

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Željko S. Žižak

**ANTITUMORSKI EFEKAT STEROIDNIH
TETRAOKSANA NA MALIGNO
TRANSFORMISANE ĆELIJSKE LINIJE
ČOVEKA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Željko S. Žižak

**ANTITUMOR EFFECT OF STEROIDAL
TETRAOXANES ON MALIGNANTLY
TRANSFORMED HUMAN
CELL LINES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

Prof dr Lidija Radenović, redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Komentor:

dr Zorica Juranić, naučni savetnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Član komisije:

Prof. dr Bogdan Šolaja, akademik, redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

Član komisije:

dr Dejan Opsenica, viši naučni saradnik Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu pod neposrednim rukovodstvom dr Zorice Juranić, u okviru projekta 145006 „Istraživanje dejstava modifikatora biološkog odgovora u fiziološkim i patološkim stanjima,“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorima, Prof. dr Lidiji Radenović i dr Zorici Juranić.

Prof. dr Lidiji Radenović se zahvaljujem na dragocenoj pomoći u svim fazama izrade moje doktorske teze i njenog konačnog oblikovanja. Korisnim sugestijama kao i velikim ličnim angažovanjem Prof. dr Lidija Radenović dala je nemerljiv doprinos mome radu.

Zahvaljujem se dr Zorici Juranić na pružanju mogućnosti da se upoznam sa istraživačkim radom, što mi je prenela deo svog velikog znanja i energije. Naučila me je pravilnom pristupu naučnoistraživačkom radu i eksperimentalnim tehnikama koje su korišćene u ovom radu.

Prof. dr Bogdanu Šolaji i dr Dejanu Opsenici se zahvaljujem na izvanrednoj saradnji i korisnim sugestijama, bitnim za postavku izradu i konačan oblik mog rada.

Mr Branku Drakuliću se takođe zahvaljujem na izvrsnoj saradnji.

Posebno veliku zahvalnost na podršci i prijatnoj atmosferi u kojoj je nastao ovaj rad, dugujem svim zaposlenima u Laboratoriji za modifikatore biološkog odgovora, kao i kolegama na Odeljenju za ekperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

I naravno veliku zahvalnost dugujem laboratorijskoj tehničarki Tanji Petrović, bez čijeg velikog angažmana i pomoći ne bi ni bilo ovog rada.

I na kraju, zahvaljujem se supruzi Irini na podršci koja je bila presudna za završetak ovog rada.

Za Ciu

ANTITUMORSKI EFEKAT STEROIDNIH TETRAOKSANA NA MALIGNO TRANSFORMISANE ĆELIJSKE LINIJEČOVEKA

REZIME

Uvod: Pronalaženje agenasa sa potencijalnim antitumorskim dejstvom je imperativ u modernoj onkologiji. Pri tome se sve više zapaža da određene hemijske strukture imaju specifičnije toksično dejstvo na maligne ćelije. Otkriće artemizinina je označilo početak istraživanja peroksida kao potencijalne zamene za tradicionalne antimalarijske lekove, a iz ovih istraživanja nastala je i strukturno jednostavna klasa peroksida - 1,2,4,5-tetraoksani, za koje je ubrzo pokazano da pored antimalarijskog pokazuju i snažan antiproliferativni efekat. Maligne ćelije imaju poremećaje u regulatornim mehanizmima koji upravljaju ćelijskom proliferacijom i homeostazom. Sposobnost tumorskih ćelijskih populacija da povećaju broj ćelija je određena ne samo intenzitetom ćelijske proliferacije, već i brzinom uklanjanja ćelija. Programirana ćelijska smrt - apoptoza, predstavlja glavni izvor ovog uklanjanja.

Cilj rada je bio da se odredi nivo citotoksičnog dejstva grupe mešovutih tetraoksana prema različitim humanim malignim ćelijama, kao i da se odredi koeficijent selektivnosti u njihovom dejstvu u odnosu na zdrave imunokompetentne ćelije. U cilju dobijanja uvida u mehanizam dejstva ispitivanih jedinjenja određiće se tip ćelijske smrti koju indukuju ispitivani tetraoksani, kao i produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta u HeLa ćelijama. Cilj 3D QSAR studije o antiproliferativnoj aktivnosti trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanska derivata prema HeLa i Fem-x tumorskim ćelijskim linijama, je bio da se utvrdi koje su najvažnije farmakofore steroidnih tetraoksana koje utiču na potenciju ispitivanih jedinjenja prema HeLa i Fem-x tumorskim ćelijskim linijama.

Materijal i metode: Citotoksično dejstvo tetraoksana **DO-122 - DO-124 i DO-126 - DO-128**, prema pet tumorskih ćelijskih linija je ispitivano standardnim MTT testom. U cilju određivanja tipa ćelijske smrti indukovane tretmanom ispitivanim tetraoksanima načinjena je morfološka analiza HeLa ćelija obojenih smešom akridin oranža i etidijum bromida. Analiza određivanja distribucije faza ćelijskog ciklusa HeLa ćelija obojenih propidijum jodidom, urađena je na protočnom citometru. Produkcija intraćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) je merena fluorometrijski pomoću fluorescentne boje 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetata. Zavisnost strukture i funkcije trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanskih derivata prema HeLa i Fem-x ćelijskim linijama pokazana je 3D QSAR studijom.

Rezultati: Ispitivani tetraoksani pokazuju dozno-zavisnu antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim koncentracijama prema ciljnim tumorskim ćelijama, uz dobru selektivnost u aktivnosti prema tumorskim ćelijama, u odnosu na normalne imunokompetentne ćelije. 24-časovni tretman HeLa ćelija sa svim ispitivanim tetraoksanima indukuju tipične morfološke karakteristike kasne apoptoze (kondenzovana i/ili fragmentisana jedra). Posle 24 i 48 časova inkubacije sa tetraoksanima, broj HeLa ćelija u G1 fazi se značajno uvećava. Nakon tretmana HeLa ćelija ispitivanim tetraoksanima, nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta je značajno porastao ukazujući na mogući oksidativni stres. Korišćenjem GRIND metodologije utvrđeno je da su farmakofore kojima se može pripisati najznačajnije dejstvo, amidni NH primarnih ili sekundarnih amida i acetoksi fragmenti na pozicijama 7 i 12 steroidnog jezgra, koji su zajedno sa tetraoksanskim prstenom, zajednički za sva ispitivana jedinjenja.

Zaključci: Ispitivani tetraoksani pokazuju dozno-zavisnu antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim koncentracijama prema ciljnim tumorskim ćelijama. Rezultati pokazuju i da ispitivani tetraoksani indukuju apoptozu i zaustavljaju HeLa ćelije u G1 fazi ćelijskog ciklusa i potentno generišu ROS ukazujući na mogući oksidativni stres. U 3D QSAR studiji utvrđeno je da su farmakofore steroidnih tetraoksana kojima se može pripisati najznačajnije dejstvo, amidni NH primarnih ili sekundarnih amida i acetoksi fragmenti na pozicijama 7 i 12 steroidnog jezgra, koji su zajedno sa tetraoksanskim prstenom, zajednički za sva ispitivana jedinjenja.

Ključne reči: antitumorski lekovi, apoptoza, artemizinin, citotoksičnost, ćelijski ciklus, hemioterapija, peroksidi, reaktivne vrste kiseonika, tetraoksani.

UDK brojevi:

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Citologija

576.385.5(043.3)

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Onkologija

616-006(043.3)

ANTITUMOR EFFECT OF STEROIDAL TETRAOXANES ON MALIGNANTLY TRANSFORMED HUMAN CELL LINES

SUMMARY

Introduction: Finding agents with potential anticancer effect is imperative in modern oncology. It is increasingly noted that certain chemical structures have specific toxic effect on cancer cells. Artemisinin discovery marked the beginning of peroxide research as a potential replacement for traditional antimalarial drugs, and the structurally simple class of peroxides that emerged from these studies was the 1,2,4,5-tetraoxanes, which was soon shown that in addition to antimalarial show strong antiproliferative activity. Malignant cells have a disruption in the regulatory mechanisms that govern cellular proliferation and homeostasis. The ability of tumor cell populations to increase the number of cells is determined not only by the intensity of cell proliferation, but also with rate of the removal of cells. Programmed cell death - apoptosis, is the main source of this removal.

The aim of this study was to determine the level of the cytotoxic effect of six mixed tetraoxanes to various human malignant cells, as well as to determine the coefficient of selectivity in their activity in comparison to healthy immunocompetent cells. In order to gain insight into the mechanism of action of investigated compounds the type of cell death induced by tetraoxanes will be examined, as well as production of reactive oxygen species in HeLa cells. The goal of 3D QSAR studies on antiproliferative activities of thirty three 1,2,4,5-tetraoxane derivatives against HeLa and Fem-x tumor cell lines has been to determine which are most important pharmacophore of steroid tetraoxanes that affect the potency of the compounds against HeLa and Fem x-tumor cell lines.

Material and Methods: The cytotoxic effect of tetraoxanes **DO-122 - DO-124 and DO-126 - DO-128**, against five tumor cell lines were examined with a standard MTT assay. In order to determine the mode of HeLa cell death induced by the investigated compounds, morphological analysis by microscopic examination of acridine orange and ethidium bromide stained cells was performed. Analysis to determine the cell cycle phase distribution of HeLa cells stained with propidium iodide was performed on the flow cytometer. Intracellular production of reactive oxygen species (ROS) was measured using the fluorescent color 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate. The dependence of the structure and function of the thirty-three 1,2,4,5-tetraoxane derivatives against HeLa and Fem-x cell lines was demonstrated with a 3D QSAR study.

Results: The tested tetraoxanes show dose-dependent antiproliferative activity in micromolar concentrations to target tumor cells with good selectivity in activities to tumor cells, compared to normal immunocompetent cells. treatment of HeLa cells for 24-hour with all tested tetraoxanes induce the typical morphological features of late apoptosis (condensed and/or fragmented nuclei). After 24 and 48 hours of incubation with tetraoxanes, the number of HeLa cells in G1 phase was significantly increased. After treatment of HeLa cells with examined tetraoxanes, the level of reactive oxygen species increased significantly indicating a possible oxidative stress. Using GRIND methodology revealed that the pharmacophore which may account for the most significant effect was amide NH of primary or secondary amides and acetoxy fragments at positions 7 and 12 of the steroid nucleus, which together with the tetraoxane ring moiety is common to all compounds.

Conclusions: The tested tetraoxanes show dose-dependent antiproliferative activity in micromolar concentrations to the target tumor cells. The results show that the tested tetraoxanes induce apoptosis in HeLa cells, stop cell cycle in the G1 phase, and potently generate ROS pointing to possible oxidative stress. 3D QSAR study revealed that the pharmacophore of steroid tetraoxanes which may account for the most significant effect is amide NH of primary or secondary amides and acetoxy fragments at positions 7 and 12 of the steroid nucleus, which together with the tetraoxane ring moiety is common to all compounds.

Keywords: anticancer drugs, apoptosis, artemisinin, cytotoxicity, cell cycle, chemotherapy, peroxides, reactive oxygen species, tetraoxanes.

UDC numbers:

Academic expertise: Biology

Field of Academic Expertise: Cytology

576.385.5(043.3)

Academic Expertise: Medicine

Field of Academic Expertise: Oncology

616-006(043.3)

Spisak skraćenica

- 3D QSAR - kvantitativna veza između strukture i aktivnosti
- AIDS - sindrom stečene imunodeficijencije
- ALT - alternativno produžavanje telomera
- AO - akridin oranž
- ATP - adenzin trifosfat
- ATR- ataksia telangiektazija-mutirani gen
- cdk - ciklin-zavisne kinaze
- DDT - dihloro-difenil-trihloroetan
- DEPM-PO - 5, 5-dimetil-1- pirolidin N-oksida
- DHA - dihidroartemizinin
- DNA-PK - DNK zavisna protein kinaza
- DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
- EPR - elektronska paramagnetna rezonanca
- ESI-MS - elektrosprej-jonizaciona masena spektrometrija
- FCS - serum fetalnog govečeta
- FITC - fluorescein izotiocijanat
- GF - faktori rasta
- GRIND - deskriptori, nezavisni od poravnavanja molekula
- H₂DCFDA - 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat
- HE - hematoksilin - eozin
- HT - hemioterapija
- IC₅₀ - inhibitorna koncentracija 50, koncentracija koja snižava preživljavanje ciljnih ćelija na 50 % u odnosu na kontrolni uzorak
- ICE - interleukin-1 β konvertujući enzim
- IR - infracrvena spektroskopija
- LC₅₀ - Letalna koncentracija 50, koncentracija koja ubija 50 % ciljnih ćelija u odnosu na kontrolni uzorak
- LSCM - laserski skenirajući konfokalni mikroskop
- MIF - polja molekularne interakcije
- MPT - tranzicija propustljivosti mitohondrijalne membrane

MS - masena spektrometrija
mTOR - sisarski ciljni molekul rapamicina
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid
NBS - Nil sulfat plavo
NMR - nuklearna magnetna rezonanca
NR - neutral red
PARP - poli adenzin difosfat-riboza polimeraza
PBS - fosfatni pufer
PCA - analiza glavnih komponenti
PDGF - faktor rasta krvnih pločica
PHA - fitohemaglutinin
PI3 - fosfatidilinozitol 3-kinaza
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS - reaktivne vrste kiseonika
RT-PCR - reverzna transkripcija - lančana reakcija polimeraze
TEM - transmisiona elektronska mikroskopija
TGF- α - faktor rast tumora α
TMSOTf - Trimetilsilil trifluorometan sulfonat
VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta
VRS - virtuelno receptorsko mesto

