, Sabo TJ, Maksimović-Ivanić DD. Platinum(II/IV) complexes containing ethylenediamine-N,N'-di-2/3-propionate ester ligands induced caspase-dependent apoptosis in cisplatin-resistant colon cancer cells. *Metallomics*. 2012; 4(9): 979-987.
329. Vujić JM, Cvijović M, Kaluderović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, Volarević V, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR. Palladium(II) complexes with R(2)edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Eur J Med Chem*. 2010; 45(9): 3601-3606.
330. Mojić M, Savić A, Arion V, Bulatovic M, Poljarevic J, Miljkovic Dj, Sabo T, Mijatovic S, Maksimovic D, Grguric Sipka S. Synthesis, X-ray structure and strong in vitro cytotoxicity of novel organoruthenium complexes. *J Organomet. Chem*. 2014; 749: 142-149.
331. Savic A, Filipovic L, Arandjelovic S, Dojcinovic B, Radulovic S, Sabo TJ, Grguric-Sipka S. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes. *Eur J Med Chem*. 2014; 82: 372-384.
332. Romero-Canelón I, Sadler PJ. Next generation metal anticancer complexes: Multi-targeting via redox modulation. *Inorg Chem*. 2013; 5(2): 12276-12291.

333. Mihajlović Lj, Savić A, Poljarević J, Vučković I, Mojić M, Bulatović M, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluđerović GN, Stošić-Grujičić S, Miljković Đ, Grgurić-Šipka S, Sabo TJ. Novel methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-N,N'-diacetate ligands and their platinum(IV) complexes. Influence on biological activity. *J Inorg Biochem.* 2012; 109: 40-48.
334. Miljković Dj, Poljarević J, Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Nikolić I, Saksida T, Stošić-Grujičić S, Grgurić-Šipka S, Sabo TJ. Novel octahedral Pt(IV) complex with di-n-propyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate ligand exerts potent immunomodulatory effects. *Eur J Med Chem.* 2011; 47(1): 194-201.
335. Grossman D, Altieri DC. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* 2001; 20(1-2): 3-11.
336. Isakovic AM, Petricevic SM, Ristic SM, Popadic DM, Kravic-Stevovic TK, Zogovic NS, Poljarevic JM, Zivanovic Radnic TV, Sabo TJ, Isakovic AJ, Markovic ID, Trajkovic VS, Misirlic-Dencic ST. In vitro and in vivo antimelanoma effect of ethyl ester cyclohexyl analog of ethylenediamine dipropanoic acid. *Melanoma Res.* 2018; 28(1): 8-20.
337. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006; 160(2): 171-177.
338. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* 2008; 8: 8.
339. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001; 59(4): 657-663.
340. Del Bello B, Toscano M, Moretti D, Maellaro E. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. *PLoS One.* 2013; 8(2):e57236.
341. Chen J, Zhang L, Zhou H, Wang W, Luo Y, Yang H, Yi H. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells. *Mol Med Rep.* 2018; 17(5): 6859-6865.

342. Pérez JM, Montero EI, González AM, Alvarez-Valdés A, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Apoptosis induction and inhibition of H-ras overexpression by novel trans-[PtCl<sub>2</sub>(isopropylamine)(amine')] complexes. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1-2): 37-42.
343. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87-108.
344. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(8-9): 1229-1235.
345. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep.* 2003; 10(6): 1663-1682.
346. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364-378.
347. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010; 2(11): 2490-2518.
348. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003; 23(5): 460-464.
349. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life.* 2014; 7(4): 572-576.
350. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(4): 277-288.
351. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13(10): 714-726.
352. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005; 205(2): 275-292.
353. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell.* 2010; 37(3): 299-310.
354. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011; 351(1-2) :41-58.
355. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene.* 2004; 23(16): 2850-2860.

356. Bouchalova K, Kharraishvili G, Bouchal J, Vrbkova J, Megova M, Hlobilkova A. Triple negative breast cancer: BCL2 in prognosis and prediction. Review. *Curr Drug Targets* 2014; 15: 1166-1175.
357. Leung LK, Wang TT. Paradoxical regulation of Bcl-2 family proteins by 17beta-oestradiol in human breast cancer cells MCF-7. *Br J Cancer*. 1999; 81: 387-392.
358. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Prognostic significance of Bcl-2 expression in non-basal triple-negative breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014; 35: 12255-12263.
359. Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT.. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1364-1374.
360. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1995; 55(19): 4471-4478.
361. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, Dietel M, Guski H, Feller A, Royer HD, Dörken B. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest*. 1996; 97(11): 2651-2659.
362. Tiwari P, Khan MJ. Molecular and Computational Studies on Apoptotic Pathway Regulator, Bcl-2 Gene from Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Indian J Pharm Sci*. 2016; 78(1): 87-93.
363. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015; 22(4): 526-539.
364. Zhao Y, Jing Z, Li Y, Mao W. Berberine in combination with cisplatin suppresses breast cancer cell growth through induction of DNA breaks and caspase-3-dependent apoptosis. *Oncol Rep*. 2016; 36(1): 567-572.
365. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6(2): 99-104.

366. Sun D, Urrabaz R, Buzello C, Nguyen M. Effects of cisplatin on expression of DNA ligases in MiaPaCa human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298: 537-544.
367. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61(3): 1029-1037.
368. Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(3): 139-145.
369. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 2001; 98(9): 2603-2614.
370. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995; 9(10): 1149-1163.
371. Hsiao CJ, Hsiao G, Chen WL, Wang SW, Chiang CP, Liu LY, Guh JH, Lee TH, Chung CL. Cephalochromin induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small-cell lung cancer cells by inflicting mitochondrial disruption. *J Nat Prod.* 2014; 77(4): 758-765.
372. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep.* 2013; 8(4): 279-285.
373. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-322.
374. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4): 1710-1715.
375. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med* 2016; 13(4): 496-504.
376. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol Med Rep.* 2015; 11(3): 1566-1572.

377. Green WJ, Ball G, Hulman G, Johnson C, Van Schalwyk G, Ratan HL, Soria D, Garibaldi JM, Parkinson R, Hulman J, Rees R, Powe DG. KI67 and DLX2 predict increased risk of metastasis formation in prostate cancer-a targeted molecular approach. *Br J Cancer*. 2016; 115(2): 236-242.
378. Cabrera-Galeana P, Muñoz-Montaña W, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, Pérez-Sánchez V, Villarreal-Garza C, Quintero RM, Porrás-Reyes F, Bargallo-Rocha E, Del Carmen I, Mohar A, Arrieta O. Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy. *Oncologist*. 2018 Feb 28. pii: theoncologist.2017-0396.
379. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*. 2017; 77(10): 2722-2734.
380. Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, Rasheed ZA, Hicks J, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, Mohseni M, Beaver JA, Chu D, Cravero K, Christenson ES, Medford A, Mattox A, De Marzo AM, Argani P, Chawla A, Hurley PJ, Lauring J, Park BH. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*. 2016; 7(5): 6281-6293.
381. Friedman R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget*. 2016; 7(11): 11746-11755.
382. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*. 2014; 15(6): 122.
383. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 1993; 7(5): 812-821
384. Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene*. 1993; 8: 1593-1602.
385. Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem*. 2001; 8: 1487-1503.
386. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(5): 2612-2624.

387. Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(7): 3463-3469.
388. Zhang Q, Sakamoto K, Liu C, Triplett AA, Lin WC, Rui H, Wagner KU. Cyclin D3 compensates for the loss of cyclin D1 during ErbB2-induced mammary tumor initiation and progression. *Cancer Res.* 2011; 71(24): 7513-7524.
389. Jiang J, Wei Y, Liu D, Zhou J, Shen J, Chen X, Zhang S, Kong X, Gu J. E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 358(1): 53-58.
390. García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(9): 2172-2181.
391. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2002; 23(10): 1677-1684.
392. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1378: F115-F177.
393. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993; 366(6456): 701-704.
394. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003; 13(2): 65-70.
395. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11): 798-809.
396. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9): 651-662.
397. Walker SR, Xiang M, Frank DA. Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology.* 2014; 382(1): 616-621.
398. Yue P, Turkson J. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert opinion on investigational drugs.* 2009; 18(1): 45-56.



399. Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebti S, Jove R. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem.* 2005; 280(38): 32979-32988.
400. Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005; 65(7): 2532-2536.
401. Wang H, Deng J, Ren H-Y, Jia P, Zhang W, Li M-Q, Li S-W, Zhou Q-H. STAT3 influences the characteristics of stem cells in cervical carcinoma. *Oncol Lett* 2017; 14(2): 2131-2136.
402. Liao WY, Liaw CC, Huang YC, Han HY, Hsu HW, Hwang SM, Kuo SC, Shen CN. Cyclohexylmethyl Flavonoids Suppress Propagation of Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of NANOG. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013 ;2013: 170261.
403. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiok S, Chellappan SP. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2012; 11: 73.
404. Song WS, Yang YP, Huang CS, Lu KH, Liu WH, Wu WW, Lee YY, Lo WL, Lee SD, Chen YW, Huang PI, Chen MT. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chin Med Assoc* 2016; 79(10): 538-545.
405. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog* 2015; 54(9): 679-687.
406. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer.* 2014; 21(1) :96-101.
407. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells.* 2015; 33(8) :2381-2390.
408. Liu P, Tang H, Song C, Wang J, Chen B, Huang X, Pei X, Liu L. SOX2 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 942.

409. Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology*. 2014; 64:494-503.
410. Chen T, Du J, Lu G. Cell growth arrest and apoptosis induced by Oct4 or Nanog knockdown in mouse embryonic stem cells: a possible role of Trp53. *Mol Biol Rep*. 2012; 39:1855-1861.
411. Müntz B, Thier MC, Winnemöller D, Helfen M, Thummer RP, Edenhofer F. Nanog induces suppression of senescence through downregulation of p27KIP1 expression. *J Cell Sci*. 2016; 129(5): 912-920.
412. Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajás AA, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*. 2013; 2: e61.
413. Avalle L, Camporeale A, Camperi A, Poli V. STAT3 in cancer: A double edged sword. *Cytokine*. 2017; 98: 42-50.
414. Yeh JE, Frank DA. STAT3-Interacting Proteins as Modulators of Transcription Factor Function: Implications to Targeted Cancer Therapy. *ChemMedChem*. 2016; 11(8): 795-780.
415. Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chem Biol*. 2016; 11(2): 308-318.
416. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem*. 2006; 108: 327-334.
417. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, Asea A. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012; 12: 120.
418. Teng Y, Ross JL, Cowell JK. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT*. 2014; 3(1): e28086.
419. You J, Shi X, Liang H, Ye J, Wang L, Han H, Fang H, Kang W, Wang T. Cystathionine-  $\gamma$ -lyase promotes process of breast cancer in association with STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017; (39): 65677-65686.

420. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2014; 33(20): 2655-2664.
421. Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, Lam EW, Chan KK, Ngan HY, Le XF, Cheung AN. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of outcome in ovarian cancers. *Oncogene*. 2013; 32(30): 3500-3509.
422. Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 9170.
423. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007; 13(9): 1050-1059.
424. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014; 21(1): 15-25.
425. Chen J, Huang X, Huang G, Chen Y, Chen L, Song H. Preconditioning chemotherapy with cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012; 27(3): 210-220.
426. Kim JE, Jang MJ, Lee JI, Chung YH, Jeong JH, Hung CF, Kim D. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4+ T-cells in peritoneal space. *J Immunother*. 2012; 35: 1-1.
427. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005; 436(7054): 1186-1190.
428. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 35: 23-28.

429. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, Saiki I. IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand,  $\alpha$ -galactosylceramide. *Blood*. 2002; 100: 1728-1733.
430. Gebremeskel S, Clattenburg DR, Slauenwhite D, Lobert L, Johnston B. Natural killer T cell activation overcomes immunosuppression to enhance clearance of post-surgical breast cancer metastasis in mice. *Oncoimmunology*. 2015; 4: e995562.
431. Gebremeskel S, Slauenwhite D, Johnston B. Reconstitution models to evaluate natural killer T cell function in tumor control. *Immunol Cell Biol*. 2016; 94: 90-100.
432. Schneiders FL, de Bruin RC, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, Langendijk JA, Verheul HM, de Gruijl TD, Molling JW, van der Vliet HJ. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J Clin Oncol*. 2012; 30(5):567-570.
433. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004; 114(10): 1379-1388.
434. Ioachim HL, Decuseara R, Giancotti F, Dorsett BH. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract*. 2005; 200(11-12):v743-751.
435. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635-1636.
436. Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Hirai H, Chiba S. CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47(10): 2218-2223.
437. Teng MW, Sharkey J, McLaughlin NM, Exley MA, Smyth MJ. CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol*. 2009; 183(3): 1911-1920.
438. Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, Kronenberg M, Seeger RC. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol*. 2001; 167(6): 3114-3122.

439. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014; 134(7): 1669-1682.
440. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006; 203(2): 289-295.
441. Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, et al. KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(34): 12474-12479.
442. Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli-Esposti MA, Smyth MJ, Tarlinton DM, Nutt SL. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol*. 2007; 178(8): 4764-4770.
443. Müller-Durovic B, Lanna A, Covre LP, Mills RS, Henson SM, Akbar AN. Killer Cell Lectin-like Receptor G1 Inhibits NK Cell Function through Activation of Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase. *J Immunol*. 2016; 197(7): 2891-2899.
444. Robbins SH, Nguyen KB, Takahashi N, Mikayama T, Biron CA, Brossay L. Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *Journal of immunology*. 2002; 168: 2585–2589.
445. Nair S, Dhodapkar MV. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017; 8: 1178.
446. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett*. 2004; 574(1–3): 37–41.
447. Dong Y, Sun Q, Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(2): 2171-2186.
448. Chang WS, Kim JY, Kim YJ, Kim YS, Lee JM, Azuma M, Yagita H, Kang CY. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol*. 2008; 181(10): 6707-6710.

449. Parekh VV, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, Kumar V, Wu L, Kaer LV. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol*. 2009; 182(5): 2816-2826.
450. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016; 39(1): 98-106.
451. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev*. 2009; 229(1): 12-26.
452. Beldi-Ferchiou A, Caillat-Zucman S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10). pii: E2129.
453. an Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med*. 1999; 190: 355-366.
454. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med*. 2014; 211: 715-725.
455. Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhou S. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:11774-11779.
456. Pentcheva-Hoang T, Simpson TR, Montalvo-Ortiz W, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade enhances antitumor immunity by stimulating melanoma-specific T-cell motility. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2: 970-980.
457. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(12): 2478-2480.
458. de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg ME, van den Bent MJ, Planting AS, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J. Weekly high-dose cisplatin is a

- feasible treatment option: Analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer*. 2003; 88(8): 1199-1206.
459. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother*. 2003; 4(6): 889-901.
460. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003; 1: 47-61.
461. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies.. *Kidney Int*. 2008; 73(9): 994-1007.
462. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*. 1996; 270: 700-708.
463. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*. 2006; 100(1): 65-72.
464. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004; 50(3): 287-290.
465. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*. 2005; 76(18): 2125-2135.
466. Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol*. 2002; 25(1): 1-8.
467. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol*. 2005; 148:107-121.
468. Hayati F, Hossainzadeh M, Shayanpour S, Abedi-Gheshlaghi Z, Beladi Mousavi SS. Prevention of cisplatin nephrotoxicity. *J Nephropharmacol*. 2015; 5(1): 57-60.

## БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Милена М. Јуришевић рођена је 26.02.1988. године у Крагујевцу, где је похађала основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2006/2007. године, а дипломирала 15.09.2011. године са просечном оценом 9,38 (девет и 38/100), чиме је стекла стручно звање магистар фармације. Положила је стручни испит за дипломиране фармацеуте пред испитном комисијом Министарства здравља Републике Србије. Од 2012. године запослена је на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, где данас обавља послове сарадника у звању асистента за ужу научну област Клиничка фармација.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија уписала је 2011/2012. године. Усмени докторски испит је положила у јулу 2014. године.

Започела је специјалистички стаж из Клиничке фармације 04. децембра 2017. године, на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Руководилац је јуниор пројекта под називом “Утицај новосинтетисаног лиганда (*O,O'*-диетил-*(S-S)*-етилендиамид-*N-N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и метастазирање тумора: тумороцидни ефекат *in vitro* и модулација антитуморског имунског одговора *in vivo*” који се реализује на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом.

Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.



## БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА

1. **Jurisevic M**, Jagic N, Gajovic N, Arsenijevic A, Jovanovic M, Milovanovic M, Pantic J, Jovanovic I, Sabo T, Radosavljevic G, Arsenijevic N. O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride enhances influx of effective NK and NKT cells in murine breast cancer. *Vojnosanit pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP180723149J
2. Gajovic N, **Jurisevic M**, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, Jovanovic I. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(4):493-507. doi: 10.1530/ERC-17-0529.
3. **Jurisevic M**, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, Poljarevic J, Sabo T, Vojvodic D, Radosavljevic G, Arsenijevic N. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget*, 2018; 9(46): 28195-28212.
4. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, **Jurisevic M**, Vojvodic D, Maric V, Arsenijevic A, Jovanovic I. Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma. *Mediators of Inflammation.* 2018; 2018: doi: 10.1155/2018/8031328
5. Jovanovic M, Gajovic N, Zdravkovic N, Jovanovic M, **Jurisevic M**, Vojvodic D, Mirkovic D, Milev B, Maric V, Arsenijevic N. Fecal galectin-1 as a potential marker for colorectal cancer and disease severity. *Vojnosanit pregl.* 2018; 10.2298/VSP171201007J
6. Jovanovic M, Gajovic N, **Jurisevic M**, Simovic-Markovic B, Maric V, Jovanovic M, Arsenijevic N, Zdravkovic N. Fecal sST2 correlates with disease severity of ulcerative colitis. *Vojnosanit pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP171225026J
7. Pavlovic M, Gajovic N, **Jurisevic M**, Mitrovic S, Radosavljevic G, Pantic J, Arsenijevic N, Jovanovic I. Diverse Expression of IL-32 in Diffuse and Intestinal Types of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2018; 2018:6578273.
8. Pavlovic M, **Jurisevic M**, Gajovic N, Mitrovic S, Jovanovic M, Radosavljevic G, Pantic J, Radovanovic D, Arsenijevic N, Jovanovic I. IL-32 expression associates with lymph vessel invasion in intestinal type of gastric cancer. *Vojnosanit pregl.* 2018; doi: 10.2298/VSP180727158P
9. Maric V, Jovanovic M, Zdravkovic N, Jovanovic M, Gajovic N, **Jurisevic M**, Jovanovic M, Jovanovic I. Increased IL-33 and IL-17 in colorectal carcinoma patients with severe disease. *Ser J Exp Clin Res.* 2018: doi:10.2478/sjocr-2018-0034.
10. Besser Silconi Z, Benazic S, Milovanovic J, **Jurisevic M**, Djordjevic D, Nikolic M, Mijajlovic M, Ratkovic Z, Radic G, Radisavljevic S, Petrovic B, Radosavljevic G, Milovanovic M, Arsenijevic N. DNA binding and antitumor activities of

platinum(IV) and zinc(II) complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem* (2018) 43: 719.

11. Jakovljevic M, Camilleri C, Rancic N, Grima S, **Jurisevic M**, Grech K, Buttigieg SC. Cold War Legacy in Public and Private Health Spending in Europe. *Front Public Health*. 2018;6:215.
12. Jakovljevic M, Al Ahdab S, **Jurisevic M**, Mouselli S. Antibiotic Resistance in Syria: A Local Problem Turns Into a Global Threat. *Front Public Health*. 2018;6:212.
13. Lukic R, Gajovic N, Jovanovic I, **Jurisevic M**, Mijailovic Z, Maric V, Popovska Jovicic B, Arsenijevic N. Potential Hepatoprotective Role of Galectin-3 during HCV Infection in End-Stage Renal Disease Patients. *Dis Markers*.2017;2017:6275987
14. **Jurisevic M**, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serb J Exp Clin Res*. 2016; 17(4):285-95
15. Boskovic M, Djokovic J, Grubor I, Guzvic V, Jakovljevic B, **Jurisevic M**, Ljubisic D, Mijajlovic M, Milicevic I, Milovanovic M, Nikolic L, Nikolic M, Peric S, Petrovic A, Petrovic J, Radonjic K, Simonovic L, Simovic M, Stojanovic S, Stojic I, Tomovic J, Vranic S, Vucicevic K, Zdravkovic A, Jankovic S. PhD Students' Awareness of Research Misconduct, *J Empir Res Hum Res Ethics*. 2013; 8(2):163-4.
16. Kovacevic A, Dragojevic-Simic V, Rancic N, **Jurisevic M**, Gutzwiller F, Matter-Walstra K, Jakovljevic M, End-of-life costs of medical care for advanced stage cancer patients, *Vojnosanit Pregl*. 2015; 72(4):334-41.
17. Jakovljevic M, Lazarevic M, **Jurisevic M**, Jovanovic MR. When cure becomes an illness-abuse of addictive prescription medicines. *Front Pharmacol*. 2015; 6:193.
18. Jakovljevic MB, Djordjevic N, **Jurisevic M**, Jankovic S. Evolution of the Serbian pharmaceutical market alongside socioeconomic transition. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*. 2015; 15(3):521-30.
19. Projovic I, Vukadinovic D, Milovanovic O, **Jurisevic M**, Pavlovic R, Jacovic S, Jankovic S, Stefanovic S. Risk factors for potentially inappropriate prescribing to older patients in primary care. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016; 72(1):93-107.
20. Kostic I, Spasic M, Stojanovic B, **Jurisevic M**, Radovanovic D, Canovic P, Stefanovic S, Jankovic S. Early cytokine profile changes in interstitial and necrotic forms of acute pancreatitis. *Serb J Exp Clin Res*. 2015; 16(1):33-37.
21. Praznik I, Spasic M, Radosavljevic I, Stojanovic B, Canovic D, Radovanovic D, Savovic Z, Vojinovic R, Babic Z, Djonovic N, Lukovic T, Lazarevic P, Djordjevic N, Kostic I, Jelic I, Petrovic J, Stojanovic S, **Jurisevic M**, Grubor I, Nikolic Lj, Vucicevic K, Artinovic V, Milojevic A, Kostic M, Stefanovic S, Jankovic S. Analysis of Treatment-Related Factors Affecting Mortality in Patients with Severe Necrotizing Acute Pancreatitis. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2016; 33(3):173-85.

## 9. ПРИЛОГ

### 9.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Милена М. Јуришевић

Ментор/коментор

Наслов рада:

НР

др сци. мед. Гордана Д. Радосављевић, ванредни професор

Утицај новосинтетисаног лиганда (*O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и метастазирање мишјег карцинома дојке и меланома

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

<b>Језик извода:</b> <b>ЈИ</b>	Српски/енглески
<b>Земља публикавања:</b> <b>ЗП</b>	Србија
<b>Уже географско подручје:</b> <b>УГП</b>	Србија
<b>Година:</b> <b>ГО</b>	2019.
<b>Издавач:</b> <b>ИЗ</b>	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> <b>МС</b>	34000 Крагујевац, Србија Светозара Марковића 69
<b>Физички опис рада:</b> <b>ФО</b>	Дисертација има 166 страна, 8 поглавља, 3 табеле, 23 графикона, 12 слика и 468 референци
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> <b>ДИ</b>	Клиничка и експериментална фармакологија
<b>Предметна одредница/кључне речи:</b> <b>ПО</b>	<i>O, O'</i> -диетил-( <i>S, S</i> )-етилендиамин- <i>N, N'</i> -ди-2-амино-(3- циклохексил)пропаноат дихидрохлорид, тумор дојке, меланом
<b>УДК:</b>	
<b>Чува се:</b> <b>ЧУ</b>	У Библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, 34000 Крагујевац Србија, Светозара Марковића 69
<b>Важна напомена:</b> <b>МН</b>	
<b>Извод:</b> <b>ИД</b>	Последњих деценија главно ограничење у лечењу канцера је првенствено повећана учесталост озбиљних нежељених реакција, као и све чешћи развој резистенције на хемотерапеутике. Управо ова ограничења наметнула су потребу за развојем нових

терапијских једињења која показују већу ефикасност а мању токсичност. Услед успешне синтезе нових потенцијалих терапијских једињења на бази метала показано је да лиганд, етилендиамин-*N,N'*-диацетат типа, *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP) испољава токсични ефекат на различитим ћелијским линијама карцинома. Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај DE-EDCP на раст и метастазирање мишијег карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10), као и да се расветли потенцијални механизам дејства. DE-EDCP показује туморицидни потенцијал на линије ћелија карцинома дојке мишева и људи, као и на ћелијску линију мишијег меланома. DE-EDCP значајно редукује раст карцинома дојке и показује јасан туморицидни капацитет који је одговоран за метастазирање тумора без очигледне системске токсичности. DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу што се огледа у способности да смањује експресију антиапоптотског протеина Bcl-2 и повећава експресију проапоптотског протеина Bax, као и ефекторске каспазе-3. Такође, примена DE-EDCP смањује експресију циклина D3, Ki-67 и повећава експресију p16, p21 и p27 што резултује задржавањем ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а тиме не само да инхибира пролиферацију туморских ћелија, већ вероватно додатно фацилитира њихову осетљивост на апоптозу. Још један додатни механизам којим DE-EDCP успорава прогресију карцинома дојке је редукција миграције туморских ћелија инхибицијом сигналног пута STAT3 који укључује NANOG и SOX2. Такође, системска примена DE-EDCP, осим што повећава инфлукс, подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност NK и NKT ћелија у туморској микросредини. Антитуморски ефекат DE-EDCP остварује на више различитих начина - фаворизује апоптозу истовремено инхибира пролиферацију туморских ћелија и појачава антитуморски имунски одговор, што указује на могућност коришћења DE-EDCP у експерименталној терапији карцинома.

Датум прихватања теме од стране ННВ: 26.10.2016. године  
ДП

Датум одбране:  
ДО

Чланови комисије:  
КО

**Председник:** Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области *Микробиологија и имунологија и Онкологија*

**Члан:** проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска хемија*

**Члан:** Проф. др Тибор Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*

## 9.2. KEYWORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC**  
**FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

DT

Monographic publication

**Type of record:**

TR

Textual printed material

**Contents code:**

CC

PhD thesis

**Author:**

AU

Milena M. Jurišević

**Menthor/co-mentor:**

MN

Gordana D. Radosavljević, MD, PhD, Associate  
Professor

**Title:**

TI

The influence of new ligand (*O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride) on growth and progression of murine mammary carcinoma and melanoma

**Language of text:**

LT

Serbian (Cyrillic)

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication:** Serbia  
**CP**

**Locality of publication:** Serbia  
**LP**

**Publication year:** 2019.  
**PY**

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** 34000 Kragujevac, Serbia  
**PP** Svetozara Markovića 69

**Physical description:** Thesis contains 166 pages, 8 chapters, 3 tables, 23 figures, 12 images and 468 citations

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Clinical and experimental pharmacology  
**SD**

**Subject/key words:** *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride, mammary carcinoma, melanoma  
**SKW**

**UDC:**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, 34000 Kragujevac Serbia, Svetozara Markovića 69

**Note:**  
**N**



**Abstract:**  
**AB**

Pharmacological treatment of cancer is mostly limited by drug-toxicity and resistance. It has been noticed that organic ester ligand, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (named DE-EDCP) showed effective cytotoxic capacities against several human and mouse cancer cell lines. The aim of present study was to examine the ability of DE-EDCP to inhibit murine breast cancer (4T1) growth and progression, as well as melanoma (B16F10), and to explore possible molecular mechanisms. DE-EDCP exhibited significant tumoricidal activity on human and murine breast cancer cell lines. Further, marked reduction of murine breast cancer growth and progression, as well as melanoma, by DE-EDCP was shown. DE-EDCP exhibits fewer side-effects compared to cisplatin as a conventional chemotherapeutic. Results obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments indicate that DE-EDCP induces apoptosis and inhibits proliferation of 4T1 cells. DE-EDCP increases percentage of 4T1 cells in late apoptosis, expression of pro-apoptotic Bax and caspase-3, while decreases expression of anti-apoptotic Bcl-2. DE-EDCP treatment increased the percentage of TUNEL-positive nuclei and reduced Ki-67 expression in breast cancer tissue. DE-EDCP decreased expression of cyclin D3 and Ki-67, increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16, p21 and p27 and arrested 4T1 cells in G0/G1 cell cycle phase. Expression of STAT3 and downstream regulated molecules, NANOG and SOX2, was reduced in 4T1 cells after DE-EDCP treatment. DE-EDCP facilitated accumulation of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells and CD3<sup>-</sup>CD49<sup>+</sup> NK cells in tumor microenvironment. In conclusion, DE-EDCP impairs breast cancer growth and progression by triggering cancer cell death and inhibition of cancer cell proliferation and by facilitating anti-tumor immunity. DE-EDCP might be of interest in the development of the new anticancer agent.

**Accepted by the Scientific  
Board on:**  
**ASB**

26 October 2016

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree / name / surname /  
title / faculty)**

**DB**

**President:**

**Ivan Jovanović MD PhD**, Associate Professor of Microbiology and immunology and Oncology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

**Member:**

**Gordana Radić PhD**, Associate Professor of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

**Member:**

**Tibor Sabo PhD**, Professor of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милена М. Јуришевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај новосинтетисаног лиганда (О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и метастазирање мишјег карцинома дојке и меланома

која је одбрањена на Факултету медицинских 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, 13.12.2018. године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Милена М. Јуришевић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај новосинтетисаног лиганда (О,О'-диетил-(S,S)-етилендиамин-  
N,N'-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида) на раст и  
метастазирање мишјег карцинома дојке и меланома

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 \_\_\_\_\_, 13.12.2018. 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/>

## The organic ester *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis

Milena Jurisevic<sup>1,2</sup>, Aleksandar Arsenijevic<sup>1</sup>, Jelena Pantic<sup>1</sup>, Nevena Gajovic<sup>1</sup>, Jelena Milovanovic<sup>1,3</sup>, Marija Milovanovic<sup>1</sup>, Jelena Poljarevic<sup>4</sup>, Tibor Sabo<sup>4</sup>, Danilo Vojvodic<sup>5</sup>, Gordana D. Radosavljevic<sup>1</sup> and Nebojsa Arsenijevic<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Department of Histology and embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>5</sup>Institute of Medical Research, Faculty of Medicine, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

**Correspondence to:** Gordana D. Radosavljevic, **email:** perun.gr@gmail.com  
Milena Jurisevic, **email:** milena.jurisevic13@gmail.com

**Keywords:** *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride; breast cancer growth; metastasis; apoptosis; proliferation

**Received:** December 30, 2017

**Accepted:** May 24, 2018

**Published:** June 15, 2018

**Copyright:** Jurisevic et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

Pharmacological treatment of cancer is mostly limited by drug-toxicity and resistance. It has been noticed that new organic ester ligand, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (named DE-EDCP) showed effective cytotoxic capacities against several human and mouse cancer cell lines. However, its effects on tumor growth and metastasis are unexplored. The aim of present study was to examine the ability of DE-EDCP to inhibit 4T1 murine breast cancer growth and progression and to explore possible molecular mechanisms. DE-EDCP exhibited significant tumoricidal activity on human and murine breast cancer cell lines. Further, marked reduction of murine breast cancer growth and progression by DE-EDCP was shown. DE-EDCP exhibits fewer side-effects compared to cisplatin as a conventional chemotherapeutic. Results obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments indicate that DE-EDCP induces apoptosis and inhibits proliferation of 4T1 cells. DE-EDCP increases percentage of 4T1 cells in late apoptosis, expression of pro-apoptotic Bax and caspase-3, while decreases expression of anti-apoptotic Bcl-2. DE-EDCP treatment increased the percentage of TUNEL-positive nuclei and reduced Ki-67 expression in breast cancer tissue. DE-EDCP decreased expression of cyclin D3 and Ki-67, increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16, p21 and p27 and arrested 4T1 cells in G0/G1 cell cycle phase. Expression of STAT3 and downstream regulated molecules, NANOG and SOX2, was reduced in 4T1 cells after DE-EDCP treatment.

In conclusion, DE-EDCP impairs breast cancer growth and progression by triggering cancer cell death and inhibition of cancer cell proliferation. DE-EDCP might be of interest in the development of the new anticancer agent.

## INTRODUCTION

Cancer is on its way to become number one killer across the world [1]. Platinum-based drugs are one of the mostly used anticancer agents [2, 3]. Cisplatin or cis-diamminedichloroplatinum(II) is the most widely known metal-based anticancer drug, used for treatment of a variety of malignancies, including breast cancer [4]. However, clinical utility of cisplatin has been often limited due to toxicity [5–7] and acquired or intrinsic resistance [8–10]. The lack of efficiency caused by these limiting factors is the main reason why vigorous attempts are committed to develop novel platinum complexes which might overcome the shortcomings of cisplatin.

Large number of edda (ethylenediamine-*N,N'*-diacetate)-type ligands and their corresponding platinum complexes have been successfully synthesized [11, 12] and some of them showed significant cytotoxic effects [13].

It has been shown that platinum(IV) [14] and platinum(II) [15] complexes with cyclohexyl-functionailized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate-type ligand exhibit effective tumoricidal capacities against various cancer cell lines. The cytotoxic effects of these platinum complexes may be at least partly related to their organic ligands (ester derivatives of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid). Moreover, the organic ligands alone demonstrated significant toxicity *in vitro*, towards a panel of different mice and human cancer cell lines [14–16]. *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride was synthesized as one of novel ester derivatives of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoic acid [14–16]. Among different organic ligands, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride exhibited considerably similar or higher cytotoxic activity than cisplatin [14–16].

However, possible *in vivo* anticancer effects of new synthesized organic ester *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (compound marked as DE-EDCP), has not been reported. The aim of our study was to investigate the effect of DE-EDCP on 4T1 murine breast cancer growth and progression, as well as possible molecular mechanism(s) of action.

## RESULTS

### DE-EDCP exerts cytotoxic capacity against mammary carcinoma cells

The effects of DE-EDCP on viability of several breast cancer cells (murine 4T1 and human MDA-MB-231 and MDA-MB-468) were examined using MTT assay. Cell viability was tested after treatment with growing concentrations of DE-EDCP for 24 and 48 hours, and IC<sub>50</sub>

values were calculated. The obtained data showed that DE-EDCP decreased viability of all tested tumor cell lines in a dose-dependent manner (Figure 1).

Cytotoxic potential of DE-EDCP toward MDA-MB-468 cells was significantly lower compared to cisplatin in concentrations 15.63–31.25  $\mu$ M after 24 hours of exposure and in concentrations 3.90–31.25  $\mu$ M after 48 hours treatment (Figure 1A). Cytotoxicity of DE-EDCP toward MDA-MB-231 was higher after 24 hours treatment in comparison with 48 hours exposure (Figure 1B). Further, viability of MDA-MB-231 cells was significantly reduced after 24 hours treatment with DE-EDCP in comparison with the same treatment with cisplatin (Figure 1B). Cytotoxicity of DE-EDCP against MDA-MB-231 cells after 48 hours exposure was higher than activity of cisplatin for concentrations 31.25–500  $\mu$ M (Figure 1B).

As shown in Figure 1C, at concentrations of 31.25  $\mu$ M or higher, DE-EDCP exerted the effective dose-dependent cytotoxic effect against 4T1 cells. The treatment of 4T1 cells with tested substances for 24 hours resulted in approximately equal cytotoxic capacity of DE-EDCP and referent cytostatic cisplatin in concentrations 62.5–1000  $\mu$ M, and more importantly in the lowest concentrations 0.49–3.90  $\mu$ M (Figure 1C). The cytotoxicity of tested compound after 48 hours treatment was lower in comparison with the effect of cisplatin in concentration range from 7.81 to 15.63  $\mu$ M (Figure 1C).

The IC<sub>50</sub> values of DE-EDCP against 4T1 and MDA-MB-468 are similar to those for cisplatin, while IC<sub>50</sub> of DE-EDCP against MDA-MB-231 is several times lower following 24 hours treatment (Table 1).

The LDH assay confirmed the significant cytotoxic effect of DE-EDCP against 4T1 cells (Figure 1D). The results revealed that the level of LDH release was increased after exposure of 4T1 cells to DE-EDCP for 24 hours compared to cells treated with cisplatin, indicating that DE-EDCP could affect the cell membrane integrity. Additionally, DE-EDCP increased the release of LDH in a dose-dependent manner. The LDH levels increased from 15.67% to 52.02% following DE-EDCP treatment in comparison with 10.73% to 26.89% after cisplatin treatment at concentration range from 62.5 to 1000  $\mu$ M.

### DE-EDCP reduces tumor growth and metastasis

In view of the pronounced tumoricidal effects of DE-EDCP *in vitro*, the next goal of present study was to examine the ability of tested compound to inhibit murine breast cancer growth and progression *in vivo*. 4T1 cells were orthotopically implanted into the mammary fat pad of mice. After the appearance of palpable tumor, mice were treated with DE-EDCP, cisplatin or vehicle.

The short-course treatment with DE-EDCP (10 mg/kg body weight/5 doses per cycle/2 cycles during 12 days), started from the day 5 after tumor cell implantation, was associated with the significant reduction of breast cancer

**Table 1: The IC<sub>50</sub> values of DE-EDCP and cisplatin determined by MTT assay**

Compound	IC <sub>50</sub> ± SD (µM)					
	MDA-MB-468		MDA-MB-231		4T1	
	24 hours	48 hours	24 hours	48 hours	24 hours	48 hours
Cisplatin	16.68±1.83	5.01±1.03	66.01±0.69	20.71±0.32	10.59±0.36	7.97±0.56
DE-EDCP	16.52±2.78	15.58±2.94	5.14±0.63	17.45±3.33	12.90±0.75	12.03±2.86

Data are presented as mean values ± SD from three experiments.

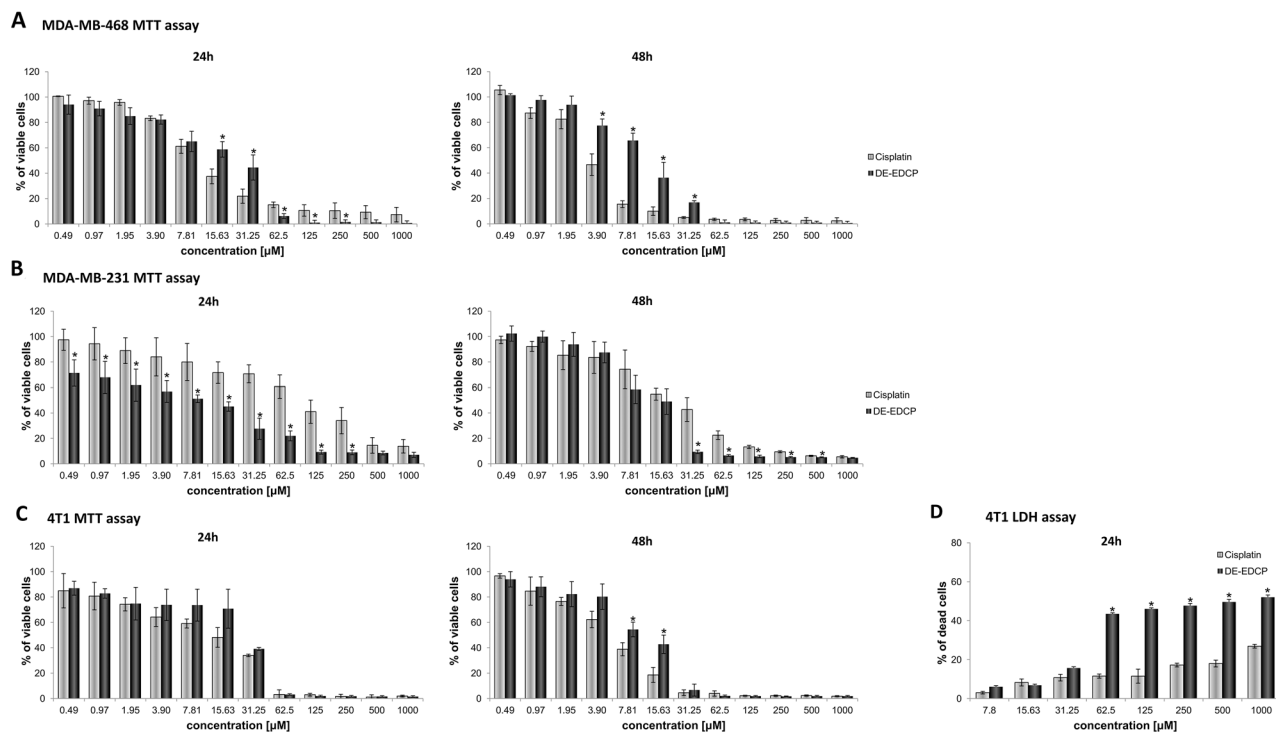
growth compared with vehicle treated animals (Figure 2A). Until day 22, DE-EDCP exhibited similar effects on tumor growth as cisplatin. After that point, although application of cisplatin showed better effects, tumor growth in DE-EDCP treated mice was significantly slower to the end of experiment (day 36 following inoculation of tumor cells) compared to vehicle treated animals (Figure 2A). Furthermore, tumor volume and weight, measured after necropsy, were markedly lower in mice treated with DE-EDCP in comparison to vehicle treated mice (Figure 2A).

On day 36, the pulmonary metastases were detected in all injected animals, but the number of metastatic colonies was significantly decreased by 1.6-fold in DE-EDCP treated and 1.7-fold in cisplatin treated mice when compared to control animals (Figure 2B). Furthermore,

DE-EDCP as well as cisplatin effectively reduced the size of metastases (4.8-fold and 10.55-fold, respectively) (Figure 2C and 2D). Metastatic colonies were not detected in the liver of mice treated with DE-EDCP or cisplatin, whereas three out of seven vehicle treated mice (42.1%) developed liver metastases (Figure 2D).

### Tumor cells treated with DE-EDCP undergo apoptotic cell death

This experimental study indicates that DE-EDCP exhibits beneficial anticancer capacity in 4T1 murine breast cancer model. Therefore, the following aim was to identify and characterize the mechanisms implicated in DE-EDCP-induced inhibition of breast cancer progression.



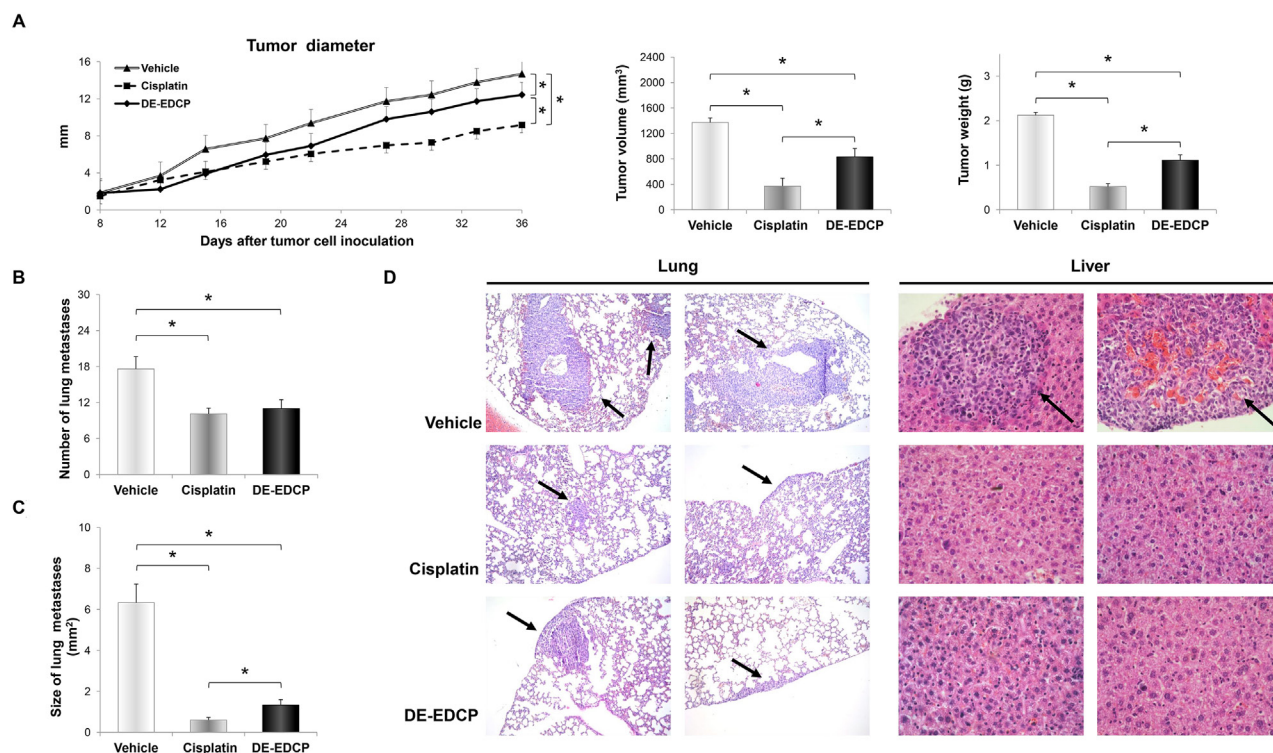
**Figure 1: Dose-dependent cytotoxicity of DE-EDCP against human and murine breast cancer cells. (A, B)** Effect of DE-EDCP on viability of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells after 24h and 48h analyzed with the MTT assay. **(C)** The viability of 4T1 cells treated with DE-EDCP and cisplatin for 24h and 48h was evaluated using MTT assay. **(D)** LDH assay of 4T1 cells treated with DE-EDCP and cisplatin for 24h. All data are presented as mean values ± SD from three independent experiments performed in triplicates. \* p < 0.05 DE-EDCP vs. cisplatin treated cells.



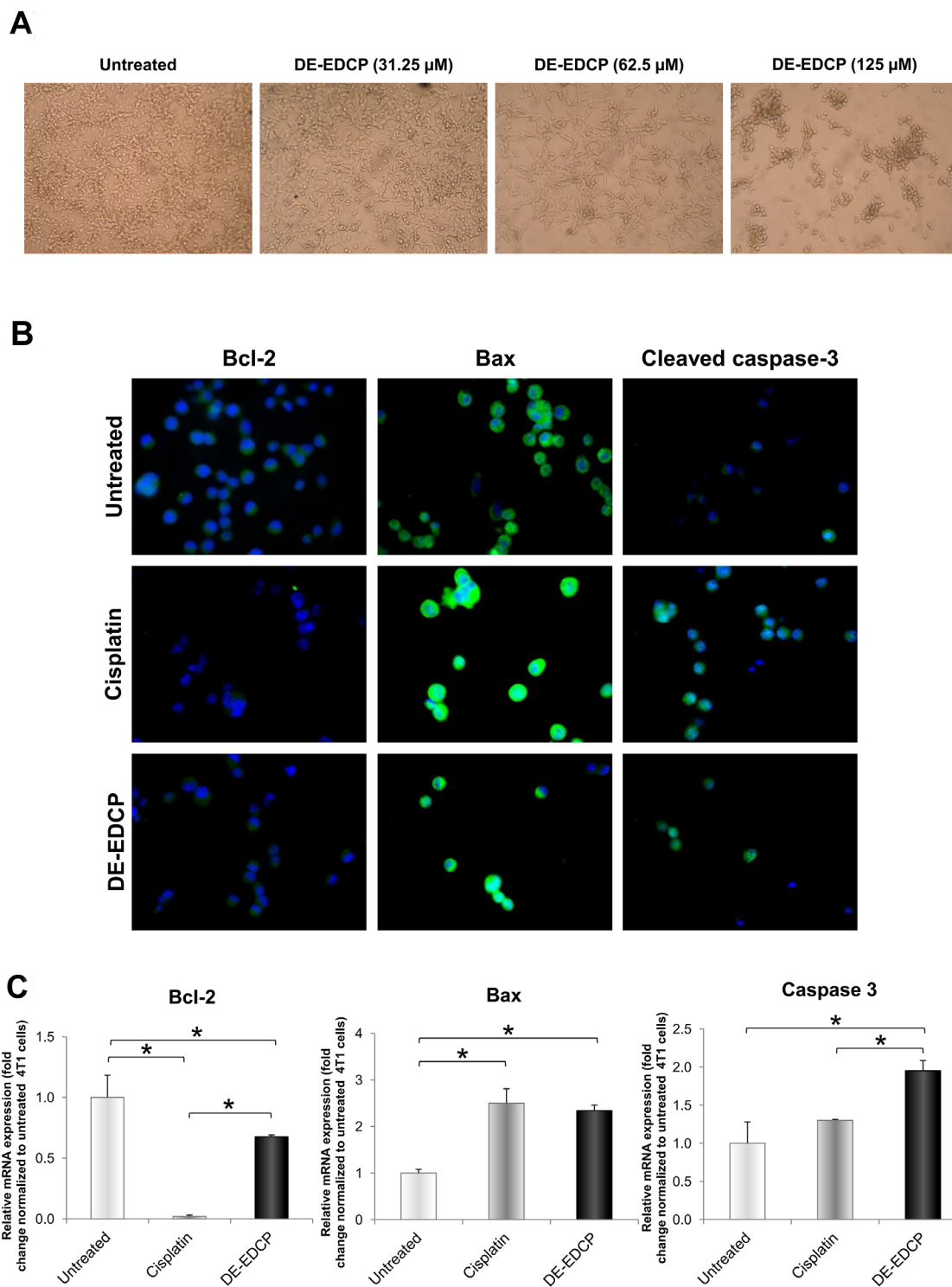
Twenty four hours after the treatment with DE-EDCP at growing concentrations, it was evident that 4T1 cells became rounded and detached (Figure 3A), suggesting that the cancer cells underwent apoptosis. Likewise, the treatment with cisplatin induced similar cell changes (data not shown). Expression of key apoptosis-related molecules, Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 in 4T1 cells following treatment with DE-EDCP or cisplatin was visualized by immunofluorescence staining. Moderately lower expression of anti-apoptotic Bcl-2 was observed in cells treated with DE-EDCP compared to untreated cells (Figure 3B), while cisplatin clearly downregulates the expression of Bcl-2. In contrast, expression of both pro-apoptotic Bax and cleaved caspase-3 was increased after DE-EDCP or cisplatin treatment, compared to untreated 4T1 cells. Quantitative analysis of Bcl-2, Bax and caspase-3 mRNA levels is in accordance with immunofluorescence staining analysis. Bax mRNA levels were significantly increased in DE-EDCP and cisplatin treated compared to untreated 4T1 cells (Figure 3C). In addition, DE-EDCP, but not cisplatin, increased the expression of caspase-3 mRNA level compared to untreated cells (Figure 3C). The caspase-3

mRNA level was significantly higher in DE-EDCP compared to cisplatin treated cells (Figure 3C). Bcl-2 mRNA level was significantly reduced after DE-EDCP and cisplatin treatment (Figure 3C). The lowest Bcl-2 mRNA level was observed in cisplatin treated cells.

To quantify the apoptotic death of 4T1 cells induced by DE-EDCP, Annexin V (AnnV) /Propidium iodide (PI) double staining was performed. Growing cell cultures were exposed to DE-EDCP or cisplatin at concentrations of 31.25 and 62.5  $\mu\text{M}$  for 24 hours. As illustrated in Figure 4A and 4B, the majority of apoptotic cells were phenotyped as AnnV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> indicating late apoptosis. The obtained data showed that both DE-EDCP and cisplatin induced significantly increased late apoptotic cell death in comparison to untreated cells, while the highest percentage of early apoptotic cells was noticed following cisplatin treatment (Figure 4B). Further, at lower concentration (31.25  $\mu\text{M}$ ), cisplatin induced late apoptosis more efficiently than DE-EDCP. However, the highest percentage of late apoptotic cells was observed after DE-EDCP treatment at the concentration of 62.5  $\mu\text{M}$  (Figure 4B). The percentage of late apoptotic cells treated with 62.5  $\mu\text{M}$  of DE-EDCP was markedly increased



**Figure 2: DE-EDCP treatment of mice bearing breast cancer inhibits tumor growth and progression.** (A) Tumor diameter, volume and weight in mice treated with DE-EDCP, cisplatin or phosphate-buffered saline (vehicle) (n=7-8 animals per group) (36<sup>th</sup> day of experiment). \* tumor diameter:- DE-EDCP vs. vehicle p=0.005; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.001; cisplatin vs. vehicle p=0.000; tumor volume:- DE-EDCP vs. vehicle p=0.03; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.005; cisplatin vs. vehicle p=0.002; tumor weight:- DE-EDCP vs. vehicle p=0.004; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.001; cisplatin vs. vehicle p=0.002). (B, C) Number and size of lung metastasis from treated mice. Data are presented as mean  $\pm$  SE (\* number of lung metastasis:- DE-EDCP vs. vehicle p=0.032; cisplatin vs. vehicle p=0.008; size of lung metastasis:- DE-EDCP vs. vehicle p=0.009; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.029; cisplatin vs. vehicle p=0.002). (D) Representative hematoxylin and eosin staining of lung and liver tissue sections showing metastatic colonies (arrows) (magnification at x100 and x400).



**Figure 3: Morphological changes and expression of key apoptosis-related molecules in 4T1 cells after DE-EDCP treatment.** (A) Morphological changes of 4T1 cells exposed to various concentrations of DE-EDCP for 24h. (B) Immunofluorescence staining for Bcl-2 (green), Bax (green) and cleaved caspase-3 (green) together with DNA staining with DAPI (blue) in 4T1 cells incubated with DE-EDCP or cisplatin (31.25  $\mu$ M) for 24h, as well as in untreated cells (magnification at x200). (C) mRNA expression of Bcl-2, Bax and caspase-3 quantified by RT-PCR in 4T1 cells after DE-EDCP 24h treatment. DE-EDCP treatment markedly increased the expression of Bax and caspase-3 mRNA and decreased the expression of Bcl-2 mRNA in 4T1 cells.  $\beta$ -actin mRNA was used as an internal control. Data points are represented by the expression ratio and mean $\pm$ SD fold of control in 4T1 cells. (\* Bcl-2-: DE-EDCP vs. untreated p=0.03; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.006; cisplatin vs. untreated p=0.001; Bax-: DE-EDCP vs. untreated p=0.011; cisplatin vs. untreated p=0.009; caspase-3-: DE-EDCP vs. untreated p=0.015; DE-EDCP vs. cisplatin p=0.021)

(54.63% ±7.19) in comparison to cisplatin treated cells (33.23±2.30) (Figure 4B).

In order to test consistency of proapoptotic effect of DE-EDCP *ex vivo*, we used TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP labeling) assay for *in situ* detection of apoptosis-triggered DNA fragmentation in tumor tissue. As shown in Figure 4C and 4D, DE-EDCP and cisplatin treated tumors have more TUNEL-positive cells than vehicle treated tumors.

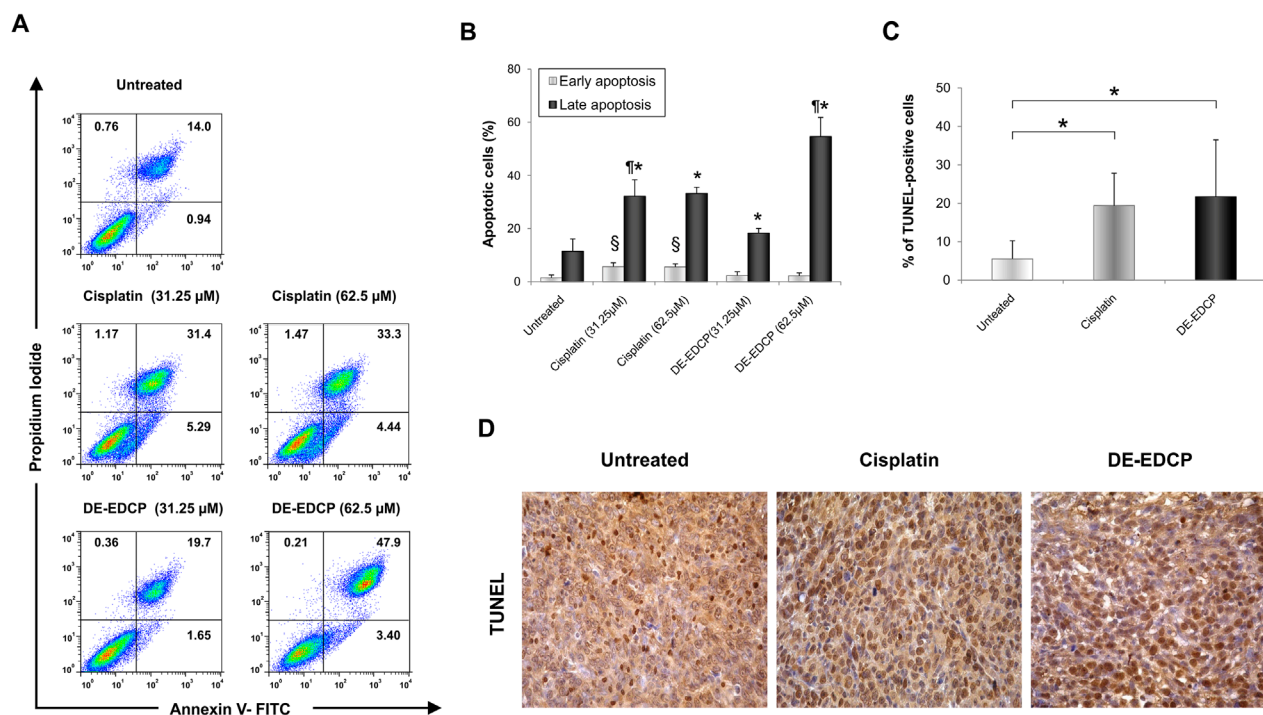
## DE-EDCP inhibits proliferation of breast cancer cells

We next investigated whether, beside apoptosis, DE-EDCP inhibits cancer cell proliferation. Consequently, the cell cycle profile of 4T1 cells was determined after exposure to DE-EDCP or cisplatin for 12 hours. DE-EDCP (31.25 μM and 62.5 μM) or cisplatin (31.25 μM) treatment significantly increased the percentage of cells in G0/G1 phase in comparison with untreated cells (Figure 5A). Furthermore, the percentage of cells in S and G2/M phases was decreased after DE-EDCP and cisplatin treatment (Figure 5A). In addition, the significant increase in the percentage of cells in sub-G1 phase was found after the

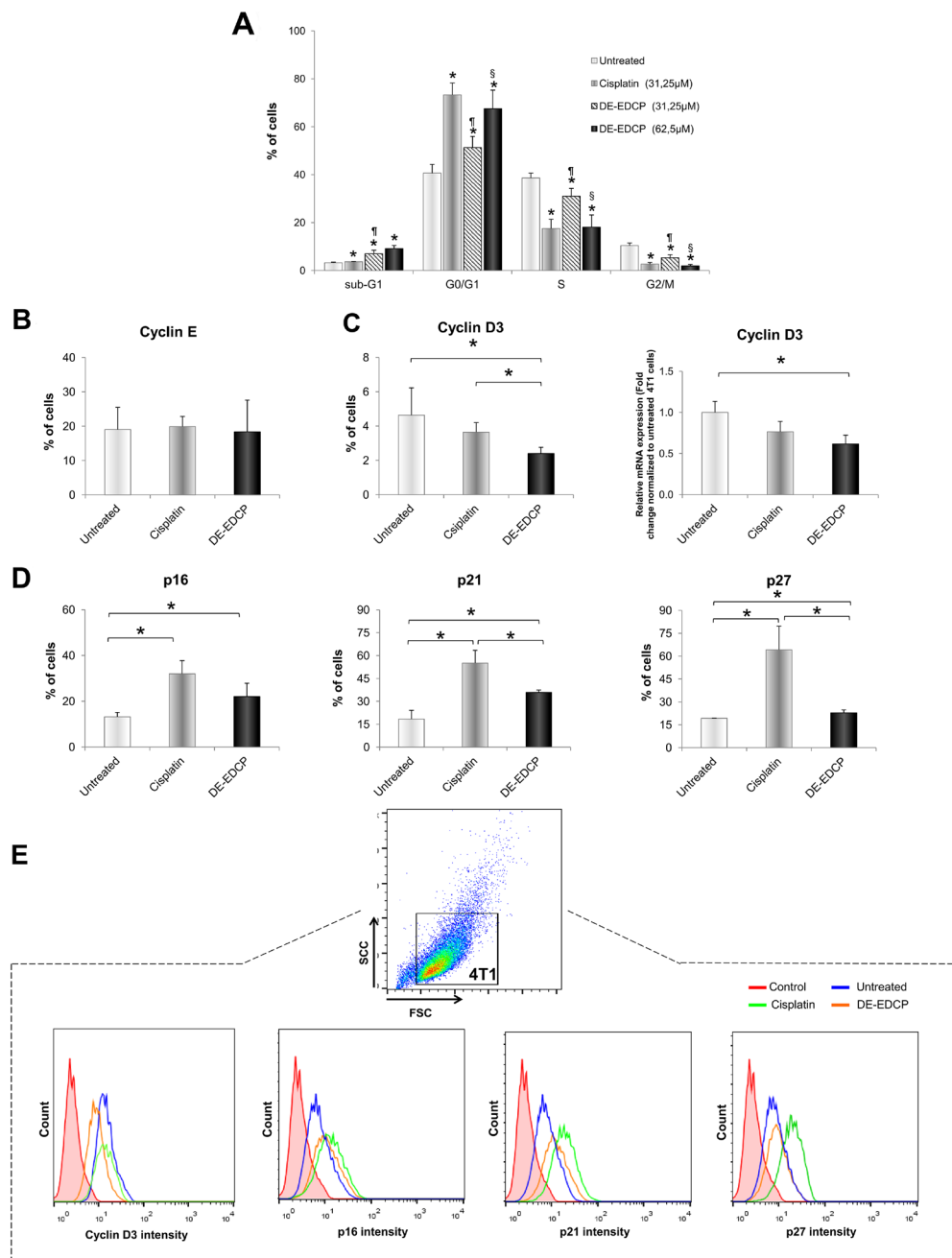
exposure to DE-EDCP (31.25 μM and 62.5 μM) (Figure 5A). Overall, the obtained data indicated that DE-EDCP inhibited cell proliferation through arrest of cell cycle progression in the G0/G1 phase and subsequent induction of apoptosis in 4T1 cells. DE-EDCP was more effective at higher concentration (62.5 μM), while cisplatin achieved similar effect at a concentration as low as 31.25 μM.

Further, we examined the expression of cell-cycle progression regulators by flow cytometry. DE-EDCP (31.25 μM) or cisplatin (31.25 μM) treatment did not affect the expression of cyclin E (Figure 5B). However, DE-EDCP treatment significantly reduced cyclin D3 expression (2.4%±0.37) compared to cisplatin treated (3.64%±0.56) and untreated cells (4.64%±1.59) (Figure 5C and 5E). In line with this finding, marked decrease of cyclin D3 mRNA level was observed after DE-EDCP treatment compared to untreated cells (Figure 5C).

Both DE-EDCP and cisplatin, enhanced the expression of inhibitor of cyclin D-CDK4 complex, p16, compared to untreated 4T1 cells (Figure 5D and 5E), thus contributing to cell cycle arrest at G0/G1 phase. Also, DE-EDCP and cisplatin markedly upregulated the expression of kinase inhibitor protein (KIP) family members, p21 and p27, compared to untreated 4T1 cells (Figure 5D and 5E).



**Figure 4: DE-EDCP enhances tumor cell apoptosis in murine breast cancer.** (A) Representative dot plots illustrate population of viable (AnnV<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>), early apoptotic (AnnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>), late apoptotic (AnnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) and necrotic (AnnV<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>) cells. (B) Apoptosis of untreated as well as DE-EDCP and cisplatin (31.25 and 62.5 μM) treated 4T1 cells were analyzed by flow cytometry using Annexin V (FITC) and PI double staining. The data are presented as means ± SD of a three independent experiment, *p* < 0.05 significantly different from: \*untreated vs. DE-EDCP or cisplatin treated cells; \*\* DE-EDCP vs. cisplatin treated cells; § cisplatin vs. untreated or DE-EDCP treated cells. (C) Quantitative analysis of the rate of apoptosis: TUNEL-positive nuclei (brown) were counted in five random fields, and the data were summarized as the mean percentage of positive cells. Data are presented as mean ± SD from four tumors per group, (\* DE-EDCP vs. untreated *p* = 0.028; cisplatin vs. untreated *p* = 0.048). (D) TUNEL assay in breast cancer tissues at 36<sup>th</sup> day (magnification at x400).



**Figure 5: DE-EDCP induces cell cycle arrest at the G0/G1 checkpoint in 4T1 cells.** (A) 4T1 cells cycle analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of cells in different phases of the cell cycle. Data are presented as the mean±SD,  $p < 0.05$  significantly different from: \*untreated vs. DE-EDCP or cisplatin treated cells; ¶ DE-EDCP vs. cisplatin treated cells; § DE-EDCP treated cells lower and upper concentration. (B) Analysis of cyclin E expression in 4T1 cells exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25 µM) for 24h using flow cytometry by first gating out cell debris and cell clumps in forward/side scatter plot. Data are presented as mean±SD. (C) Analysis of cyclin D3 expression in 4T1 cells exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25 µM) for 24h using flow cytometry by first gating out cell debris and cell clumps in forward/side scatter plot. Data are presented as mean±SD (\* DE-EDCP vs. untreated  $p=0.002$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.01$ ). mRNA expression of cyclin D3 quantified by RT-PCR in 4T1 cells after DE-EDCP (31.25 µM) treatment.  $\beta$ -actin mRNA was used as an internal control. Data points are represented by the expression ratio and mean±SD fold of control in 4T1 cells (\* DE-EDCP vs. untreated  $p=0.017$ ). (D) Analysis of p16, p21 and p27 expression in 4T1 cells exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25 µM) for 24h using flow cytometry by first gating out cell debris and cell clumps in forward/side scatter plot. Data are presented as the mean±SD (\* p16-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.041$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.034$ ; p21-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.002$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.017$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.001$ ; p27-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.031$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.006$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.004$ ). (E) Representative histograms after flow cytometric analysis of cyclin D3, p16, p21 and p27 of three independent experiments are shown.

The expression of p21 and p27 was increased in cisplatin compared to DE-EDCP treated cells. These results suggested that the downregulation of cyclin D3 and the upregulation of p16, p21 and p27 by DE-EDCP led to cell cycle arrest at G0/G1 phase, and consequently resulted in growth cell inhibition.