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	MALIGNE BOLESTI - EPIDEMIOLOŠKI PODACI.....	1
1.2	TERAPIJA MALIGNIH BOLESTI.....	2
1.2.1	Hemioterapija.....	2
1.3	ENDOPEROKSIDI U TRETMANU RAZLIČITIH BOLESTI.....	5
1.3.1	Artemizinin i trioksanski endoperoksidi.....	8
1.3.1.1	Istorijat korišćenja artemizininina.....	8
1.3.1.2	Antitumorska aktivnost artemizininina.....	9
1.3.2	Tetraoksani - 1,2,4,5-tetraoksacikloalkani.....	10
1.4	KARAKTERISTIKE MALIGNIH ČELIJA.....	12
1.4.1	Samodovoljnost u signalima rasta.....	14
1.4.2	Neosetljivost na inhibitorne signale rasta.....	14
1.4.3	Izbegavanje apoptoze.....	15
1.4.4	Neograničeni replikatini potencijal.....	15
1.4.5	Održiva angiogeneza.....	17
1.4.6	Invazija tkiva i metastaza.....	17
1.5	ČELIJSKI CIKLUS.....	18
1.5.1	G1-S faza.....	19
1.5.2	p53-posredovana apoptoza.....	21
1.5.3	Anti-apoptozni mehanizmi.....	22
1.5.4	Apoptozne kontrolne tačke.....	23
1.5.5	G2-M faza.....	24
1.5.6	Terapeutski potencijal regulatornih puteva ćelijskog ciklusa.....	25
1.6	MEHANIZMI ČELIJSKE SMRTI.....	27
1.6.1	Apoptoza.....	28
1.6.1.1	Morfološke odlike apoptoze.....	29
1.6.1.2	Razlike između apoptoze i nekroze.....	32
1.6.1.3	Mehanizmi apoptoze.....	33
1.6.1.4	Biohemijske karakteristike apoptoze.....	34
1.6.1.5	Patološka apoptoza.....	35
1.6.2	Testovi za apoptozu.....	37
1.6.2.1	Citomorfološke promene.....	38
1.6.2.2	DNK Fragmentacija.....	39
1.6.2.3	Detekcija kaspaza i njihovih substrata, regulatora i inhibitora....	40
1.6.2.4	Membranske promene.....	41
1.6.2.5	Detekcija apoptoze u kompletnom organu ili organizmu (engl. whole mounts).....	42
1.6.2.6	Mitohondrijalni eseji.....	42
1.6.3	Ostali oblici ćelijske smrti.....	43
1.6.3.1	Senescenca.....	43
1.6.3.2	Mitotička katastrofa (hromozomske aberacije).....	44
1.6.3.3	Autofagija.....	44

2	CILJ RADA	46
3	MATERIJAL I METODE	48
3.1	SINTEZE I STRUKTURE ISPITIVANIH JEDINJENJA	48
3.2	HRANLJIVA PODLOGA (MEDIJUM) I REAGENSI	49
3.3	PRIPREMA ISPITIVANIH SUPSTANCI	49
3.4	ĆELIJSKE LINIJE	49
3.4.1	Tumorske ćelijske linije	49
3.4.2	Priprema mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC)	50
3.5	ODREĐIVANJE INTENZITETA CITOTOKSIČNOG DEJSTVA ISPITIVANIH TETRAOKSANA	50
3.5.1	Citotoksični MTT test za određivanje preživljavanja ćelija u kulturi	51
3.5.2	Tretman tumorskih ćelija (određivanje ćelijskog preživljavanja).....	51
3.5.3	Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi.....	52
3.6	MORFOLOŠKA ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI	52
3.7	ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA NA PROTOČNOM CITOMETRU	53
3.8	ANALIZA DNK FRAGMENTACIJE	54
3.9	ODREĐIVANJE PRODUKCIJE INTRAĆELIJSKIH REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA (ROS)	55
3.10	3D QSAR TEST - ISPITIVANJE RELACIJE IZMEĐU BIOLOŠKE AKTIVNOSTI JEDINJENJA I NJIHOVE STRUKTURE	55
4	REZULTATI	59
4.1	CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ISPITIVANIH TETRAOKSANA PREMA TUMORSKIM ĆELIJAMA I MONONUKLEARNIM ĆELIJAMA PERIFERNE KRVI DOBROVOLJNIH DAVALACA <i>IN</i> <i>VITRO</i>	59
4.2	REZULTATI MORFOLOŠKE ANALIZE ĆELIJSKE SMRTI HELA ĆELIJA I BIOHEMIJSKOG TESTA FRAGMENTACIJE INTERNUKLOZOMALNE DNK	65
4.3	REZULTATI ODREĐIVANJA DISTRIBUCIJE FAZA ĆELIJSKOG CIKLUSA HELA ĆELIJA TRETIRANIH ISPITIVANIM TETRAOKSANIMA	68
4.4	REZULTATI ODREĐIVANJA PRODUKCIJE REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA U HELA ĆELIJAMA	69
4.5	3D QSAR STUDIJA ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI 1,2,4,5- TETRAOKSANA	70
5	DISKUSIJA	73
6	ZAKLJUČCI	85
7	LITERATURA	87
	BIOGRAFIJA	105
	PRILOZI	
	Izjava o autorstvu	
	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
	Izjava o korišćenju	

1 UVOD

Smatra se da je veliki grčki lekar Hipokrat (*Hippocrates* 460-370. pne.), bio prva osoba koja je jasno prepoznala razliku između benignih i malignih tumora. Njegovi spisi obuhvataju opise tumora koji zahvataju različite delove tela. Hipokrat je primetio da krvni sudovi oko malignog tumora izgledaju kao kraci krabe. On je imenovao bolest *karkinos* (grčki naziv za krabu) da bi opisao tumore koji mogu, ali i ne moraju napredovati do stvaranja čireva.

Rak (kancer) je opšti naziv za veliku grupu oboljenja koja mogu zahvatiti bilo koji deo tela čoveka. Ostali termini koji su u upotrebi su maligni tumori i neoplazme. Najvažnija karakteristika raka je brzo stvaranje abnormalnih ćelija koje rastu izvan svojih uobičajenih granica, koje zatim mogu i da izvrše invaziju susednih delova tela i prošire se i na druge organe čoveka. Ovaj proces se naziva metastaziranje. Metastaze su uobičajeni uzrok smrti kao posledice raka.

1.1 MALIGNE BOLESTI - EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Rak je vodeći uzrok smrti širom sveta i odgovoran je za 7,6 miliona smrtnih slučajeva (oko 13 % svih umrlih) u 2008. godini (1). Glavni tipovi raka su: rak pluća (1,37 miliona smrtnih slučajeva), rak želuca (736000 smrtnih slučajeva), rak jetre (695000 smrtnih slučajeva), kolorektalni kancer (608000 smrtnih slučajeva), rak dojke (458000 smrtnih slučajeva), rak grlića materice (275000 smrtnih slučajeva) (1).

Oko 70 % svih smrtnih slučajeva kao posledice raka dogodi se u zemljama sa niskim i srednjim dohotkom. Projektovano je da će broj ljudi umrlih od posledica raka širom sveta nastaviti da raste na preko 13,1 miliona u 2030. godini (1).

1.2 TERAPIJA MALIGNIH BOLESTI

Terapijske procedure za obolele od raka i dalje su u velikoj meri empirijske. Lečenje zavisi od različitih pojedinačnih faktora koji uključuju specifične patološke i molekulske karakteristike raka, njegovu lokaciju, obim bolesti i zdravstveno stanje pacijenta. Krajnji cilj je da se unište sve ćelije raka uz minimalne štetne posledice na zdravom tkivu.

Postoji nekoliko različitih vrsta tretmana, koji mogu da se koriste samostalno ili u kombinaciji, istovremeno ili sekvencijalno: hirurgija, radioterapija i upotreba lekova - hemioterapija (HT). U poslednje vreme imunoterapija zauzima značajno mesto u terapiji pojedinih maligniteta (npr. melanoma). Hirurgija je najčešće prva linija terapije, i za rane stadijume raka, može biti potpuno delotvorna. Radioterapija se najčešće koristi u lokalizovanom okruženju i najčešće je u vezi sa hirurškim procedurama. Upotreba lekova uključuje hemioterapiju, koja obuhvata široku grupu lekova koja ima citotoksične efekte koji prvenstveno, ali ne i isključivo, ciljaju ćelije raka koje se brzo dele.

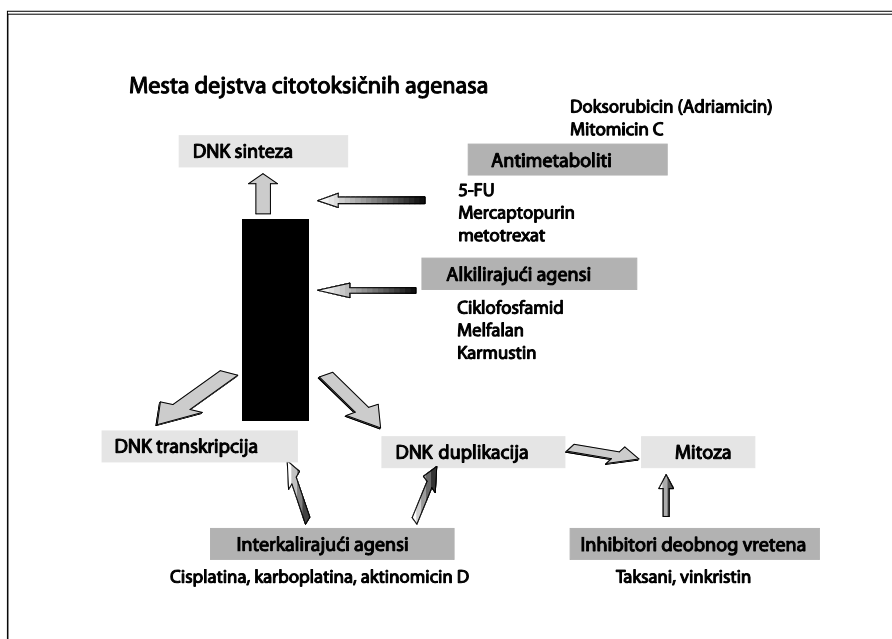
Endokrina terapija je specifičan oblik lečenja, koji se koristi kod raka dojke. Namenjena je za sprečavanje proliferacije ćelija raka, tako što antagonizuje estrogenom stimulisane intraćelijske signale, koji kontrolišu rast ćelija koje prekomerno ekspimiraju receptor za estrogen.

1.2.1 Hemioterapija

Iako se dodatna (engl. *adjuvant*) hemioterapija često koristi i kod primarnih tumora, njena glavna funkcija je da kontroliše diseminovanu bolesti. Preterana aktivnost signalnih puteva koji kontrolišu rast ćelija raka čini ih podložnim širokom spektru lekova koji ciljaju signalne molekule rasta i/ili procese uključene u replikaciju ćelija (slika 1-1). Međutim, kako se ovi procesi odvijaju i u zdravim ćelijama, efekat nije isključiv, što rezultira u neželjenim sporednim efektima ovih agenasa, pre svega prema ćelijama koje se normalno aktivno dele, naročito u koštanoj srži i sluzokoži creva.

Poremećeni događaji u ćelijskom ciklusu, usled mutacija u ćelijama raka, ponekad nude mogućnosti za ciljnu terapiju ovih ćelija bez štetnih uticaja na zdrave ćelije. Relativno širok spektar aktivnosti citotoksičnih lekova ih čini prilično grubim i nespecifičnim oblikom lečenja koji se može tolerisati kraće vreme. Efekti lečenja mogu ponekad izazvati jako izražene nepoželjne sporedne efekte. Ipak, generalno govoreći, pozitivni efekti najčešće nadmašuju nedostatke, te je HT najčešći oblik terapije raka.

Većina hemioterapeutika ubija ćelije raka direktno, ali može i zaustaviti njihovu reprodukciju i metastaziranje inhibirajući metaboličke funkcije ćelija raka. Mnogi od primenjenih HT lekova su proizvodi koji se prirodno javljaju u biljkama, dok su drugi sintetički. Na osnovu mehanizma dejstva i mestu aktivnosti mogu se podeliti u tri glavne grupe: antimetabolite, genotoksične agense i inhibitore mitotičkog deobnog vretena.



Slika 1-1. Mesta dejstva citotoksičnih agenasa

Tako, na primer, antimetaboliti uključuju folatne, pirimidinske i purinske antagoniste (analoge). Odlikuju se niskim molekulskim težinama i imaju slične strukture sa molekulima koji se koriste u sintezi nukleinskih kiselina (DNK i RNK).

Antimetaboliti su slični jedinjenjima neophodnim za normalne biohemijske aktivnosti, ali se u dovoljnoj meri razlikuju, tako da ometaju fiziološku funkciju ćelija. Generalno, antimetaboliti izazvaju smrt ćelija u toku S faze ćelijskog ciklusa, kada su inkorporirani u DNK ili RNK i inhibiraju enzime neophodne za sintezu nukleinskih kiselina. Ovi agensi se koriste za terapiju leukemije, raka dojke, jajnika i gastrointestinalnih maligniteta.

Genotoksični agensi se vezuju direktno za DNK ili je mogu indirektno oštetiti, tako što utiču na enzime uključene u replikaciju, što dovodi do indukcije apoptoze. Stoga su, ćelije raka osetljivije na ove lekove, nego većina zdravih ćelija koje se ređe dele. Ova klasa lekova može se podeliti u nekoliko grupa: alkilirajuće i interkalirajuće agense, inhibitore enzima i inhibitore mitotičkog deobnog vretena.

Alkilirajući agensi vrše alkilovanje nukleinskih baza i na taj način dolazi do promena u strukturi DNK, što dovodi do ometanja replikacije i transkripcije i krajnji ishod je mutacija. Unakrsno povezivanje atoma u DNK, sprečava razdvajanje lanaca neophodnih za replikaciju ili transkripciju, što takođe može uzrokovati oštećenja. Povezivanje neodgovarajućih baza između lanaca je takođe posledica alkilovanja. Primeri ove grupe agenasa su cisplatina, ciklofosfamid, melfalan, mitomicin C i temozolomid.

Interkalirajući agensi se ugrađuju u žlebove DNK spirale i na taj način ometaju polimerazne aktivnosti tokom replikacije/transkripcije. Primeri ove grupe su epirubicin i doksorubicin.

Inhibitori enzima blokiraju replikaciju inhibicijom enzima, kao što je topoizomeraza. Mutagena svojstva ovih lekova čine ih kancerogenim i stoga njihova upotreba podrazumeva dodatni rizik od sekundarne pojave raka, kao što su leukemije. Primeri ovih agenasa su etopozid, topotekan i irinotekan.