### DE-EDCP decreases expression of Ki-67 and STAT3

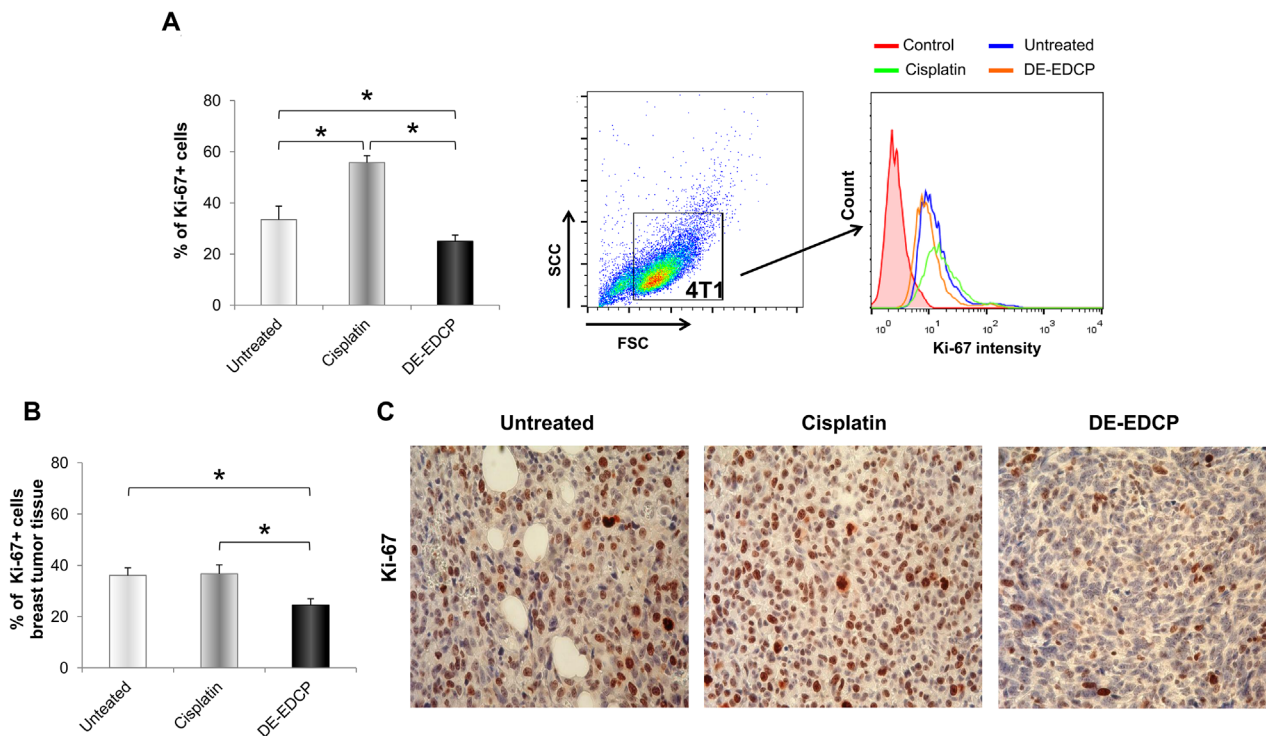
A recent study revealed that Ki-67 and STAT3 might be promising therapeutic targets in cancer, including breast cancer [17, 18]. As evaluated by flow cytometry, percentage of Ki-67-positive 4T1 cells treated with DE-EDCP (31.25  $\mu$ M) was significantly decreased (24.97% $\pm$ 2.42) compared to untreated (33.43% $\pm$ 5.28) and cisplatin treated cells (55.77% $\pm$ 2.70) (Figure 6A). Also, there was significant increase of Ki-67 positive cells treated with cisplatin compared with untreated cells (Figure 6A). Further, immunohistochemistry showed decreased percentage of Ki-67-positive cells (24.46% $\pm$ 2.45) within breast cancer tissue of DE-EDCP treated mice compared to vehicle and cisplatin treated animals (36.05% $\pm$ 2.94 and 36.66% $\pm$ 3.47, respectively)

(Figure 6B and 6C). There was no difference in the expression of Ki-67 in breast cancer tissue from mice treated with cisplatin or vehicle controls.

DE-EDCP decreased expression of STAT3 (18.0% $\pm$ 3.05) in 4T1 cells in comparison to cisplatin treated (41.23% $\pm$ 12.18) and untreated cells (42.4% $\pm$ 18.62) (Figure 7A). In line with this finding, the marked decrease of STAT3 mRNA level was observed in 4T1 cells treated with DE-EDCP (Figure 7B). Reduction in STAT3 expression after DE-EDCP treatment was accompanied with significantly lower expression of NANOG and SOX2 mRNA, as one of downstream targets of STAT3 signaling pathway (Figure 7B). However, the percentage of Y705 phospho-STAT3-positive cells within breast cancer tissue of DE-EDCP and cisplatin treated mice was decreased compared to control group, although this difference did not reach statistical significance (Figure 7C and 7D).

### DE-EDCP at its effective concentration was well tolerated *in vivo*

Finally, in order to examine the safety of DE-EDCP *in vivo*, the mice's body weight was assessed before and



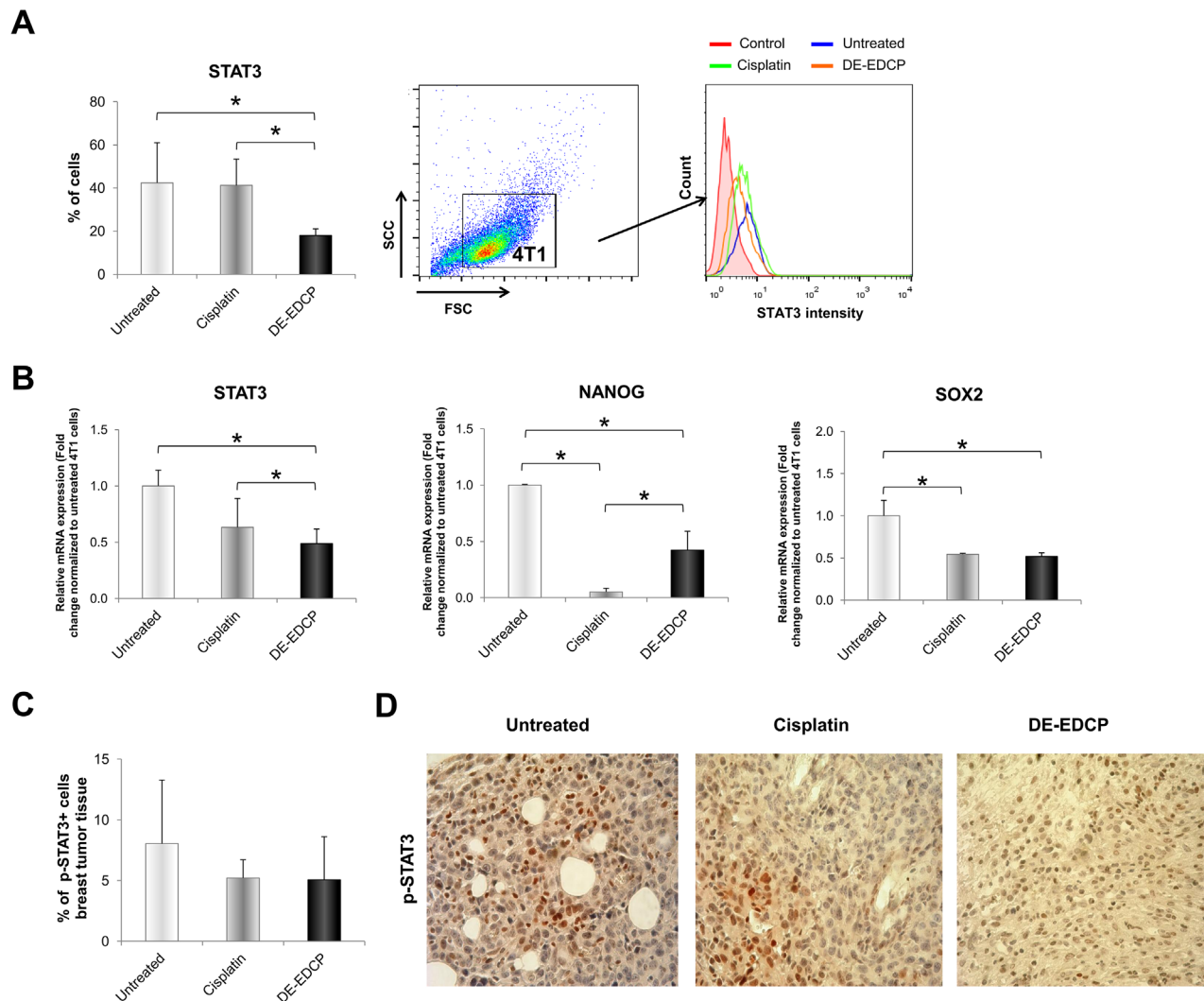
**Figure 6: DE-EDCP treatment attenuates expression of Ki-67 in murine breast cancer.** (A) Analysis of Ki-67 expression in 4T1 cells exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25  $\mu$ M) for 24h using flow cytometry by first gating out cell debris and cell clumps in forward/side scatter plot. Data are presented as the mean  $\pm$  SD, (\* DE-EDCP vs. untreated  $p=0.020$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.002$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.009$ ). Representative histograms of three independent experiments are shown. (B, C) At 36<sup>th</sup> day of the experiment, tumors were harvested from tumor-bearing mice treated with DE-EDCP, cisplatin and vehicle and Ki-67 expression was detected using immunohistochemical method. Representative images and quantitative analysis of the percentage of Ki-67- positive cells are shown. Ki-67-positive cells were counted in five random fields (magnification at x 400), and data were summarized as the mean percentage of positive cells (four tumors per group). Data are presented as mean  $\pm$  SE. (\*DE-EDCP vs. untreated  $p=0.006$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.004$ )

36<sup>th</sup> day after tumor cell inoculation. Also, on 36<sup>th</sup> day after tumor cell inoculation the serum levels of transaminases (AST and ALT), creatinine and urea were measured.

As shown in Figure 8A, DE-EDCP administration resulted in significant weight loss at the end of treatment. However, DE-EDCP induced reduction of body weight was lower in comparison with cisplatin treatment. Mice treated with cisplatin lost approximately 22% vs. 10% of weight induced by DE-EDCP 36<sup>th</sup> day after tumor cell inoculation (Figure 8A). Further, serum levels of

creatinine and urea of both naive and tumor-bearing mice treated with cisplatin were significantly increased compared to DE-EDCP treated or untreated mice (Figure 8B). It appears that DE-EDCP did not significantly affected systemic levels of creatinine and urea.

There were no significant differences in levels of transaminases (data not shown). Additionally, histological changes were not observed in organs of mice treated with DE-EDCP, including the liver, kidney, lung, intestine, spleen and stomach (data not shown). Taken together, obtained



**Figure 7: DE-EDCP treatment downregulates expression of STAT3 in murine breast cancer.** (A) Analysis of STAT3 expression in 4T1 cells exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25  $\mu$ M) for 24h using flow cytometry by first gating out cell debris and cell clumps in forward/side scatter plot. Data are presented as the mean  $\pm$  SD (\* DE-EDCP vs. untreated  $p=0.002$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.002$ ). Representative histograms of three independent experiments are shown. (B) mRNA expression of STAT3, NANOG and SOX2 quantified by RT-PCR in 4T1 cells after DE-EDCP (31.25  $\mu$ M) 24h treatment.  $\beta$ -actin mRNA was used as an internal control. Data points are represented by the expression ratio and mean  $\pm$  SD fold of control in 4T1 cells. (\* STAT3-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.008$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.023$ ; NANOG-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.019$ ; DE-EDCP vs. cisplatin  $p=0.029$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.001$ ; SOX2-: DE-EDCP vs. untreated  $p=0.021$ ; cisplatin vs. untreated  $p=0.021$ ). (C, D) At 36<sup>th</sup> day of the experiment, tumors were harvested from tumor-bearing mice treated with DE-EDCP, cisplatin and vehicle and phospho-STAT3 expression was detected using immunohistochemical method. Representative images and quantitative analysis of the percentage of phospho-STAT3-positive cells are shown. Phospho-STAT3-positive cells were counted in five random fields (magnification at x 400), and data were summarized as the mean percentage of positive cells (four tumors per group). Data are presented as mean  $\pm$  SE.

data indicate that DE-EDCP administration is accompanied with fewer side effects when compared to cisplatin.

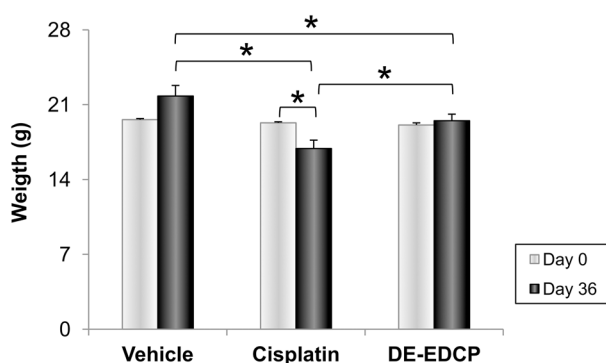
## DISCUSSION

The major limitations in cancer treatment are drug resistance and severe side effects of conventional chemotherapeutics. Due to limitations related to the treatment of cancer, there is an opening field for the development of novel therapeutic compounds exhibiting higher efficiency as well as lower toxicity. Herein, anticancer activities of newly synthesized compound DE-EDCP were investigated using murine breast cancer model. Testing cytotoxicity of organic ligands and their corresponding platinum complexes revealed that DE-EDCP affected the viability of several cancer cell lines similarly or even efficiently then cisplatin [14–16]. In fact, DE-EDCP exhibited higher cytotoxic capacity compared to cisplatin, especially against human acute myelogenous

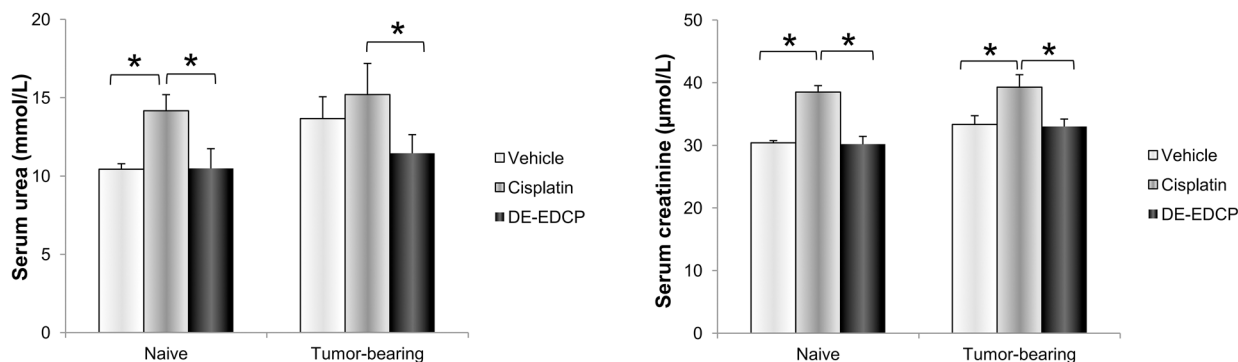
(KG-1) and promyelocytic leukemia (HL-60) as well as murine melanoma (B16) cell lines [14–16]. These data implicate that DE-EDCP might be considered as a valuable candidate for anticancer therapy. However, to date the effects of DE-EDCP on tumor growth and metastasis are unexplored.

DE-EDCP exhibited significant dose-dependent cytotoxic effect against murine (4T1) and human (MDA-MB-468 and MDA-MB-231) breast cancer cell lines (Figure 1). The most important finding to emerge from present study is that DE-EDCP is capable of favorably influencing the course of malignant disease even after “therapeutic” administration to mice that have already developed tumor. DE-EDCP exhibited marked anticancer activity by reducing breast cancer growth and progression as evaluated by significantly lower tumor volume and weight (Figure 2A) as well as decreased number and size of lung and liver metastases when compared to untreated group (Figure 2B, 2C and 2D). Also, it should

**A**



**B**



**Figure 8: Administration of DE-EDCP is accompanied by fewer side effects compared to cisplatin.** (A) Body weight of tumor-bearing mice treated with DE-EDCP, cisplatin or vehicle before and 36<sup>th</sup> day of experiment (\* DE-EDCP day 36 vs. vehicle day 36  $p=0.023$ ; DE-EDCP day 36 vs. cisplatin day 36  $p=0.039$ ; cisplatin day 36 vs. vehicle day 36  $p=0.002$ ; cisplatin day 0 vs. cisplatin day 36  $p=0.03$ ). (B) Levels of serum urea and creatinine among cisplatin, DE-EDCP and vehicle treated naive and tumor-bearing mice ( $n=12-14$  animals per group). Data are presented as mean  $\pm$  SD. (\*creatinine levels-: naive control group cisplatin vs. vehicle  $p=0.030$ ; cisplatin vs. DE-EDCP  $p=0.029$ ; tumor-bearing group cisplatin vs. vehicle  $p=0.030$ ; cisplatin vs. DE-EDCP  $p=0.029$ ; \*urea levels-: naive control group cisplatin vs. vehicle  $p=0.005$ ; cisplatin vs. DE-EDCP  $p=0.005$ ; tumor-bearing group cisplatin vs. DE-EDCP  $p=0.005$ ).

be noted that until the 22<sup>th</sup> day of experiment, DE-EDCP exhibited similar effects on tumor growth as cisplatin (Figure 2A). After that point, cisplatin showed better effects which could be attributed to possible differences in pharmacokinetic factors. It is known that cisplatin, as metal-based anticancer drug, has low platinum excretion rate and is retained in the body, thus achieving its effects in a longer period of time, especially when nephrotoxicity occurs [4]. However, pharmacokinetic properties of DE-EDCP remain unknown. Therefore, it seems quite arbitrary to *assume* that application of DE-EDCP, according to its organic chemical structure, should not conduct to progressive cellular accumulation thus potentially avoiding side-effects. As opposed, cellular accumulation of cisplatin, especially the relatively high degree of accumulation in the renal tissue, might lead to diverse side-effects such as cisplatin-induced nephrotoxicity.

It is well known that dysregulations of apoptosis and cell proliferation are key events in cancer development. Compounds that promote apoptosis and inhibit dysfunctional cell proliferation efficiently prevent the cancer growth and progression. As a conventional chemotherapeutic, cisplatin may trigger the activation of both intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis [4]. Therefore, the next aim of the present study was to investigate the possible mechanisms underlying the cytotoxic capacity of DE-EDCP. Initially, it was observed that 4T1 cells exposed to various concentrations of DE-EDCP for 24 hours undergo significant morphological changes indicating that cell death might occur via apoptosis (Figure 3A). In addition, the expression of important counterparts in apoptotic cell death such as anti-apoptotic Bcl-2, pro-apoptotic Bax or cleaved caspase-3 [19] was observed in both DE-EDCP- and cisplatin-treated 4T1 cells as evaluated by immunofluorescence (Figure 3B). In line with these findings, treatment with DE-EDCP or cisplatin downregulate mRNA level of Bcl-2 expression and upregulate of Bax and caspase-3 mRNA (Figure 3C). Further, DE-EDCP (31.25 and 62.5  $\mu$ M) significantly increased the percentage of late apoptotic Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> 4T1 cells in dose-dependent manner following 24 hours treatment (Figure 4B). The highest percentage of late apoptotic cells was observed after DE-EDCP treatment at the concentration of 62.5  $\mu$ M compared to untreated, but also to cisplatin treated cells. In addition, significantly elevated percentage of TUNEL-positive nuclei in breast cancer tissue following exposure to DE-EDCP or cisplatin (Figure 4C and 4D). In accordance with these findings, it was recently established that DE-EDCP (50  $\mu$ M) enhanced the superoxide anion production and inner mitochondrial membrane depolarization as evaluated by detection of phosphatidylserine externalization and DNA fragmentation due to apoptosis of HL-60 cells [16]. Pt(II) complex containing DE-EDCP induced HL-60 oxidative stress and apoptosis further evidenced by activation of initiator caspases (caspase-8 and caspase-9)

[15]. On the other hand, Pt(IV) complex containing DE-EDCP causes oxidative stress-mediated necrotic death of glioma, melanoma and fibrosarcoma cells *in vitro* [14]. It appears that DE-EDCP and corresponding platinum(II) or platinum(IV) complexes may trigger at least two different types of cancer cell death. However, the authors do not exclude the possibility that these difference could be due to some specific properties of investigated cell lines. Herein, the results obtained from LDH assay strongly implicate that DE-EDCP, as opposed to cisplatin, affects tumor cell membrane integrity as an alternative way for the induction of cell death. Overall, the presented data strongly implicate cytotoxic activity of DE-EDCP *in vitro* and *ex vivo*.

There are evidences that some anticancer agents affect cancer cell proliferation by arresting their cell cycle in G0/G1 phase [20, 21]. Initially, it was noticed that DE-EDCP alters cell cycle status by arresting the 4T1 cells in G0/G1 phase thus preventing cell cycle progression (Figure 5A). Although cyclin E is essential for progression through the G1-phase of the cell cycle [22], DE-EDCP treatment did not affect the percentage of cyclin E-positive 4T1 cells (Figure 5B). Cyclin D3, as initial activator of G1/S phase, is one of the critical players that drives cell proliferation [23, 24]. Overexpression of cyclin D3 has been reported in invasive breast cancer and represents an independent prognostic marker [25]. It has been demonstrated that the beneficial anticancer effect of rapamycin is mainly based on the arresting cells in G1 phase due to destabilization and subsequent down-regulation of cyclin D3 protein in HER2-overexpressing breast cancer cells [26]. Accordingly, down-regulation of cyclin D3 at both the protein and mRNA levels in 4T1 cells was noticed following treatment with DE-EDCP when compared to untreated cells (Figure 5C). Besides cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin dependent kinases inhibitors tightly regulate the cell cycle progression. DE-EDCP caused significant upregulation of CIP/KIP (p21 and p27) and INK (p16) cyclin-dependent kinase inhibitor levels (Figure 5D). p16 specifically binds CDK4 or CDK6 and inhibits cyclin D association in early stage of G1 phase [27]. p21 is a universal cyclin-CDK inhibitor [28], while p27 prevents the activation of cyclin A-Cdk2, cyclin E-CDK2 and cyclin D-CDK4 complexes [27, 29]. The results indicate that DE-EDCP induced G1 cell cycle arrest through downregulating the expression of cyclin D3 and upregulating the expression of p16, p21 and p27.

Ki-67, as widely used marker of cell proliferation, is tightly linked to the cell cycle machinery but its exact role is still unknown. This nuclear protein is expressed in all active phases of cell cycle, but not in quiescent or resting cells in the G0 and early G1 phase [30, 31]. For this reason, Ki-67 could be used as prognostic biomarker and metastatic predictor in many type of human malignancies [32–34]. However, recent study reports that Ki-67 is

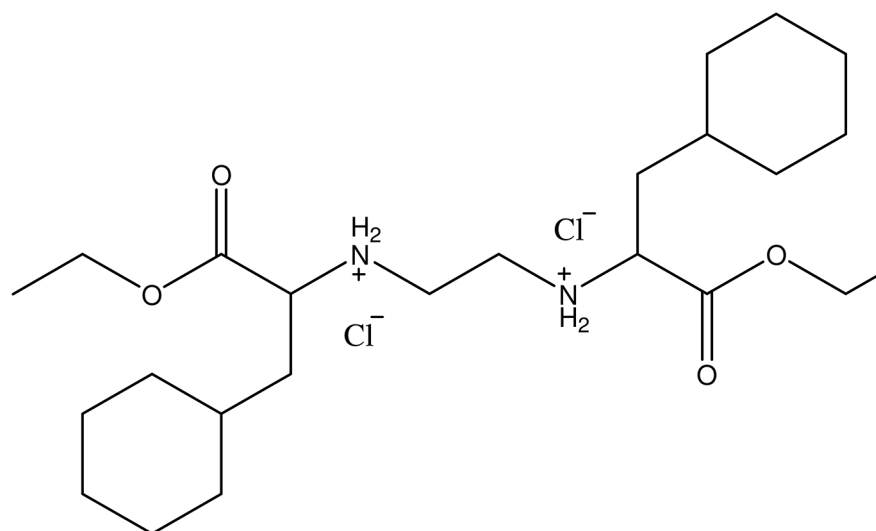


responsible for cancer resistance to chemotherapeutic agents via maintaining the cancer stem cell niche [17], and suggests that Ki-67 is an attractive therapeutic target in cancer. Our data showed that the percentage of Ki-67-positive 4T1 cells exposed to DE-EDCP was markedly decreased compared to untreated and cells exposed to cisplatin (Figure 6A). Decreased expression of Ki-67 in DE-EDCP treated 4T1 cells could be the result of G0/G1 cell cycle arrest and increased expression of CDK4/CDK6 inhibitor, p16, as it was previously shown in normal and cancer cells [35]. Unexpectedly, the highest percentage of Ki-67-positive cells was observed after cisplatin treatment (Figure 6A). Further, immunohistochemistry confirms that DE-EDCP reduced Ki-67 expression in breast cancer *ex vivo*, but there was no difference in the expression of Ki-67 in breast cancer from mice treated with cisplatin or vehicle. We speculate that the higher percentage of Ki-67-positive cells following cisplatin treatment *in vitro* is mainly related to apoptosis-induced compensatory proliferation [36]. This is in line with the results presented above which demonstrated that cisplatin was more effective inducer of 4T1 cell apoptosis at concentration as low as 31.25  $\mu\text{M}$ .

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is constitutively activated in numerous cancers and contributes to different processes involved in tumor progression such as cell proliferation, angiogenesis and metastasis [18, 37]. Therefore, STAT3 could be considered as an important target for cancer treatment. In addition, lower activity of STAT3 lead to G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis [38]. The present study revealed that DE-EDCP significantly reduces the percentage of STAT3-positive 4T1 cells in comparison with untreated or cisplatin treated cells (Figure 7A). Also, downregulation of STAT3 mRNA in breast cancer cells was noticed following treatment

with DE-EDCP when compared to both untreated and cisplatin exposed cells (Figure 7B). It has been reported that knockdown of STAT3 protein in 4T1 cell line by small interfering RNA (siRNA) reduce expression of c-Myc and completely block expression of Twist protein, thus inhibiting tumor growth and metastasis [39]. Accordingly, it seems that one of important anticancer effects of DE-EDCP is the reduction of STAT-3 expression in cancer cells.

Recent results reported by Wang H et al [40] suggested that SOX2 and NANOG are the key downstream proteins of STAT3 signaling pathways in cancer. SOX2 and NANOG are transcription factors and biomarkers for cancer stem cells (CSCs) [41, 42]. Also, evidence has revealed that the SOX2 and NANOG are critical factors in conferring certain CSC properties to cancer cells such as self-renewal, metastasis and drug resistance [43, 44]. Aberrant expression of NANOG has been previously found in a variety of tumors, including breast cancer [45]. The upregulation of NANOG expression is linked to tumor progression and relapse [44, 45]. High SOX2 expression was related to adverse breast carcinoma profile, less differentiated subtype and poor disease outcome [46]. Our data showed that DE-EDCP treatment significantly reduces NANOG and SOX2 mRNA level in 4T1 treated cells compared to untreated cells (Figure 7B). Decreased gene expression of stemness transcription factors accompanied with lower expression of Ki-67 in DE-EDCP treated 4T1 cells is in agreement with previous report [17]. In addition, in line with finding that DE-EDCP treatment markedly reduced expression of STAT3 at protein and mRNA level *in vitro*, immunohistochemistry analysis showed a similar trend for decreased percentage of Y705 phospho-STAT3-positive cells within breast cancer tissue of DE-EDCP treated mice compared to control group, although this difference did



**Figure 9: Chemical structure of *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride.**

not reach statistical significance (Figure 7C and 7D). A previous report demonstrated that knockdown of STAT3 protein in cervical carcinoma cell line by siRNA reduced mRNA and protein expressions of NANOG and SOX2 [40]. Accordingly, data obtained from our study indicated that reduction in STAT3 expression after DE-EDCP treatment resulted in significantly lower expression of NANOG and SOX2 mRNA.

The main problems with approved anticancer drugs today are drug-resistance and lack of selectivity responsible for numerous toxic side effects. It is well known that cisplatin treatment is associated with nephrotoxicity, hepatotoxicity and cardiotoxicity, as well as loss in body weight [4]. Results obtained from our study demonstrated that DE-EDCP, in effective concentration of 10 mg/kg, was well tolerated *in vivo*. DE-EDCP induced reduction of body weight was lower in comparison with cisplatin treatment (Figure 8A). We have also observed higher serum levels of both creatinine and urea of cisplatin treated mice in comparison to DE-EDCP treated mice. Although this side effect of cisplatin is well known, the molecular mechanisms underlying cisplatin nephrotoxicity is still under investigation [47–49]. On the contrary, DE-EDCP did not increase serum levels of both creatinine and urea compared to untreated animals (Figure 8B). This lack of nephrotoxicity may be the consequence of DE-EDCP chemical structure as an organic ester. Taken together, obtained data indicate that DE-EDCP administration is accompanied with fewer side effects when compared to cisplatin.

Collectively, DE-EDCP administration exhibits respectable anti-cancer activity with fewer side-effects in comparison with conventional chemotherapeutic. It appears that tumoricidal capacities of DE-EDCP may be achieved by several mechanisms such as triggering cancer cell death via apoptosis or nonapoptotic cell death induced by direct interfering with cancer cell membrane, and inhibition of cell proliferation. The tumoricidal and anti-proliferative capacities of DE-EDCP might be of interest in development of new anticancer agent.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

The substance, *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (compound marked as DE-EDCP, Figure 9), was synthesized according to previously described procedure [14, 15] and registered as patent in Intellectual Property Office of the Republic of Serbia (Number 2015/11427-P-2013/0270). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II)/cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) (Sigma-Aldrich) was used without purification.

### Cell culture

4T1 mouse mammary carcinoma cell line was purchased from American Type Culture Collection

(CRL-2539™; ATCC, USA). These cells were routinely grown in suspension in complete DMEM medium in a 5% CO<sub>2</sub> incubator with standard conditions. In all *in vitro* and *in vivo* experiments only cell suspensions with >95% viable cells were used. Trypan blue was used to determinate the number of viable tumor cells.

## Cytotoxicity assays

### MTT assay

4T1, MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were seeded on 96-well plates at a density of 3 x 10<sup>3</sup> cells/100 μl (per well) in complete DMEM (Invitrogen) growth medium and were allowed to adhere by incubation at 37°C overnight. After 24 hours, culture medium were replaced and each well received 100 μl of different compounds, which had been serially diluted two-fold in medium to concentrations ranging from 1000 to 0.49 μM. Cells were incubated under standard conditions (37°C/5% CO<sub>2</sub>) for 24 and 48 hours. Upon incubation medium was removed, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (5mg/ml in PBS, 20 μl) was added to each well and the 96-multiplates were incubated for additional 4 hours. Using microplate multimode detector Zenyth 3100 the optical density of each well was determined at 595 nm. The percentage of cell viability was determined by comparison with untreated controls according to formula: % of viable cells = (E-B)/(S-B) x 100 where B is for background of medium alone, S is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for experimental well [50]. Experiments, performed in triplicates, were repeated three times.

### LDH assay

Cytotoxicity of test compound was examined by *In Vitro* Toxicology Assay Kit (Lactic Dehydrogenase based) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells were prepared and treated with test compound in the same way as for MTT assay. A high control, leading to 100% cytotoxicity by lysing the cells completely, was included in the assay. Cells exposed to medium only were used as a low control. After 24 hours of treatment, supernatant (50 μl) was transferred to new multiplate and incubated with previously prepared substrate solution (100 μl). Plates were protected from light and incubated at room temperature for 30 minutes. The reaction was stopped by stop solution and data were acquired by spectrophotometry at 490 nm. Experiments were repeated three times. The percentage of dead cells was calculated using the formula [51]:

$$\% \text{ dead cells} = (\text{exp. value} - \text{low control}) / (\text{high control} - \text{low control}) \times 100$$

## Annexin V propidium iodide double staining assay

Annexin V is cellular protein with ability to bind to phosphatidylserine when it is on the external portion of the plasma membrane. Propidium iodide (PI), as small fluorescent molecule, binds to DNA but cannot passively traverse into cells if plasma membrane remains intact [52]. After 24 hours of treatment with test compound at concentrations 31.25 and 62.5  $\mu\text{M}$ , 4T1 cells were stained with Annexin V-FITC, followed addition of PI (BD Pharmingen, San Diego, California, USA) according to the manufacturer's instructions. The percentages of dead cells were determined by FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) and the data were analyzed using FlowJo (Tree Star). It is considered that Annexin V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> are viable cells, Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> are cells in early stage of apoptosis, Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> are cells in late stage of apoptosis, while Annexin V<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> are necrotic cells.

## Cell cycle analysis

4T1 cells were allowed to grow until 70–80% confluent in culture plates and were exposed to DE-EDCP or cisplatin (31.25 and 62.5  $\mu\text{M}$ ) for 12 hours and cell cycle analysis was performed with Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA) according to manufacturer's instructions. After treatment, 4T1 cells were stained with Vybrant DyeCycle Ruby and analyzed by FACS Calibur flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA). The cell cycle distribution was analyzed using FlowJo software [53].

## Flow cytometric analysis

4T1 cells, grown in culture plates, were treated with either DE-EDCP or cisplatin (31.25  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours. Next, the treated cells were fixed and permeabilized with permeabilization buffer (BD Bioscience) and incubated with antibodies specific for STAT3 (IC1799G, Novus Biologicals, San Diego, USA), Ki-67 (11-5698-82, eBioscience, San Diego, USA), cyclin D3 (ab28283, Abcam Cambridge, United Kingdom), cyclin E (MA5-14336, Thermo fisher scientific, USA), p16 (ab211542, Abcam Cambridge, United Kingdom), p21 (ab188224, Abcam Cambridge, United Kingdom) and p27 (ab215434, Abcam Cambridge, United Kingdom). For staining cyclin D3, cyclin E, p16, p21 and p27 cells were additionally incubated with secondary goat anti-mouse IgG FITC (ab6785 Abcam Cambridge, United Kingdom) or donkey anti-rabbit IgG (ab150073 Abcam Cambridge, United Kingdom). Flow cytometry was conducted on FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) and the data were analyzed using FlowJo (Tree Star).

## Immunofluorescent staining

The expression of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 proteins were investigated by immunofluorescence method as previously described [54]. In brief, the 4T1 cells were seeded in a 6-well plate and exposed to the DE-EDCP and cisplatin at concentration of 31.25  $\mu\text{M}$  for 24 hours. After washing the cells twice with PBS, they were fixed in 4% paraformaldehyde at 25°C for 20 min. The cells were stained with rabbit polyclonal antibody specific for Bcl-2 (sc-783, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA), Bax (sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA) and active/cleaved caspase-3 (NB100-56113, Novus Biologicals, UK). After incubation, the cells were washed and treated with appropriate secondary antibody, goat anti-rabbit IgG FITC (Ab6717-1, Abcam, Cambridge, United Kingdom). The sections were mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) and analyzed at x 200 magnification using fluorescent microscope (Olympus BX 51).

## Real-time PCR analysis

4T1 cells were treated with DE-EDCP and cisplatin (31.25  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours. Total RNA from 4T1 cell was isolated with TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). First-strand cDNA was synthesized by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). qRT-PCR was performed using Power SYBR MasterMix (Applied Biosystems) and mRNA specific primers for Bax (forward 5'-ACACCTGAGCTGACCTTG-3' and reverse 5'-AGCCCATGATGGTTCTGATC-3'), Bcl-2 (forward 5'-GTGGTGGAGGAACTCTTCAG -3' and reverse 5'-GTTCCACAAAGGCATCCCAG-3'), Caspase-3 (forward 5'-AAATTCAAGGGACGGGTCAT-3' and reverse 5'-ATTGACACAATACACGGGATCTGT-3'), STAT3 (forward 5'-GGCATTTCGGGAAGTATTGTCG-3' and reverse 5'-GGTAGGCGCCTCAGTCGTATC-3'), Cyclin D3 (forward 5'-CCGTGATTGCGCAGACTTC-3' and reverse 5'-TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG-3'), NANOG (forward 5'-AAGCAGAAGATGCGGACTGT-3' and reverse 5'-GTGCTGAGCCCTTCTGAATC-3'), SOX2 (forward 5'-AAAGGGTTCTTGCTGGGTTT-3' and reverse 5'-AGACCACGAAAACGGTCTTG-3') and  $\beta$ -actin (forward 5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3' and reverse 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT -3') as a housekeeping gene. qRT-PCR reactions were initiated with a 10 minute incubation time at 95°C followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds in a Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). For each sample (four per group) relative amount of mRNA was normalized to the  $\beta$ -actin content. Fold expression changes relative to 4T1 cells were calculated with the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method [55]. Data points are represented by the expression ratio and mean $\pm$ SD fold of control in 4T1 cells.