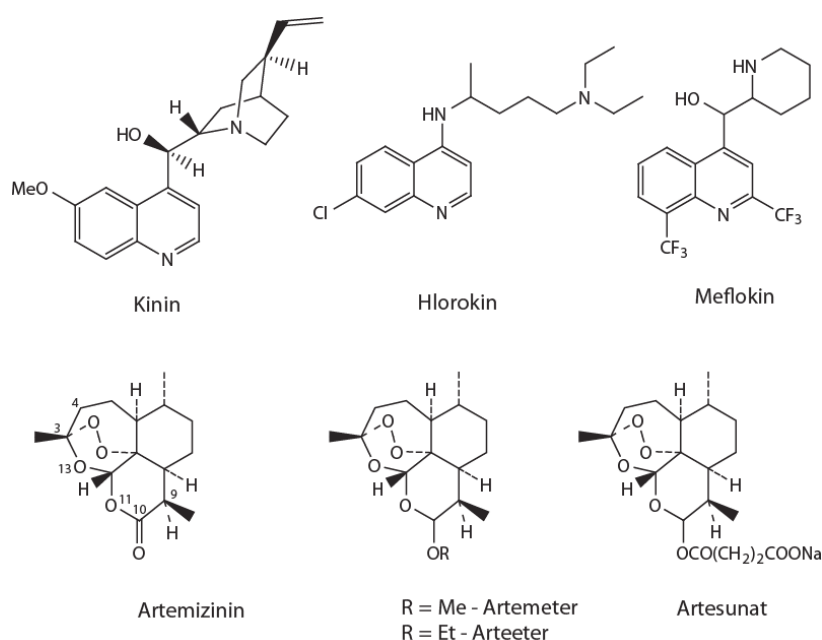
Inhibitori mitotičkog deobnog vretena utiču na mitozu tako što remete formiranje/funkciju mikrotubula deobnog vretena koje su neophodne za pravilno postavljanje i razdvajanje hromozoma tokom mitoze. Sprečavaju polimerizaciju monomera tubulina i deluju u zavisnosti od faze ćelijskog ciklusa. Takođe utiču i na zdrave ćelije, ali u mnogo manjoj meri zbog niže frekvencije ćelijskih deoba. Najčešće

korišćeni lekovi u ovoj kategoriji su poreklom iz biljaka izvedeni vinka alkaloidi i paklitaksel (Taxol[®]) i sintetički docetaksel (Taxotere[®]).

Pored navedenih hemioterapeutskih agenasa, koji se sa manje ili više uspeha koriste u kliničkoj onkologiji, potraga za novim lekovima se i dalje neprestano odvija. Grupa jedinjenja – endoperoksida, koja je pokazala uspešno dejstvo prema potpuno drugačijoj bolesti – malariji, se sada intenzivno proučava u smislu sagledavanja njihovog dejstva prema malignim poremećajima.

1.3 ENDOPEROKSIDI U TRETMANU RAZLIČITIH BOLESTI

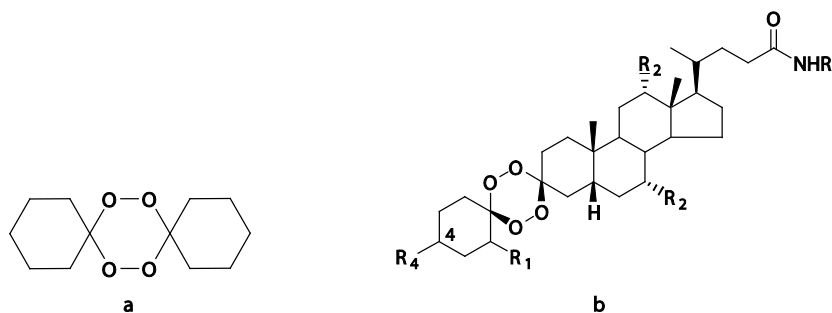
Otkriće artemizininina iz kineske lekovite biljke *Artemisia annua* L. 1971. godine, pokrenuo je novu eru u terapiji malarije. Ovo otkriće predstavljalo je početak istraživanja peroksida kao potencijalne zamene za tradicionalne antimalarijske lekove - hlorokin i meflokin (slika 1-2). Strukturno jednostavna klasa peroksida koja se iznedrila iz ovih studija bili su 1,2,4,5-tetraoksani.



Slika 1-2. Najčešće korišćeni antimalarici

Malarija je tropska zarazna parazitska bolest, koja pogađa 300-500 miliona ljudi širom sveta sa 1-3 miliona smrtnih slučajeva svake godine (2-9). Uzrokovana je infekcijom parazitskom protozomom iz roda *Plasmodium*. Pet vrsta u okviru ovog roda: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* i *P. falciparum* mogu zaraziti ljude; a od ovih *P. falciparum* je najopasniji i zaslužan je za polovinu svih kliničkih slučajeva malarije (10, 11). Malarija izazvana drugim vrstama *Plasmodium*-a ima blaži tok bolesti i nije fatalna. Malarija je uspešno redukovana posle drugog svetskog rata, zbog korišćenja DDT-a i lako dostupnih lekova, kao što su kinin i hlorokin (slika 1-2), ali pojava rezistencije *P. falciparum*-a na lekove koji se najčešće koriste (hlorokin, meflokin - slika 1-2), pa čak i prirodno dostupni kinin, dodatno komplikuje problem. Rezistencija na lekove je toliko rasprostranjena da je najčešće korišćeni hlorokin postao beskorisan u nekim delovima sveta.

U cilju prevazilaženja problema rezistencije bilo je neophodno da se razviju lekovi sa novim mehanizmom dejstva u tretmanu malarije. U tu svrhu 1967. godine kineska vlada je pokrenula istraživački program koji se bavio istraživanjem tradicionalnih lekovitih biljaka (12, 13). Tokom ovog programa, prirodni proizvod pod nazivom artemizinin (slika 1-2) izolovan je iz kineske lekovite biljke *Artemisia annua* L. i ispostavilo se da ovo jedinjenje poseduje snažno antimalarijsko dejstvo prema *P. falciparum*-u (14-16). Međutim, artemizinin je pokazao loše farmakokinetičke karakteristike (17). U cilju dobijanja novih derivata koji bi pokazali bolje farmakokinetičke karakteristike i terapijski prihvatljivije osobine razvijena je grupa polu-sintetičkih derivata artemizinina kao što su artemeter, arteeter, artesunat (slika 1-2) i drugi, koji takođe pokazuju visoku aktivnost i koriste se za lečenje infekcije *P. falciparum*-om. Visoka aktivnost i netoksičnost peroksidnih antimalarika, pokrenula je široko istraživanje razvoja ove grupe jedinjenja kao potencijalne zamene tradicionalnih lekova kao što su hlorokin i meflokin (slika 1-2) (7, 18). Strukturno najjednostavnija klasa peroksida koja se iznedrila iz ove studije bili su tetraoksani (19) (slika 1-3). Tetraoksani (1,2,4,5-tetraoksani) su peroksiacetalni derivati ketona ili aldehida (20). Sadrže dve peroksidne grupe koje formiraju šestočlani heterociklični prsten (6, 21).



Slika 1-3. Tetraoksani: a) jednostavan simetrični tetraoksan, b) primer mešovito steroidalnog tetraoksana

Tradicionalno, tetraoksani su korišćeni u industriji za proizvodnju makrocikličnih ugljovodonika i laktone (22, 23). Vennerstrom sa saradnicima (1992.) je među prvima ispitao biološku aktivnost ove klase jedinjenja i pokazao da su neka od jedinjenja jednako aktivna kao artemizinin (19). Od tada objavljeni su brojni naučni radovi i za nešto više od 250 tetraoksana je određena antimalarijska aktivnost (do 2009. godine) i utvrđeno je da neka od jedinjenja imaju snažnu *in vivo* antimalarijsku aktivnost (24, 25).

Tokom devedesetih godina prošlog veka nekoliko istraživačkih grupa opisuje i citotoksičnu aktivnost artemizininina i njegovih derivata prema tumorskim ćelijama (26-30).

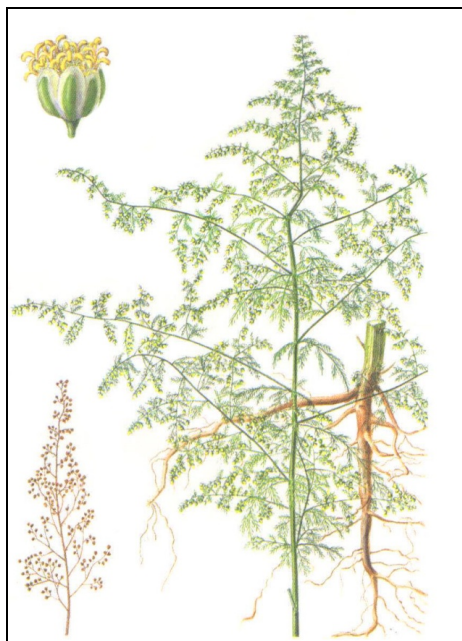
Pronalaženje agenasa sa potencijalnim antitumorskim dejstvom je imperativ u modernoj onkologiji. Pri tome se sve više zapaža da određene hemijske strukture imaju specifičnije toksično dejstvo na maligne ćelije. Zbog toga se takva saznanja koriste u planiranju i organskoj sintezi novih jedinjenja od kojih se očekuje dato dejstvo.

1.3.1 Artemizinin i trioksanski endoperoksidi

1.3.1.1 Istorijat korišćenja artemizininina

Prvi opis kineske lekovite biljke *A. annua* L. (slika 1-4) datira iz 168 godine pre n.e. Biljka se pominje u preporučenim lekovima za 52 bolesti nađenim u jednom grobu (*Mawangdui tomb*) koji pripada vremenu Han dinastije. *Artemisia annua* L. (slika 1-4) pripada familiji *Asteraceae* i predstavlja snažno aromatičan grm visine 50-150 cm. Biljka predstavlja tipičan neofit nizija i brdskih predela Azije i Evrope sa kontinentalnom i subkontinentalnom klimom.

U toku vijetnamskog rata, kineska vlada pokreće istraživanje u cilju pronalaženja antimalarijskog leka u tradicionalnoj kineskoj medicini kao podšku vijetnamskoj armiji. Kao rezultat toga identifikovan je artemisinin (*qinghaosu*, slika 1-2) 1972. godine kao aktivni antimalarijski konstituent *A. annua* L. (12). Danas se artemizinin koristi širom sveta u cilju borbe protiv sojeva *Plasmodium*-a rezistentnih na druge lekove, potom kod cerebralne malarije i malarije kod dece (31).



Slika 1-4. *Artemisia annua* L.

1.3.1.2 Antitumorska aktivnost artemizininina

S obzirom da tumorske ćelije sadrže znatno manje jona gvožđa od eritrocita, ali više od normalnog/zdravog tkiva (32), postavlja se pitanje da li joni gvožđa mogu biti od kritične važnosti za dejstvo artemizininina na tumorske ćelije. Farmakološki efekat artemizininina zasniva se na raskidanju endoperoksidne veze artemizininina, pod dejstvom jona gvožđa(II) poreklom iz hema, Fentonovom reakcijom. Kao proizvodi dobijaju se reaktivne kiseonične vrste, kiseonični radikali (O-radikali) kao što su hidroksi-radikali i superoksidni anjoni, (33, 34). Sve je više podataka koji govore u prilog tome da je oksidativni stres dominantni mehanizam delovanja artesunata na tumorske ćelije (35-37).

Tako recimo ekspresija tioredoksin reduktaze i katalaze značajno korelira sa IC_{50} vrednostima za artesunat (36). WEHI7.2 mišje ćelije (*thymoma*) selektovane zbog rezistencije na vodonik peroksid ili transfektovane genima za tioredodoksin ili katalazu pokazuju rezistenciju na artesunat u poređenju sa parentalnim ćelijskim linijama (36). Ispitivanje ekspresionih profila primenom DNK mikročipa pokazalo je da ekspresija dihidrodiol dehidrogenaze, glutation S-transferaza (GSTM4, GSTT2, GSTZ1) i mikrozomalne glutation S-trasferaze značajno korelira sa rezistencijom na artesunat u ćelijskom panelu NCI-a (*National Cancer Institute*) (37). Ulazak jona gvožđa u ćelije posredovan je vezivanjem kompleksa transferina i jona gvožđa za transferinski receptor (CD71) eksprimiranom na površini ćelijske membrane i potonje endocitoze. Mnoga normalna tkiva su CD71 – negativna, dok je s druge strane CD71 snažno eksprimiran na tumorskim ćelijama kliničkih tumora (38, 39). CCRF-CEM (leukemija) i U373 (astrocitom) ćelije eksprimiraju visok nivo CD71 i preparat gvožđa Ferrosanol [gvožđe(II) glicin sulfat] i transferin povećavaju citotoksičnost artesunata i artemizininina u odnosu na artemizininine primenjene bez jona gvožđa (40). Ovaj efekat se ukida primenom monoklonskog antitela specifičnog za transferinski receptor koje spečava vezivanje kompleksa gvožđa i transferina. Vrednosti IC_{50} za osam artemizinskih derivata u NCI panelu ćelijskih linija korelišu sa ekspresijom iRNK dvanaest gena uključenih u metabolizam i transfer gvožđa u ćelije. S druge strane, artemizinin i njegovi derivati pokazuju nisku citotoksičnost prema zdravim

ćelijama (41-43). Na rast primarnih fibroblasta koncentracije artesunate do 100 μ M praktično nemaju nikakav uticaj.

Osim O-radikala tokom reakcije artemizininina sa jonima gvožđa(II) nastaju i C-radikali (radikali kod kojih je nespareni elektron lokalizovan na ugljeniku) (44-46). Tako artemizinin i njegovi derivati mogu da se ponašaju i kao alkilirajući reagensi i da izvrše alkilovanje velikog broja proteina, pa je prema tome moguće, da je široko nespecifično alkilovanje proteina u tumorskim ćelijama, pre nego specifično alkilovanje ciljnih proteina, uzrok citotoksičnog i citostatskog efekta artemizininina.

Pored toga postavlja se i pitanje da li artemizininini mogu alkilirati i druge nukleofilne molekule u ćeliji, kao što je DNK. U radu Yang-a i saradnika (47) saopšteno je da artemizinin ne alkilira DNK *Plasmodium*-a.

1.3.2 Tetraoksani - 1,2,4,5-tetraoksacikloalkani

Otkriće artemizininina je označilo početak istraživanja peroksida kao potencijalne zamene za tradicionalne antimalarijske lekove, a iz ovih istraživanja nastala je i strukturno jednostavna klasa peroksida - 1,2,4,5-tetraoksani.