## Experimental animals

All experiments were approved by and conducted in accordance with the Guidelines of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of the University of Kragujevac, Serbia. Female (8–10 weeks old) BALB/c mice were used. The mice were housed in a temperature-controlled environment with a 12-hour light-dark cycle, fed *ad libitum* and observed daily. Also, experimental animals were equalized in weight and randomized in experimental or control groups.

## Animal model and drug treatment

### Orthotopic breast cancer model

BALB/c mice were inoculated with  $3 \times 10^4$  4T1 cells orthotopically into the fourth mammary fat pad. Five days after 4T1 cells were applied, the mice were injected with a chemotherapy drug by intraperitoneal injection. Female BALB/c mice received either DE-EDCP (10 mg/kg body weight/ for 5 consecutive days followed by 2 days break and treated again for 5 days), cisplatin (3mg /kg/dose; three times per week; nine doses in total) or phosphate-buffered saline. Mice were sacrificed on 36<sup>th</sup> day of the experiment.

### Estimation of breast cancer growth

The size of primary 4T1 mammary tumors was assessed morphometrically using electronic calipers in two dimensions. Using a below formula the tumor volumes ( $\text{mm}^3$ ) were calculated [56]: tumor volume ( $\text{mm}^3$ )= $L$  (major axis of the tumor)  $\times$   $W$ (minor axis) $^2/2$ .

### Histopathological analysis of metastatic lung and liver

Hematoxylin-eosin (H&E) staining was performed using 4  $\mu\text{m}$  paraffin-embedded tumor bearing lung or liver sections. In order to avoid missing micrometastases, stained sections from at least three different levels were examined for the presence of lung or liver metastases. Metastases were verified at magnification  $\times$  100 and  $\times$  400 and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope (Olympus BX51). In the histological section metastatic area per tissue was calculated using ImageJ software [57].

### *In situ* TUNEL staining

The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nickend labeling) reaction was performed to assess apoptotic cells within breast cancer tissues sections. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were stained with Apo-tag TUNEL assay kit (Millipore, Temecula, CA, USA) following the protocol of manufacturer. DAB

(3,3'-diaminobenzidine) as peroxidase substrate, was used to yield the characteristic brown color for nuclei. Following rinsing, slides were counterstained with hematoxylin solution and photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope. The negative control was performed by omitting TdT reaction step. The TUNEL-positive nuclei (brown) were quantified under  $\times$  400 magnification in five randomly fields representing at least 1000 neoplastic nuclei and the data were summarized as the mean percentage of positive cells (four tumors per group) [58].

### Immunohistochemical detection of Ki-67 and phospho-STAT3 (pSTAT3) in breast cancer tissues

Briefly, paraffin-embedded breast cancer tissue sections were deparaffinized, rehydrated and subjected to heat-induced antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.0). Next, sections were incubated with rabbit anti-mouse Ki-67 antibody (ab66155, Abcam, Cambridge, United Kingdom) or STAT3 (phospho Y705) antibody (ab76315, Abcam, Cambridge, United Kingdom) followed by visualization using the rabbit-specific conjugate (Expose Rb-Specific HRP/AEC Detection IHC Kit; Abcam Cambridge, United Kingdom). The slides were photomicrographed with a digital camera mounted on light microscope. The negative control slides were obtained by omitting the primary antibody.

The Ki-67-positive, as well as pSTAT3-positive, cells were determined by counting at least 1000 neoplastic nuclei per slide in five randomly selected fields (at magnification  $\times$  400). The data were summarized as the mean percentage of positive cells (four tumors per group) [59].

### Toxicity assessment

To study the potential side effects in the DE-EDCP treated mice, they were remarked for weight loss. After sacrificed, tissue sections of various organs (liver, kidney, lung, intestine, spleen and stomach) stained with H&E and were also examined. The levels of serum urea, creatinine and transaminase were determined to assess the renal and hepatic function. After blood collection, serum levels of these toxicity markers were measured immediately using assay kits and blood chemistry analyzer, as described [60].

### Statistical analysis

The data were analyzed using software package IBM SPSS Statistics version 20. First the normality of data distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk test. The two-tailed Student's *t* test or nonparametric Mann-Whitney Rank Sum test were used. All data in this study were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) or standard error (SE). Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant.

## Author contributions

Conceived and designed the experiments: GDR, MM, MJ, NA. Performed the experiments: MJ, AA, NG, JM, GDR. Analyzed the data: GDR, MJ, MM. Contributed reagents/materials/analysis/ tools: TS, JP, DV. Wrote the paper: GDR, JP, JM, MM.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Milan Milojevic, Aleksandar Ilic and Dusan Tomasevic for technical assistance.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## FUNDING

This work was funded by grants from the Ministry of education, science and technological development, Serbia (Grants ON 175071, ON 175069 and ON 175103) and by the Faculty of Medicine Sciences of the University of Kragujevac, Serbia (Grant MP 02/14, MP 01/14 and JP 08/15).

## REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:87-108.
2. Liu X, Hummon A. Chemical imaging of platinum-based drugs and their metabolites. *Scientific Reports*. 2016; 6:38507. <https://doi.org/10.1038/srep38507>.
3. Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem*. 2006; 13:1337-57.
4. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740:364-78.
5. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77:1103-24.
6. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*. 2008; 6:1-18.
7. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 2011; 3:1351-71.
8. Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26:71-83.
9. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012; 31:1869-83.
10. Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*. 2005; 8:131-46.
11. Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat*. 2011; 14:22-34.
12. Sabo T, Sipka-Grujicic S, Trifunovic S. Transition metal complexes with edda-type ligands — a review. *Synth React Inorg Met Org Chem*. 2002; 32:1661-1717.
13. Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda (ethylenediamine-N,N'-diacetate) ligands as potential anticancer agents. *Serb J Exp Clin Res*. 2016; 17:285-95.
14. Lazic JM, Vucićečić L, Grgurić-Sipka S, Janjetovic K, Kaluderovic GN, Misirkic M, Gruden-Pavlovic M, Popadic D, Paschke R, Trajkovic V, Sabo TJ. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem*. 2010; 5:881-889.
15. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S. Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: comparison of the representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des*. 2017; 90:262-271.
16. Misirlic Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovich U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, et al. Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol*. 2012; 25:931-9.
17. Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, Rasheed ZA, Hicks J, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, Mohseni M, Beaver JA, et al. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget*. 2016; 7:6281-93. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7057>.
18. Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: a review. *Int J Cancer*. 2016; 138:2570-8.
19. Henkels KM, Turchi JJ. Cisplatin-induced Apoptosis Proceeds by Caspase-3-dependent and -independent Pathways in Cisplatin-resistant and -sensitive Human Ovarian Cancer Cell Lines. *Cancer Res*. 1999; 59:3077-83.
20. Hsiao CJ, Hsiao G, Chen WL, Wang SW, Chiang CP, Liu LY, Guh JH, Lee TH, Chung CL. Cephalochromin induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small-cell lung cancer cells by inflicting mitochondrial disruption. *J Nat Prod*. 2014; 77:758-65.

21. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep.* 2013; 8:279-85.
22. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 1994; 79:551-5.
23. Naderi S, Gutzkow KB, Lähne HU, Lefdal S, Ryves WJ, Harwood AJ, Blomhoff HK. Blomhoff. cAMP-induced degradation of cyclin D3 through association with GSK-3 $\beta$ . *Journal of Cell Science.* 2004; 117:3769-3783.
24. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene.* 2005; 24:2909-15.
25. Chi Y, Huang S, Liu M, Guo L, Shen X, Wu J. Cyclin D3 predicts disease-free survival in breast cancer. *Cancer Cell Int.* 2015; 15:89.
26. García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menéndez-Gutiérrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5:2172-81.
27. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13:1501-12.
28. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993; 366:701-4.
29. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 2003; 13:65-70.
30. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182:311-22.
31. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984; 133:1710-5.
32. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med.* 2016; 13:496-504.
33. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015; 11:1566-72.
34. Green WJ, Ball G, Hulman G, Johnson C, Van Schalwyk G, Ratan HL, Soria D, Garibaldi JM, Parkinson R, Hulman J, Rees R, Powe DG. KI67 and DLX2 predict increased risk of metastasis formation in prostate cancer-a targeted molecular approach. *Br J Cancer.* 2016; 115:236-42.
35. Sobocki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* 2017; 77:2722-2734.
36. Friedman R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget.* 2016; 7:11746-55. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7459>.
37. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:798-809.
38. Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebti S, Jove R. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem.* 2005; 280:32979-88.
39. Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005; 65:2532-6.
40. Wang H, Deng J, Ren HY, Jia P, Zhang W, Li MQ, Li SW, Zhou QH. STAT3 influences the characteristics of stem cells in cervical carcinoma. *Oncol Lett.* 2017; 14:2131-2136.
41. Liao WY, Liaw CC, Huang YC, Han HY, Hsu HW, Hwang SM, Kuo SC, Shen CN. Cyclohexylmethyl flavonoids suppress propagation of breast cancer stem cells via downregulation of NANOG. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013:170261.
42. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiock S, Chellappan SP. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2012; 11:73.
43. Song WS, Yang YP, Huang CS, Lu KH, Liu WH, Wu WW, Lee YY, Lo WL, Lee SD, Chen YW, Huang PI, Chen MT. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chin Med Assoc.* 2016; 79:538-45.
44. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog.* 2015; 54:679-87.
45. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer.* 2014; 21:96-101.
46. Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology.* 2014; 64:494-503.
47. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 2003; 1:47-61.
48. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008; 73:994-1007.
49. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010; 2:2490-2518.
50. Nikolic M, Mijajlovic M, Jevtic V, Ratković Z, Novakovic S, Bogdanovic G, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure.* 2016; 1116:264-271.
51. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, Arsenijevic N, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic V. *in vitro* and *in vivo*

- anti-tumor effects of selected platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2017; 22:807-817.
52. Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1998; 217:61-70.
53. Koltowska K, Apitz H, Stamataki D, Hirst EM, Verkade H, Salecker I, Ober EA. Ssrp1a controls organogenesis by promoting cell cycle progression and RNA synthesis. *Development* 2013; 140:1912-1918.
54. Karimian H, Mohan S, Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Razavi M, Arya A, Kamalidehghan B, Ali HM, Noordin MI. *Tanacetum polycephalum* (L.) schultz-bip. Induces mitochondrial-mediated apoptosis and inhibits migration and invasion in MCF7 cells. *Molecules*. 2014; 19:9478-950.
55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25:402-8.
56. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7:18106-15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7635>.
57. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, Muratore A, Bartolini A, Barone V, Ribero D, Monti M, Bovino P, Sun J, Giavazzi R, Ascoli S, Cassoni P, et al. A complex of  $\alpha 6$  integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. *EMBO Mol Med*. 2012; 4:1156-75.
58. Xue M, Ge Y, Zhang J, Wang Q, Hou L, Liu Y, Sun L, Li Q. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*. 2012; 7:e43483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043483>.
59. Sznajder JI. Retraction: inhibition of nonneuronal  $\alpha 7$ -nicotinic receptor for lung cancer treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182:1456.
60. Yang M, Wang R, Sun J, Yu K, Chen B, Xu L, Zhao B, Wang H. The liver X receptor agonist TO901317 protects mice against cisplatin-induced kidney injury. *Exp Biol Med* (Maywood). 2015; 240:1717-27.



**VOJNOSANITETSKI PREGLED**

VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**

Tel/faks: +381 11 2669689

[vsp@vma.mod.gov.rs](mailto:vsp@vma.mod.gov.rs)

### ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article: ***O,O'*-DIETHYL-(S,S)-ETHYLENEDIAMINE-*N,N'*-DI-2-(3-CYCLOHEXYL)PROPANOATE DIHYDROCHLORIDE ENHANCES INFLUX OF EFFECTIVE NK AND NKT CELLS IN MURINE BREAST CANCER**

***O,O'*-DIETIL-(S,S)-ETILENDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANOAT DIHIDROHLORID POVEĆAVA INFLUKS EFEKTIVNIH NK I NKT ČELIJA U KARCINOMU DOJKE MIŠA**

**Authors** Milena Jurisevic\*, Nikola Jagić, Nevena Gajović\*, Aleksandar Arsenijević\*, Milan Jovanović, Marija Milovanović\*, Jelena Pantić\*, Ivan Jovanović\*, Tibor Sabo, Gordana D. Radosavljević\*, Nebojsa Arsenijević\*  
Vojnosanitetski pregled (2018); Online First September, 2018.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP180723149J>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.



***O,O'*-DIETHYL-(*S,S*)-ETHYLENEDIAMINE-*N,N'*-DI-2-(3-CYCLOHEXYL)PROPANOATE DIHYDROCHLORIDE ENHANCES INFLUX OF EFFECTIVE NK AND NKT CELLS IN MURINE BREAST CANCER**

***O,O'*-DIETIL-(*S,S*)-ETILENDIAMIN-*N,N'*-DI-2-(3-CIKLOHEKSIL)PROPANOAT DIHIDROHLORID POVEĆAVA INFLUKS EFEKTIVNIH NK I NKT ĆELIJA U KARCINOMU DOJKE MIŠA**

<sup>1</sup>Milena Jurisevic\*,<sup>†</sup><sup>‡</sup>,<sup>1</sup>Nikola Jagić<sup>‡</sup>, Nevena Gajovic\*, Aleksandar Arsenijevic\*, Milan Jovanovic<sup>‡</sup>, Marija Milovanovic\*, Jelena Pantic\*, Ivan Jovanovic\*, Tibor Sabo<sup>§</sup>, Gordana D. Radosavljevic\*, Nebojsa Arsenijevic\*

\*Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>†</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>‡</sup> Department of Radiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia

<sup>§</sup>Department of Abdominal Surgery, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>§</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

<sup>1</sup>Equally contributed first author

Correspondence to:

Gordana D. Radosavljevic

Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research,

Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,

Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia,

phone: +38134306800

email: [perun.gr@gmail.com](mailto:perun.gr@gmail.com)

## Abstract

**Background / Aim.** *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride (DE-EDCP) has been found to possess promising cytotoxic activity against various tumor cell lines. Also, DE-EDCP reduces tumor progression by several mechanisms such as triggering tumor cell death and inhibition of cell proliferation. The aim of present study was to further evaluate anti-tumor activity of DE-EDCP by investigating effects on migratory potential of tumor cells and anti-tumor immune response. **Methods.** Migratory potential of DE-EDCP was evaluated by scratch wound assay. Female BALB/c mice were inoculated with 4T1 breast cancer cells and treatment with DE-EDCP started five days following orthotopic tumor implantation. The frequency and phenotype of tumor-infiltrating NK and NKT cells were analyzed by flow cytometry. **Results.** DE-EDCP inhibited migratory potential of highly metastatic 4T1 cells. DE-EDCP facilitated accumulation of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells and CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NK cells in tumor microenvironment. DE-EDCP treatment led to significant decrement of tumor infiltrating anergic NKT cells expressing CTLA-4, KLRG-1 and PD-1. Mice given DE-EDCP had significantly increased percentages of tumoricidal FasL positive NK cells. **Conclusion.** DE-EDCP inhibits murine breast cancer progression through direct effects on tumor cells and by facilitating anti-tumor immunity. DE-EDCP enhances accumulation, promotes tumoricidal phenotype and maintains responsiveness of NK and NKT cells in 4T1 murine breast cancer.

**Key words:** *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride, breast cancer, anti-tumor immune response

## Apstrakt

**Uvod / Cilj.** *O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid (DE-EDCP), poseduje značajnu citotoksičku aktivnost na linije različitih tumorskih ćelija. DE-EDCP redukuje rast i metastaziranje karcinoma dojke tako što indukuje ćelijsku smrt i inhibira progresiju ćelijskog ciklusa. U cilju dalje analize antitumorske aktivnosti DE-EDCP, ispitan je njegov uticaj na migratorni potencijal, kao i na antitumorski imunski odgovor. **Metode.** Uticaj DE-EDCP na mobilnost malignih ćelija ispitan je testom migracije (*scratch wound assay*). Model karcinoma dojke je indukovan ortotopskom transplantacijom malignih ćelija 4T1 u singene BALB/C miševе. Nakon pojave palpabilnog tumora, miševi su tretirani sa DE-EDCP. Protočnom citometrijom određivana je procentualna zastupljenost NK i NKT ćelija, kao i njihov funkcionalni fenotip. **Rezultati.** DE-EDCP inhibira migratorni potencijal 4T1 malignih ćelija sa izraženom metastatskom sposobnošću. DE-EDCP povećava influks CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT i CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NK ćelija u tumorsku mikrosredinu miševa tretiranih sa DE-EDCP u poređenju sa farmakološki netretiranim miševima. DE-EDCP smanjuje procent anergičnih NKT ćelija koje eksprimiraju inhibicione receptore CTLA-4, KLRG-1 i PD-1. Kod miševa tretiranih sa DE-EDCP uočena je povećana zastupljenost tumoricidnih NK ćelija koje eksprimiraju FasL. **Zaključak.** DE-EDCP inhibira progresiju mišjeg karcinom dojke što je posledica kako direktinih efekata ispitivane supstance na tumorske ćelije tako i pojačanog antitumorskog imunskog odgovora. Drugim rečima, DE-EDCP osim što povećava influks,

podstiče tumoricidni fenotip i zadržava responzivnost NK i NKT ćelija u mišjem karcinomu dojke.

**Ključne reči:** *O,O'*-dietil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)propanoat dihidrohlorid, karcinom dojke, antitumorski imunski odgovor

## Introduction

Ester derivatives of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoic acid were synthesized as ligands for ethylenediamine-based platinum complexes (1). These platinum(IV) complexes exhibit higher tumoricidal activity toward several cancer cell lines compared to cisplatin as a conventional chemotherapeutic drug. The cytotoxicity of platinum(IV) complexes could be at least partly related to their organic ligands with lack of relationship between the cytotoxic capacity and the alkyl side-chain length of these ligands. In line with this observation, it was further demonstrated that ligand *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoate dihydrochloride (DE-EDCP) alone exerted similar or even higher cytotoxic activity compared to cisplatin against various human and mouse cell lines (1, 2). Taken together, it seems that DE-EDCP exerted highly potent cytotoxic activity against murine melanoma cells (1) and human promyelocytic leukemia cells (2). Next, cytotoxicity of DE-EDCP was demonstrated on various leukemic cell lines (3). According to obtained IC<sub>50</sub> values, human promyelocytic leukemia cells were highly sensitive to DE-EDCP. The cytotoxic effect of DE-EDCP against human leukemic cells (HL-60) was accompanied with increased production of superoxide and depolarization of mitochondrial membrane (3). Results of this study indicated that DE-EDCP treatment caused caspase-independent apoptosis of HL-60 cells by presentation of phosphatidylserine on cell membrane and fragmentation of DNA (3).

Recently, we demonstrated that DE-EDCP attenuated murine breast cancer progression by facilitating apoptosis and inhibiting proliferation of tumor cells (4). DE-EDCP in 4T1 tumor cells reduced expression of anti-apoptotic Bcl-2 while increased expression of proapoptotic Bax and caspase-3. Also, DE-EDCP treatment blocks cell cycle progression in 4T1 tumor cells by increasing expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16, p21 and p27 with subsequent decrease in the expression of cyclin D3 and Ki-67, and arresting 4T1 cells in G0/G1 phase of cell cycle (4). Further, DE-EDCP reduced the malignant potential of tumor cells by reducing expression of STAT3 and downstream regulated molecules, NANOG and SOX2 in 4T1 cells. Recent study also reported that DE-EDCP reduces melanoma growth mainly by inducing expression of key proapoptotic genes (5). Melanoma cells treated with DE-EDCP underwent caspase-dependent apoptosis as a result of mitochondrial dysfunction and increased accumulation of reactive oxygen species. In both murine breast cancer and melanoma models, DE-EDCP was well tolerated *in vivo* without obvious side effects (4,5).

Activity of natural killer (NK) cells, as well as NKT cells, represents the major mechanism of innate immunity against tumors (6-9). NK cells lyse tumor cells without prior sensitization and represent the first line of defense against established tumors (6, 8). NKT cells, by production of various immunoregulatory cytokines, link innate and adaptive immune response (9). It has been reported that NKT cell reduce tumor progression, mostly by enhancing cytotoxicity and IFN- $\gamma$  production of NK cells and CD8<sup>+</sup>T cells (10).

The aim of this study was to further evaluate anti-tumor activity of DE-EDCP in 4T1 murine breast cancer model. We investigated the effects of DE-EDCP on migratory potential of tumor cells as well as modulation of anti-tumor immune response.

## **Methods**

### *Cell culture and reagents*

The cell line of murine breast cancer (4T1) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA). 4T1 cells were grown in suspension in complete DMEM medium in a 5% CO<sub>2</sub> incubator with standard conditions (11). Tumor cell suspension with >90% viability was prepared using 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate buffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH). In all *in vitro* and *in vivo* experiments only cell suspensions with >95% viable cells were used. In order to determinate the viability of tumor cells trypan blue was used.

The organic compound *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylendiamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoate dihydrochloride (DE-EDCP), was prepared according previously described procedure (1, 2). As referent cytostatic cisplatin (CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum(II)/*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) (Sigma-Aldrich) was used.

### *Scratch wound assay*

The wound healing assay was performed as previously reported (12). After 4T1 cells were seeded into 6-well plates, they were allowed to growth to about 90% confluence in present of complete medium. After 4T1 achieved appropriate confluence, a plastic tip was used to make a scratch on the cell monolayer (13). The wound area was washed three times with PBS and the 4T1 cells were incubated with DE-EDCP (15.63 μM) or CDDP (15.63 μM) for 4 and 15 hours. The 4T1 cells migrated into the wound surface and the average distance of the migrating cells was observed using inverted microscopy. All data were analyzed from three independent experiments performed in triplicate using ImageJ software and the results are presented as the mean ± SD (14).

### *Animals*

Female (8–12 weeks old) BALB/c mice were used in *in vivo* experiment. Experimental animals were equalized in weight and randomized in experimental or control groups. The mice were housed in a temperature-controlled environment with a 12-hour light-dark cycle, fed ad libitum and observed daily. All experiments were approved by and conducted in accordance with the Guidelines of the Animal Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

### *Animal Model and Drug Treatment*

BALB/c mice were inoculated with 3 x 10<sup>4</sup> 4T1 tumor cells orthotopically into the fourth mammary fat pad (11, 15). Pharmacology treatments started when tumors were palpable five days after implantation of 4T1 cells. Tumor bearing mice received intraperitoneal injection of either DE-EDCP (10mg/kg/dose- five consecutive doses + two days pause + five consecutive doses; ten doses in total); CDDP (3mg/kg/dose; three times per week; nine doses in total) or 0.9 % NaCl. Mice were sacrificed on 18<sup>th</sup> day of the experiment.

### *Flow cytometric analyses of tumor-infiltrating NK and NKT cells*

After three experimental groups of mice were sacrificed on 18th day of the experiment, primary tumor was isolated from mice and single cell suspensions of primary tumors were obtained by enzymatic digestion, as previously described (16). Fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies specific for CD3 (145-2C11), CD49b (HMa2), CD178/FasL (MFL3), CD152/CTLA-4 (BNI3), PD-1 (PDCD1/922), KLRG-1 (2F1) or their respective isotype controls (BD Pharmingen, NJ/Invitrogen, Carlsbad, CA) were used. Expression of cell surface antigens was analyzed with Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and the data were analyzed using FlowJo (Tree Star). Data are presented as means  $\pm$  SD of two individual experiments, each carried out with six mice per experimental group.

### *Statistical Analysis*

The data were analyzed using software package IBM SPSS Statistics version 20. First the normality of data distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Wilk test. The two-tailed Student's t test or Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test were used. All data in this study were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant.

## **Results**

### **DE-EDCP reduces migration of 4T1 cells**

It is well known that cell migration is the first step in the invasive-metastatic cascade (17). We recently reported that DE-EDCP reduces murine breast cancer growth and metastasis (4). Herein, we add the effect of DE-EDCP treatment on 4T1 cell migration examined by wound healing assay using non-lethal concentration (15.63  $\mu$ M) for 4 and 15 hours. Migration assay revealed that scratch wound area in wells with untreated 4T1 cells had a significant diminution (approximately 65%), while wound area of 4T1 cells treated with DE-EDCP was significantly wider in comparison to control cells 4 hours following treatment ( $p=0.003$ ; Fig. 1). The same phenomenon was observed 15 hours after scratch ( $p=0.019$ ; Fig. 1). In addition, significant effect of CDDP on the reduction of 4T1 cell migration was achieved after 15 hours (Fig. 1).

### **DE-EDCP administration facilitates accumulation of NKT and NK cells within tumor microenvironment**

We further analyzed the effect of DE-EDCP on local antitumor immune response. The obtained data revealed that DE-EDCP significantly increased the percentages of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells in tumor tissue when compared to vehicle-treated mice ( $p=0.03$ ; Fig. 2, left panel). Of note, the frequencies of NKT cells were increased in mice treated with CDDP, but it did not reach statistical significance (Fig. 2, left panel). DE-EDCP also increased the percentages of tumor-infiltrating CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NK cells ( $p=0.032$ ; Fig. 2, right panel). CDDP did not significantly affect accumulation of NK cells in tumor tissue (Fig. 2, middle panel). We did not reveal effect of DE-EDCP administration, or CDDP, on intratumoral accumulation of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> T cells (Fig.2 right panel).

### **DE-EDCP affects functional phenotype of tumor-infiltrating NKT and NK cells**

Further, we analyzed functional phenotype of tumor-infiltrating NKT and NK cells. Apart from CDDP, DE-EDCP did not affect the presence of tumoricidal NKT cells expressing

FasL (Fig 3). However, DE-EDCP significantly decreased the presence of NKT cells expressing inhibitory markers such as CTLA-4, KLRG-1 and PD-1 in comparison with vehicle and CDDP treated mice (Fig. 3). In contrast to DE-EDCP, CDDP significantly increased the percentage of PD-1 positive NKT cells when compared to vehicle-treated mice (Fig. 3).

Furthermore, mice treated with DE-EDCP, but not CDDP, exhibited significantly increased percentages of tumoricidal FasL<sup>+</sup> NK cells compared to vehicle-treated mice (Fig. 4). There were no significant differences in the expression of inhibitory KLRG-1, CTLA-4 and PD-1 among NK cells from both DE-EDCP and CDDP treated mice (Fig. 4).

## **Discussion**

Cell migration is a prerequisite for tumor invasion and metastasis (17), and can be a potential therapeutic target for tumor treatment. For this purpose we used 4T1 cells, known as cells with high metastatic potential (18). Herein, our results indicated that DE-EDCP effectively inhibits the migration of 4T1 cells as evaluated by wound healing assay (Fig. 1). We previously reported that DE-EDCP decreased expression of STAT3 in 4T1 cells, as well as NANOG and SOX2 which are downstream targets of STAT3 signaling pathway (4). STAT3 has impact on cell invasion and motility (19). For instance, knockdown of STAT3 compromised the proliferation and migration of MCF7 human breast cancer cells (20). In addition, overexpression of NANOG promoted the migration and invasion of MCF7 cells (21). Similarly, NANOG regulated cell migration in ovarian cancer (22). Furthermore, SOX2 silencing has also been found to prevent migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells (23). In agreement with these findings, it appears that DE-EDCP inhibits tumor cell migration via downregulation of STAT3, NANOG and SOX2 expression. Therefore, inhibition of 4T1 cell migration seems to be the additional beneficial effect of DE-EDCP on breast cancer progression.

In addition to obvious direct effects on tumor cells, we further hypothesized that DE-EDCP might influence tumor progression by modulating anti-tumor immune response. To the date, it was found that DE-EDCP inhibited production of IFN- $\gamma$  and IL-17 by cells derived from spleen and lymph nodes of mice and rats (24). However, the effects of DE-EDCP on anti-tumor immune response are still unknown. In this study, we explored the effects of DE-EDCP on anti-tumor innate immunity in the weakly immunogenic and highly metastatic 4T1 murine mammary cancer model. We showed that DE-EDCP facilitated influx of CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NKT cells and CD3<sup>+</sup>CD49<sup>+</sup> NK cells in tumor microenvironment (Fig. 2). CDDP treatment slightly increased influx of these cells, however the increment did not achieve statistical significance so we can only assume that CDDP antitumor effects in particular tumor model were achieved by some other mechanisms. NK cells are innate immune effector lymphocytes that play an important role in the protection against tumor. NK cells infiltrate solid tumors thus contributing to favorable prognosis in cancer patients (25). Apart from NK cells, activated NKT cells are involved in elimination of tumor cells either directly or indirectly by engagement of other immune cells (26-28). Furthermore, recently an association between numbers of tumor-infiltrating NKT cells with better clinical outcome was found (29). NKT cells react quickly to stimuli and have a remarkable capacity to produce an array of cytokines and chemokines in order to modulate both innate and adaptive immune response (30).

In addition to increased influx of NKT and NK cells in breast cancer tissue, the obtained data revealed that DE-EDCP affects functional phenotype of these cells. It is well-

established that both cell types, in particular NK cells, directly eliminate target tumor cells by at least two mechanisms, producing perforins and granzymes as well as the engagement of cell death receptors. Cell death receptor Fas and its ligand FasL are important players in initiation of target cell apoptosis (31). Fas-FasL interaction induces receptors trimerization, activation of adaptor protein FADD which results with activation of caspase-8 and consequent initiation of apoptosis (32). Our results revealed that DE-EDCP treated mice had significantly increased percentages of FasL<sup>+</sup> NK cells, but not NKT cells, indicating their enhanced tumoricidal potential (Fig. 3 and 4). These data are in line with our previously described results revealing that DE-EDCP treatment increased percentage of apoptotic (TUNEL<sup>+</sup>) tumor cells in breast cancer tissue (4). NKT cells directly eliminate CD1d-expressing tumor cells (33). 4T1 cells express minimal surface levels of CD1d (34). Therefore, there is low possibility that NKT cells directly eliminate 4T1 cells. However, NKT cells could produce IL-2 further stimulating NK cells to kill the NKT cell-resistant tumor cell targets (35). Teng et al (34) showed that CD8<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  are crucial for 4T1 tumor eradication. However other studies revealed that antitumor activity based on cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells plays a nonessential role in 4T1 breast tumor model (11, 36). Innate immunity cells, especially NK cells, occupy a central place in the control of growth and metastasis of weakly immunogenic mouse 4T1 breast tumor (11, 36). The influence of DE-EDCP on the functional status of NK cells in the tumor microenvironment indicates that the DE-EDCP effects on the innate immune response may be an additional anti-tumor mechanism of action. At this point we may suppose that higher percentage of tumor-infiltrating NK cells and higher expression of FasL on NK cells after DE-EDCP treatment may lead to Fas-FasL interaction of tumor and NK cells and consequently cause tumor cell death. Also, we can only assume that DE-EDCP might stimulate NKT cells in tumor microenvironment to produce various cytokines thus enhancing tumoricidal capacities of NK cells. This can be an additional mechanism of DE-EDCP-mediated diminishing of tumor progression.

Killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG-1) is C-type lectin-like inhibitory receptor expressed mostly on NK cells, cytotoxic T cells and long-lived effector NKT cells (37, 38). KLRG-1 regulates homeostasis and maturation of NK cells (39). High KLRG-1 expression correlates with low proliferative capacity (39, 40) and increases apoptosis of NK cells (41). DE-EDCP significantly decreased percentage of NKT cells, but not NK cells, expressing inhibitory receptors KLRG-1 (Fig. 3 and 4). The programmed cell death-1 receptor (PD-1) is immune checkpoint inhibitor expressed on the surface of immune effector cells, including T cells, NK and NKT cells (42-44). Marked increase in PD-1 expression after  $\alpha$ -GalCer stimulation indicated NKT cell anergy (45, 46). Herein, we observed significantly decreased percentage of PD-1<sup>+</sup> NKT cells following DE-EDCP treatment (Fig. 3) thus contributing to NKT cell responsiveness. Next, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) is another immune checkpoint molecule with crucial role in decline of immune response and maintaining immune homeostasis (47, 48). CTLA-4 is expressed on tumor-infiltrating NK cells in mice (49). The obtained data revealed that DE-EDCP also reduced the frequencies of CTLA-4<sup>+</sup> NKT cells (Fig. 3). Both PD-1 and CTLA-4 blockade, as well as their combination, have proven to be very effective in animal models of melanoma and some breast cancer models (50-53).

## Conclusion

In addition to our previously published data regarding the beneficial effects of DE-EDCP on 4T1 breast cancer progression, here we add the evidences that DE-EDCP inhibits 4T1 cell migration and promotes anti-tumor immune response mediated by NK and NKT cells. DE-EDCP enhances accumulation, promotes tumoricidal phenotype and maintenances responsiveness of NK and NKT cells in 4T1 murine breast cancer model.

### **Declaration of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgments**

We would like to thank Milan Milojevic, Dusan Tomasevic and Aleksandar Ilic for technical assistance. This work was funded by grants from the Ministry of education, science and technological development, Serbia (Grants ON 175071, ON 175069 and ON 175103) and by the Faculty of Medicine Sciences of the University of Kragujevac, Serbia (JP 08/15).

### **Reference**



1. *Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetovic K, Kaluderovic GN, Misirkic M, et al.* Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate- type ligands. *Chem Med Chem.* 2010; 5:881-889.
2. *Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S.* Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: Comparison of the representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(2):262-271.
3. *Misirlic Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovich U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, et al.* Cyclohexyl analogues of ethylenediamine dipropanoic acid induce caspase-independent mitochondrial apoptosis in human leukemic cells. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(4):931-9.
4. *Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, et al.* The organic ester *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget.* 2018; 9(46):28195-28212.
5. *Isakovic AM, Petricevic SM, Ristic SM, Popadic DM, Kravic-Stevovic TK, Zogovic NS, et al.* In vitro and in vivo antimelanoma effect of ethyl ester cyclohexyl analog of ethylenediamine dipropanoic acid. *Melanoma Res.* 2018; 28(1):8-20.
6. *Vujanovic, NL, Basse P, Herberman RB, Whiteside TL.* Antitumor functions of natural killer cells and control of metastasis. *Methods.* 1996; 9: 394–408.
7. *Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L.* Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(4):239-52.
8. *Morvan MG, Lanier LL.* NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(1):7-19.
9. *Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB.* Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(2):101-17.
10. *Gebremeskel S, Clattenburg DR, Slauenwhite D, Lobert L, Johnston B.* Natural killer T cell activation overcomes immunosuppression to enhance clearance of postsurgical breast cancer metastasis in mice. *Oncoimmunology.* 2015; 4(3):e995562.
11. *Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, et al.* Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer.* 2014; 134(7):1669-82.

12. Jiang Q, Pan Y, Cheng Y, Li H, Liu D, Li H. Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Oncol Rep.* 2016; 36(1):253-62.
13. Xu L, Deng X. Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem.* 2006;281:4457-4466.
14. Valaee S, Yaghoobi MM, Shamsara M. Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174486.
15. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, et al. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7:18106-15.
16. Gajovic N, Jurisevic M, Pantic J, Radosavljevic G, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Endocr Relat Cancer.* 2018; 25(4):493-507.
17. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem.* 2006; 108:327-334.
18. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer.* 2012; 12:120.
19. Teng Y, Ross JL, Cowell JK. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT.* 2014; 3(1):e28086.
20. You J, Shi X, Liang H, Ye J, Wang L, Han H, et al. Cystathionine- $\gamma$ -lyase promotes process of breast cancer in association with STAT3 signaling pathway. *Oncotarget.* 2017; (39):65677-65686.
21. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2014; 33(20):2655-64.
22. Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, et al. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of outcome in ovarian cancers. *Oncogene.* 2013; 32(30):3500-9.
23. Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):9170.
24. Miljković D, Poljarević JM, Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Nikolić I, et al. Novel octahedral Pt(IV) complex with di-n-propyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-

cyclohexyl)propanoate ligand exerts potent immunomodulatory effects. *Eur J Med Chem.* 2012; 47(1):194-201.

25. *Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareño J, et al.* Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002; 35:23–28.

26. *Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, et al.* IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand,  $\alpha$ -galactosylceramide. *Blood.* 2002; 100:1728–33.

27. *Gebremeskel S, Clattenburg DR, Slauenwhite D, Lobert L, Johnston B.* Natural killer T cell activation overcomes immunosuppression to enhance clearance of post-surgical breast cancer metastasis in mice. *Oncoimmunology.* 2015; 4:e995562.

28. *Gebremeskel S, Slauenwhite D, Johnston B.* Reconstitution models to evaluate natural killer T cell function in tumor control. *Immunol Cell Biol.* 2016; 94:90–100.

29. *Schneiders FL, de Bruin RC, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al.* Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J Clin Oncol.* 2012; 30(5):567-70.

30. *Godfrey DI, Kronenberg M.* Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004; 114(10):1379-88.

31. *Ioachim HL, Decuseara R, Giancotti F, Dorsett BH.* FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract.* 2005; 200(11-12):743-51.

32. *Wajant H.* The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635-1636.

33. *Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, et al.* CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells. *Leuk Lymphoma.* 2006; 47(10):2218-23.

34. *Teng MW, Sharkey J, McLaughlin NM, Exley MA, Smyth MJ.* CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol.* 2009; 183(3):1911-20.

35. *Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, et al.* Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol.* 2001; 167(6):3114-22.

36. *Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML.* ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol.* 2011;41(7):1902-12.
37. *Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N.* Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med.* 2006; 203(2):289-95.
38. *Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, et al.* KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(34):12474-9.
39. *Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli Esposti MA, et al.* NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol.* 2007; 178(8):4764-70.
40. *Müller-Durovic B, Lanna A, Covre LP, Mills RS, Henson SM, Akbar AN.* Killer Cell Lectin-like Receptor G1 Inhibits NK Cell Function through Activation of Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase. *J Immunol.* 2016; 197(7):2891-2899.
41. *Robbins SH, Nguyen KB, Takahashi N, Mikayama T, Biron CA, Brossay L.* Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *Journal of immunology.* 2002; 168:2585–2589.
42. *Nair S, Dhodapkar MV.* Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2017; 8:1178.
43. *Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 2004; 574(1–3):37–41.
44. *Dong Y, Sun Q, Zhang X.* PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(2):2171-2186.
45. *Chang WS, Kim JY, Kim YJ, Kim YS, Lee JM, Azuma M, et al.* Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol.* 2008; 181(10):6707-10.
46. *Parekh VV, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, et al.* PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol.* 2009; 182(5):2816-26.
47. *Buchbinder EI, Desai A.* CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39(1):98-106.
48. *Rudd CE, Taylor A, Schneider H.* CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009; 229(1):12-26.

49. *Beldi-Ferchiou A, Caillat-Zucman S.* Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10). pii: E2129. doi: 10.3390/ijms18102129.
50. *an Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP.* Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med.* 1999; 190:355–66.
51. *Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP.* Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med.* 2014; 211:715–25.
52. *Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, et al.* Eradication of metastatic mouse cancers resistant to immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:11774–9.
53. *Pentcheva-Hoang T, Simpson TR, Montalvo-Ortiz W, Allison JP.* Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade enhances antitumor immunity by stimulating melanoma-specific T-cell motility. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2:970–80.

Received on July 23, 2018.  
Revised on August 24, 2018.  
Accepted on September 11, 2018.  
Online First September, 2018.

## Figure Legends

**Figure 1. Inhibitory effect of DE-EDCP on murine breast cancer cell migration.** The scratch wound assay of 4T1 cells treated with DE-EDCP (15.63  $\mu$ M) or CDDP (15.63  $\mu$ M) for 4 hours and 15 hours. Representative images of wound closure in control, CDDP and DE-EDCP treated 4T1 cells. The images were captured three times at different areas and the results were analyzed by ImageJ software. Cell migration was quantified measuring the mean cell-free gap distance between the edges of the scratch area. Data are presented as

mean of wound area  $\pm$  SD. Mann-Whitney U test was performed and significant differences are reported  $*p < 0.05$ .

**Figure 2. DE-EDCP increases influx of NKT and NK cells in tumor microenvironment.** The graphs and representative FACS plots showing the percentages of NKT, NK and T cells derived from tumor tissue of vehicle-treated, CDDP-treated and DE-EDCP-treated mice 18 days after 4T1 cell inoculation. Data are presented as mean  $\pm$  SD of two individual experiments, each carried out with six mice per group. Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test,  $*p < 0.05$ .

**Figure 3. DE-EDCP affects the functional phenotype of NKT cells in tumor tissue.** The graphs and representative FACS plots show the percentage of FasL<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NKT cells derived from tumor tissue of vehicle-treated, CDDP-treated and DE-EDCP-treated mice 18 days after 4T1 cell inoculation. Data are presented as means  $\pm$  SD of two individual experiments, each carried out with six mice per group. Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test,  $*p < 0.05$ .

**Figure 4. DE-EDCP affects the phenotype of NK cells in tumor tissue.** The graphs and representative FACS plots show the percentage of FasL<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells derived from tumor tissue of vehicle-treated, CDDP-treated and DE-EDCP-treated mice 18 days after 4T1 cell inoculation. Data are presented as means  $\pm$  SD of two individual experiments, each carried out with six mice per group. Statistical significance was tested by Mann-Whitney U test,  $*p < 0.05$ .

Figure 1.

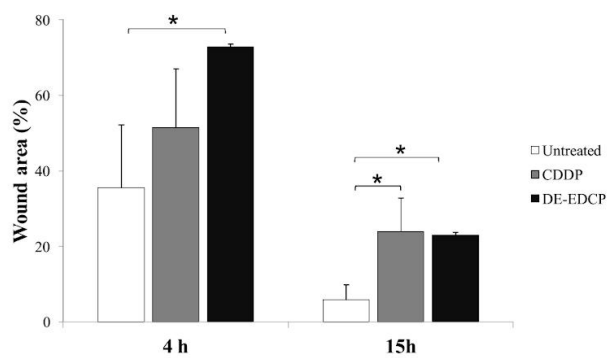
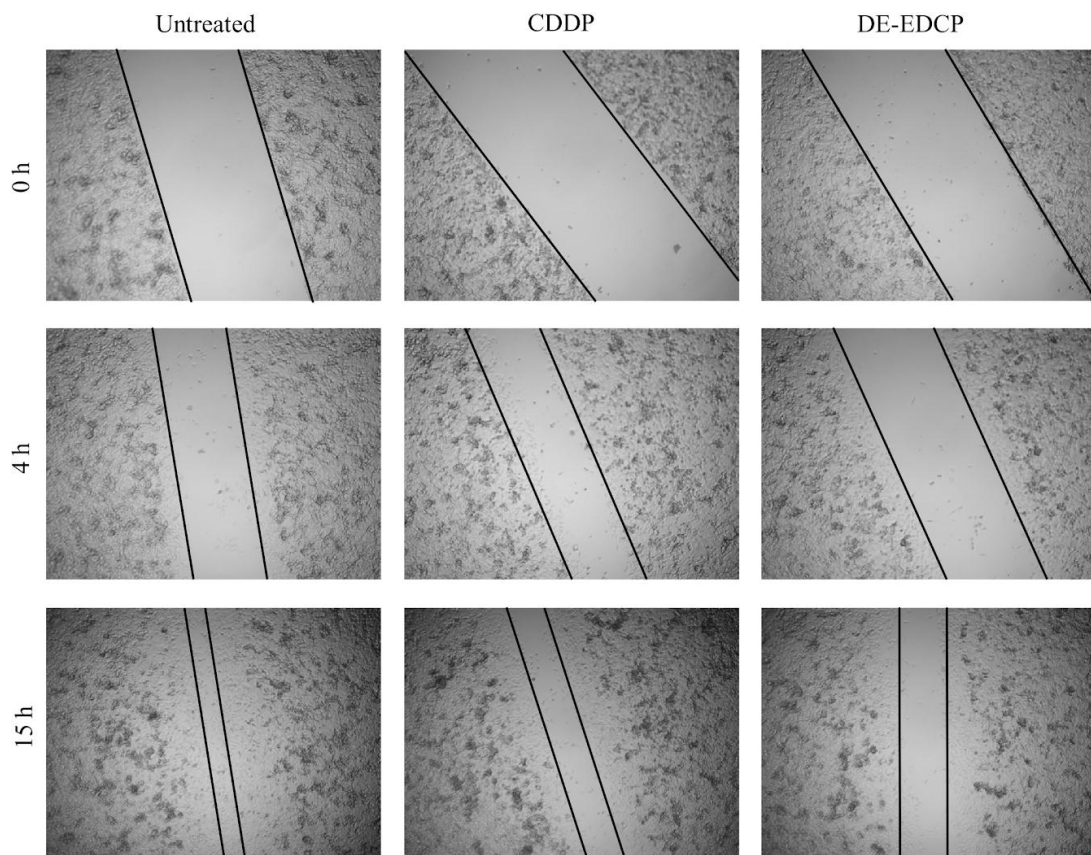




Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

## Research Article

# Fecal Galectin-3: A New Promising Biomarker for Severity and Progression of Colorectal Carcinoma

Milan Jovanovic,<sup>1</sup> Nevena Gajovic ,<sup>2</sup> Natasa Zdravkovic,<sup>3</sup> Marina Jovanovic,<sup>3</sup> Milena Jurisevic,<sup>4</sup> Danilo Vojvodic,<sup>5</sup> Veljko Maric,<sup>6</sup> Aleksandar Arsenijevic,<sup>2</sup> and Ivan Jovanovic <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Abdominal Surgery, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup>Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>4</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>5</sup>Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

<sup>6</sup>Department of Surgery, Faculty of Medicine Foca, University of East Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

Correspondence should be addressed to Nevena Gajovic; [gajovicnevena@yahoo.com](mailto:gajovicnevena@yahoo.com)

Received 29 December 2017; Revised 26 February 2018; Accepted 5 March 2018; Published 4 April 2018

Academic Editor: Amedeo Amedei

Copyright © 2018 Milan Jovanovic et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background and Objectives.** The aim of the study was to determine systemic and fecal values of galectin-3 and pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with CRC and the relationship with clinicopathological aspects. **Methods.** Concentrations of galectin-3, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-1 $\beta$  were analyzed in samples of blood and stool of 60 patients with CRC. **Results.** Systemic concentration of TNF- $\alpha$  was significantly lower in patients with severe diseases (advanced TNM stage, nuclear grade, and poor histological differentiation) as in patients with more progressive CRC (lymph and blood vessel invasion, presence of metastasis). Fecal values of anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  and IL-10 were increased in patients with severe stadium of CRC. Fecal concentration of Gal-3 was enhanced in CRC patients with higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, advanced TNM stage, and metastatic disease. Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio in sera and feces had a higher trend in patients with severe and advanced diseases. Positive correlation between fecal Gal-3 and disease severity, tumor progression, and biomarkers AFP and CEA, respectively, was also observed. **Conclusions.** Predomination of Gal-3 in patients with advanced diseases may implicate on its role in limiting ongoing proinflammatory processes. The fecal values of Gal-3 can be used as a valuable marker for CRC severity and progression.

## 1. Introduction

Of cancers that affect both men and women, colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer death in the world [1, 2]. It is the third most common cancer in males and the second in females [1, 2]. Although the distribution of CRC varies widely, more than two-thirds of all cases and more than half of all deaths happen in countries with high human development index (HDI) [3]. Besides the important role of genetic factors such as mutations of oncogenes and tumor suppressor genes and history of CRC in first-degree relatives, environmental factors, such as inflammatory bowel

disease, increased body mass index (BMI), red meat intake, cigarette smoking, low physical activity, and low vegetable and fruit consumption, are associated with an increased risk of CRC [4, 5]. CRC metastasizes to the liver and lungs, while bone metastasis often indicates the terminal phase of colon cancer [6]. Despite the fact that around 80% of patients with CRC have primary surgery, about half of the patients already have metastatic lesions primarily in the liver [7, 8]. Surgery, as well as radiofrequency ablation, cryosurgery, chemotherapy, radiation therapy, or targeted therapy, is the most common treatment option for CRC [4]. Although a 5-year survival or stage I–III CRC is pretty good, cancer-related



deaths are registered in one-third of patients younger than 65 years old at disease onset [9]. Although the gold standard for CRC diagnosis is a colonoscopy procedure, there is a tendency to use more noninvasive tests such as measurement of different molecules in sera and feces of patients [10]. There has been a sustained interest in the identification of state biomarkers for CRC [11–13]. New markers should contribute to the prediction of prognosis. Recent studies revealed the significance of estimation of fecal markers in the determination and prediction of disease severity [14–16].

Galectin-3 (Gal-3) is a multifunctional  $\beta$ -galactoside-binding lectin highly expressed in a variety of inflammatory and epithelial cells [17]. Multiple functions of Gal-3 depend on its location inside the cell or on the cell surface [18]. It is well known that Gal-3 is involved in several biological processes such as cell attachment, cell differentiation and proliferation, embryogenesis, inflammation, cancer invasion, and metastasis [19, 20]. Previous studies revealed the importance of Gal-3 as a prognostic marker in CRC. It is shown that patients with detectable expression of Gal-3 in tumor have more lymph node and distant metastases, frequent venous invasion, and deeper wall invasion in comparison to those with Gal-3-negative cases [21]. Moreover, a recent study revealed that serum galectin-3 and carcinoembryonic antigen (CEA) promote CRC migration and metastasis [22].

The aim of this study was to evaluate systemic and fecal values of Gal-3 and pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as their ratios, in patients with CRC and UC and the relationship with clinicopathological aspects of disease. We demonstrate enhanced fecal concentration of Gal-3 in CRC patients with higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, advanced TNM stage, and metastatic disease, while predominance of Gal-3 over proinflammatory cytokines in patients with advanced TNM stage and metastatic disease. Fecal Gal-3 positively correlates with disease severity (advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation) and progression (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis) and systemic biomarkers AFP and CEA. There was no significant correlation between fecal Gal-3 and clinical and endoscopic scores and histopathological characteristics of affected tissue in patients with ulcerative colitis. These findings indicate Gal-3 as a potential marker of CRC severity and progression.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Ethics Approval.** The study was conducted at Center for Gastroenterology, Clinical Center of Kragujevac, and Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. Informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by the ethics committee of the Clinical Center of Kragujevac, Kragujevac, Serbia, and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia. All research procedures were made according to the principle of Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki.

**2.2. Patients.** The study included 60 patients with CRC. The diagnosis of CRC was based on endoscopic and

histopathological criteria. Patients with no well-defined pathology, no adequate clinical document available, or previously treated with radiation or chemotherapy were excluded from the study. Clinicopathological information for all patients included sex, age, TNM stage, vascular/lymph node invasion, nuclear grade, and differentiation. Blood and stool specimens were collected before the surgery and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pathological features were analyzed according to the 2010 American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification.

Fifty patients, with a median age of 55 (range, 23–73 years), diagnosed as UC cases, were also enrolled in this study. Diagnosis was made on the basis of established clinical, endoscopic, and histological criteria [23]. The study did not include patients without well-defined pathology, no adequate clinical document available, or with previously diagnosed coexisting cardiopulmonary, renal, hepatic, allergy, and rheumatic disease who were treated with anti-inflammatory drugs. Stool samples were collected before the surgery and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Clinical activity of disease and endoscopic findings were represented as Mayo clinical/endoscopic subscore, defined as previously described [24–26]. Histological activity was scored according to Geboes Score (GS), considering the presence of architectural changes, neutrophils, eosinophils, crypt destruction, and erosion of the mucous membranes [27].

**2.3. Measurement of Galectin-3, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-1 $\beta$  in Sera and Feces.** All samples were collected prior to any therapeutic application. Blood specimens were collected from each studied subject; blood clot was cut and centrifuged for separating the serum; and all serum samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  before use. Stools (1–10 g) were collected in sterile containers and weighed. They were divided into 1 g aliquot and then emulsified in 5 mL of protease inhibitor cocktail (SIGMA, P83401), diluted 1:100, and centrifuged for 5 minutes at 400g, at  $4^{\circ}\text{C}$ , as previously described [28, 29]. The supernatant fluid was collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until ELISA. Serum and fecal concentrations of cytokines were measured, as described [30], using sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) specific for human cytokines according to the manufacturer's instructions. Briefly, the PVC microtiter plates were coated with capture antibody, overnight. After blocking the remaining protein-binding sites by adding blocking buffer (1% bovine serum albumin in PBS) for 1 hour, serum/fecal samples or standard recombinant Gal-3/TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ /IL-10 were added to the plates for 2 hours, followed by application of biotinylated detection antibody for 1 hour at room temperature. After introduction of streptavidin peroxidase for 1 hour, the plates were developed with substrate reagent for 20 minutes. The reaction was stopped by adding 4 mol/L sulfuric acid, and the absorbance was read at 495 nm by a microplate reader. Concentration of the samples was measured by interpolation from the standard curve made by a series of well-known concentrations as per manufacturer's instruction. Values of measured cytokines are presented as pg/ml of sera and pg/g of feces, respectively. The lower detection limit (sensitivity) of the ELISA

kits, for measured cytokines, was galectin-3: 85 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 5.5 pg/ml; TGF- $\beta$ : 15.4 pg/ml; IL-10: 3.9 pg/ml, and IL-1 $\beta$ : 1 pg/ml.

**2.4. Evaluation of Tumor Markers in Sera.** Serum levels of tumor markers alpha-fetoprotein (AFP), carcinoembryonic antigen (CEA), and cancer antigen 19-9 (CA19-9) were determined by chemiluminescence enzyme immunoassay (CLIA) in the central biochemical laboratory of the Clinical Center Kragujevac.

**2.5. Statistical Analysis.** The statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software. The results were reported as mean, standard deviation (SD), and standard error (SE). Determination of statistically significant difference between the means of two groups was determined using Student's *t*-test for independent samples if the data had normal distribution or Mann-Whitney *U* test for data without normal distribution. Kruskal-Wallis test was used to determine statistically significant difference between the means of three groups. Pearson's correlation evaluated the possible relationship between the cytokines and disease severity and progression in patients with CRC. The strength of correlation was defined as negative or positive weak ( $-0.3$  to  $-0.1$  or  $0.1$  to  $0.3$ ), moderate ( $-0.5$  to  $-0.3$  or  $0.3$  to  $0.5$ ), or strong ( $-1.0$  to  $-0.5$  or  $1.0$  to  $0.5$ ). A *p* value of 0.05 was considered statistically significant.

### 3. Results

Sixty adult patients with CRC and fifty with UC were included in this study. There was no significant difference in gender distribution. The average age of all patients with CRC is  $64 \pm 1$  and of patients with UC is  $55 \pm 1$ . Clinical and pathologic characteristics of these patients are presented in Table 1. We have assessed concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as Gal-3, and tumor markers (AFP, CEA, and CA19-9) in serum and feces liquid fraction.

**3.1. Fecal Concentration of Gal-3 Associated to Histopathologic Characteristics of CRC.** Firstly, patients with CRC were classified in four groups based on the nuclear grades of tumor tissue: I, II, III, and IV. This classification was based on the evaluation of the size and shape of the nucleus in tumor cells and the percentage of tumor cells that are in the process of dividing or growing [31]. Recent studies have shown associations between nuclear grading and aggressiveness underscoring the importance of nuclear grading beyond prognostic stratification [31, 32]. We did not estimate nuclear grade IV in any of the CRC patients. Evaluation of systemic levels of the previously defined markers of interest revealed significantly lower level of TNF- $\alpha$  in the group of patients with nuclear grade III in comparison to patients with nuclear grade I or II ( $p = 0.001$ ; Figure 1(a)). There were no statistical differences in the serum level of Gal-3 between the defined groups. However, Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was significantly higher in the patients with nuclear grade III ( $p = 0.001$ ; Figure 1(a)). There was no significant difference in the fecal level of TNF- $\alpha$  between the patients with different nuclear grades of CRC (Figure 1(a)). We noticed significant

TABLE 1: Baseline characteristics of patients.

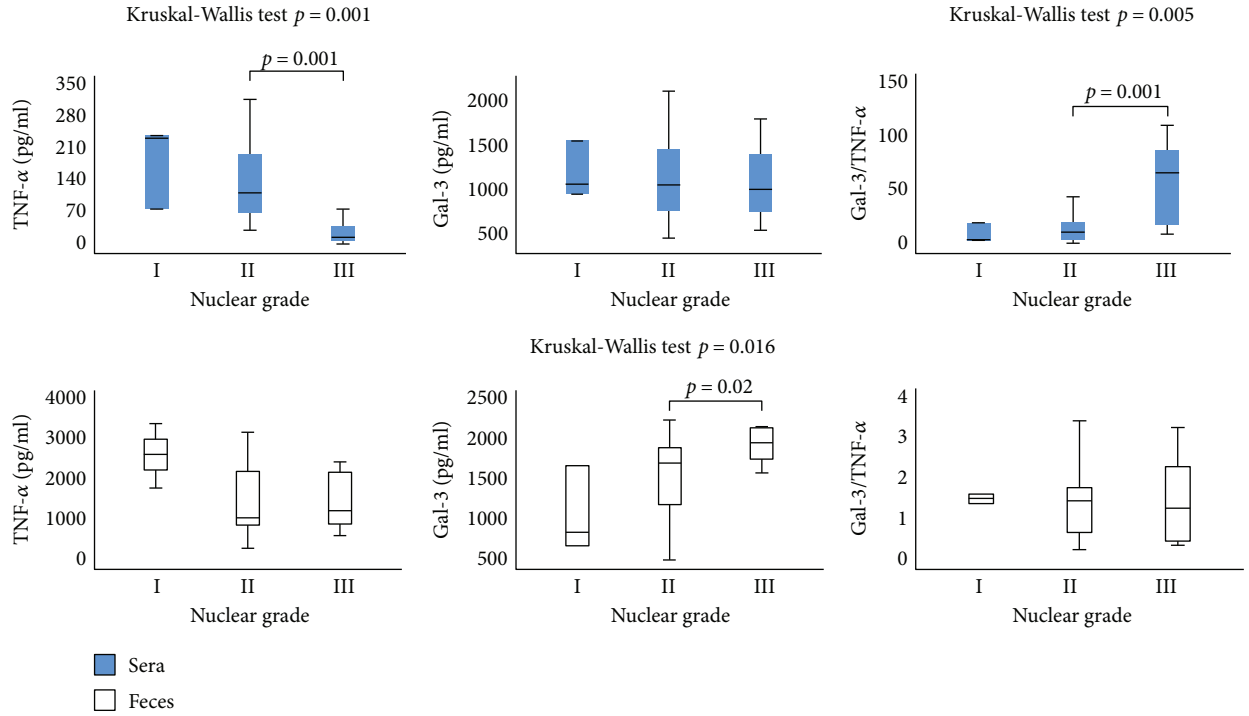
	Number
<b>Colorectal carcinoma (CRC)</b>	
Gender (male/female)	35/25
Age (mean (range))	64 (50–82) years
Site (P/D/R)	15/34/11
Nuclear grade (I/II/III)	8/37/15
Histological differentiation rate (well/moderate/poor)	11/33/16
Stage (TNM: I/II/III/IV)	42/0/16/12
Necrosis (well/moderate/absent)	16/44/0
<b>Ulcerative colitis (UC)</b>	
Gender (male/female)	29/21
Age (mean (range))	55 (23–73) years
Endoscopic score (0/I/II/III)	0/26/16/8
Clinical score (0/I/II/III)	0/28/14/8
Crypt destruction (0/I/II/III)	4/25/9/12
Erosion of the mucous membranes (0/I/II/III/IV)	12/13/6/9/10
Architectural changes (0/I/II/III)	0/23/14/13
Neutrophil infiltration (0/I/II/III)	5/19/8/18
Eosinophil infiltration (0/I/II/III)	10/16/13/11

P: proximal colon; D: distal colon; R: rectum.

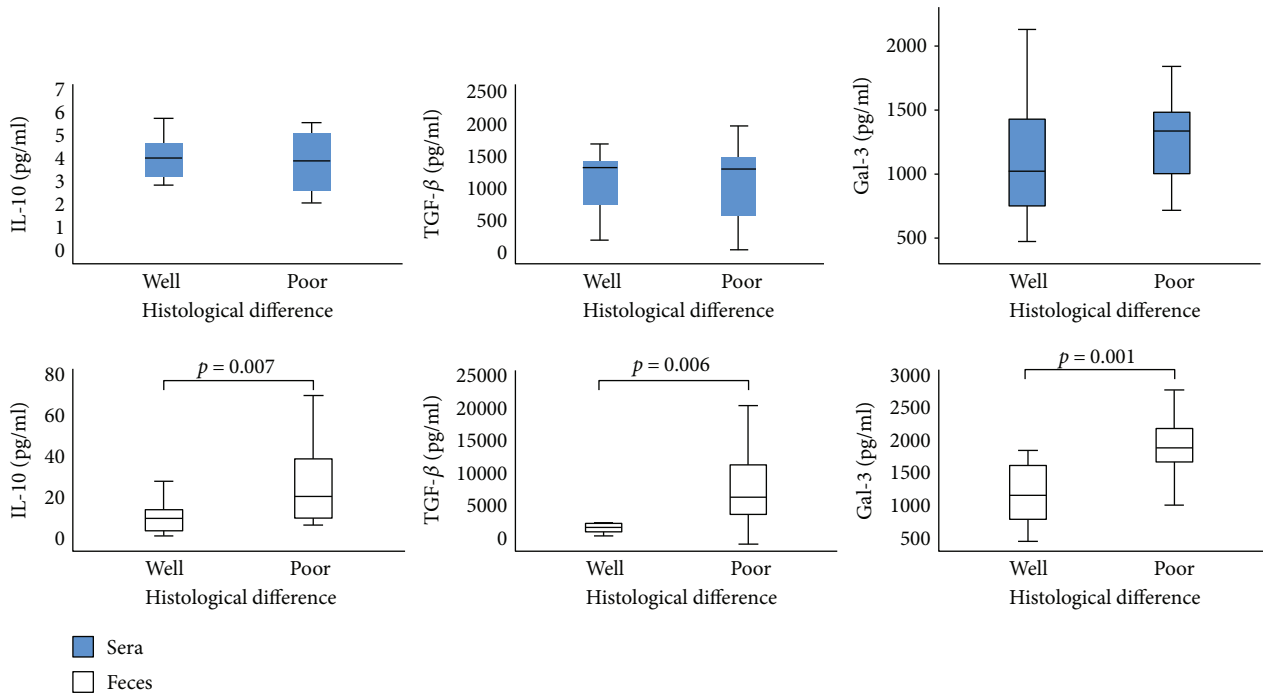
increment of the fecal level of Gal-3 in the group of patients with nuclear grade III compared to grades I and II ( $p = 0.02$ ), while there was no difference in the Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio (Figure 1(a)).

Next, patients were divided into two groups according to histological differentiation rate: well/moderate and poor. Well-differentiated and moderately differentiated tumors (well/moderate) were defined as low-grade lesions, whereas poorly differentiated tumors (poor) were defined as high-grade lesions according to the WHO guidelines [33]. Grading was based on the evaluation of the worst area, excluding areas of focal dedifferentiation present at the invasive margin of the tumor [34]. Poorly differentiated tumors have repeatedly been shown to behave more aggressively than well/moderate-differentiated carcinomas in multivariate analysis [34]. We did not find significant differences in the serum level of IL-10, TGF- $\beta$ , and Gal-3 between the defined groups (Figure 1(b)). However, fecal levels of Gal-3 ( $p = 0.001$ ) and anti-inflammatory cytokines IL-10 ( $p = 0.007$ ) and TGF- $\beta$  ( $p = 0.006$ ) were significantly higher in patients with poorly differentiated CRC (Figure 1(b)).

**3.2. Fecal Gal-3 and Gal-3/TNF- $\alpha$  Ratio Associated with TNM System and Lymph and Blood Vessel Invasion.** Patients with CRC were divided into two categories on the basis of TNM stage of disease: I+II and III+IV. Patients with TNM stages III+IV revealed significantly lower TNF- $\alpha$  in sera in comparison to patients with TNM stages I+II ( $p = 0.006$ ; Figure 2(a)). There were no differences in the serum level of TGF- $\beta$  and Gal-3 (Figure 1(b)). The Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was higher in the sera of patients with



(a)



(b)

FIGURE 1: (a) Increased concentration of Gal-3 in feces and Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio in sera, in patients with a higher nuclear grade of CRC. Patients with CRC were divided into three groups, based on nuclear grades (I, II, and III). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- $\alpha$  ratios were evaluated for each patient, separately. Kruskal-Wallis test was used to determine statistically significant difference between the means of three groups. (b) Increased concentrations of IL-10, TGF- $\beta$ , and Gal-3 in the feces of patients with poor histological differentiation of CRC. Patients with CRC were divided into two groups, according to histological differentiation rate (well/moderate and poor). Statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test.

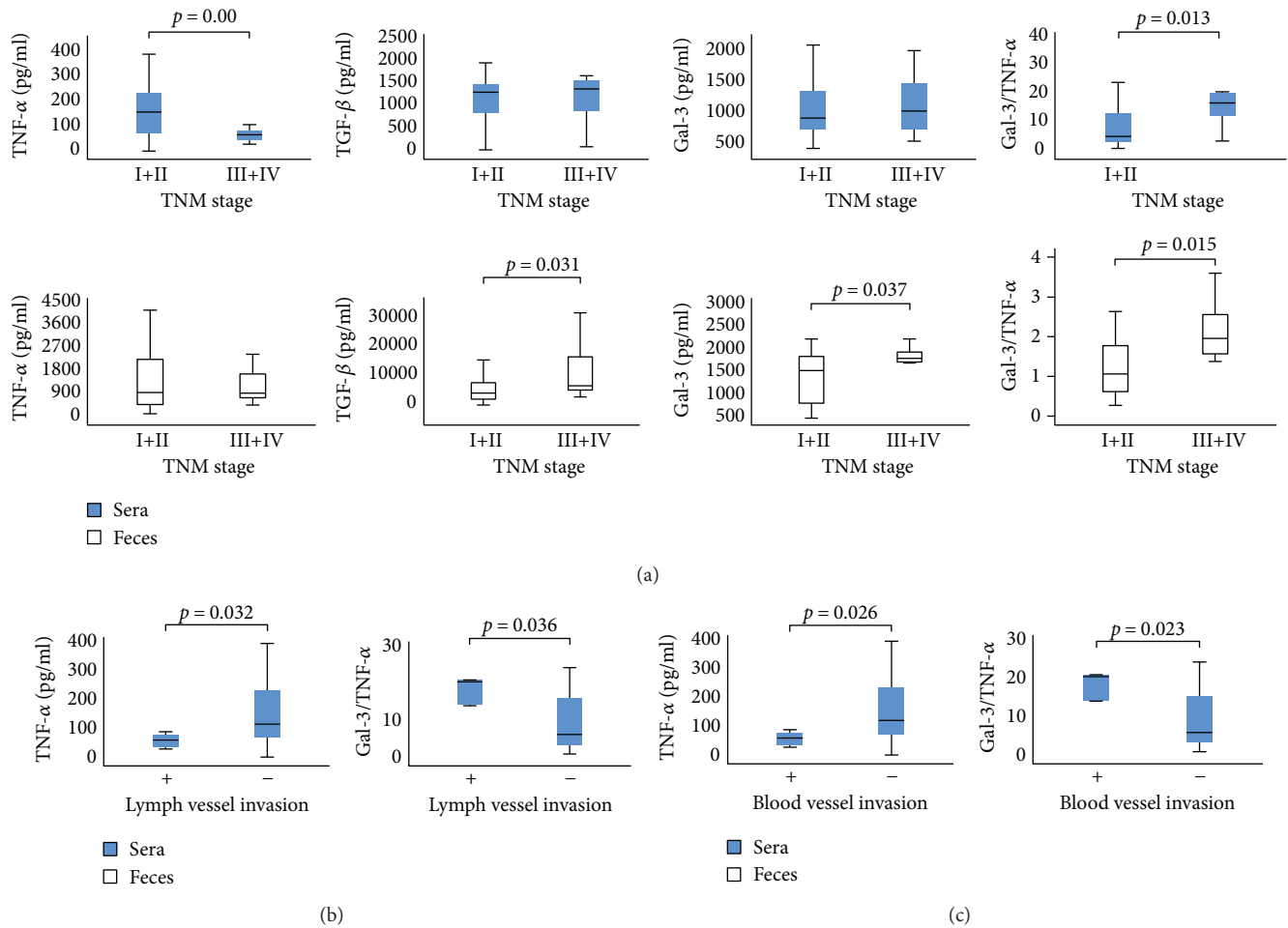


FIGURE 2: (a) Increased concentration of TGF- $\beta$ , Gal-3, and Gal-3/TNF- $\alpha$  ratios in feces in patients with higher TNM stage of CRC. The patients with CRC were divided into two groups, based on the TNM stage (I + II and III + IV). Serum and fecal levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was evaluated for each patient, separately. (b-c) Decreased TNF- $\alpha$  and increased Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio in the sera of patients with detectable lymphatic and blood vessel invasion of CRC. The patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of lymphatic/blood vessel invasion (+ and -). Serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was evaluated for each patient, separately. Statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test or independent samples *t*-test, where appropriate.