Pored toga pokazano je i da steroidni tetraoksani indukuju apoptozu malignih ćelija u kulturi pri mikromolarnim i submikromolarnim koncentracijama, što je utvrđeno posmatranjem morfoloških promena tretiranih ćelija. Pored toga mnogi testirani tetraoksani pokazuju visoku selektivnost kada je njihova toksičnost prema normalnim zdravim ćelijama poređena sa aktivnošću prema tumorskim ćelijama (48-50).

Kao što je navedeno u prethodnom delu, 3,6-substituisani derivati 1,2,4,5-tetraoksacikloheksana (1,2,4,5-tetraoksani) poznati su već dugi niz godina i korišćeni su u različite svrhe (51-56). Lako se dobijaju kiselo-katalizovanom reakcijom peroksiacetalizacije karbonilnih jedinjenja vodonik-peroksidom ili pomoću bis-trimetilsililperoksida u prisustvu TMSOTf (48, 57, 58). Otkriće da 3,6-amfidicikloheksilidenski tetraoksani poseduju snažnu antimalarijsku aktivnost otvorilo je nove mogućnosti u borbi protiv ove pošasti i drevnog i savremenog sveta (59).

Nakon prvih radova u kojima su opisani mešoviti tetraoksani (49, 60), ova jedinjenja su stekla značajnu pažnju (61). Od tada, razvijene su i neke nove procedure za njihovu sintezu (24, 62) ili sintezu gem dihidroperoksida kao ključnog prekursora (63-67) sa ciljem poboljšanja prinosa tetraoksanskih jedinjenja.

Nova grupa mešovitih dicikloheksilidenskih tetraoksana, koji sadrže polarnu neutralnu ili baznu grupu, pokazala je izrazitu aktivnost prema hlorokin senzitivnim i rezistentnim sojevima *P. falciparum*-a (68-70). Pored toga, detaljno ispitivanje reaktivnosti mešovitih tetraoksana u baznim i kiselim uslovima pokazalo je izuzetnu hemijsku stabilnost tetraoksanske farmakofore što je omogućilo i sintezu velikog broja derivata (70).

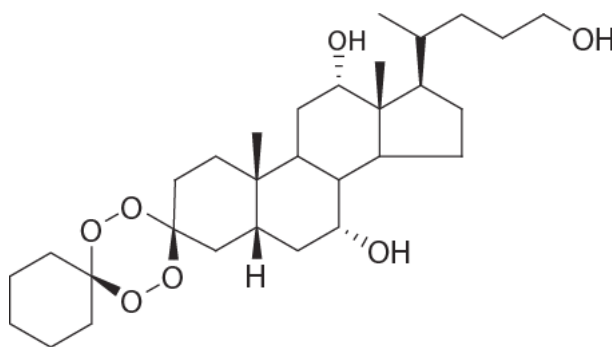
Prvi opisani steroidni tetraoksani bili su derivati holestana (58). Rezultati su pokazali da i složeni molekuli kao što su steroidi mogu biti dobri nosači tetraoksanske farmakofore. Zamenom holestanskog dela strukture derivatima holne kiseline značajno je poboljšana antimalarijska aktivnost (48, 71).

Molekuli nosači intenzivno se koriste u medicinskoj hemiji za povećanje efikasnosti lekova. Šolaja je sa saradnicima dizajnirao tetraoksane sa holnom kiselinom kao nosačem u cilju poboljšanja rastvorljivosti u fiziološkim uslovima (48). Pored toga i propustljivost ćelijske membrane za ova jedinjenja može biti povećana zbog njihovog amfifilnog karaktera (58).

Zamena jednog steroida jednostavnijim alkilidenskim ostatkom omogućila je sintezu druge generacije steroidnih tetraoksana baziranih na derivatima holne kiseline. Steroidni i drugi tetraoksani izvedeni iz cikličnih ketona su imali ograničenje za dalju funkcionalizaciju s obzirom da su samo C3 i C6 pozicije bile slobodne za hemijske modifikacije. Imajući ovo ograničenje u vidu, Šolaja i sar. dizajniraju asimetrične tetraoksane koji sa jedne strane molekula sadrže steroid i jednostavan cikloalkan na suprotnoj strani (49). Ovaj pristup smanjuje molekulsku masu jedinjenja i u isto vreme čuva efikasnost steroidnog nosača. Neki od mešovitih steroidnih tetraoksana pokazali su impresivnu *in vitro* i *in vivo* antimalarijsku aktivnost (72).

U daljem radu na steroidnim tetraoksanima (70) otkriveno je da su zaštićene hidroksilne grupe na C(7) i C(12) holne kiseline od suštinske važnosti za dobru antimalarijsku aktivnost, dok slobodna OH na C(24) ima malu ulogu u antimalarijskoj

aktivnosti. Iznenadujuće, za najpolarnije jedinjenje iz ove serije utvrđeno je da je efikasan antiproliferativni agens protiv širokog spektra ćelijskih linija. Triol sa slike 1-5, potpuno sprečava rast raka na nanomolarnom nivou, sa prosečnom koncentracijom od 0,40 μM (70). Dalje, ovo jedinjenje pokazalo je veoma visoku i selektivnu toksičnost protiv melanoma (LOX IMVI, LC_{50} (*Lethal Concentration*) = 60 nM) i raka jajnika (IGROV1, LC_{50} = 60 nM) (70).



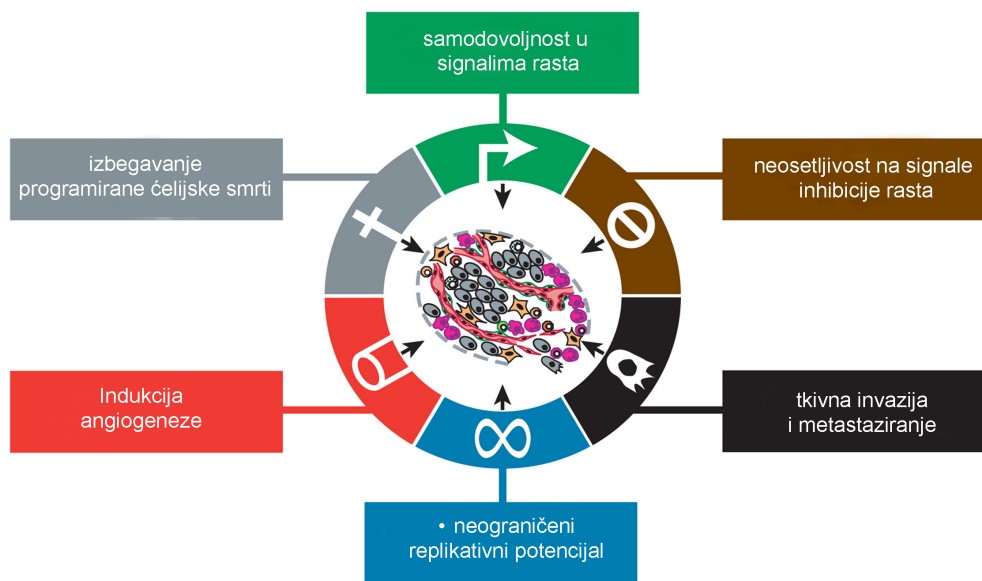
Slika 1-5. Mešoviti steroidni tetraoksan koji pokazuje snažnu antitumorsku *in vitro* aktivnost (70)

1.4 KARAKTERISTIKE MALIGNIH ĆELIJA

Maligne ćelije imaju poremećaje u regulatornim mehanizmima koji upravljaju ćelijskom proliferacijom i homeostazom. Postoji više od 100 različitih vrsta malignih bolesti i brojni podtipovi tumora se mogu naći unutar specifičnih organa. Ovakva složenost podstiče niz pitanja. Koliko različitih regulatornih mehanizama unutar svakog tipa ciljnih ćelija mora biti poremećeno da bi takve ćelije postale kancerogene? Da li isti skup ćelijskih regulatornih mehanizama trpi poremećaje u ćelijama različitih neoplazmi nastalih u ljudskom telu? Koji od ovih mehanizama rade na autonomnoj osnovi, a koji su spregnuti sa signalima koje ćelije dobijaju iz njihove okoline unutar tkiva? Može li velika i raznolika kolekcija sa rakom udruženih gena da bude povezana sa malom grupom regulatornih mehanizama?

Hanahan i Weinberg (73) su predložili da je ogromna većina genotipova malignih ćelija manifestacija šest esencijalnih promena u fiziologiji ćelija koje zajedno diktiraju maligni rast (slika 1-6):

- samodovoljnost u signalima rasta
- neosetljivost na signale inhibicije rasta
- izbegavanje programirane ćelijske smrti (apoptoze)
- neograničeni replikativni potencijal
- indukcija angiogeneze
- tkivna invazija (širenje na okolna tkiva) i metastaziranje.



Slika 1-6. Stečene osobenosti malignih tumora (Iz Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Cell, 2011. 144;646-674.)

Svaka od ovih fizioloških promena, odnosno novih sposobnosti stečenih tokom razvoja tumora, predstavlja uspešno narušavanje jednog antitumorskog odbrambenog mehanizma „ukorenjenog“ u ćelije i tkiva. Hanahan i Weinberg su predložili da ovih šest sposobnosti poseduje većina, a možda i svi vidovi malignih tumora čoveka. To mnoštvo odbrambenih mehanizama može objasniti zašto se rak relativno retko pojavljuje u toku prosečnog ljudskog života.

1.4.1 Samodovoljnost u signalima rasta

Zdrave ćelije zahtevaju mitogene signale rasta (engl. *growth signals* - GS) pre nego što se pokrenu iz stanja mirovanja u aktivnu proliferaciju. Ovi signali se prenose u ćeliju transmembranskim receptorima koji vezuju karakteristične klase signalnih molekula: faktore rasta, komponente ekstraćelijskog matriksa, kao i molekule koji učestvuju u adheziji i interakciji ćelija. Prema današnjim saznanjima, nijedan tip zdravih ćelija se ne umnožava u odsustvu takvih stimulatornih signala. Mnogi onkogeni imitiraju signale neophodne za rast fiziološki normalnih ćelija. Tumorske ćelije proizvode mnoge signalne molekule rasta, čime se smanjuje njihova zavisnost od stimulacije od okolnog zdravog tkiva.

Stečena autonomija je bila prva od šest sposobnosti malignih ćelija koja je jasno definisana od strane istraživača raka, u velikoj meri i zbog rasprostranjenosti dominantnih onkogenih faktora rasta (GFs) za koje je pronađeno da je modulišu. Dok većinu mitogenih faktora rasta (GFs) proizvodi jedan tip ćelija u cilju podsticanja proliferacije drugih ćelija, mnoge ćelije raka stiču sposobnost da sintetišu faktore rasta na koje same odgovaraju, stvaranjem pozitivne povratne sprege, a takvu signalizaciju često nazivamo autokrina stimulacija (74). Proizvodnja PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) glioblastoma i TGF- α (engl. *tumor growth factor α*) sarkoma, su dva ilustrativna primera (74).

1.4.2 Neosetljivost na inhibitorne signale rasta

Unutar zdravog tkiva, brojni antiproliferativni signali deluju u cilju održavanja ćelijskog mirovanja i tkivne homeostaze; ovi signali uključuju i rastvorljive inhibitore rasta i imobilisane inhibitore ugrađene u ekstraćelijski matriks na površini okolnih ćelija. Ovi inhibitorni signali rasta, kao i prethodno pomenuti aktivacioni signali rasta se primaju preko površinskih transmembranskih receptora koji su povezani sa intraćelijskim signalnim mehanizmima.

Maligne ćelije moraju izbeći antiproliferativne signale, kako bi ostvarile rast. Veći deo signalnih puteva koji omogućavaju zdravim ćelijama da odgovore na inhibitorne signale rasta je povezan sa časovnikom ćelijskog ciklusa, a posebno

komponente koje regulišu tranziciju ćelije kroz G1 fazu ciklusa. Ćelije prate spoljnu sredinu tokom ovog perioda i na osnovu određenih signala, odlučuju da li da se umnožavaju, prestanu da se dele ili da uđu u postmitotičko stanje. Na molekularnom nivou, mnogi, a možda i svi antiproliferativni signali se prenose preko Retinoblastoma proteina (pRb) i dva srodna proteina - p107 i p130. Kada je u hipofosforilisanom stanju, pRb blokira proliferaciju vezivanjem i menjanjem funkcije E2F transkripcionih faktora koji kontrolišu ekspresiju gena neophodnih za napredovanje iz G1 u S fazu (75).

Poremećaj pRb puta oslobađa E2F i time omogućava ćelijsku proliferaciju, čineći ćelije neosetljivim na inhibitorne faktore koji normalno deluju blokiranjem napredovanja kroz G1 fazu ćelijskog ciklusa. Efekti solubilnog signalnog molekula TGFβ su najbolje dokumentovani (76-78). TGFβ deluje sprečavanjem fosforilacije koja deaktivira pRb; na taj način, TGFβ blokira napredak kroz G1 fazu. TGFβ suprimira ekspresiju *c-myc* gena, koji reguliše G1 fazu ćelijskog ciklusa (76). Još direktnije, TGFβ podstiče sintezu p15^{INK4B} i p21 proteina, koji blokiraju ciklin:CDK komplekse odgovorne za fosforilaciju pRb (77, 78).

1.4.3 Izbegavanje apoptoze

Sposobnost tumorskih ćelijskih populacija da povećaju broj ćelija je određena ne samo intenzitetom ćelijske proliferacije, već i brzinom uklanjanja ćelija. Programirana ćelijska smrt - apoptoza, predstavlja glavni izvor ovog uklanjanja. Dokazi potiču, uglavnom iz studija na mišjim model sistemima i kulturama ćelija, kao i iz deskriptivne analize biopsija različitih stadijuma humanih karcinoma, iz kojih je jasno da je izbegavanje apoptoze osnovna karakteristika malignih ćelija.

1.4.4 Neograničeni replikatini potencijal

Mnoge vrste ćelija sisara nose unutrašnji ćelijski autonomni program koji ograničava njihovo umnožavanje. Čini se da ovaj program radi nezavisno od signalnih

molekula koji se prenose od ćelije do ćelije. Taj program takođe mora biti prekinut da bi se klonovi ćelija mogli umnožiti i obrazovati makroskopski tumor koji ugrožava život.