TNM stages III + IV, but this difference did not reach statistical significance (Figure 2(a)).

As shown in Figure 2(a), CRC patients with higher TNM stages appear to have a higher fecal level of TGF- $\beta$  ( $p = 0.031$ ). There was no difference in the fecal level of TNF- $\alpha$  between the defined groups (Figure 2(a)). We noticed a higher fecal level of Gal-3 ( $p = 0.037$ ) as well as Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio ( $p = 0.015$ ) in patients with TNM stages III + IV (Figure 2(a)).

Further, we divided the patients based on the invasion of lymph and blood vessels, respectively (+ and -), and analyzed their serum levels of biomarkers. TNF- $\alpha$  was significantly decreased in patients with detected lymph or blood vessel invasion ( $p = 0.032$ ;  $p = 0.026$ ; Figures 2(b) and 2(c)). Moreover, an increased Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio in sera was evaluated in patients with detectable lymphatic ( $p = 0.036$ ) and blood vessel invasion ( $p = 0.023$ ; Figures 2(b) and 2(c)).

**3.3. Liver, Lung, and Peritoneal Metastasis Associated with Higher Fecal Gal-3.** Next groups of patients with CRC were made according to the presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, respectively, and analyzed for values of Gal-3 and other mediators of interest. There were no differences in the systemic concentrations of IL-1 $\beta$  and Gal-3 between the patients with and without metastasis/carcinomatosis (Figure 3). Lower TNF- $\alpha$  but a higher Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was found in the sera of patients with detectable liver metastasis, lung metastasis, or peritoneal carcinomatosis, in comparison to patients without metastasis/carcinomatosis ( $p < 0.05$  all, Figure 3). Feces concentration of IL-1 $\beta$  was significantly lower while the level of Gal-3 was significantly higher in patients with metastasis/carcinomatosis. There were no differences in the feces levels of TNF- $\alpha$  and neither in the Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio between the defined groups.

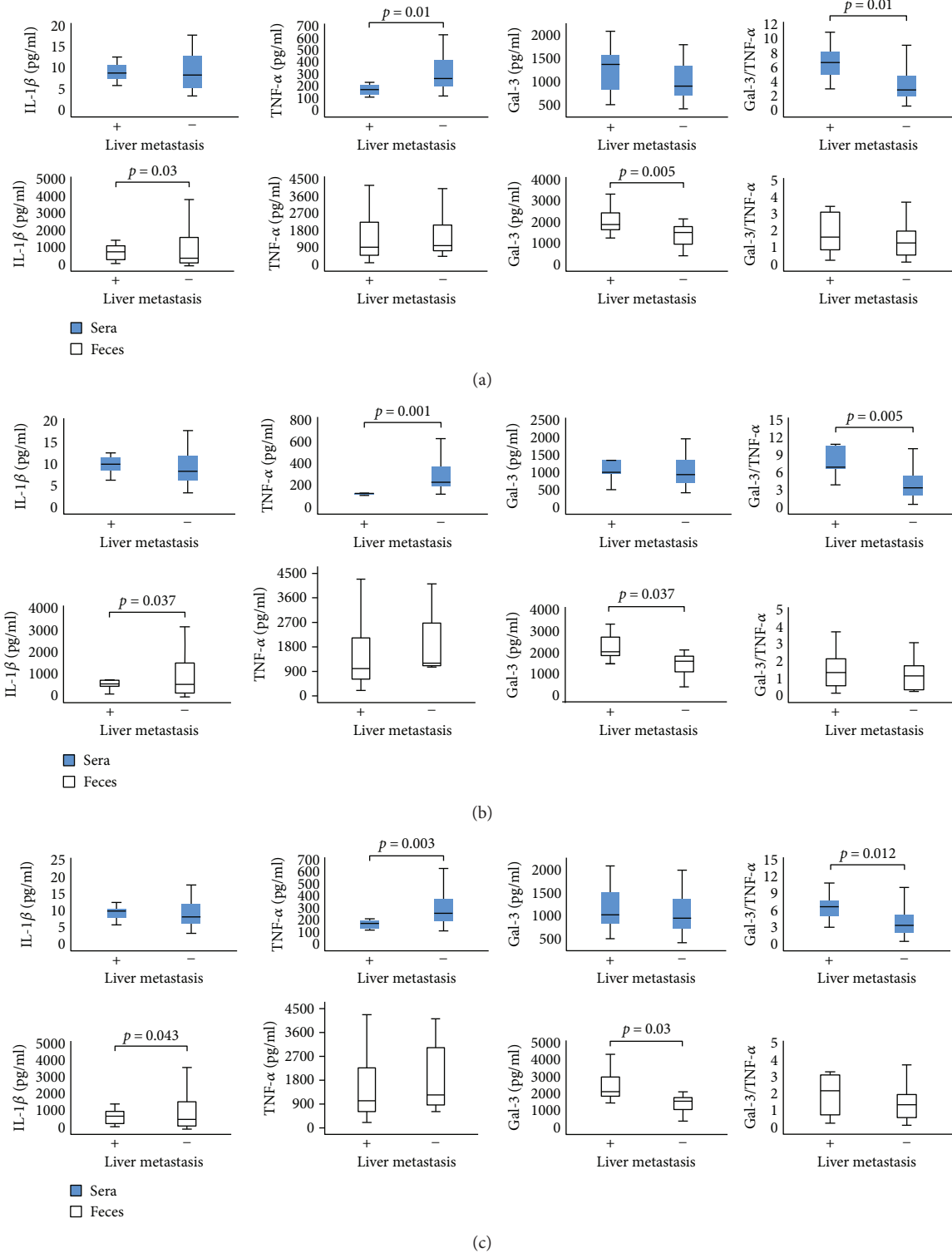


FIGURE 3: (a) Decreased fecal IL-1 $\beta$  and systemic TNF- $\alpha$ , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- $\alpha$  ratios in patients with detectable liver metastasis. Patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of liver metastasis (+ and -). (b) Decreased fecal IL-1 $\beta$  and systemic TNF- $\alpha$ , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- $\alpha$  ratios in patients with detectable lung metastasis. The patients with CRC were divided into two groups, based on the presence of lung metastasis (+ and -). (c) Decreased fecal IL-1 $\beta$  and systemic TNF- $\alpha$ , while increased fecal Gal-3 and systemic Gal-3/TNF- $\alpha$  ratios in patients with detectable peritoneal carcinomatosis. The patients with CRC were divided into two groups, according to the presence of carcinomatosis in peritoneum cavity (+ and -). The serum levels of all mentioned biomarkers were determined by ELISA. Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio was evaluated for each patient, separately. The statistical significance was tested by Mann-Whitney Rank Sum test.

**3.4. Fecal Gal-3 Concentration Significantly Correlated with CRC Severity, but Not with UC Severity.** The relationship between fecal Gal-3 and the clinicopathological parameters of patients with CRC and UC, respectively, were summarized in Table 2. An analysis revealed a positive correlation between fecal galectin-3 and parameters and markers of disease severity and progression. There is a moderate positive correlation between fecal galectin-3 and nuclear grade ( $r = 0.358$ ;  $p = 0.025$ ), histological type ( $r = 0.543$ ;  $p = 0.001$ ), TNM stage ( $r = 0.339$ ;  $p = 0.035$ ), presence of liver metastasis ( $r = 0.406$ ;  $p = 0.004$ ), presence of lung metastasis ( $r = 0.303$ ;  $p = 0.036$ ), presence of peritoneal carcinomatosis ( $r = 0.420$ ;  $p = 0.003$ ), and tumor markers AFP ( $r = 0.438$ ;  $p = 0.002$ ) and CEA ( $r = 0.308$ ;  $p = 0.049$ ). We did not find a correlation between systemic galectin-3 and the same parameters (data not shown). Further, we found no correlation between fecal Gal-3 and parameters and markers of UC severity (endoscopic score, clinical score, crypt destruction, erosion of the mucous membranes, architectural changes, neutrophil infiltration, and eosinophil infiltration; Table 2).

Analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of fecal galectin-3 for various stages and parameters of CRC found that galectin-3 level in feces could predict disease severity (Figure 4). The analysis showed that Gal-3 can be a valuable marker for distinguishing the nuclear grade (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%) and histological type of CRC (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), TNM stage (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), presence of liver metastasis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), lung metastasis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%), and peritoneal carcinomatosis (sensitivity 88.7%, specificity 83.8%). The optimal cutoff value estimated for Gal-3 that allows the discrimination of stages of CRC progression was 1958.82 pg/g. For this cutoff, we determined sensitivity to be 81.8% and specificity 60.7%.

#### 4. Discussion

Disease severity depends of cytokine milieu that dominates in a tumor environment. Previous studies established that presence of CD4+ Th1 cells and cytotoxic CD8+ T cells (CTLs) in tumor microenvironment presents positive prognostic sign, while presence of Treg and Th2/Th17 cells indicates lower survival of patients with CRC [35, 36]. Predomination of proinflammatory TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells, besides enhancing CTL activity, also facilitates innate antitumor mechanisms and associates with the absence of metastatic invasion, tumor recurrence, and increased survival of patients with CRC [37–39]. On contrary, Th2-polarized CD4+ T cells produce IL-4, IL-10, and IL-13, enhancing local humoral immunity and suppressing Th1 immune response [36]. In line with this phenomenon, previous studies have shown that patients with bladder and colorectal cancer have decreased proportions of IFN- $\gamma$ /IL-2-producing Th1 cells, while increased proportions of IL-4/IL-10-producing Th2 cells, in peripheral blood [40, 41]. Presence of immunosuppressive TGF- $\beta$ /IL-10-producing innate/adaptive immune cells correlates with advanced disease and poor prognosis [35]. In the present study, we analyzed concentration of pro- and anti-inflammatory cytokines in sera

TABLE 2: Correlation between the fecal level of Gal-3 and parameters of disease severity and progression in patients with CRC and UC. Statistical significance was tested by Spearman correlation coefficient.

Variables	Gal-3	
	Spearman's rho	<i>p</i> value
CRC		
Nuclear grade	0.358	0.025
Histological type	0.543	0.001
Dukes stage	0.339	0.035
Liver metastasis	0.406	0.004
Lung metastasis	0.303	0.036
Peritoneal carcinomatosis	0.420	0.003
AFP	0.438	0.002
CEA	0.308	0.049
CA19-9	0.254	0.088
UC		
Endoscopic score	0.187	0.172
Clinical score	0.091	0.511
Crypt destruction	0.193	0.159
Erosion of the mucous membranes	0.170	0.215
Architectural changes	0.100	0.468
Neutrophil infiltration	0.107	0.435
Eosinophil infiltration	0.035	0.799

and feces of patients with CRC. Systemic values of proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  were significantly lower in patients with severe disease (TNM stages III and IV, poor histological differentiation, and nuclear grade III) (Figures 1 and 2). Moreover, systemic TNF- $\alpha$  was significantly lower in patients with more progressive CRC (lymph and blood vessel invasion and presence of metastasis in the liver, lung, and peritoneal carcinomatosis; Figures 2 and 3). Local values of cytokines in liquid fraction of feces have shown predominance of anti-inflammatory cytokines TGF- $\beta$  and IL-10 in patients with severe stadium of CRC (TNM stages III and IV, poor histological differentiation) as well as lower level of proinflammatory IL-1 $\beta$  in patients with a more progressive disease (presence of metastasis in the liver, lung, and peritoneal carcinomatosis; Figures 1, 2, and 3). These results are in line with our and other previous studies claiming that serum levels of IL-10 and TGF- $\beta$  were increased in patients with CRC in comparison to healthy controls and that CRC patients with worse prognosis had increased systemic concentration of IL-10 compared to patients with better prognosis [11, 42].

Gal-3 is involved in various biological and pathological processes, such as cell proliferation and differentiation, cell and extracellular matrix interactions, metastasis, and regulation of apoptosis [43, 44]. Earlier studies have investigated possible linkage between Gal-3 and CRC. Immunohistochemical staining confirmed that colon cancer with detected Gal-3 was significantly larger, with deeper invasion to the colonic wall and with poor histological differentiation [25, 45]. Others showed that Gal-3 upregulation correlated with

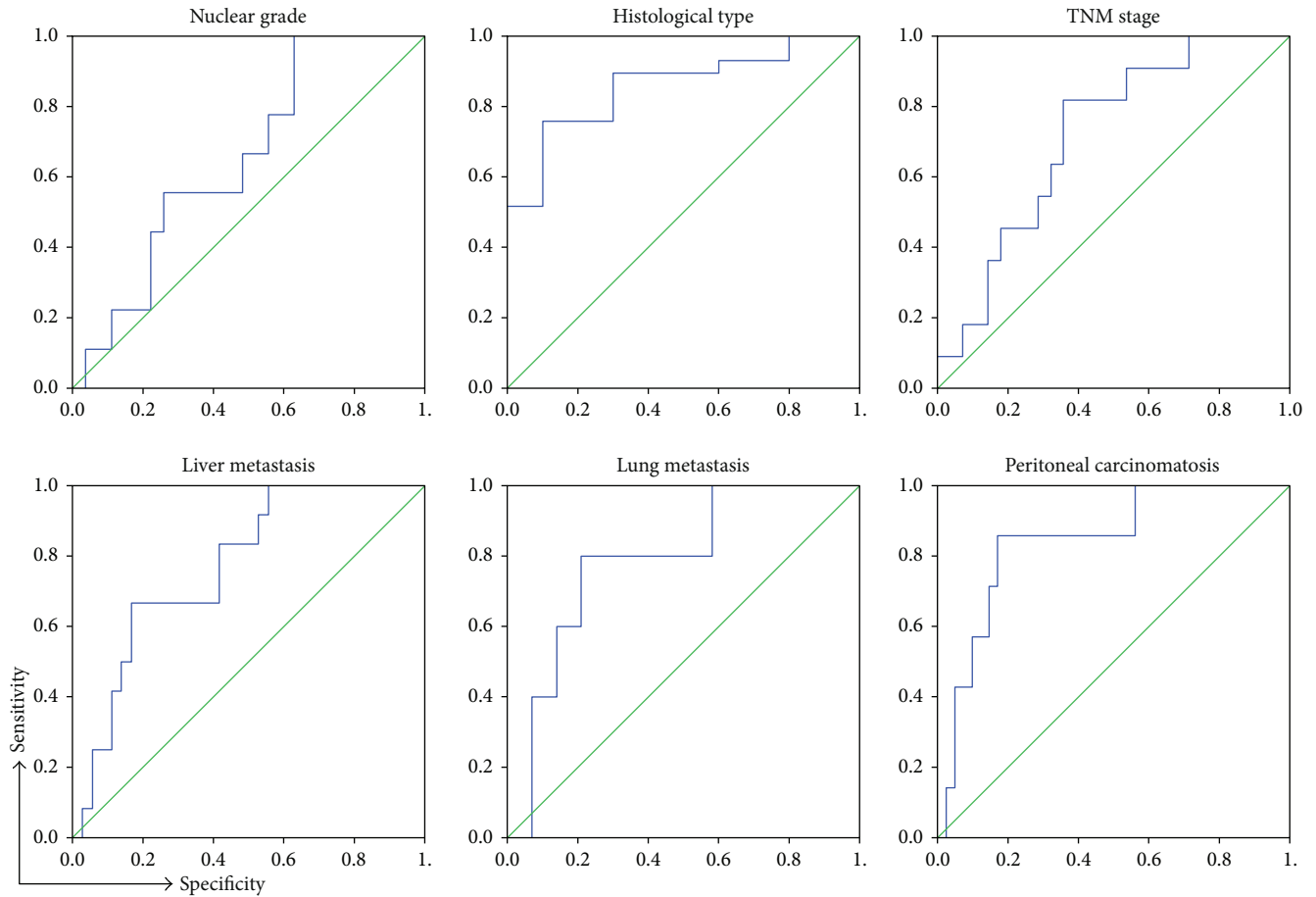


FIGURE 4: Specificity and sensitivity of fecal Gal-3. ROC curves illustrate the specificity and sensitivity of fecal Gal-3 comparing nuclear grade, histological type of tumor tissue (well/moderate versus poor differentiated), TNM stage (I+II versus III+IV), presence of liver metastasis (+ versus -), lung metastasis (+ versus -), and peritoneal carcinomatosis (+ versus -).

tumor progression and predicted shorter survival of CRC patients [46]. In contrast, some studies showed decreased Gal-3 levels in CRC progression and that there was no significant correlation between galectin-3 and tumor staging of colon cancer [13, 47]. These findings highlight the importance of extracellular Gal-3 in CRC biology. Recently, studies point on significance of measuring biomarkers in feces [14, 15]. In this way, proteins and molecules produced by intestinal mucosa are measured, which reflect condition in bowels [48]. Recent studies have shown elevated fecal values of M2 pyruvate kinase, fecal calprotectin, and iFOBT in CRC and suggested for screening high-risk groups for CRC [49]. Today, researchers are testing diagnostic accuracy of different fecal markers in the detection of cancerous lesions in the colon, in order to find the most accurate for CRC screening. To our knowledge, this is the first study testing fecal Gal-3 for detection of severe and progressive forms of CRC. We have not found differences in the systemic level of Gal-3 between different stages of colorectal cancer. However, significantly increased fecal level of Gal-3 was detected in patients with a more severe stage of CRC (poor histological differentiation and higher nuclear grade and TNM stages III and IV; Figures 1 and 2). Moreover, fecal Gal-3 was significantly increased in patients with lymph and blood vessel

invasion and with presence of metastasis in the liver, lung, or peritoneal carcinomatosis, respectively (Figures 2 and 3).

As it is well known that the ratio of counterregulatory cytokines is a reliable marker of the disease process, we have analyzed the ratio of Gal-3 with pro- and anti-inflammatory cytokines. There were no differences in the ratio of Gal-3 and TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-1 $\beta$ . However, we noticed predomination of Gal-3 over proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in sera and feces of patients with more severe and progressive stadium of CRC (Figures 1, 2, and 3). Based on these findings, we believe that the Gal-3/TNF- $\alpha$  ratio could be a predictor for the advanced stages of colorectal cancer. There are few possible mechanisms that can explain the potential role of Gal-3 in CRC progression. Firstly, Gal-3 can exert anti-inflammatory effect. The role of Gal-3 in the onset, progression and resolution of inflammation is well established [19]. It is well known that during inflammation, reactive oxygen species and other toxic products accumulate in cell and induce production of advanced glycation end products (AGEs) [50]. Further, AGEs bind to receptor (RAGE) thus facilitating local inflammation [51]. Gal-3 inhibits AGE-RAGE pathway and subsequently suppresses RAGE-induced inflammation in tissue [52]. Another possible mechanism of act of Gal-3 is direct inhibition of cellular immune

response, by inhibiting interaction between T cells and antigen-presenting cells [53]. Others claimed that extracellular galectin-3 induces apoptosis of CD4 or CD8 T cells in the tumors and can suppress IFN- $\gamma$  secretion of human cytotoxic T cells in tumor [54]. We are first to describe prevalence of Gal-3 over TNF- $\alpha$  in stool of patients with severe and progressive forms of CRC (Figures 2 and 3).

Besides these roles in immunomodulation, Gal-3 can facilitate migration of colon cancer cells through the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway [55]. Gal-3 can exert clustering of integrins, leading to cell motility, while binding to mucin-1, a molecule that dominates in gastrointestinal environment and facilitates transendothelial invasion [56].

Further in this study, we envisage the possible role of fecal galectin-3 as a biomarker in preceding disease severity and progression. We obtained a positive correlation between the fecal Gal-3 and disease severity (advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation; Table 2 and Figure 4). Moreover, the fecal level of Gal-3 is in a positive correlation with more progressive CRC (presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis; Figure 4). We have also shown a strong positive correlation between the fecal Gal-3 and biomarkers AFP and CEA, respectively (Table 2). Interestingly, we did not find a correlation of serum Gal-3 with the same parameters and markers of the disease severity. Also, values of Gal-3 in feces are about two to three times higher than those in sera, what makes measurement in feces a more sensitive method. In CRC, AFP and CEA have been used as reliable tumor markers for monitoring tumor progression. Recent studies demonstrated that Gal-3 interacts with CEA, promoting colorectal cancer cell migration, adhesion, and subsequent metastasis [22, 57]. Analysis on UC patients revealed that fecal Gal-3 does not correlate with the endoscopic and clinical Mayo score, as well as with histopathological parameters of the affected tissue, and is not suitable for evaluation of severity of UC (Table 2).

Analysis of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves of Gal-3 and disease parameters and markers for CRC revealed that Gal-3 could predict an advanced TNM stage, higher nuclear grade, and poor tumor tissue differentiation as well as the presence of lung/liver metastasis or peritoneal carcinomatosis, at good sensitivity and specificity. According to our findings, fecal Gal-3 could be a valuable marker for CRC severity and progression.

## 5. Conclusions

In summary, increased local values of Gal-3, reflected through a higher fecal concentration, in CRC patients with a higher nuclear grade, poor tumor tissue differentiation, and advanced TNM stage of disease, may be considered as a sign of the tumor's malignant progression and, consequently, of a poor prognosis for patients. Predominance of Gal-3 over proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , in patients with advanced and progressive disease, may implicate on immunomodulatory role of Gal-3 in limiting ongoing proinflammatory processes and preventing potent antitumor immune response. This phenomenon favors tumor immune escape and long-range dissemination of tumoral cells

(metastasis). Furthermore, the fecal values of Gal-3 can be used as a valuable marker for CRC severity and progression and not for UC severity. These observations support the idea that Gal-3 may contribute to the immune privilege of tumors by modulating local immune response and point on possible role of fecal Gal-3 as a state and progression marker of CRC and its potential use as a therapeutic target.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Authors' Contributions

Milan Jovanovic, Nevena Gajovic, and Ivan Jovanovic wrote the manuscript. Marina Jovanovic and Nevena Gajovic collected the data. Milan Jovanovic, Marina Jovanovic, Veljko Maric, Aleksandar Arsenijevic, and Natasa Zdravkovic were involved in the analysis and interpretation of the data. Milena Jurisevic, Danilo Vojvodic, and Ivan Jovanovic contributed towards conception and design. All the authors have approved the final version of this manuscript. Milan Jovanovic and Nevena Gajovic contributed equally to this work.

## Acknowledgments

The authors thank Aleksandar Ilic and Milan Milojevic for the excellent technical assistance. This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071, 175069), Serbia, and from the Faculty of Medical Sciences Kragujevac (Project JP 04/15), Serbia.

## References

- [1] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683–691, 2017.
- [2] M. Ponz de Leon, G. Rossi, C. di Gregorio et al., "Epidemiology of colorectal cancer: the 21-year experience of a specialised registry," *Internal and Emergency Medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 269–279, 2007.
- [3] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit et al., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *International Journal of Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [4] A. R. Marley and H. Nan, "Epidemiology of colorectal cancer," *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, vol. 7, no. 3, pp. 105–114, 2016.
- [5] C. M. Johnson, C. Wei, J. E. Ensor et al., "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors," *Cancer Causes & Control*, vol. 24, no. 6, pp. 1207–1222, 2013.
- [6] E. S. Roth, D. T. Fetzter, B. J. Barron, U. A. Joseph, I. W. Gayed, and D. Q. Wan, "Does colon cancer ever metastasize to bone first? A temporal analysis of colorectal cancer progression," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 274, 2009.
- [7] A. Wiegering, J. Riegel, J. Wagner et al., "The impact of pulmonary metastasectomy in patients with previously resected colorectal cancer liver metastases," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, article e0173933, 2017.



- [8] J. N. Primrose, "Treatment of colorectal metastases: surgery, cryotherapy, or radiofrequency ablation," *Gut*, vol. 50, no. 1, pp. 1–5, 2002.
- [9] T. Veen, K. Stormark, B. S. Nedrebø et al., "Long-term follow-up and survivorship after completing systematic surveillance in stage I-III colorectal cancer: who is still at risk?," *Journal of Gastrointestinal Cancer*, vol. 46, no. 3, pp. 259–266, 2015.
- [10] T. M. Geiger and R. Ricciardi, "Screening options and recommendations for colorectal cancer," *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, vol. 22, no. 4, pp. 209–217, 2009.
- [11] N. Zdravkovic, M. Pavlovic, G. Radosavljevic, and I. Jovanovic, "Serum levels of immunosuppressive cytokines and tumor markers in metastatic colorectal carcinoma," *Journal of BUON*, vol. 22, pp. 1–8, 2017.
- [12] N. D. Zdravkovic, I. P. Jovanovic, G. D. Radosavljevic et al., "Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 11, no. 9, pp. 936–947, 2014.
- [13] K. L. Wu, H. H. Chen, C. T. Pen et al., "Circulating galectin-1 and 90K/mac-2BP correlated with the tumor stages of patients with colorectal cancer," *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 306964, 7 pages, 2015.
- [14] M. Wagner, C. G. Peterson, P. Ridefelt, P. Sangfelt, and M. Carlson, "Fecal markers of inflammation used as surrogate markers for treatment outcome in relapsing inflammatory bowel disease," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 36, pp. 5584–5589, 2008.
- [15] J. A. Tibble, G. Sigthorsson, S. Bridger, M. K. Fagerhol, and I. Bjarnason, "Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 119, no. 1, pp. 15–22, 2000.
- [16] J. Tibble, K. Teahon, B. Thjodleifsson et al., "A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease," *Gut*, vol. 47, no. 4, pp. 506–513, 2000.
- [17] L. Larsen, H. Y. Chen, J. Saegusa, and F. T. Liu, "Galectin-3 and the skin," *Journal of Dermatological Science*, vol. 64, no. 2, pp. 85–91, 2011.
- [18] H. Y. Chen, F. T. Liu, and R. Y. Yang, "Roles of galectin-3 in immune responses," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 53, no. 6, pp. 497–504, 2005.
- [19] V. Desmedt, S. Desmedt, J. R. Delanghe, R. Speeckaert, and M. M. Speeckaert, "Galectin-3 in renal pathology: more than just an innocent bystander," *American Journal of Nephrology*, vol. 43, no. 5, pp. 305–317, 2016.
- [20] R. Lukic, N. Gajovic, I. Jovanovic et al., "Potential hepatoprotective role of galectin-3 during HCV infection in end-stage renal disease patients," *Disease Markers*, vol. 2017, Article ID 6275987, 8 pages, 2017.
- [21] K. Endo, S. Kohnoe, E. Tsujita et al., "Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer," *Anticancer Research*, vol. 25, no. 4, pp. 3117–3121, 2005.
- [22] K. L. Wu, E. Y. Huang, W. L. Yeh, C. C. Hsiao, and C. M. Kuo, "Synergistic interaction between galectin-3 and carcinoembryonic antigen promotes colorectal cancer metastasis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 37, pp. 61935–61943, 2017.
- [23] A. Dignass, R. Eliakim, F. Magro et al., "Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part I: definitions and diagnosis," *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 6, no. 10, pp. 965–990, 2012.
- [24] F. Gomollón, S. García-López, B. Sicilia, J. P. Gisbert, J. Hinojosa, and Grupo Espa<sup>ñ</sup>ol de Trabajo en Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, "Therapeutic guidelines on ulcerative colitis: a GRADE methodology based effort of GETECCU," *Gastroenterología y Hepatología*, vol. 36, no. 2, pp. 104–114, 2013.
- [25] P. Rutgeerts, W. J. Sandborn, B. G. Feagan et al., "Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 353, no. 23, pp. 2462–2476, 2005.
- [26] G. D'Haens, W. J. Sandborn, B. G. Feagan et al., "A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 763–786, 2007.
- [27] K. Geboes, R. Riddell, A. Ost, B. Jensfelt, T. Persson, and R. Löfberg, "A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis," *Gut*, vol. 47, no. 3, pp. 404–409, 2000.
- [28] R. M. Heilmann, S. M. Cranford, A. Ambrus et al., "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of canine S100A12," *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 45, no. 1, pp. 135–147, 2016.
- [29] N. Prakash, P. Stumbles, and C. Mansfield, "Initial validation of cytokine measurement by ELISA in canine feces," *Open Journal of Veterinary Medicine*, vol. 03, no. 6, pp. 282–288, 2013.
- [30] M. Jovanovic, N. Zdravkovic, I. Jovanovic et al., "TGF- $\beta$  as a marker of ulcerative colitis and disease severity," *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 2018.
- [31] American Joint Committee on Cancer, *AJCC Cancer Staging Manual*, Springer, New York, NY, USA, 7th edition, 2010.
- [32] Q. Yang, I. Mori, T. Sakurai et al., "Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer," *Breast Cancer*, vol. 8, no. 2, pp. 105–110, 2001.
- [33] S. R. Hamilton and L. A. Aaltonen, "Pathology and genetics: tumours of the digestive system," in *World Health Organization Classification of Tumours*, S. R. Hamilton and L. A. Aaltonen, Eds., pp. 103–143, IARC, Lyon, France, 3rd edition, 2000.
- [34] G. Lanzaa, L. Messerini, R. Gafa, and M. Risio, "Colorectal tumors: the histology report," *Digestive and Liver Disease*, vol. 43, pp. S344–S355, 2011.
- [35] V. Formica, V. Cereda, A. Nardecchia, M. Tesaro, and M. Roselli, "Immune reaction and colorectal cancer: friends or foes?," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 35, pp. 12407–12419, 2014.
- [36] M. Johansson, D. G. Denardo, and L. M. Coussens, "Polarized immune responses differentially regulate cancer development," *Immunological Reviews*, vol. 222, no. 1, pp. 145–154, 2008.
- [37] L. Klampfer, "Cytokines, inflammation and colon cancer," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 11, no. 4, pp. 451–464, 2011.
- [38] S. Pernot, M. Terme, T. Voron et al., "Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 14, pp. 3738–3750, 2014.
- [39] M. Kitajima, T. Ito, D. J. Tumes et al., "Memory type 2 helper T cells induce long-lasting antitumor immunity by activating natural killer cells," *Cancer Research*, vol. 71, no. 14, pp. 4790–4798, 2011.
- [40] M. Kanazawa, K. Yoshihara, H. Abe et al., "Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients," *Anticancer Research*, vol. 25, no. 1B, pp. 443–449, 2005.
- [41] A. Agarwal, S. Verma, U. Burra, N. S. Murthy, N. K. Mohanty, and S. Saxena, "Flow cytometric analysis of Th1 and Th2

- cytokines in PBMCs as a parameter of immunological dysfunction in patients of superficial transitional cell carcinoma of bladder," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 55, no. 6, pp. 734–743, 2006.
- [42] S. Abtahi, F. Davani, Z. Mojtahedi, S. V. Hosseini, A. Bananzadeh, and A. Ghaderi, "Dual association of serum interleukin-10 levels with colorectal cancer," *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, vol. 13, no. 2, pp. 252–256, 2017.
- [43] K. D. Johnson, O. V. Glinkii, V. V. Mossine et al., "Galectin-3 as a potential therapeutic target in tumors arising from malignant endothelia," *Neoplasia*, vol. 9, no. 8, pp. 662–670, 2007.
- [44] P. Nangia-Makker, V. Balan, and A. Raz, "Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3," *Cancer Microenvironment*, vol. 1, no. 1, pp. 43–51, 2008.
- [45] L. Tao, L. Jin, L. Dechun, Y. Hongqiang, K. Changhua, and L. Guijun, "Galectin-3 expression in colorectal Cancer and Its correlation with clinical pathological characteristics and prognosis," *Open Medicine*, vol. 12, pp. 226–230, 2017.
- [46] W. Lu, J. Wang, G. Yang et al., "Posttranscriptional regulation of galectin-3 by miR-128 contributes to colorectal cancer progression," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 15242–15251, 2017.
- [47] K. Tsuboi, T. Shimura, N. Masuda et al., "Galectin-3 expression in colorectal cancer: relation to invasion and metastasis," *Anticancer Research*, vol. 27, no. 4B, pp. 2289–2296, 2007.
- [48] G. V. Assche, "Fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease," *Gastroenterology & Hepatology*, vol. 7, no. 6, pp. 396–398, 2011.
- [49] M. Rutka, R. Bor, A. Bálint et al., "Diagnostic accuracy of five different fecal markers for the detection of precancerous and cancerous lesions of the colorectum," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 2492081, 6 pages, 2016.
- [50] V. Krane and C. Wanner, "The metabolic burden of diabetes and dyslipidaemia in chronic kidney disease," *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 17, Supplement 11, pp. 23–27, 2002.
- [51] A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, and M. A. Creager, "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury," *Circulation*, vol. 114, no. 6, pp. 597–605, 2006.
- [52] K. Nomoto, K. Tsuneyama, H. O. Abdel Aziz et al., "Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice," *The Journal of Pathology*, vol. 210, no. 4, pp. 469–477, 2006.
- [53] H. Y. Chen, A. Fermin, S. Vardhana et al., "Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the immunological synapse," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 34, pp. 14496–14501, 2009.
- [54] W. Peng, H. Y. Wang, Y. Miyahara, G. Peng, and R. F. Wang, "Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells," *Cancer Research*, vol. 68, no. 17, pp. 7228–7236, 2008.
- [55] K. L. Wu, E. Y. Huang, E. W. Jhu et al., "Overexpression of galectin-3 enhances migration of colon cancer cells related to activation of the K-Ras-Raf-Erk1/2 pathway," *Journal of Gastroenterology*, vol. 48, no. 3, pp. 350–359, 2013.
- [56] A. Fortuna-Costa, A. M. Gomes, E. O. Kozłowski, M. P. Stelling, and M. S. G. Pavão, "Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis," *Frontiers in Oncology*, vol. 4, p. 138, 2014.
- [57] D. Cvejic, S. Savin, S. Golubovic, I. Paunovic, S. Tatic, and M. Havelka, "Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression," *Histopathology*, vol. 37, no. 6, pp. 530–535, 2000.