Hayflick je u svom ranom radu pokazao da ćelije u kulturi imaju konačan replikativni potencijal (79). Kada jedna ćelijska populacija dostigne određeni broj deoba, ćelije prestaju da rastu - i ulaze u stanje koje je nazvano senescenca. Senescenca se u kulturama humanih fibroblasta može prevazići onesposobljavanjem pRb i p53 supresor proteina, što ovim ćelijama omogućava da nastave sa umnožavanjem još nekoliko dodatnih generacija dok ne uđu u drugo stanje koje nazivamo krizom. Stanje krize se karakteriše masivnom ćelijskom smrću, kariotipskim poremećajima u vezi sa *end-to-end* fuzijom hromozoma, a povremeno se pojave i varijante (1 u 10^7) ćelija koje su stekle sposobnost da se umnožavaju bez ograničenja - osobina koju nazivamo imortalizacija (80).

Mehanizam za „brojanje“ ćelijskih generacija je otkriven pre dve decenije: to su krajevi hromozoma, telomere, koje se sastoje od nekoliko hiljada ponovaka kratkog elementa od 6 bp. Replikativna generacija se karakteriše gubitkom 50-100 bp telomerne DNK sa krajeva svakog hromozoma tokom ćelijskog ciklusa. Ova progresivna skraćanja se pripisuju nemogućnosti da DNK polimeraza potpuno replikuje 3' krajeve hromozomske DNK tokom S faze. Erozijska telomera putem sukcesivnih ciklusa replikacije na kraju dovodi do gubljenja njihove sposobnosti da štite krajeve hromozomske DNK. Nezaštićeni hromozomski krajevi dovode do *end-to-end* hromozomskih fuzija, stvarajući kariotipske poremećaje povezane sa stanjem krize i rezultiraju, skoro neminovno, u smrti ćelije (81).

Održavanje telomera je evidentno u gotovo svim vrstama malignih ćelija (82); 85-90 % tih ćelija povećava ekspresiju enzima telomeraze, koji dodaje heksanukleotidne ponovke na krajevima telomerne DNK (83), dok preostalih 10-15% ćelija aktivira mehanizam, pod nazivom ALT (engl. *alternative lengthening of telomeres*), za koji se predpostavlja da održava telomere putem rekombinacija zasnovanih na interhromozomalnoj rekombinaciji sekvenci (84). Jednim ili drugim mehanizmom, dužina telomera se održava iznad kritične granice, a to zauzvrat omogućava neograničeno umnožavanje ćelija.

1.4.5 Održiva angiogeneza

Kiseonik i hranljive materije dobijene od strane krvnih sudova ključne su za ćelijske funkcije i opstanak. U toku organogeneze, bliskost ćelija i kapilara je obezbeđena koordiniranim rastom krvnih sudova i parenhima. Kada se formira tkivo, rast novih krvnih sudova - proces angiogeneze je pažljivo regulisan. Zbog zavisnosti od obližnjih kapilara, čini se verovatnim da sve brojnije proliferišuće ćelije unutar tkiva imaju unutrašnju sposobnost da podstaknu rast krvnih sudova. Međutim, dokazi govore suprotno. Ćelije sa aberantnim proliferativnim lezijama u početku nemaju angiogenu sposobnost, što smanjuje njihove sposobnosti za rast. Da bi se napredovalo u većoj veličini, početna neoplazija mora da razvije angiogenu sposobnost (85-87).

Eksperimentalni dokazi za značaj indukcije i održavanje angiogeneze u tumorima veoma su obimni i ubedljivi (85-87). Priča započinje pre skoro 30 godina sa Folkman-om i saradnicima, koji su koristili *in vivo* bioeseje kojima su pokazali neophodnost angiogeneze za eksplozivan rast tumorskih eksplantata (86). Molekularni dokaz principa je nađen, kada je za antitela na VEGF dokazano da su u stanju da spreče neovaskulizaciju i rast potkožnih tumora kod miševa (88). Ovaj rezultat je motivisao razvoj specifičnih VEGF/VEGF-R inhibitora koji su sada u kasnoj fazi kliničkih ispitivanja.

1.4.6 Invazija tkiva i metastaza

Pre ili kasnije u toku razvoja većine tipova raka, primarne tumorske mase otpuštaju specifične ćelije koje vrlo složenim mehanizmima odlaze dalje, napadaju susedna tkiva, a odatle putuju na udaljena mesta gde mogu osnovati novu koloniju. Ove udaljene kolonije tumorskih ćelija - metastaze, su uzrok 90 % smrtnih slučajeva kod raka ljudi (89). Sposobnost malignih ćelija za invaziju i metastazu omogućava im da kolonizuju novi teren u telu pacijenta, gde bar u početku, hranljive materije i prostor nisu ograničeni. Novoformirane metastaze nastaju kao amalgam malignih i potpornih normalnih ćelija regrutovanih iz tkiva domaćina. Kao i kod formiranja primarne tumorske mase, uspešna invazija i metastaza zavise od svih ostalih pet sposobnosti malignih ćelija.

1.5 ĆELIJSKI CIKLUS

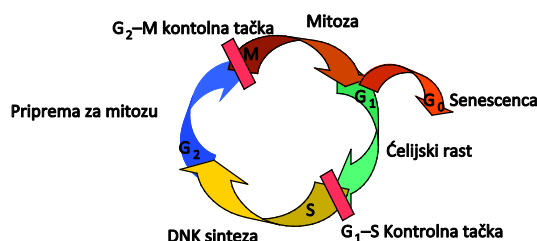
Ćelijski ciklus je složeni sled događaja koji omogućava ćelijama da rastu i da se umnožavaju. Dva genska tipa koja igraju glavnu ulogu u ćelijskom ciklusu, a samim tim i u razvoju raka, su onkogeni (npr. HER2/neu, Ras, c-Myc, itd) i tumor supresorski geni (npr. p53 i Rb) (90).

Podsticaj rasta započinje oslobađanjem faktora rasta iz ćelije. Ovi faktori se vezuju za receptore na ćelijskoj membrani. Signali se zatim prenose kroz membranu do citoplazmatskih proteina, koji signaliziraju oslobađanje transkripcionih faktora unutar jedra. Ovakav redosled događaja prosto gura ćeliju kroz ćelijski ciklus (91).

Časovnik ćelijskog ciklusa upravlja sudbinom ćelije i predstavljen je mehanizmom koji tumači regulatorne signale rasta, odlučujući da li se ciklus nastavlja ili zaustavlja. Ćelije koje su predodređene za replikaciju, prelaze iz G1 faze ciklusa, u S fazu (sinteza DNK). S fazu sledi G2 faza, gde se ćelije pripremaju za duplikaciju u M fazi (slika 1-7) (90).

Kontrolne tačke događaja tokom ćelijskog ciklusa, su pod kontrolom ciklin-zavisnih kinaza (cdk), koje se eksprimiraju kako ćelija prolazi od G1 preko S do G2 i do M faze (90, 92). Cdk su sačinjeni od ciklina (strukturni proteini) i kinaze (enzim). Cdk2, cdk4 i cdc2 (engl. *cell division cycle 2*) su eksprimirani kod sisara, zajedno sa ciklinima D, E, A i B (90). Cdk aktivnost proveravaju inhibitorni proteini ćelijskog ciklusa - cdk inhibitori (cki). Dve različite cki familije su ink4 koja uključuje P15, P16, P18, P19 (inhibira cdk4 i 6), i Cip/Kip familija koja uključuje P21, P27, P57 (inhibira cdk-ciklin kompleks) (93).

Proteini koji vrše kontrolu u G1-S fazi su se pokazali kao neaktivni u većini maligniteta, dok su izmene G2-M kontrolnih tačaka manje česte (94).



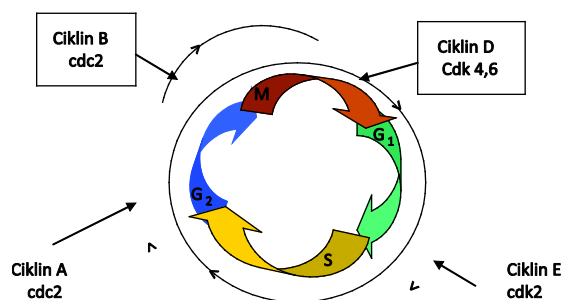
Slika 1-7. Ćeljski ciklus. Ćelija sledi niz događaja, koji su regulisani spoljnim i unutrašnjim faktorima. Kontrolne tačke ćeljskog ciklusa regulišu složenu mrežu interakcija koje određuju rast ćelija, senescencu ili apoptozu.

1.5.1 G₁-S faza

Nakon mitoze, kćerka ćelija ulazi u G₁ fazu i kroz kompletan ciklus može da prođe ponovo. Tokom ove faze dolazi do stimulacije ćelija i rasta, ili se ćelija može privremeno zaustaviti (G₀ faza). Kada prođe restrikcionu tačku, (retinoblastoma gen - Rb) u kasnoj G₁ fazi, ćelija će ući u S fazu u kojoj se događa sinteza DNK. Ova faza bi trebalo da bude završena što pre, jer je DNK veoma osetljiva na oštećenja tokom ove faze, kada su baze izložene i DNK lanci raspleteni (95).

Stimulatorne signale rasta ćelije primaju u ranoj G₁ fazi, u vidu povećanja nivoa ciklina D, a zatim kroz povećanje nivoa ciklina E u kasnijoj fazi (slika 1-8) (90, 91, 95). Nivo ciklina D se povećava u odgovoru na Ras-zavisnu kinaznu kaskadu (96).

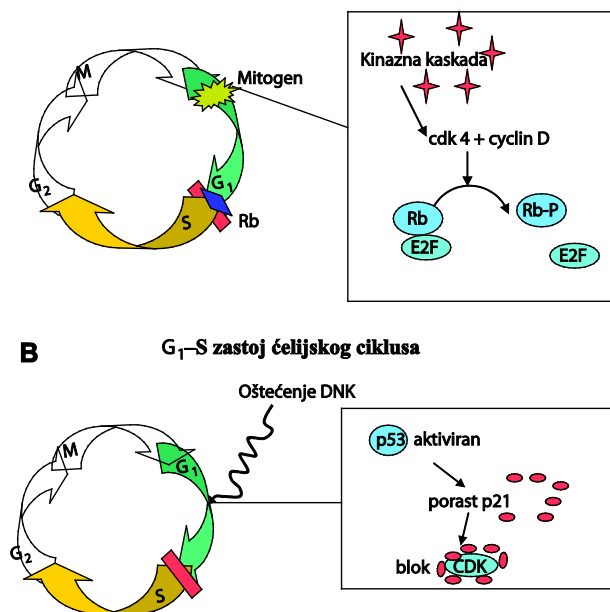
Na drugoj strani, negativna kontrola rasta je regulisana restrikcionom tačkom u G₁ fazi koja određuje napredovanje ćeljskog ciklusa. Ova restrikciona tačka je inhibicioni faktor rasta Rb, koji deluje kao prekidač, određujući da li ćelija ulazi u S fazu (90, 91). Do ovog trenutka, ćelija može da načini kompletan ćeljski ciklus, ili da se zaustavi u rastu (97). Međutim, ćelija koja pređe restrikcionu tačku i uđe u kasnu G₁ fazu neopozivo nastavlja putem kojim će proći ceo ćeljski ciklus. Napredovanje kroz ćeljski ciklus je određeno fosforilacijom Rb proteina, koji pokreće cdk (96). U hipofosforilisanom stanju, Rb vezuje i inhibira transkripcioni faktor E2F. Cdk se kombinuje sa ciklinima, i formira se kompleks ciklin-cdk koji fosforiliše Rb protein (slika 1-9) (91, 97). Fosforilisani Rb protein oslobađa vezani E2F koji aktivira transkripciju gena potrebnih za ulazak u S fazu (95, 96, 98, 99).



Slika 1-8. Status ciklina i CDK tokom ćelijskog ciklusa. Nivo ciklina D raste na početku G₁ faze i ostaje konstantan u daljem toku ciklusa. Ovo je praćeno porastom ciklina E u kasnoj G₁-S fazi, ciklina A u ranoj S-G₂ fazi i ciklina B u G₂-M fazi.

Gore opisani mehanizam prekida se kada je ćelija oštećena, npr. posle izlaganja radijaciji (100). Poremećeni lanac događaja rezultira u poremećenom ćelijskom ciklusu. Delecije gena, overekspresija ili tačkaste mutacije određuje proliferativno stanje ćelije. Tačkaste mutacije ili delecije mogu se naći u velikom broju malignih ćelija (94).

Protein p53 je ubikvitarni transkripcioni faktor (101), koji obavlja zaštitnu ulogu tako što detektuje oštećenja DNK (95, 98). Nivo p53 se povećava kao odgovor na oštećenje DNK što zaustavlja ćeliju u G₁ fazi kako bi se omogućila reparacija DNK (102, 103). Još uvek nije razjašnjeno kako se detektuju oštećenja. Ono što znamo je da oštećenja DNK mogu dovesti do ćelijske smrti, zaustavljanja rasta ili popravke DNK, ali ne i ono što određuje kojem će procesu podleći oštećena ćelija.



Slika 1-9. Progresija ćelijskog ciklusa. (A) Ćelije primaju stimulatorne mitogene signale u ranoj G₁ fazi koji rezultiraju u Ras zavisnoj kinaznoj kaskadi. Raste nivo ciklina D koji ulazi u kompleks sa cdk4. Ciklin-cdk kompleks fosforiliše retinoblastoma (Rb) protein, koji oslobađa vezani transkripcioni faktor (E2F). Ovo aktivira transkripcione gene potrebne za ulazak ćelije u S fazu. (B) Nivo p53 se povećava kao odgovor na oštećenje DNK. Aktivirani p53 povećava i transkripciju cdk inhibitora p21. Inhibicija cdk ekspresije dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa.

1.5.2 p53-posredovana apoptoza

Geni p53 i Bcl-2 igraju ključnu ulogu u apoptozi (104). Pod fiziološkim uslovima, funkcionalni p53 reguliše složenu mrežu interakcija koje određuju sudbinu ćelije. Nuklearni fosfoprotein c-Myc, aktivira p53 (93), koji pokreće apoptozu indukujući transkripciju gena koji regulišu programiranu ćelijsku smrt (96). Pokazano je da c-Myc igra ključnu ulogu u apoptozi, uključujući p53 zavisne i nezavisne puteve (97, 98). c-Myc nije u vezi samo sa ekspresijom Fas liganda i Fas receptora, već se smatra da reguliše i transkripciju bax koji indukuje oslobađanje citohroma *c* (97). Međutim, u odsustvu funkcionalnog p53, oštećene ćelije mogu nastaviti ciklus i doći do mitoze, akumulirajući mutacije, koje neće biti kontrolisane na kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa (105, 106). Alternativni mehanizam za koji je pokazano da premošćava regulatornu aktivnost p53 jeste preko Mdm2, negativnog regulatora p53.

Genska amplifikacija Mdm2 nađena je kod leukemija, limfoma, sarkoma, glioma i raka dojke, što ukazuje na zaobilaznje p53-posredovane kontrole rasta (93). Apoptoza je fiziološki, visoko organizovan proces koji omogućava uništenje oštećenih ćelija, koje potencijalno mogu biti štetne za organizam (93, 94, 102, 103, 107, 108). Disfunkcija mehanizama unutar apoptoznog puta, omogućava razvoj malignih promena na dva nivoa. U prvom, mutacije regulatornih gena apoptoznog puta, omogućiće preživljavanje mutiranim ćelijama, koje bi normalno bile eliminisane apoptozom (102, 109). Na drugom nivou, proliferišućim ćelijama koje su stekle otpornost na apoptozu (Darvinovom selekcijom malignih ćelija nepovoljnim unutrašnjim uslovima), takođe je omogućeno preživljavanje (109).

1.5.3 Anti-apoptozni mehanizmi

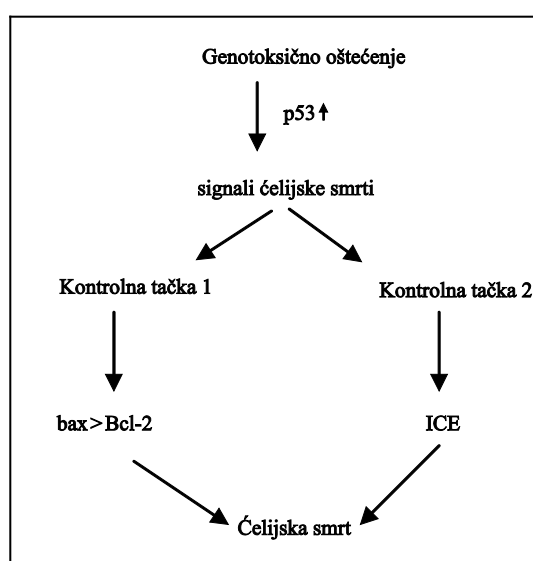
Gen Bcl-2 funkcioniše kao glavni inhibitor ćelijske smrti (95, 105, 110). Ostali članovi ove porodice koji uključuju Bcl-xL, mcl i bag-1, takođe deluju kao inhibitori ćelijske smrti, dok su bad, bax i bik promotori apoptoze (110). Tumor promotori deluju kao faktori preživljavanja, sprečavajući apoptozu, i tako povećavaju proporciju oštećenih ćelija koje će preživeti (106). Gen c-Myc promoviše rast ćelija suprimirajući GADD45 i cki gene p15, p21 i p27 (91, 93). U odsustvu faktora preživljavanja, onkogeni c-Myc takođe promoviše smrt ćelije, vodeći ćelije u apoptozu (105, 111). Bcl-2 funkcioniše tako što skreće signal c-Myc, što dovodi do ćelijske proliferacije (92, 111, 112).

Bcl-2, koji se nalazi na spoljašnjem membrani mitohondrija, blokira oslobađanje citohroma *c* iz mitohondrija (109, 113), koji aktivira kaspaze (96, 110). Stoga je moguće da je nivo ekspresije Bcl-2 odlučujući faktor u apoptoznom putu i da ćelije koje prekomerno ekspimiraju Bcl-2 mogu izbeći smrt (97), mada je takođe pokazano i da veoma visoke koncentracije Bcl-2 promovišu smrt ćelije (91). Transkripcioni faktor NF-κB povećava nivo ekspresije Bcl-2 familije proteina. Protein Bcl-2 takođe reguliše i anti apoptoznu aktivnost Ras, membranski lokalizovanog G proteina (93).

Još jedan regulacioni mehanizam proteina Bcl-2 je blokiranje apoptoze inhibicijom aktivnosti drugih regulatora rasta, kao što je bax (95, 110). Odnos aktivnosti bax i Bcl-2 može odrediti da li će doći do apoptoze (95, 100).

1.5.4 Apoptozne kontrolne tačke

Dakle, za odvijanje apoptoze, nivo bax mora prevazići nivo Bcl-2 (95, 107). Ovaj mehanizam je u daljem tekstu označen kao kontrolna tačka 1 apoptoze (slika 1-10) (95). Pored toga, nizak nivo Bcl-2 u prisustvu *wild type* p53, takođe će dovesti do apoptoze (106). U obrnutom slučaju, kod prekomerne ekspresije Bcl-2 sa nedostatkom p53, doći će do visoke stope mutacija, s obzirom da je aktivirana i ćelijska proliferacija (95, 114).



Slika 1-10. Apoptozne kontrolne tačke

Bcl-xL, veliki protein Bcl-2 familije, ponaša se na sličan način kao Bcl-2 (94, 108), a manji proteini, Bcl-XS, i Bak, suprimiraju aktivnost Bcl-2, čineći tako ćelije osjetljivim na apoptozu (105, 115).

Druga kontrolna tačka u apoptoznom putu (slika 1-10) je slabo definisana, ali uključuje interleukin-1 β konvertujući enzim (ICE), koji interaguje sa enzimima mehanizama za popravku DNK (95).

PARP (*Poly adenosine diphosphate-ribose*) polimeraza funkcioniše prepoznavanjem prekida u molekulu DNK i primarno je uključena u popravku DNK. Ako je PARP inaktivirana od strane ICE, apoptoza će biti pokrenuta, s obzirom da će fragmentacija DNK postati ireverzibilna (105).

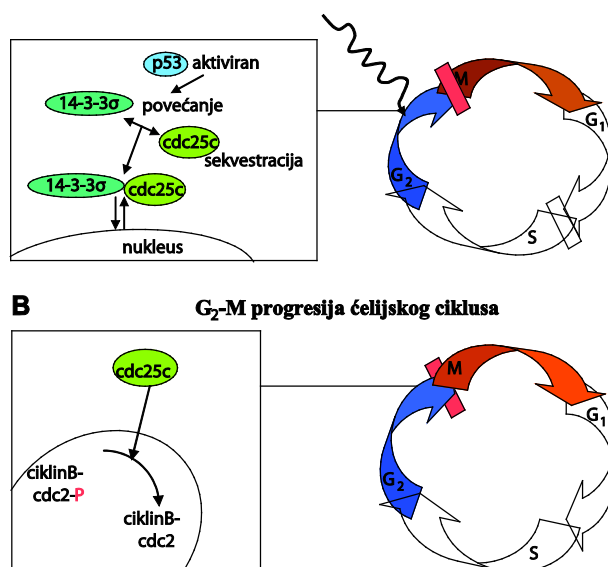
1.5.5 G2-M faza

Nekoliko reorganizacionih procesa u ćelijskoj sintezi dogodiće se tokom G2 faze, uključujući i regulisanje nesparenih oštećenja DNK. Svi ovi procesi se prate na G2 kontrolnim tačkama. Kontrolne tačke u G2 fazi zahtevaju ciklin-cdk-cki sistem za eliminaciju oštećenih ćelija koje su prošle kroz G1 fazu (95). Ovaj kontrolni mehanizam sprečava razdvajanje hromozoma ako hromozomi nisu intaktni (96). Tokom M faze, odvija se poravnanje hromatida i podela na dve ćerke ćelije. Kontrolna tačka deobnog vretena prati precizno poravnanje hromozoma. Mitoza se odlaže ako centromere nisu vezane za mikrotubule. Cdks (cdc2 i ciklin B) su takođe neophodni za nesmetano odvijanje mitoze (95). Cdc2-ciklin B kompleks, takođe poznat kao mpf (*mitosis promoting factor*) igra ključnu ulogu u progresiji u M fazu. Preвременa aktivacija mpf je regulisana nuklearnim proteinom, Wee 1 koji zajedno sa myt1 održava cdc2 u fosforilisanom stanju tokom interfaze.

Da bi ćelija napredovala kroz ovu fazu, za cdc2 koji je neaktivan u fosforilisanom stanju, potrebna je aktivacija od strane cdc25b i cdc25c fosfataza (116). Aktivnost cdc25b se povećava tokom G2 faze olakšavajući aktiviranje cdc2-ciklin B kompleksa. Overekspresija cdc25b može da dovede do prevremene mitoze, s obzirom da se povećava nivo cdc25c kao odgovor na aktivaciju cdc2-ciklin B kompleksa. cdc25c se transportuje iz citoplazme u jedra gde se akumulira i stimuliše dalje povećanje mpf u pozitivnoj povratnoj sprezi (94). Nizvodno od cdc2-ciklin B aktivnosti identifikovane su aurora-A kinaze (117). Čini se da su aurora-A kinaze

indirektno aktivirane cdc2-ciklin B posredovanom fosforilacijom. Da bi inicirao napredovanje ćelijskog ciklusa, potrebna je da cdc2-ciklin B kompleks uđe u jedro.

Proteini p21 i p53 sprečavaju oštećene ćelije u G₂-M fazi da uđu u drugi krug replikacije DNK, inhibiranjem aktivnosti cdk (96, 111). p53 inhibira ovu tranziciju povećanjem transkripcije 14-3-3 σ gena koji sprečava ulazak u G₂ fazu. 14-3-3 σ se kombinuje sa cdc25c fosfatazom u citoplazmi (96). 14-3-3 σ -cdc25c kompleks, sprečava ulazak cdc25c u jezgro, što dovodi do DNK bloka i zastoja ćelijskog ciklusa (slika 1-11).



Slika 1-11. G₂-M zastoja (A) i progresija ćelijskog ciklusa (B). (A) Aktivirani p53 povećava transkripciju 14-3-3 σ . Sekvencijacija cdc25c sa 14-3-3 σ u citoplazmi sprečava ulazak u jedro i aktivaciju cdc2. (B) Da bi ćelije napredovale kroz ovu fazu, cdc25c iz citoplazme prelazi u jedro. Cdc2 u neaktivnom fosforilisanom stanju je regulisan ravnotežom između fosforilacije i defosforilacije i sa cdc25c. Ova aktivacija je od suštinskog značaja za G₂-M tranziciju.

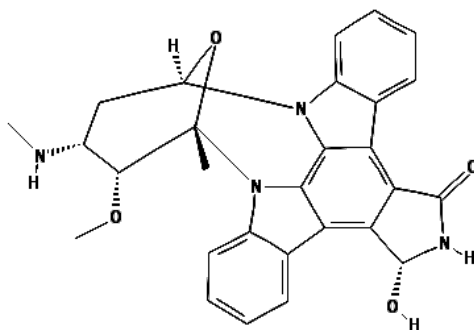
1.5.6 Terapeutski potencijal regulatornih puteva ćelijskog ciklusa

Postoje mnogi molekuli ili kompleksi koje nazivamo *gatekeepers* - „čuvari“ i koji suprimiraju stvaranje tumorskih formacija, a aktivirani su preko uređenih puteva. Jedan od tih puteva, predvođen aktivnošću p53, ima ogroman naučni značaj. Aktivnost p53 je posredovana ATM-om, ATR-om i DNA-PK, gde je za DNA-PK

otkrivena uloga u sprečavanju hromozomskih mutacija. Mutacije u p53 su nađene u više od 50 % od svih humanih malignih bolesti (118).

Otkrivanje ključnih učesnika unutar regulatornih puteva ćelijskog ciklusa ne samo da poboljšava razumevanje kontrole ćelijskog ciklusa i razvoja raka, već takođe doprinosi i napretku terapijskih ciljeva i strategija.

Jedan anti kancerski agens označen kao UCNO1 (7-hidroksistaurosporin) ukida G2/M kontrolnu tačku inhibicijom cdc25c i povećava efikasnost hemioterapije i radioterapije (116). Čini se da rezistencija na anti-kancersku terapiju, kao što su hemioterapijski agensi i zračenje, može biti posledica promene kontrolnih tačaka koje registruju oštećenja DNK, stoga je dalji razvoj lekova protiv raka sve više orijentisan ka molekularnim ciljevima uključenim u ćelijsku transformaciju. Istraživanje je takođe okrenuto potrazi za hemijskim cdk inhibitorima za manipulaciju kontrole ćelijskog ciklusa (93).



Slika 1-12. Struktura agensa UCNO1 (7-hidroksistaurosporin)

Dodatne dokaze neophodne u istraživanju dobrih terapijskih pristupa u lečenju maligniteta može dati istraživanje podataka koji ukazuju da se kod 50 % bolesnika sa familijarnim rakom dojke i jajnika javljaju BRCA1 mutacije (119) i mutacije Rb gena u 20 % linija sitnoćelijskog raka pluća i familijarnim

retinoblastomima (118). Pored toga, mutacije ATM dovode do *ataxia telangiectasiae*, predisponirajući ove osobe na rak preko preosetljivosti na jonizujuće zračenje (94).

Korišćenjem citometrije i tehnologijama kvantifikacije bilo je moguće istražiti vremena dupliranja tumora, indeks mitotske aktivnosti i izmeriti frakciju S faze (SPF). Smatra se da SPF ima potencijal za predviđanje trajanja intervala bez ponovne pojave bolesti (engl. *recurrence free interval*) a samim tim i bolje indikacije o modalitetu odgovora.

Dalje potencijal u unapređenju ishoda lečenja je u skriningu p53 ili pRb mutacija u pred-kanceroznim lezijama, što pruža mogućnosti za rano otkrivanje tumorigeneze (118). Pokazana je npr. razlika u nivou ekspresije ciklina A ili E i p53 mutacijama, između pred-kanceroznih lezija i invazivnog raka jajnika (120).