## RESEARCH

# Attenuation of NK cells facilitates mammary tumor growth in streptozotocin-induced diabetes in mice

Nevena Gajovic, Milena Jurisevic, Jelena Pantic, Gordana Radosavljevic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L Lukic and Ivan Jovanovic

Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence should be addressed to I Jovanovic: [ivan.jovanovic@medf.kg.ac.rs](mailto:ivan.jovanovic@medf.kg.ac.rs)

## Abstract

Diabetic patients have higher incidence and mortality of cancer. Recent study revealed that hyperglycemia-induced oxidative stress is involved in the acceleration of tumor metastasis. We used model of high-dose streptozotocin-induced diabetes to investigate its effect on tumor growth and modulation of antitumor immune response of 4T1 murine breast cancer in BALB/c mice. Diabetes accelerated tumor appearance, growth and weight, which was associated with decreased NK cells cytotoxicity against 4T1 tumor cells *in vitro*. Diabetes reduced frequencies of systemic NKG2D<sup>+</sup>, perforin<sup>+</sup>, granzyme<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and IL-17<sup>+</sup> NK cells, while increased level of PD-1 expression and production of IL-10 in NK cells. Diabetes decreased percentage of NKG2D<sup>+</sup>NK cells and increased percentage of PD-1<sup>+</sup> NK cells also in primary tumor. Diabetes increased accumulation of IL-10<sup>+</sup> Tregs and TGF- $\beta$ <sup>+</sup> myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in spleen and tumor. Diabetic sera *in vitro* significantly increased the percentage of KLRG-1<sup>+</sup> and PD-1<sup>+</sup> NK cells, decreased the percentage of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK cells, expression of NKp46 and production of perforin, granzyme, CD107a and IL-17 per NK cell in comparison to glucose-added mouse sera and control sera. Significantly increased percentages of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) producing MDSCs and dendritic cells (DC) were found in the spleens of diabetic mice prior to tumor induction. 1-methyl-DL-tryptophan, specific IDO inhibitor, almost completely restored phenotype of NK cells cultivated in diabetic sera. These findings indicate that diabetes promotes breast cancer growth at least in part through increased accumulation of immunosuppressive cells and IDO-mediated attenuation of NK cells.

## Key Words

- ▶ diabetes mellitus
- ▶ breast cancer
- ▶ NK cells
- ▶ myeloid-derived suppressor cells
- ▶ indoleamine 2,3-dioxygenase

Endocrine-Related Cancer  
(2018) 25, 493–507

## Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and one of the leading causes of death related to tumors (DeSantis et al. 2014, Tao et al. 2015). Diabetes mellitus is metabolic disease, mainly characterized by hyperglycemia, resulting due to lack of insulin secretion

or insulin action (American Diabetes Association 2014). Beside very important role of hyperglycemia, the other factors such as oxidative stress and hyperlipidemia are also involved in the development of diabetic complications (Kangralkar et al. 2010).

Previous animal and human studies indicate that diabetes is associated with increased risk of breast cancer development because of many shared risk factors (Goto *et al.* 1995, Vigneri *et al.* 2009, Giovannucci *et al.* 2010, Cohen & LeRoith 2012, Shi & Hu 2014). Diabetes may influence tumor genesis and progression by several mechanisms (Shi & Hu 2014). According to Warburg's hypothesis, cancer cells use far more glucose for energy and survival than regular cells, implicating that hyperglycemia could facilitate tumor growth (Vander Heiden *et al.* 2009). Abundant reactive oxidative species, one of the main characteristics of diabetes, are involved in both, the initiation and progression of cancer (Waris & Ahsan 2006). Recent study indicated that a hyperglycemia-mediated enhanced oxidative stress increased the expression of adhesive molecules on endothelial cells thus accelerating melanoma metastasis and that nullifying systemic oxidative stress suppressed progression of tumor metastasis in diabetes (Ikemura *et al.* 2013). These suggested mechanisms explain the possible linkage between diabetes and accelerated genesis and progression of tumors. However, the role of diabetes in primary tumor growth and immune response to tumor is incompletely understood.

There is evidence that diabetes compromises defense to infection and immune response in general, including NK cells. Type 1 diabetic patients have decreased expression and aberrant signaling through the NKG2D receptor as well as markedly lower expression of p30/p46 NK-activating receptor molecules (Rodacki *et al.* 2007, Qin *et al.* 2011). Chen and coworkers have shown that stimulated streptozotocin (STZ)-diabetic cytotoxic T cells produce less perforin and TNF- $\alpha$  and thus they have no capability to eliminate melanoma cells and improve the survival of tumor-bearing mice (Chen *et al.* 2014). Other studies have shown that diabetes decreases total percentage and also impairs the expression of chemokine receptors and costimulatory molecules and decreases the production of proinflammatory cytokines in professional antigen-presenting cells (Nieminen *et al.* 2012, Sun *et al.* 2012). To our knowledge, there are no data about immunosuppressive cells, important players in biology of tumor, in diabetic condition. As mammary cancer is one of the most frequent tumors in population, the aim of our study was to investigate the effects of diabetes on murine 4T1 breast cancer growth and alteration of antitumor immune response.

Herewith, we provide the evidence that diabetic condition accelerates murine breast cancer growth, promotes suppressive activity of MDSC and regulatory T cells (Treg) affecting NK cells activity at least in part by enhancing 2,3-dioxygenase (IDO) production.

## Material and methods

### Mice

Six-to-eight-week-old female BALB/C mice used in all experiments were obtained from Military Medical Academy, Belgrade, Serbia. Mice were housed under standard laboratory conditions ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , relative humidity  $51 \pm 5\%$  and a 12-h light-dark cycle) and were administered standard laboratory chow and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Animal Ethics Board of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

### Induction of diabetes

BALB/C mice received an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, obtained from Sigma Chemical) dissolved in sodium citrate buffer (CB, pH 4.5) at a single dose of 170 mg/kg body weight. Control group of mice received only 100  $\mu\text{L}$  of CB.

### Induction of mammary carcinoma

The mouse mammary carcinoma cell line 4T1, syngenic to the BALB/c background, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). 4T1 cells were maintained in culture medium (Dulbecco's-modified Eagle's medium added with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L penicillin-streptomycin and 1 mmol/L mixed nonessential amino acids (Sigma). Subconfluent monolayers, in log growth phase, were harvested by brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH, Etobicoke, Canada) and washed three times in serum-free PBS before use in all *in vivo* and *in vitro* experiments. The number of passage of 4T1 cell line was 7–10 in all experiments. The number of viable tumor cells was determined by trypan blue exclusion. Suspensions only with >95% viable cells were used in experiments. After 4 of weeks STZ or CB injection, each mouse was inoculated with  $5 \times 10^4$  4T1 tumor cells orthotopically into the 4th mammary fat pad.

### Estimation of *in vivo* 4T1 tumor appearance and growth

Appearance of primary tumor and tumor diameter were assessed during experiment. The size of primary 4T1 mammary tumors was assessed morphometrically

from the day of tumor appearance, two times per week, using electronic calipers in two dimensions. Thirty-six days after tumor cell injection, mice were killed and the primary tumors were surgically removed and measured their weight. Blood was taken from the abdominal aorta.

### Determination of catalase

Red blood cells (RBC) isolated from the blood of STZ-treated and CB-treated mice were used for measuring antioxidative enzyme, catalase (CAT). RBCs were treated as previously described, and the activity of CAT in RBCs are presented in units per gram of hemoglobin  $\times 10^3$  (U/g Hb  $\times 10^3$ ) (Gajovic *et al.* 2016).

### Purification of CD8<sup>+</sup> T cells

CD8<sup>+</sup> T cells were isolated from spleens of tumor-bearing mice treated with STZ or CB, respectively using magnetic cell separation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). After negative selection, unlabeled cells were highly enriched with CD8<sup>+</sup> T cells.

### Purification of NK cells

NK49b<sup>+</sup> cells were purified from spleens of diabetic and control group of mice using magnetic cell separation kit (Miltenyi Biotec) as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). After positive selection, labeled cells were highly enriched with NK cells.

### Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay was determined by the xCELLigence RTCA (Real-Time Cell Analyzer) DP (Dual Plate) Instrument (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's recommendations. 100  $\mu$ L of complete medium were added to each well and background impedance on the plates was measured on the xCELLigence RTCA DP instrument at 37° and 5% CO<sub>2</sub>. The E-plate 16 were placed in the xCELLigence RTCA DP, and impedance measurements were recorded every 15 min for 60h. 4T1 cells ( $1 \times 10^4$ /well) were seeded in plate and used as target cells. After 36h, splenocytes (ratio of target to effector cells (T:E=1:20), purified CD8<sup>+</sup> T cells (T:E=1:5) and NK cells (T:E=1:5) derived from spleen of experimental and control group of mice, respectively, were added in plates as effector cells. Splenocytes, CD8<sup>+</sup> T-cell and NK cell-mediated death of tumor cells were

monitored in real time and was indicated by a decrease in cell index. Data were analyzed with RTCA Software 1.2 (ACEA Biosciences).

### Flow cytometric analyses of splenocytes and tumor-infiltrating leukocytes

Single-cell suspensions of spleens were obtained by mechanical dispersion. Single-cell suspensions of primary tumors were obtained by enzymatic digestion as previously described (Jovanovic *et al.* 2014). Fluorochrome-labeled anti-mouse mAbs specific for CD3 (145-2C11), CD49b (HMa2), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), NKp46 (29A1.4), CD69 (H1.2F3), CD11b (M1/70), CD11c (N418), MHC class II (14-4-4S), CD86 (GL1), CD279 (J43), Ly-6C/G (RB6/8C5), NKG2D (CX5), KLRG-1 (2F1) or isotype-matched controls (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA; Invitrogen) were used. For intracellular staining, cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/mL, Sigma-Aldrich), ionomycin (500 ng/mL, Sigma-Aldrich) and GolgiStop (BD Pharmingen) for 4h and stained with fluorochrome-labeled anti-mouse mAbs specific for perforin (eBio0MAK-D), granzyme (16g6; NGZB), CD107a (1D4B), Foxp3 (MF23), IFN- $\gamma$  (XMG1.2), IL-10 (JES5-16E3), IL-17 (C15.6) and TGF- $\beta$  (141231), IDO (2E2/IDO1) and iNOS (CXNFT) (BD Pharmingen; BioLegend, San Diego, CA, USA; eBiosciences, San Diego, CA, USA). Flow cytometry was conducted on FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the data were analyzed using FlowJo (Tree Star).

### In vivo depletion of NK cells

For *in vivo* depletion of NK cells, mice were treated i.p. with 100  $\mu$ g of anti-GM1b anti-asialo antibody (Waco Chemicals, Richmond, VA, USA) 1 day prior and 5 days after 4T1 tumor cell application. Efficacy of depletion of NK cells was >95%.

### In vitro experiments on splenocytes

Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultured for 24h in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% of serum isolated from diabetic mice, serum isolated from control mice with added glucose (glucose level was equal ( $16.7 \pm 0.8$  mmol/L) to the glucose concentration in serum of diabetic mice) and serum isolated from control mice, respectively. After incubation, cells were harvested and stained with appropriate antibodies for FACS and evaluated by flow cytometry.

### Measurement of cytokines

Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, IL-17 and IL-10 in the mouse serum were measured using ELISA kits specific for the mouse cytokines (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

### *In vitro* inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultured for 24 h in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% of serum isolated from diabetic mice, serum isolated from diabetic mice with added peg-catalase (Sigma-Aldrich) and serum isolated from control mice, respectively. Fifteen minutes prior the addition of serum diabetic mice, splenocytes were incubated with 2000 U/mL catalase, which converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> (Peraldi et al. 2009). After incubation, cells were harvested and stained with appropriate antibodies for FACS and evaluated by flow cytometry.

### *In vitro* pharmacological inhibition of IDO

Freshly isolated splenocytes from healthy mice were cultured for 24 h in RPMI medium containing 10% of serum isolated from diabetic mice with or without addition of inhibitor of IDO enzymatic activity, 1 mM 1-methyltryptophan, (1-MT, Sigma-Aldrich) and 10% of serum isolated from healthy mice, respectively. After incubation, cells were harvested, stained with appropriate antibodies for FACS and analyzed by flow cytometry.

### Statistical analysis

The data were analyzed using commercially available software (SPSS, version 20). Results were analyzed using the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test where appropriate. Difference in appearance of primary tumor was assessed using Kaplan-Meier analysis and was evaluated using the log-rank test. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### Enhancement of tumor growth in hyperglycemic mice

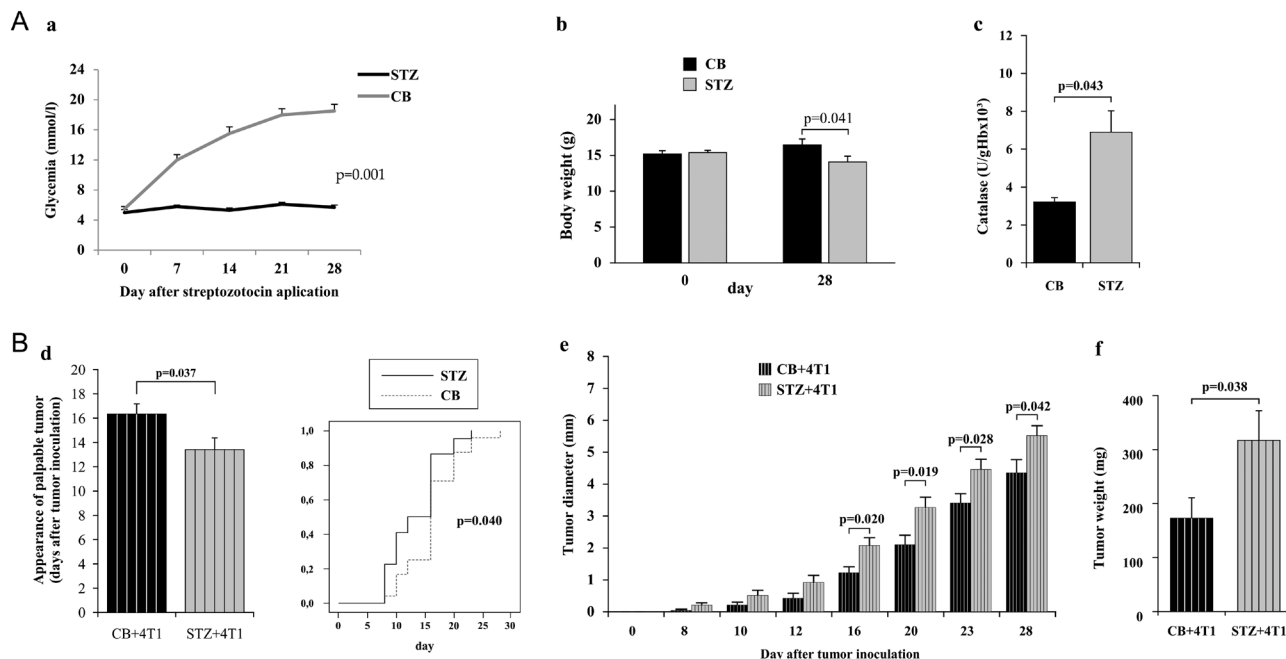
Glycemia and body weight were measured weekly after treatment with STZ. As shown in Fig. 1a and b, glycemia was significantly increased ( $P = 0.001$ ) while the

body weight was significantly decreased ( $P = 0.041$ ) in STZ-treated group of mice compared to control group on the 28th day after STZ injection. STZ-treated mice had significantly increased catalase activity compared to control mice ( $P = 0.043$ ; Fig. 1c). At that time, 4T1 mammary carcinoma cells were inoculated and tumor appearance and tumor diameter were monitored three times per week while tumor weight was measured after mice were killed. The appearance of palpable tumor was significantly accelerated in STZ-treated mice ( $P = 0.037$ ; Fig. 1d). Log-rank test confirmed significant difference in tumor appearance between defined groups, which was illustrated using Kaplan-Meier curves ( $P = 0.040$ ; Fig. 1d). Primary tumor diameters were increased in STZ-treated mice in comparison to control mice and the difference reached statistical significance 16 days after tumor induction ( $P = 0.020$ ; Fig. 1e). Thirty-five days after tumor cell application, mice were killed, and tumors were isolated and measured. Tumor weights were significantly increased in mice treated with STZ compared to controls. ( $P = 0.038$ ; Fig. 1f).

### Altered NK but not cytotoxic T cells activity contributes to enhanced tumor growth in diabetic mice

In order to test cells important for enhanced tumor growth of STZ-treated animals, we evaluated the cytotoxicity of splenocytes and isolated NK cells and CD8<sup>+</sup>T cells against 4T1 tumor cell line, *in vitro*. The results obtained by xCELLigence system for monitoring real-time cytotoxicity showed that diabetes led to decreased cytotoxic activity of splenocytes ( $P = 0.021$ ; Fig. 2A). In order to define the effector cells responsible for diminished cytotoxic activity of splenocytes, we isolated splenic CD8<sup>+</sup> T cells from tumor-bearing mice and tested their effect on 4T1 cells. There were no differences in cytotoxicity between CD8<sup>+</sup> T lymphocytes derived from STZ-treated and control mice (Fig. 2B). Further, we tested cytotoxic activity of isolated CD49b<sup>+</sup> NK cells against tumor cells, at same target:effector ratio as for CD8<sup>+</sup> T cells (1:5). As shown in Fig. 2C, splenic NK cells isolated from STZ-treated mice were significantly less cytotoxic against 4T1 cells ( $P = 0.001$ ), indicating that diabetes significantly reduced cytotoxic potential of NK cell population.

Further, we depleted NK cells in STZ and CB-treated mice by *in vivo* administration of an antiasialo-GM1 antibody, following tumor challenge. After antiasialo-GM1 treatment, tumor appearance was significantly accelerated in both groups of mice in comparison to non-treated



**Figure 1**

Diabetes accelerates tumor appearance and growth. (A) Metabolic parameters prior to tumor induction. Mice were injected intraperitoneally with STZ at a single dose of 170 mg/kg bodyweight or 100  $\mu$ L of CB only. Glycemia and body weight were measured weekly (a and b). Catalase was measured by spectrophotometry in red blood cells derived from STZ-treated and control mice (c). (B) Appearance and growth of mammary tumor inoculated 28 days after STZ-induced diabetes. Mice were inoculated with  $5 \times 10^4$  4T1 cells. Palpable tumors were monitored for 36 days (d and e). Tumor weight was measured on day 36 (f). Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. of seven mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann–Whitney rank-sum test or Student’s unpaired *t*-test and log-rank test where appropriate.

animals, which is confirmed by log-rank test (CB vs CB+AA  $P=0.001$ ; STZ vs STZ+AA  $P=0.001$ ; Fig. 2D). Moreover, after NK cells depletion, the difference in dynamic of tumor appearance as well as in tumor diameter and tumor weight in STZ and CB-treated mice could no longer be registered (Fig. 2D, E and F).

### Diabetes alters functional phenotype of NK cells in spleen

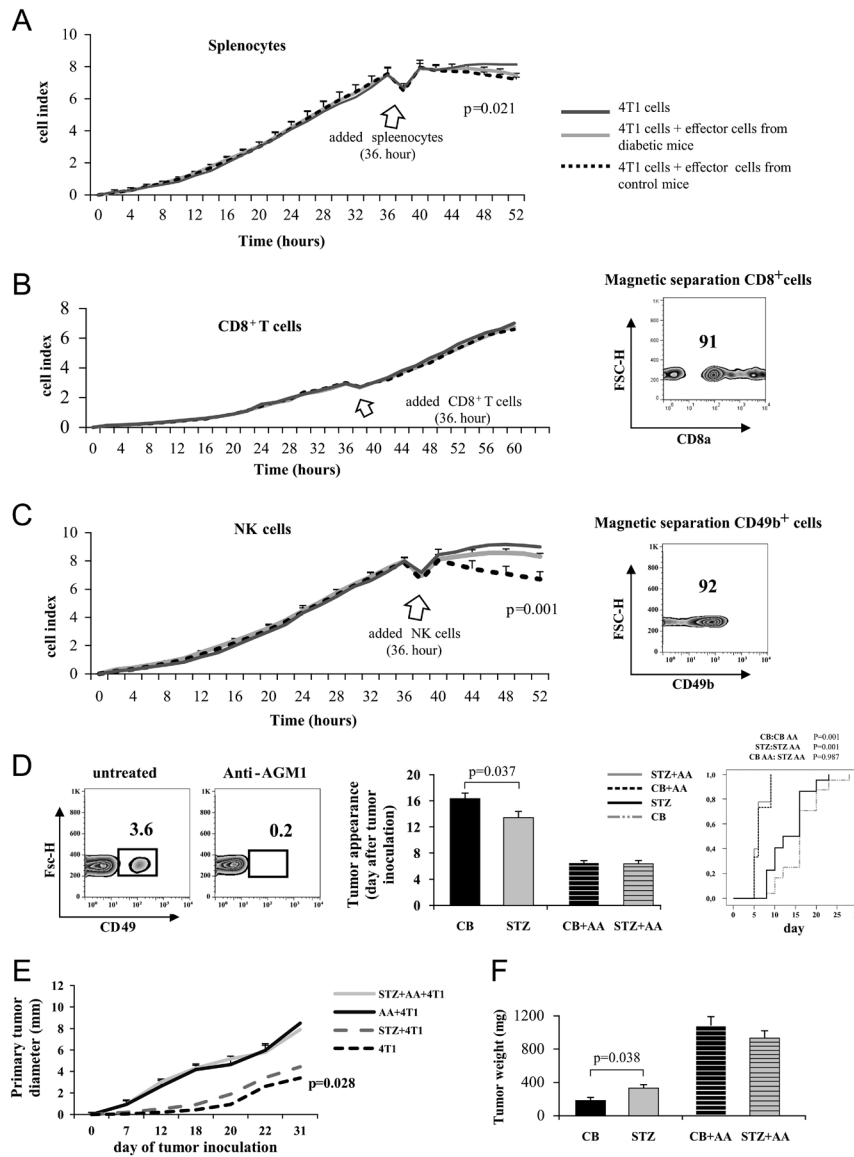
We further examined phenotype of splenic NK cells on the 28th day after STZ induction, prior to tumor induction. Diabetic condition decreased expression of NKG2D-activating receptor on CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells compared to NK cells derived from control mice ( $P=0.005$ ; Fig. 3A). There was no significant difference in percentage of PD-1<sup>+</sup>CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells. However, level of PD-1 expression was significantly increased on individually NK cell derived from STZ-treated mice in comparison to controls ( $P=0.017$ ; Fig. 3B). Intracellular staining of NK cells revealed significantly lower percentage of perforin ( $P=0.045$ ), IFN- $\gamma$  ( $P=0.049$ ) and IL-17 ( $P=0.032$ ) producing CD3-CD49b<sup>+</sup>NK cells in STZ-induced mice

(Fig. 3C, D and E). There was no significant difference ( $P>0.05$ ) in the percentage of IL-10-producing NK cells between groups; however, we found significantly higher expression of IL-10 per NK cell isolated from STZ-treated mice ( $P=0.049$ ; Fig. 3F).

Interestingly, there were no differences in the phenotype of splenic CD8<sup>+</sup> T cells between STZ- and CB-treated tumor-bearing mice, respectively. Analyses revealed insignificant increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in STZ-treated tumor-bearing mice while we did not find any differences in the expression of other surface markers of interest: NKG2D, CD69, Cd107a and PD-1 or in the production of IFN- $\gamma$ , IL-17, perforin and granzyme (data not shown).

### Diabetes facilitates accumulation of innate and acquired immunosuppressive cells in tumor-bearing mice

Analysis of serum cytokines have shown increased concentration of IL-10 in the sera of STZ-treated mice in comparison to control group (Fig. 4A), while there were no differences in the level of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12 and



**Figure 2**

Diabetes diminishes NK cell cytotoxicity. The results obtained by xCELLigence system showed cytotoxic activity of splenocytes (A), CD8<sup>+</sup>T cells (B) and NK cells (C) isolated from mice treated with STZ and CB, respectively. Data are presented as means ± s.e.m. of two individual experiments, each carried out with seven mice per group. Statistical significance was tested by unpaired Student's t-test. NK cells were depleted by administration of anti-asialo GM1 mAb (AA). Representative flow cytometry plots show percentage of splenic NK cells after *in vivo* depletion (D). NK-depleted diabetic and control mice were injected with 5 × 10<sup>4</sup> 4T1 tumor cells. Palpable tumors (E), tumor diameter (F) and tumor weight (G) were measured up to day 36 from the inoculation of 4T1 tumor cells. Data are presented as mean ± s.e.m. of seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was tested by Student's unpaired t-test and log-rank test, where appropriate.

IL-17 between two groups (data not shown). According to these results, we further analyzed immunosuppressive cells in spleens of STZ-treated and CB-treated mice, respectively, prior and 15 days after 4T1 tumor cell application. STZ-treated mice exhibited pronounced increase in percentage of splenic CD11b<sup>+</sup>CD11c-Gr-1<sup>+</sup> MDSCs compared with control mice ( $P=0.029$ ; Fig. 4B). Moreover, STZ-treated mice exhibited increased percentage of splenic CD11b<sup>+</sup>CD11c-Gr-1<sup>+</sup> MDSCs that produce TGF- $\beta$  ( $P=0.03$ ; Fig. 4C). Percentage of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells ( $P=0.029$ ) as well as percentage of IL-10-producing CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells ( $P=0.048$ ) were significantly increased in spleens of diabetic tumor-bearing mice (Fig. 4D and E).

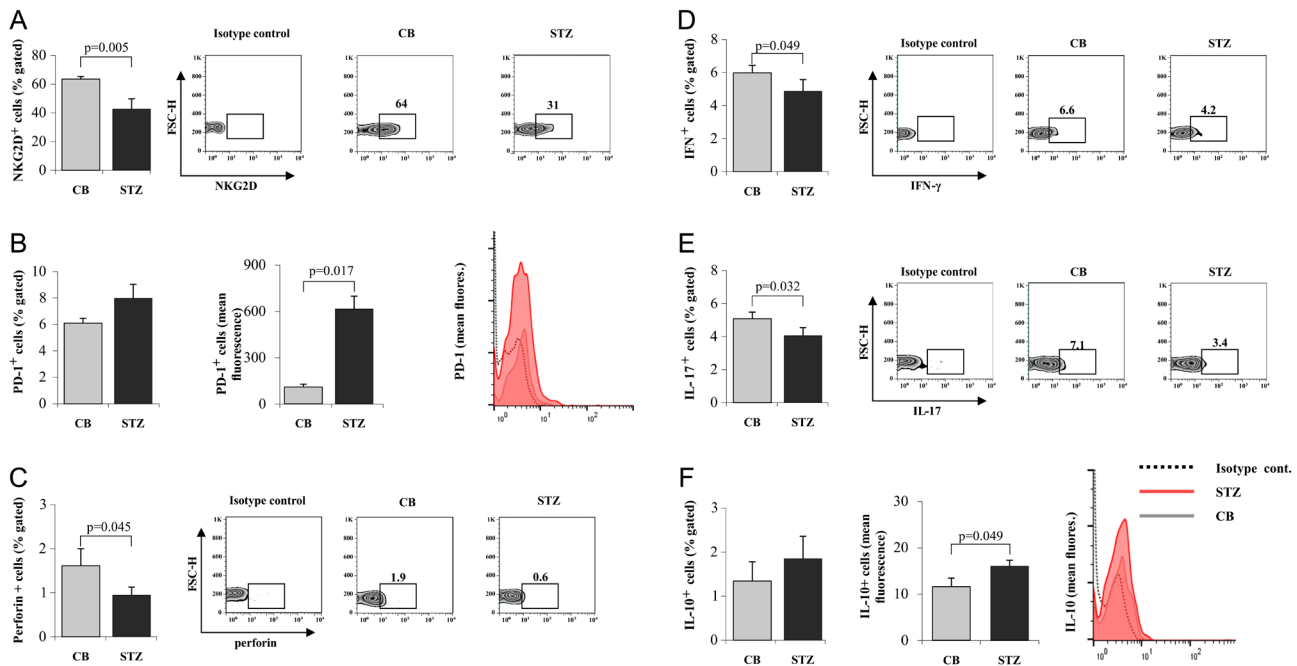
Analyses of dendritic cells (DCs) revealed that there were no differences in the percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells in spleen derived from STZ-treated and CB-treated

mice prior and after tumor challenge (data not shown). There were no differences in expression of MHC II and CD86<sup>+</sup> on CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells derived from spleen of animals from previously defined groups (data not shown).

### Diabetes modulates innate lymphoid and myeloid cells phenotype in primary tumor

Analysis of NK cells in tumor tissue did not show differences in percentage of CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK cells (Fig. 5A). Analyses of functional phenotype revealed significantly lower percentage of NKG2D<sup>+</sup> ( $P=0.008$ ) and higher percentage of PD-1<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.029$ ) in the tumors of STZ-treated mice compared to animals treated with CB only (Fig. 5B and C).





**Figure 3**

Diabetes alters functional phenotype of NK cells in spleen. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of NKG2D (A), PD-1 (B), perforin (C), IFN- $\gamma$  (D), IL-17<sup>+</sup> (E) and IL-10<sup>+</sup> (F) NK cell derived from spleens of STZ and control, respectively. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. of seven mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired t-test, where appropriate. A full color version of this figure is available at <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0529>.

We found increased percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs ( $P=0.021$ ) as well as TGF- $\beta$ <sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs ( $P=0.039$ ) in primary tumor of STZ-treated mice compared to control mice (Fig. 5D and E).

### Diabetic serum altered NK cell phenotype *in vitro*

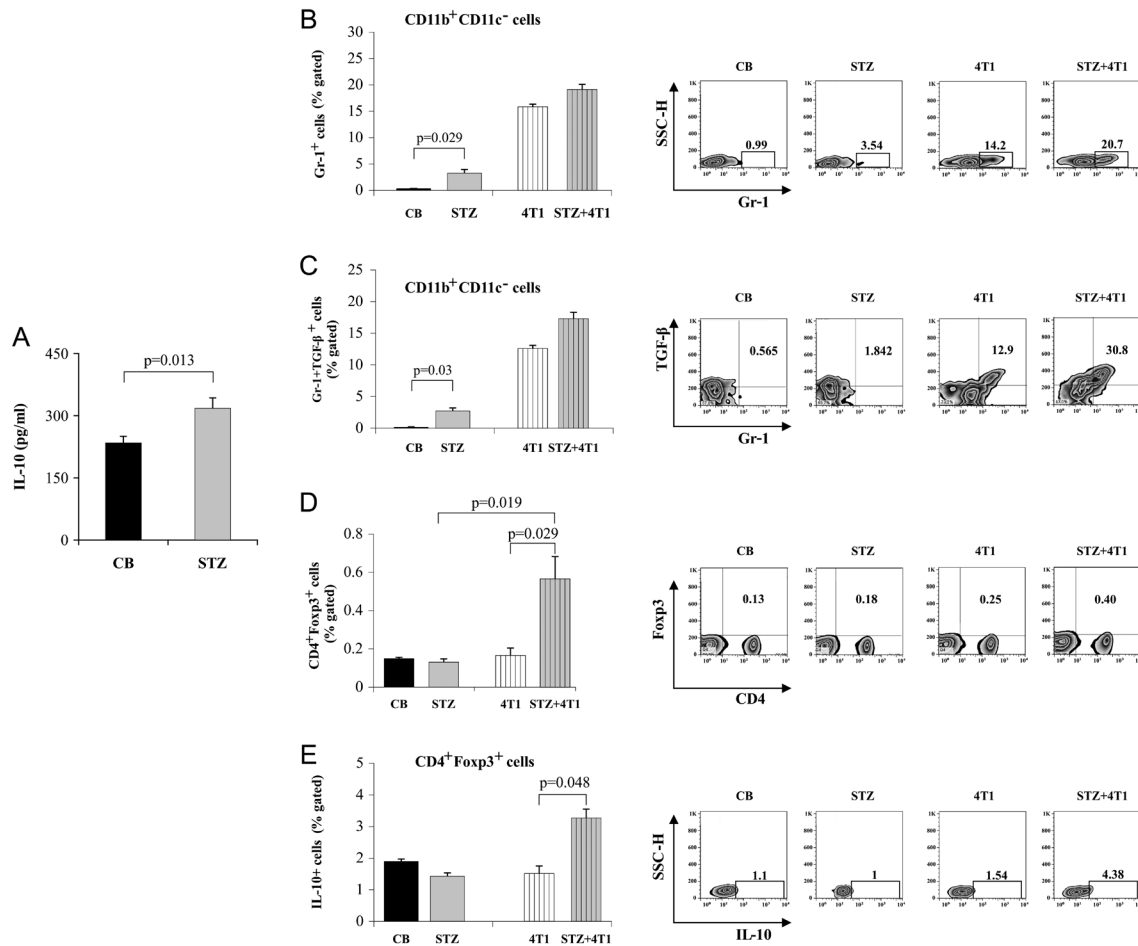
Further, we investigated the effects of diabetes-mediated soluble factors and glucose on functional phenotype of NK cells. Splenocytes isolated from healthy mouse were seeded for 24 h in medium containing serum derived from diabetic mice, serum derived from healthy mice with added glucose or serum derived from healthy mice only, and CD3-CD49<sup>+</sup> NK cells were analyzed within cultivated population of splenocytes. Addition of glucose increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> ( $P=0.029$ ) and PD-1<sup>+</sup> ( $P=0.016$ ) CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells (Fig. 6A and B). Although there were no differences in the percentage of NKp46 and perforin, there was significant decrement in the level of expression of these molecules in NK cells treated with glucose added sera ( $P=0.026$ ;  $P=0.017$ ; Fig. 6C and D). Cultivation in diabetic sera additionally increased percentage of KLRG-1<sup>+</sup> ( $P=0.032$ ;  $P=0.016$ ) and PD-1<sup>+</sup> ( $P=0.036$ ;  $P=0.016$ ) CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells and decreased expression of NKp46 ( $P=0.038$ ;  $P=0.014$ ) and production of perforin ( $P=0.049$ ;

$P=0.012$ ) per CD3-CD49<sup>+</sup>NK cell in comparison to glucose added sera and control sera (Fig. 6A, B, C and D). Diabetic sera decreased percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.029$ ;  $P=0.029$ ) decreased expression of CD107a ( $P=0.016$ ;  $P=0.014$ ), and production of granzyme ( $P=0.004$ ;  $P=0.003$ ) and IL-17 ( $P=0.048$ ;  $P=0.032$ ) in CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells compared to glucose added sera and control sera (Fig. 6E, F, G and H).

In order to nullify enhanced oxidative stress, we performed additional *in vitro* experiments. Freshly isolated splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing serum derived from diabetic mice, serum derived from diabetic mice with added peg-catalase, and serum derived from healthy mice, respectively. Addition of peg-catalase significantly increased the percentage of NKp46<sup>+</sup>CD3-CD49<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.05$ ) but did not affect the expression of PD-1, KLRG-1 and NKG2D molecules in comparison to NK cells cultivated in diabetic sera (Table 1).

### NK cell function is suppressed in IDO-dependent manner

Further, we analyzed the production of iNOS and IDO in different cell populations. Intracellular staining of



**Figure 4**

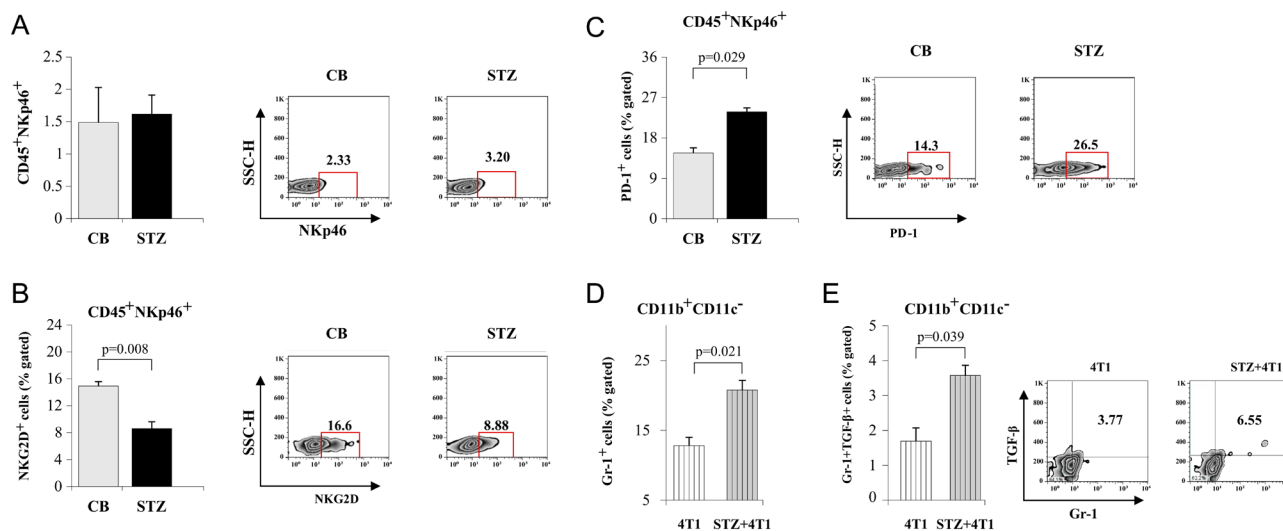
Diabetic condition favors immunosuppressive phenotypes of spleen cells. The level of IL-10 in the sera of diabetic and control group of mice (A). The percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (B) and TGF-β<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (C), CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (D), IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells (E) in the spleen of STZ-treated and control mice, respectively, prior and 15 days after 4T1 tumor cell application were determined by flow cytometry and displayed on graphs and representative facs plots. Data are mean ± s.e.m. from six mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney rank-sum test.

splenic MDSCs and DCs revealed significantly higher percentages of iNOS<sup>+</sup> ( $P=0.029$ ) and IDO<sup>+</sup> ( $P=0.031$ ) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSCs as well as iNOS<sup>+</sup> ( $P=0.005$ ) and IDO<sup>+</sup> ( $P=0.026$ ) CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DCs in STZ-treated mice in comparison to control group (Fig. 7A, B, C and D). Next, in *in vitro* experiments, splenocytes isolated from healthy mouse have been cultivated in medium containing serum derived from diabetic mice with and without added 1-MT, selective blocker of IDO, and in sera isolated from healthy mice, respectively, for 24h. Addition of 1-MT in diabetic sera abrogates suppressive effect on percentage of NKG2D<sup>+</sup> ( $P=0.016$ ), NKp46<sup>+</sup> ( $P=0.038$ ) and CD69<sup>+</sup> ( $P=0.004$ ), perforin-producing ( $P=0.008$ ) and granzyme-producing ( $P=0.032$ ) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> cells compared to the same population of cells cultivated in diabetic sera without addition of 1-MT (Fig. 7E, F, G, H and I). Addition of 1-MT

decreased percentage of IL-10-producing CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>NK cells ( $P=0.041$ ) and expression of PD-1 per CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> cells ( $P=0.015$ ) in comparison to NK cells cultivated in diabetic serum only (Fig. 7J and K).

## Discussion

Previous evidence in mice and humans clearly demonstrated the relationship between type 1 and type 2 diabetes and malignancy and some studies have investigated the underlying mechanisms (Ikemura et al. 2013, Chen et al. 2014). The study by Goto and coworkers demonstrated that STZ-induced diabetes accelerates mammary tumor genesis; however, the cellular basis of this effect was not explored (Goto et al. 1995). It is also obvious that effector cells involved in antitumor immunity may



**Figure 5**

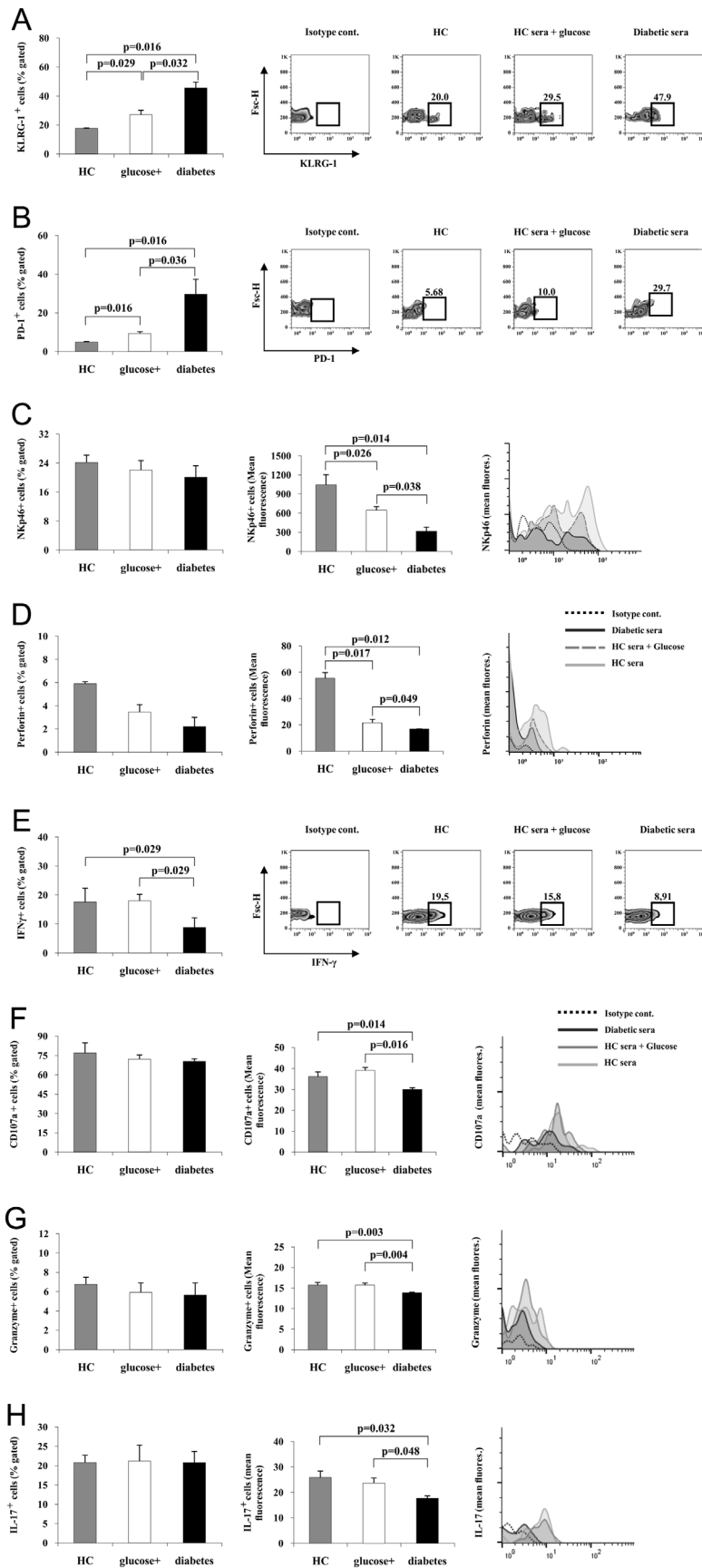
Diabetes affects the phenotype of NK cells and Tregs in primary tumor. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of CD45<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup> NK cells (A) as well as NKG2D<sup>+</sup> (B) and PD-1<sup>+</sup> (C) NK cells, derived from primary tumor of STZ and control mice, respectively, 15 days after 4T1 tumor cell application. The percentage of CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (D) as well as TGF-β<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>Gr-1<sup>+</sup> MDSCs (E) in the primary tumor of STZ-treated mice and control mice were determined by flow cytometry 15 days after 4T1 tumor cell application. Data are mean ± s.e.m. from seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney rank-sum test. A full color version of this figure is available at <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0529>.

be differently affected by hyperglycemia and pathologies in obesity, insulin resistance and inflammation (Sell et al. 2012, Wrann et al. 2012, Berrou et al. 2013). In this paper, we have demonstrated the accelerated growth of mammary carcinoma in mice made hyperglycemic by a single 'high'-dose injection of STZ.

We found that splenocytes derived from tumor-bearing diabetic mice had significantly lower cytotoxic activity in comparison to those isolated from control tumor-bearing mice (Fig. 2A). Further, we tested the cytotoxicity of isolated CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells. Recently, using melanoma model, Chen and coworkers have shown that the acquisition of tumor-killing capacity of CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells is diminished in melanoma-bearing STZ-diabetic mice (Chen et al. 2014). However, we did not find any significant difference in cytotoxicity of CD8<sup>+</sup> T cells to mammary tumor cells *in vitro* (Fig. 2B). While in these animal model, CD8<sup>+</sup> T cells have been shown to play an important antitumor role, our previous studies revealed a nonessential role of CD8<sup>+</sup> T cells-mediated cytotoxic antitumor activity (Jovanovic et al. 2011, 2014). The fact that 4T1 is weakly immunogenic mouse breast tumor cell line and previous findings that innate immunity is essential in antitumor response in this tumor model are in line with our results (Jovanovic et al. 2011, 2014). As we and others have shown previously that NK cells cytotoxicity is important in immunological surveillance

and immune response to established tumor, we found cytotoxic capacity and phenotypic alteration of NK cells in diabetic mice as shown prior to tumor induction (Smyth et al. 2005, Jovanovic et al. 2011, Marcus et al. 2014). These findings demonstrated lower cytotoxicity of NK cells of mice treated with STZ (Fig. 2C). *In vivo* depletion of NK cells nullified the difference in tumor appearance and growth which is in line with *in vitro* experiment (Fig. 2D, E and F). These findings suggest on essential role of diminished NK cells activity in accelerated tumor growth phenomenon in diabetic mice.

Rodacki and coworkers reported that NK cells in patients with long-standing type 1 diabetes had markedly lower expression of p30/p46 NK receptors compared with those of control subjects (Rodacki et al. 2007). Interestingly, both NOD mice and patients with diabetes also have slightly decreased expression of NKG2D (Ogasawara et al. 2003, Qin et al. 2011). Accordingly, our findings show that diabetic condition attenuates expression of activating receptor such as NKG2D, production of cytolytic molecules such as perforin and proinflammatory cytokines IFN-γ and IL-17, while favors expression of PD-1 molecule and production of IL-10 in splenic NK cells (Fig. 3). These findings together with diminished cytotoxic activity of NK cells derived from STZ-treated mice, as previously described (Fig. 2), implicate that diabetes attenuates



**Figure 6** Diabetic serum induces alteration of NK cells phenotype, *in vitro*. Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera, glucose added sera and control sera, respectively. The graphs and representative facs plots displaying the percentage of KLRG-1<sup>+</sup> (A), PD-1<sup>+</sup> (B), Nkp46<sup>+</sup> (C), perforin (D), IFN-γ (E), Cd107a<sup>+</sup> (F), granzyme<sup>+</sup> (G), IL-17<sup>+</sup> (H) NK cells. Data are shown as mean ± s.e.m. of six mice per group and are representative of three separate experiments. Statistical significance was tested by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired t-test, where appropriate.

**Table 1** Effect of catalase, *in vitro*.

	Diabetic sera	Diabetic sera +peg-catalase	Control sera	
KLRG-1	39.85 ± 0.21	36.13 ± 2.12	27.82 ± 3.24	<i>P</i> > 0.05
PD-1	31.95 ± 2.62	29.15 ± 2.39	13.52 ± 3.57	<i>P</i> > 0.05
NKG2D	8.13 ± 0.85	9.15 ± 0.96	10.44 ± 1.33	<i>P</i> > 0.05
NKp46	13.28 ± 0.85*	20.02 ± 1.01*	22.36 ± 1.37	<i>P</i> = 0.05

Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera, diabetic sera with added peg-catalase and control sera, respectively. The table displays the percentage of KLRG-1+, NKG2D+ and NKp46+ NK cells. Data are shown as mean ± s.e.m. of seven mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was tested by Mann–Whitney rank-sum test or Student’s unpaired *t*-test, where appropriate. \*Statistical significance in NKp46 expression between diabetic sera and diabetic sera+peg-catalase is 0.05.

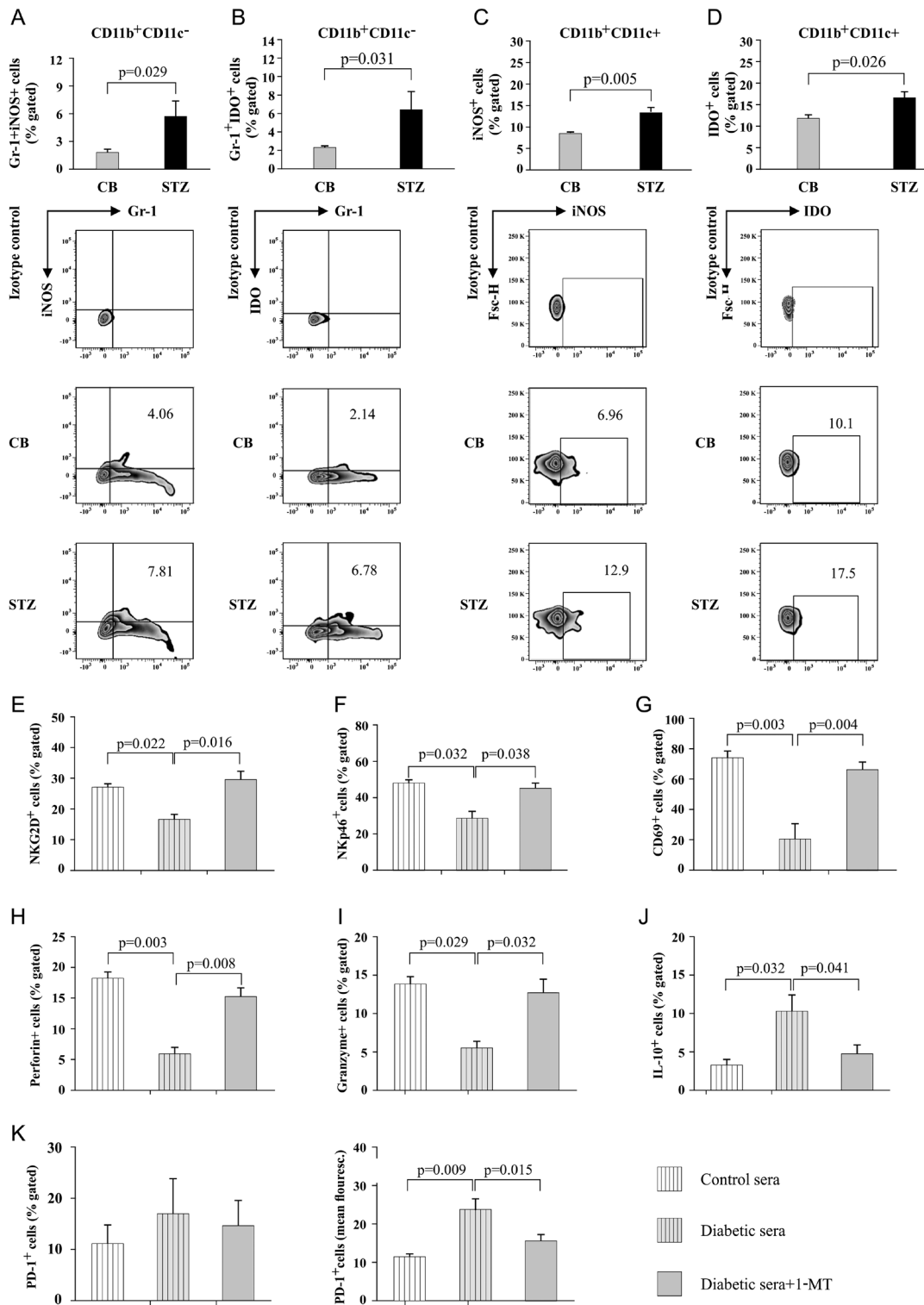
tumoricidal phenotype of NK cells. Our results are in line with previously mention studies claiming alteration of NK cells phenotype in humans with diabetes (Rodacki *et al.* 2007, Berrou *et al.* 2013). Similar phenomenon was obtained in tumor microenvironment. Although we did not find difference in percentage of tumor-infiltrating NK cells, significantly lower percentage of NKG2D+ NK cells and higher percentage of PD-1+ NK cells suggest that diabetes favors accumulation of poorly functional NK cells in primary tumor (Fig. 5A, B, C and D).

As various mechanisms are proposed to be responsible for the immunosuppressive effects of diabetes, we tested several hypotheses to identify agents responsible for suppression of NK cells. First, we examined the possibility that this is mediated by hyperglycemia, which is known to directly disturb endoplasmatic reticulum (ER) function, favor accumulation of misfolded proteins in the lumen thus promoting ER stress, which in turn decreases the expression of activating receptors on NK cells (Berrou *et al.* 2013). Diabetic sera increased percentage of KLRG-1+ and PD-1+ NK cells, decreased the expression of NKp46, CD107a and production of perforin, granzyme, IFN-γ and IL-17 per NK cell compared to glucose added sera and control sera (Fig. 6A, B, C, D, E, F, G and H). These results suggest that hyperglycemia is not crucial for altered NK cell phenotype in diabetes and left at least two nonexclusive possibilities. First, reactive oxidative species, which are abundant in the sera of diabetic mice, may suppress NK cell activity through diminished expression of activating receptors such as NKG2D, as previously reported (Choi *et al.* 2008, Peraldi *et al.* 2009). In our study, increment in catalase concentration indicates on higher systemic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, one of the major ROSs, in serum of diabetic mice (Fig. 1c). However, addition of peg-catalase and subsequently blocking of enhanced oxidative stress revealed increment of NKp46 expression only but did not affect the expression or production of other markers of NK cell activity such as NKG2D, KLRG-1 and PD-1 (Table 1). Recent study has shown that *in vivo* treatment with peg-catalase significantly reduced the number of tumor cells

in the lung and liver in both untreated and STZ-treated mice however, our results are implicating on some other mediators that suppress tumoricidal phenotype of NK cells (Ikemura *et al.* 2013).

Level of IL-10 was significantly increased in the sera of diabetic mice (Fig. 4A). It is known that immunosuppressive cells such as MDSCs, Tregs and immature DCs are important regulators of innate and adaptive immunity and all may produce IL-10 (Dilek *et al.* 2012, Yang 2013). It appears that diabetic condition facilitated accumulation of suppressive CD11b+CD11c-Gr-1+ MDSCs in spleen, prior to tumor injection (Fig. 4B and C). During tumor growth, recruited MDSCs promote generation, polarization, activation and migration of Tregs (Huang *et al.* 2006, Hoechst *et al.* 2009, Vitale *et al.* 2014). Indeed, diabetic condition led to significant increased accumulation of TGF-β producing MDSCs both in spleen and mammary tumor (Figs 4C and 5E). Moreover, increased accumulation of IL-10 producing CD4+Foxp3+Tregs was detected in spleen of tumor-bearing diabetic mice (Fig. 4E). Sitrin and coworkers argue that Tregs control NK cell function by controlling bioavailability of limited amount of IL-2 in the islets generated mainly by CD4+ T cells infiltrating the islets in BDC2.5/NOD mice (Sitrin *et al.* 2013). However, in our model, this should be of very limited effect as the single high dose of STZ is toxic for β cells but does not induce significant islet infiltration.

Few possible mechanisms of MDSC-mediated NK cell suppression are known. They inhibit NK cells through a cell-contact-dependent mechanism via membrane-bound TGF-β or recognition of the NK cell-activating receptors (Ostrand-Rosenberg *et al.* 2012). It is also known that in order to make immunosuppressive tumor microenvironment, activated MDSCs produce arginase 1, inducible nitric oxide synthase (iNOS), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), NADPH oxidase and immunosuppressive cytokines (Wesolowski *et al.* 2013). iNOS is one of the products of immunosuppressive cells important for producing NO that further directly



**Figure 7**

Diabetic condition suppresses NK cells function in IDO-dependent manner. The graphs and facs plots display percentage of iNOS<sup>+</sup> MDSCs (A) and IDO<sup>+</sup> MDSCs, respectively, as well as iNOS<sup>+</sup> (C) and IDO<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (D) DCs, respectively, in the spleens of experimental and control mice. Splenocytes derived from healthy mice were cultivated in medium containing diabetic sera with added 1-MT, diabetic sera and control sera. The percentage of NKG2D<sup>+</sup> (E), NKp46<sup>+</sup> (F) and CD69<sup>+</sup> (G), perforin (H) and granzyme (I), IL-10 (J) and PD-1<sup>+</sup> (K) CD3-CD49b<sup>+</sup> cells were determined by flow cytometry. Data are mean ± s.e.m. from six mice per group and are representative of two separate experiments. Statistical significance was determined by Mann-Whitney rank-sum test or Student's unpaired *t*-test, where appropriate.

suppress proliferation of lymphocytes (Gabrilovich & Nagaraj 2009, Bogdan 2011). Recent study revealed higher iNOS activity in diabetic patients (Adela *et al.* 2015). Diabetic condition significantly increased percentage of iNOS<sup>+</sup> MDSCs as well as iNOS<sup>+</sup> DCs (Fig. 7A and C). Low-grade inflammation, one of the diabetes hallmarks, provoke iNOS expression and subsequent NO production that leads to increased IDO activity (Biswas 2016, Gazdic *et al.* 2017). IDO, an enzyme produced by variety of immune and stromal cells, has powerful immunomodulatory effects (Yu *et al.* 2013). IDO is involved in the catabolism of the essential amino acid L-tryptophan to L-kynurenine, while further metabolites of the L-kynurenine act in the immunosuppressive manner (Lee *et al.* 2002, Sucher *et al.* 2010, Harden & Egilmez 2012). IDO inhibits proliferation and increased apoptosis of T cells, interferes with the IL-2-induced expression of activating receptors on NK cells, inhibits IFN- $\gamma$  production and favors apoptosis of NK cells (Della Chiesa *et al.* 2006, Li *et al.* 2009, Cacalano 2016).

Accordingly, herewith we showed significantly increment in percentages of IDO producing MDSCs and DCs in diabetic mice (Fig. 7B and D). In order to confirm the possible immunosuppressive MDSCs/DCs-IDO pathway, we blocked effect of IDO using pharmacological inhibitor 1-MT *in vitro*. Addition of 1-MT in diabetic serum increased percentage of NKG2D<sup>+</sup>, NKp46<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, perforin and granzyme producing NK cells (Fig. 7E, F, G, H and I). Moreover, inhibition of IDO in diabetic condition has significantly decreased percentage of IL-10 producing CD3-CD49<sup>+</sup> NK cells as well as expression of PD-1 molecule on CD3-CD49<sup>+</sup> cells (Fig. 7J and K). In comparison to control serum, 1-MT treatment almost completely restored the phenotype of NK cells indicating on important role of IDO signaling pathway in the suppression of NK cells in diabetic condition.

Collectively, diabetic condition promotes breast cancer growth through suppression of antitumor immunity. Diabetes favors accumulation of iNOS and IDO-producing innate immunosuppressive cells and subsequent attenuation of NK cells tumoricidal phenotype in at least in part through IDO-dependent manner. The growth of breast cancer in diabetic condition might thereby be controlled by the development of new IDO based biologics.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Funding

This work was supported by grants from the Serbian Ministry of Science and Technological Development (175071, 175069 and 175103), Serbia and from the Faculty of Medical Sciences Kragujevac (project JP 06/15), Serbia.

#### Author contribution statement

N G, M L L and I J wrote the manuscript. N G, M J and I J collected the data. N G, M J, J P, G R and I J were involved in the analysis and interpretation of the data. N G, N A, M L L and I J contributed toward conception and design. All the authors have approved the final version of this manuscript.

#### Acknowledgements

The authors thank Ivana Milovanovic, Sandra Nikolic, Katerina Martinova, Aleksandar Ilic and Milan Milojevic for excellent technical assistance.

#### References

- Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN & Banerjee SK 2015 Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS ONE* **10** e0125270. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125270>)
- American Diabetes Association 2014 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37** S81–S90. (<https://doi.org/10.2337/dc14-S081>)
- Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier JF, Dulphy N, Toubert A & Peraldi MN 2013 Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. *PLoS ONE* **8** e62418. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062418>)
- Biswas SK 2016 Does the Interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016** 5698931. (<https://doi.org/10.1155/2016/5698931>)
- Bogdan C 2011 Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods in Molecular Biology* **677** 375–393. ([https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_24))
- Cacalano NA 2016 Regulation of natural killer cell function by STAT3. *Frontiers in Immunology* **7** 128. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00128>)
- Chen SC, Su YC, Lu YT, Ko PC, Chang PY, Lin HJ, Ho HN & Lai YP 2014 Defects in the acquisition of tumor-killing capability of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS ONE* **9** e109961. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109961>)
- Choi SW, Benzie IF, Ma SW, Strain JJ & Hannigan BM 2008 Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radical Biology and Medicine* **44** 1217–1231. (<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.005>)
- Cohen DH & LeRoith D 2012 Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. *Endocrine-Related Cancer* **19** F27–F45. (<https://doi.org/10.1530/ERC-11-0374>)
- Della Chiesa M, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A & Vitale M 2006 The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* **108** 4118–4125. (<https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-006700>)
- DeSantis C, Ma J, Bryan L & Jemal A 2014 Breast cancer statistics 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **64** 52–62. (<https://doi.org/10.3322/caac.21203>)

- Dilek N, Vuillefroy de Sully R, Blancho G & Vanhove B 2012 Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Frontiers in Immunology* **3** 208. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00208>)
- Gabrilovich DI & Nagaraj S 2009 Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology* **9** 162–174. (<https://doi.org/10.1038/nri2506>)
- Gajovic N, Jovanovic I, Ilic A, Jeremic N, Jakovljevic V, Arsenijevic N & Lukic ML 2016 Diabetes mellitus directs NKT cells toward type 2 and regulatory phenotype Ser. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **17** 35–41. (<https://doi.org/10.1515/sjccr-2016-0005>)
- Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML & Volarevic V 2017 Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **12** e1173–e1185. (<https://doi.org/10.1002/term.2452>)
- Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG & Yee D 2010 Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care* **33** 1674–1685. (<https://doi.org/10.2337/dc10-0666>)
- Goto Y, Nagasawa H & Iguchi T 1995 Streptozotocin-induced diabetes accelerates mammary tumorigenesis in shn and sln mice. *Oncology Reports* **2** 37–40. (<https://doi.org/10.3892/or.2.1.37>)
- Harden JL & Egilmez NK 2012 Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. *Immunological Investigations* **41** 738–764. (<https://doi.org/10.3109/08820139.2012.676122>)
- Hoehchst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, Lehner F, Manns MP, Greten TF & Korangy F 2009 Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the Nkp30 receptor. *Hepatology* **50** 799–807. (<https://doi.org/10.1002/hep.23054>)
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM & Chen SH 2006 Gr-1<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research* **66** 1123–1131. (<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1299>)
- Ikemura M, Nishikawa M, Kusamori K, Fukuoka M, Yamashita F & Hashida M 2013 Pivotal role of oxidative stress in tumor metastasis under diabetic conditions in mice. *Journal of Controlled Release* **170** 191–197. (<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.028>)
- Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Lisnic Juranic V, McKenzie ANJ, Arsenijevic N, Jonjic S & Lukic ML 2011 ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *European Journal of Immunology* **41** 1902–1912. (<https://doi.org/10.1002/eji.201141417>)
- Jovanovic I, Pejnovic N, Radosavljevic G, Pantic J, Milovanovic M, Arsenijevic N & Lukic M 2014 Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoural accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *International Journal of Cancer* **134** 1669–16682. (<https://doi.org/10.1002/ijc.28481>)
- Kangralkar VA, Patil SD & Bandivadekar RM 2010 Oxidative stress and diabetes: a review. *International Journal of Pharmaceutical Applications* **1** 38–45.
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH & Mellor AL 2002 Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* **107** 452–460. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01526.x>)
- Li R, Wei F, Yu J, Li H, Ren X & Hao X 2009 IDO inhibits T-cell function through suppressing Vav1 expression and activation. *Cancer Biology and Therapy* **8** 1402–1408. (<https://doi.org/10.4161/cbt.8.14.8882>)
- Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N & Raulet DH 2014 Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in Immunology* **122** 91–128. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00003-1>)
- Nieminen JK, Vakkila J, Salo HM, Ekström N, Härkönen T, Ilonen J, Knip M & Vaarala O 2012 Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care* **35** 2303–2310. (<https://doi.org/10.2337/dc11-2460>)
- Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, Pertel T, Carnaud C, Bluestone JA & Lanier LL 2003 Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* **18** 41–51. ([https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00505-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00505-8))
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW & Clements VK 2012 Crosstalk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in Cancer Biology* **22** 275–281. (<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.011>)
- Peraldi MN, Berrou J, Dulphy N, Seidowsky A, Haas P, Boissel N, Metivier F, Randoux C, Kossari N, Guérin A, et al. 2009 Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *Journal of Immunology* **182** 1696–1705. (<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1696>)
- Qin H, Lee IF, Panagiotopoulos C, Wang X, Chu AD, Utz PJ, Priatel JJ & Tan R 2011 Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes* **60** 857–866. (<https://doi.org/10.2337/db09-1706>)
- Rodacki M, Svoren B, Butty V, Besse W, Laffel L, Benoist C & Mathis D 2007 Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* **56** 177–185. (<https://doi.org/10.2337/db06-0493>)
- Sell H, Habich C & Eckel J 2012 Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology* **8** 709–716. (<https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.114>)
- Shi Y & Hu FB 2014 The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* **383** 1947–1948. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60886-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60886-2))
- Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C & Mathis D 2013 Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *Journal of Experimental Medicine* **210** 1153–1165. (<https://doi.org/10.1084/jem.20122248>)
- Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM & Hayakawa Y 2005 NKG2D function protects the host from tumor initiation. *Journal of Experimental Medicine* **202** 583–588. (<https://doi.org/10.1084/jem.20050994>)
- Sucher R, Kurz K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D & Brandacher G 2010 IDO-mediated tryptophan degradation in the pathogenesis of malignant tumor disease. *International Journal of Tryptophan Research* **3** 113–120. (<https://doi.org/10.4137/IJTR.S4157>)
- Sun C, Sun L, Ma H, Peng J, Zhen Y, Duan K, Liu G, Ding W & Zhao Y 2012 The phenotype and functional alterations of macrophages in mice with hyperglycemia for long term. *Journal of Cellular Physiology* **227** 1670–1679. (<https://doi.org/10.1002/jcp.22891>)
- Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z & Zhao J 2015 Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics* **72** 333–338. (<https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>)
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB 2009 Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324** 1029–1033. (<https://doi.org/10.1126/science.1160809>)
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G & Vigneri R 2009 Diabetes and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **16** 1103–1123. (<https://doi.org/10.1677/ERC-09-0087>)
- Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC & Moretta L 2014 Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *European Journal of Immunology* **44** 1582–1592. (<https://doi.org/10.1002/eji.201344272>)



- Waris G & Ahsan H 2006 Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5** 14. (<https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>)
- Wesolowski R, Markowitz J & Carson WE 3rd 2013 Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **1** 10. (<https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-10>)
- Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L & Nave H 2012 Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* **302** E108–E116. (<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00057.2011>)
- Yang WC 2013 Myeloid-derived suppressor cells in autoimmune diabetes: their anti-diabetic potential and mechanism. *Journal of Diabetes and Metabolism* **12** 2. (<https://doi.org/10.4172/2155-6156.S12-004>)
- Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, Yu W, Shen C, Liu J & Ren X 2013 Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Journal of Immunology* **190** 3783–3797. (<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>)

Received in final form 8 February 2018

Accepted 19 February 2018

Accepted Preprint published online 19 February 2018