1.6 MEHANIZMI ĆELIJSKE SMRTI

Shvatanje da se smrt ćelije često pojavljuje kao deo aktivnog, programiranog procesa značajno je promenilo naše razumevanje kako razvoja, tako i tretmana malignih bolesti. Smrt ćelije se danas često posmatra i kao „izbor“ od strane ćelije koja je nepovratno oštećena ili je postala potencijalno opasna zbog aktiviranja onkogeno koji podstiče rast. Termin apoptoza, dobro opisani oblik programirane ćelijske smrti koji karakteriše aktiviranje kaspaza (121), često se koristi kao sinonim za samu smrt ćelije. Ovo je razumljivo, jer ovaj vid ćelijske smrti rezultira u brzom i obično potpunom uništenju i uklanjanju ćelije. Međutim, kada uzmemo u obzir smrt ćelija u kontekstu razvoja i lečenja maligniteta, možda je korisnije proširiti definiciju tako da uključi i druge procese koji se dovode do inaktivacije proliferativnog ili „klonogenog“ kapaciteta ćelije. Ovi drugi procesi uključuju senescencu, mitotsku katastrofu, autofagiju i nekrozu (122). Postalo je jasno da apoptoza predstavlja moćan i važan ćelijski odbrambeni mehanizam protiv razvoja raka. Shodno tome, gubitak apoptozne osetljivosti smatra se i jednim od obeležja raka (73).

Skлонost pojedinih ćelija da krenu u apoptozu je i pozitivno i negativno regulisana različitim genima, od kojih su mnogi mutirani i/ili deregulisani u tumoru (122). Osim toga, na apoptozu jak uticaj može imati lokalno mikrookruženje tumora,

koje se odlikuje velikom heterogenošću u oksigenaciji i ponudi hranljivih materija (123). Prema tome, ćelijska apoptozna osetljivost može značajno varirati između različitih tumora, pa čak i unutar istog tumora. S obzirom na to da su antitumorski agensi, uključujući i najčešće korišćene hemioterapeutske lekove i zračenje, u stanju da aktiviraju apoptozu, postalo je široko prihvaćeno da apoptozna osetljivost daje važan doprinos ukupnoj osetljivosti tretmana (124, 125). Ovo je dovelo do potrage za novim agensima koji su u stanju da izazovu apoptozu u ćelijama raka kao i istraživanja mehanizama za povećanje osetljivosti tumorskih ćelija na apoptozu. Međutim, kako je već gore pomenuto, apoptoza predstavlja samo jedan oblik smrti ćelije koji može da doprineti inaktivaciji tumorskih ćelija.

1.6.1 Apoptoza

Termin apoptoza prvi put je upotrebljen u sada klasičnom radu Kerr-a, Wyllie-a, i Currie iz 1972 u kojem je opisan morfološki osoben oblik ćelijske smrti, mada su neke komponente apoptoznog koncepta opisane mnogo godina ranije (126-128).

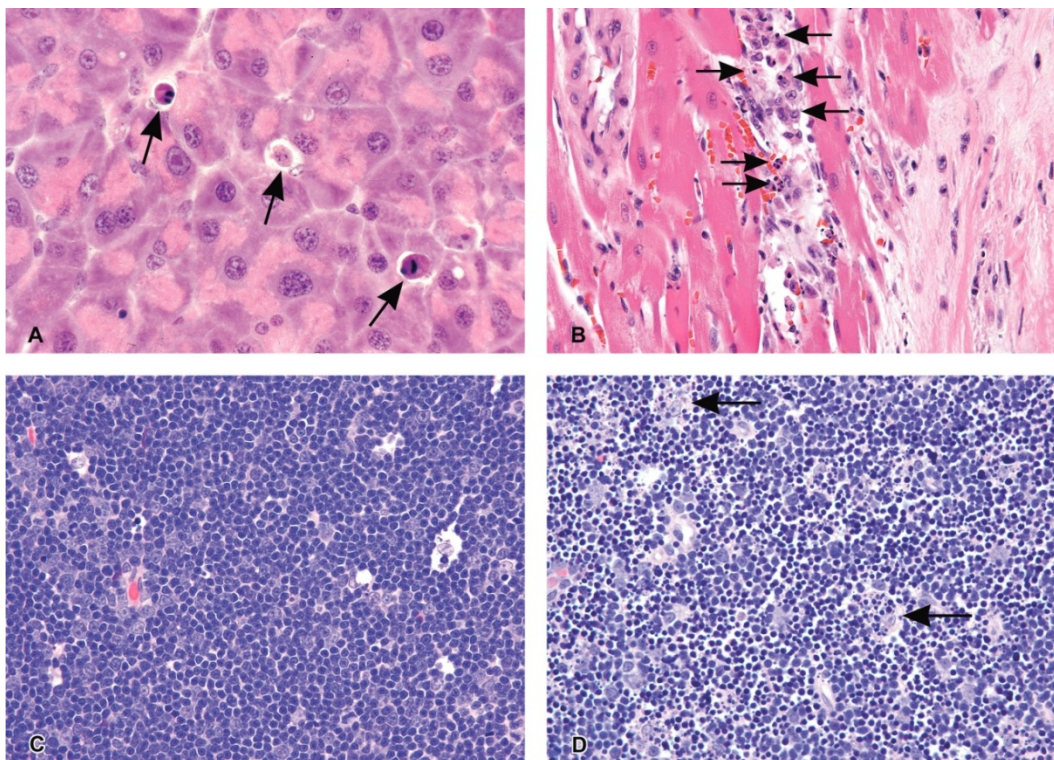
Apoptoza se javlja u toku razvoja i starenja i kao homeostatski mehanizam za održavanje populacije ćelija u tkivima. Apoptoza se takođe javlja kao mehanizam odbrane kao što su imune reakcije ili kada su ćelije oštećene bolešću ili škodljivim agensom (129). Iako postoji širok spektar stimulusa i uslova, i fizioloških i patoloških, koji mogu izazvati apoptozu, neće sve ćelije neminovno umreti u odgovoru na isti stimulus. Zračenje ili lekovi koji se koriste u hemioterapiji rezultiraju u oštećenju DNK u nekim ćelijama, što može dovesti do apoptotične smrti preko p53-zavisnog puta. Neki hormoni, kao što su kortikosteroidi, mogu dovesti do apoptotične smrti ćelije (npr. timocita), iako su druge ćelije nepromenjene, pa čak mogu biti i stimulisane.

Neke ćelije eksprimiraju Fas ili TNF receptore koji mogu dovesti do apoptoze putem vezivanja liganda i proteinskog umrežavanja (engl. *cross-linking*). Tu je i pitanje razlikovanja apoptoze od nekroze, dva procesa koji se mogu odigrati nezavisno, sukcesivno, kao i istovremeno (130, 131). U nekim slučajevima ono što određuje da li će ćelija umreti apoptozom ili nekrozom je vrsta i/ili stepen stimulusa.

Pri niskim dozama, razni štetni stimuli kao što su toplota, radijacija, hipoksija i citotoksični antitumorski lekovi mogu da indukuju apoptozu, ali ti isti stimuli mogu dovesti do nekroze pri višim dozama. Konačno, apoptoza je koordinisan i često energetski zavisan proces koji podrazumeva aktiviranje grupe cistein proteaza pod nazivom „kaspaze“ kao i kompleks kaskadnih događaja koji povezuju pokretački stimulus i konačnu smrt ćelije.

1.6.1.1 Morfološke odlike apoptoze

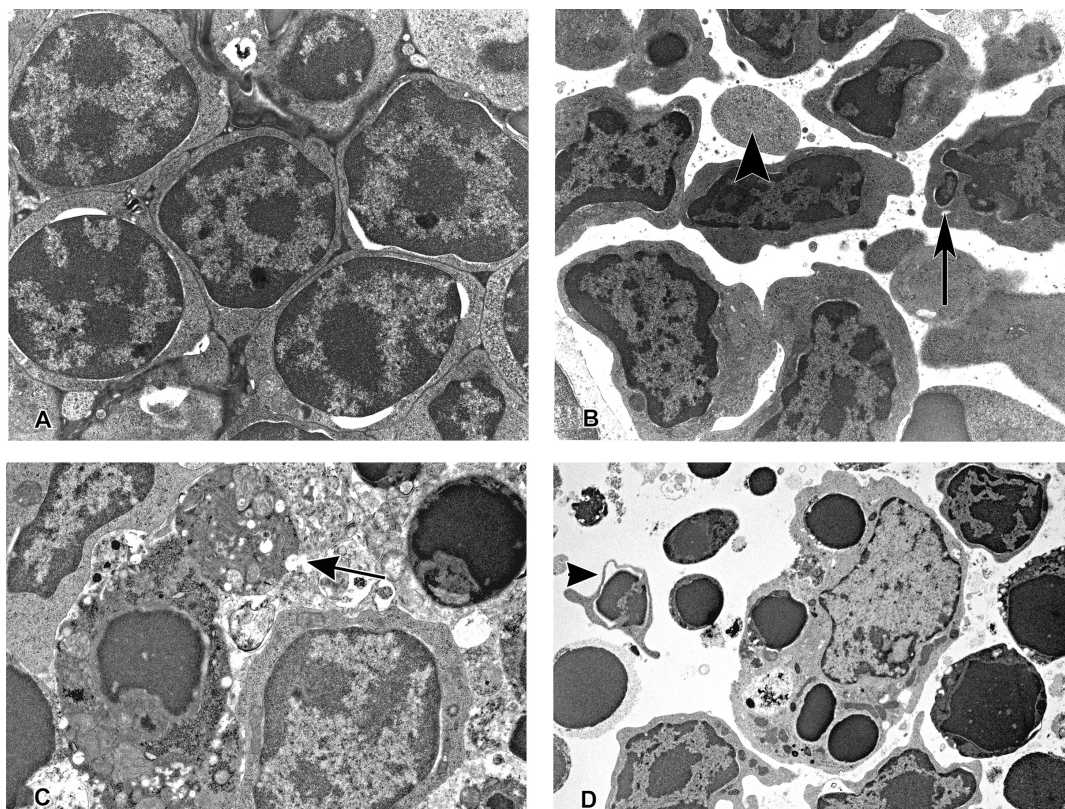
Različite morfološke promene koje se dešavaju u toku apoptoze identifikovane su svetlosnom i elektronskom mikroskopijom (132). U ranim stadijumima apoptoze, svetlosnom mikroskopijom se mogu videti skupljanje ćelija i piknoza (126). Ćelije su manjih dimenzija, citoplazma je gusta i organele su tešnje spakovane. Piknoza je rezultat kondenzacije hromatina, a to je najznačajnija karakteristika apoptoze. Pri histološkim pregledima preparata obojenih hematoksilinom i eozinom, u apoptozi se mogu naći pojedinačne ćelije ili male grupe ćelija. Apoptotična ćelija se pojavljuje kao okrugla ili ovalna masa sa tamnom eozinofilnom citoplazmom i gustim ljubičastim jedrovim hromatinskim fragmentima (slika 1-13). Elektronskom mikroskopijom mogu se bolje definisati subćelijske promene. Rano tokom faze kondenzacije hromatina, elektronski gust jedrov materijal karakteristično se agregira periferno ispod jedrove membrane (slike 1-14A, B).



Slika 1-13. Apoptoza - HE. **A)** Fotomikrografija dela egzokrinog pankreasa B6C3F1 miša. Strelice pokazuju apoptozne ćelije koje su smanjene zapremine i sa kondenzovanom citoplazmom. Jedra su piknotična i fragmentirana. Upalnog procesa nema. **B)** fotografija miokarda 14 nedelja starog pacova tretiranog efedrinom (25 mg/kg) i kofeinom (30 mg/kg). U intersticijalnom prostoru postoje apoptozne ćelije sa zgusnutom citoplazmom, kondenzovanim i hiperhromatičnim hromatinom i fragmentiranim jedrima (strelice). Makrofagi su pomešani sa apoptoznim telima, a neka su i zahvatili fagocitozom. **C)** fotomikrografija zdravog timusnog tkiva kontrolnog Sprague–Dawley pacova. **D)** ilustruje klastere apoptoznih ćelija u timusu pacova koji je tretiran deksametazonom i kod koga je podstaknuta apoptoza limfocita. Pod fiziološkim uslovima, apoptoza obično zahvata jednu ili male klastere ćelija. Međutim, stepen apoptoze kod ovog pacova je viši zbog visoke i duge izloženosti deksametazonu (1 mg/kg telesne težine, 12 časova). Apoptozni limfociti su mali i snažno bazofilni sa piknotičnim i često fragmentiranim jedrima. Prisutni makrofagi u citoplazmi sadrže apoptozna tela (strelice). Iz: Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35:495–516.

Javlja se baloniranje (engl. *blebbing*) plazma membrane praćeno cepanjem jedra i razdvajanje fragmenata ćelija u apoptozna tela tokom procesa pupljenja (engl. *budding*). Apoptozna tela se sastoje od citoplazme sa čvrsto upakovanim organelama sa ili bez fragmenta jedra (slika 1-14C). Integritet organela je još uvek održan i sve to se nalazi u sklopu intaktne plazma membrane. Ova tela će naknadno fagocitirati

makrofagi, parenhimalne ćelija ili neoplastične ćelije i biće degradirana u fagolizozomima (Slika 1-14D).



Slika 1-14. Apoptoza - elektromikrografija. **A)** TEM normalnog tkiva timusa prikazanog na slici 1-11C. Limfociti su gusto pakovani, imaju veliki jedra i oskudnu citoplazmu. **B)** TEM apoptoznih limfocita timusa u ranoj fazi apoptoze. Citoplazma se kondenzuje i ćelijske konture su neregularne. Strelica označava fragmentirani deo jedra a kratka strelica ukazuje na apoptozno telo koje sadrži pretežno citoplazmu, bez organela ili jedrovog materijala. **C)** ilustruje apoptozni limfocit u procesu pupljenja membrane (strelica). Ovaj ekstrudirani fragment će biti apoptozno telo. **D)** TEM isečka timusa sa limfocitima u različitim fazama apoptoze. Velika ćelija u centru elektromikrografije je makrofag sa zahvaćenim apoptoznim telima. Strelica ukazuje na limfocit u podmakloj fazi apoptoze sa fragmentacijom jedra. Iz: Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology, 35:495–516.

U suštini ne postoji inflamatorna reakcija u procesu apoptoze niti tokom uklanjanja apoptoznih ćelija, jer apoptozne ćelije ne oslobađaju svoj sadržaj u intersticijalno tkivo, brzo su fagocitirane od okolnih ćelija i na taj način se sprečava sekundarna nekroza i fagociti ne proizvede anti-inflamatorne citokine (133, 134).

1.6.1.2 *Razlike između apoptoze i nekroze*

Nekroza je nekontrolisan i pasivni proces koji obično utiče na velike oblasti ćelija, dok je apoptoza kontrolisan i energetski zavisani proces koji zahvata pojedinačne ili manje grupe (klustere) ćelija. Nekrotični put je posredovan sa dva glavna mehanizma; ometanjem ćelija u snabdevanju energijom i neposrednim oštećenjem ćelijske membrane.

Iako se mehanizmi i morfologija apoptoze i nekroze razlikuju, postoji i preklapanje između ova dva procesa. Na primer, dva faktora koji će konvertovati apoptotične procese u nekrotične uključuju smanjenje dostupnosti kaspaza i intracelularnog ATP-a (135, 136). Da li ćelija umre nekrozom ili apoptozom delimično zavisi od prirode signala ćelijske smrti, tipa tkiva, razvojne faze tkiva i fiziološkog miljea (131, 137).

Korišćenjem histoloških metoda, nije uvek lako razlikovati nekrozu od apoptoze, i moguća je njihova istovremena pojava u zavisnosti od faktora kao što su intenzitet i trajanje stimulacije ili inhibicije, nivoa ATP-a i dostupnosti kaspaza (131).

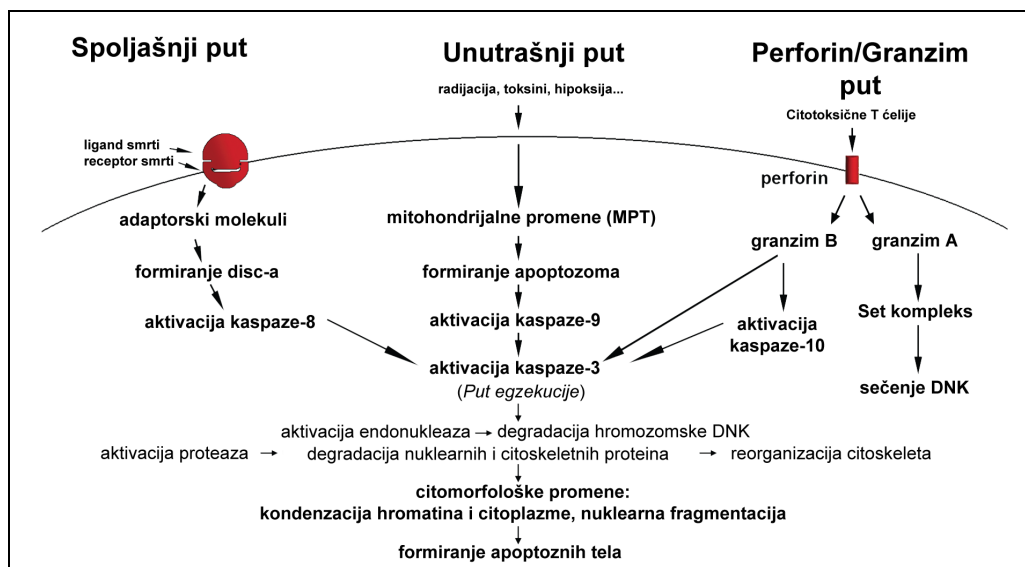
Neke od glavnih morfoloških promena koje se dešavaju tokom nekroze uključuju uvećanje ćelija; formiranje citoplazmatskih vakuola; širenje endoplazmatičnog retikuluma; formiranje citoplazmatskih blebs-ova; zgusnute, uvećane ili oštećene mitohondrije; deagregacija i otkačivanje ribozoma; oštećene membrane organela; uvećani i oštećeni lizozomi; i na kraju pucanje ćelijske membrane (126, 138, 139). Ovaj gubitak membranskog integriteta ćelije rezultira u oslobađanju citoplazmatskog sadržaja u okolno tkivo, što šalje hemotaksične signale i nakupljanje inflamatornih ćelija. Takođe je važno napomenuti da piknoza i cepanje jedra nisu isključive osobenosti apoptoze i mogu biti deo spektra citomorfoloških promena koja se javlja i tokom nekroze (140). U tabeli 1-1 poredene su neke od glavnih morfoloških karakteristika apoptoze i nekroze.

Tabela 1-1. Poređenje morfoloških karakteristika apoptoze i nekroze.

Apoptoza	Nekroza
Jedna ili klaster ćelija	Često ima veliki obim
Skupljanje ćelija	Širenje ćelija
Piknoza i cepanje jedra	Karioliza, piknoza i cepanje jetra
Intaktna ćelijska membrana	Oštećena ćelijska membrana
Citoplazma zadržana u apoptoznim telima	Oslobađanje citoplazme
Nema inflamacije	Inflamacija prisutna

1.6.1.3 Mehanizmi apoptoze

Mehanizmi apoptoze su veoma složeni i uključuju energetske zavisne kaskade molekularnih događaja (slika 1-15). Dosadašnja istraživanja pokazuju da postoje dva glavna apoptozna puta: spoljašnji ili put receptora smrti i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Međutim, sada postoje dokazi da su ova dva puta povezana i da molekuli jednog puta mogu uticati na drugi (141). Postoji i dodatni put koji podrazumeva T-ćelijama posredovanu citotoksičnost i perforin-granzim zavisno ubijanje ćelije. Spoljašnji, unutrašnji i granzim B putevi konvergiraju ka istom putu egzekucije. Ovaj put se pokreće sečenjem kaspaze-3 i rezultira u DNK fragmentaciji, degradaciji citoskeleta i nuklearnih proteina, unakrsnog povezivanja proteina, formiranje apoptotskih tela, ekspresije liganada za receptore fagocitoznih ćelija i na kraju prihvatanje apoptoznih ćelija fagocitima. Granzim A put aktivira paralelni, od kaspaza nezavisni put smrti ćelije preko jednolančanih oštećenja DNK (142).



Slika 1-15. Šematski prikaz apoptoznih događaja. Dva glavna puta apoptoze su spoljašnji i unutrašnji, a pored njih tu je i perforin/granzim put. Svaki od ovih puteva zahteva specifične aktivirajuće signale da bi započela energetski zavisna kaskada molekularnih događaja. Svaki put aktivira svoje inicijatorske kaspaze (8, 9, 10) što će aktivirati izvršnu kaspazu-3. S druge strane, granzim funkcioniše na od kaspaza nezavisan način. Egzekucija rezultira u karakterističnim citomorfološkim promenama, uključujući skupljanje ćelija, kondenzaciju hromatina, formiranje citoplazmatskih "blebs-ova" i apoptoznih tela i na kraju njihovu fagocitozu od susednih parenhimskih ili neoplastičnih ćelija ili makrofaga.

1.6.1.4 Biohemijske karakteristike apoptoze

Apoptozne ćelije pokazuju nekoliko biohemijskih promena, kao što su degradacija proteina, unakrsno povezivanje proteina, sečenje DNK i prepoznavanje od strane fagocita što zajedno dovodi do za apoptozu karakterističnih strukturnih promena (143). Kaspaze su eksprimirane u formi neaktivnog proenzima u većini ćelija i jednom aktivirane često mogu aktivirati ostale prokaspaze, omogućavajući pokretanje proteazne kaskade. Neke prokaspaze se agregiraju i imaju sposobnost autokatalize. Ova proteolitička kaskada, u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, pojačava apoptozni signalni put i na taj način dovodi do brze smrti ćelije.

Proteinsko unakrsno povezivanje je još jedna karakteristika apoptotskih ćelija i ostvaruje se kroz ekspresiju i aktiviranje tkivne transglutaminaze (144). Sečenje DNK Ca^{2+} i Mg^{2+} zavisnim endonukleazama rezultira u formiranju DNK fragmenata od 180 do 200 baznih parova (145). Karakteristične „DNK lestvice“ mogu biti vizualizovane

na UV iluminatoru posle elektroforeze ukupne ćelijske DNK na agaroznom gelu i bojenja sa ethidium bromidom.

Još jedna biohemijska osobenost je ekspresija markera na površini ćelije koje rezultira u ranom fagocitnom prepoznavnju apoptoznih ćelija od strane susednih ćelija, čime se omogućava brza fagocitoza bez štete po okolno tkivo. To se postiže kretanjem fosfatidilserina koji je normalno okrenut ka unutrašnjosti ćelijskog membranskog lipidnog dvosloja do spoljašnjeg sloja plazma membrane (146). Iako je eksternalizacija fosfatidilserina poznati ligand za prepoznavanje fagocita na površini apoptozne ćelije, novije studije su pokazale da su i drugi proteini takođe eksprimirani na površini tokom odstranjivanja apoptoznih ćelija. Ovo uključuje aneksin I i kalretikulin.

Aneksin V (Annexin V) je rekombinantni protein koji reaguje snažno i specifično sa fosfatidilserinskim ostacima i može se koristiti za detekciju apoptoze (147). Kalretikulin je protein koji se vezuje za LDL-receptor-srodni protein na fagocitnim ćelijama i predpostavlja se kao i fosfatidilserin služi kao signal prepoznavanja (148). Adhezivni glikoprotein, trombospondin-1, može biti eksprimiran na spoljnoj površini aktiviranih mikrovaskularnih endotelnih ćelija i, u saradnji sa CD36, kaspaze-3-slične proteaze i drugih proteina, indukuju receptorom posredovanu apoptozu (149).

1.6.1.5 Patološka apoptoza

Poremećaji u regulaciji ćelijske smrti mogu biti značajne komponente bolesti poput raka, autoimunog limfoproliferativnog sindroma, AIDS-a, ishemije i neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest, Hantingtonova bolest i amiotrofna lateralna skleroza. Karakteristika nekih stanja je nedovoljna apoptoza, dok druge karakteriše preterana apoptoza.

Rak je primer gde su normalni mehanizmi regulacije ćelijskog ciklusa disfunkcionalni, sa bilo preteranom proliferacijom ćelija i/ili smanjenim uklanjanjem ćelija (150). U stvari, smatra se da suzbijanje apoptoze tokom karcinogeneze igra

centralnu ulogu u razvoju nekih vrsta raka (151). Postoji niz molekularnih mehanizama koji tumorske ćelije koriste za suzbijanje apoptoze.

Tumorske ćelije mogu steći otpornost na apoptozu ekspresijom anti-apoptoznih proteina, kao što su Bcl-2 ili smanjenjem ekspresije ili mutacijom pro-apoptoznih proteina kao što je Bax. Ekspresiju i Bcl-2 i Bax reguliše tumor supresor gen p53 (152). Bcl-2 je overekspimiran kod nekih oblika humanog B ćelijskog limfoma i ovo je jedan od prvih i najjačih dokaza da poremećaj ćelijske smrti doprinosi razvoju maligne bolesti (153). Drugi metod koji maligne ćelije koriste za suzbijanje apoptoze podrazumeva izbegavanje imunog nadzora (154).

Određene imunske ćelije (T-ćelije i ćelije prirodne ubice), normalno uništavaju ćelije tumora putem perforin/granzim B puta ili preko puta receptora smrti. Da bi izbegle imunu destrukciju, neke ćelije tumora će umanjiti odgovor puta receptora smrti na FasL koji proizvode T ćelije. Ovo je pokazano da se dešava na različite načine, uključujući i smanjenu ekspresiju Fas receptora na tumorskim ćelijama. Drugi mehanizmi uključuju ekspresiju nefunkcionalnog Fas receptora, lučenje visokog nivoa rastvorljivog oblika Fas receptora koji će blokirati Fas ligand ili ekspresija Fas liganda na površini tumorskih ćelija (155, 156). Zapravo, neke tumorske ćelije su sposobne za Fas ligandom posredovan „kontranapad“, koji rezultira apoptozom aktiviranih limfocita infiltriranih u tumor (157).

Izmene različitih ćelijskih signalnih puteva mogu dovesti do deregulacije apoptoze i rezultirati u malignoj bolesti. p53 tumor supresor gen je najčešće mutirani gen u humanoj tumorogenezi (158). Ključna uloga p53 je evidentna iz činjenice da je mutiran u preko 50 % od svih humanih malignih bolesti. p53 može da aktivira proteine DNK repera, kada je DNK pretrpela štetu, može zadržati ciklus ćelija u G₁/S regulatornoj tački i može pokrenuti apoptozu ako se pokaže da je oštećenje DNK nepopravljivo (159). U slučaju poremećaja ovog sistema može doći do tumorogeneze. Ako je p53 gen oštećen, supresija tumora je znatno smanjena. p53 gen može biti oštećen zračenjem, raznim hemikalijama i virusima kao što je humani papiloma virus (engl. *Human papillomavirus* - HPV). Ljudi koji naslede samo jednu funkcionalnu kopiju ovog gena najverovatnije će razviti Li-Fraumeni sindrom, koji se odlikuje razvojem tumora u ranoj zrelosti (160, 161).

Takođe je pokazano da je *ataxia telangiectasia*-mutirani gen (ATM) uključen u tumorogenezu preko ATM/p53 signalnog puta (162). ATM gen kodira protein kinazu koja deluje kao tumor supresor. ATM aktivacija preko oštećenja DNK jonizujućim zračenjem, stimuliše DNK popravku i blokira napredovanje ćelijskog ciklusa. Mehanizam kroz preko kojeg se to odvija je ATM zavisna fosforilacija p53 (163).

1.6.2 Testovi za apoptozu

S obzirom da se apoptoza odvija preko složene signalne kaskade koja je čvrsto regulisana u više tačaka, postoje mnoge mogućnosti da se proceni aktivnost proteina koji su uključeni u ovaj proces. Kako aktivatori, efektori i regulatori ove kaskade i dalje bivaju opisani, osmišljen je veliki broj testova za detekciju i brojanje apoptoznih ćelija. Međutim, mnoge karakteristike apoptoze i nekroze se mogu preklapati i zato je od ključnog značaja da se primeni dva ili više različitih testova u cilju potvrde da se ćelijska smrt odvija putem apoptoze. Jedan test može otkriti rane apoptozne događaje dok drugi testovi mogu da ciljaju kasnije događaje. Drugi test se koristi u cilju potvrde apoptoze i uopšteno govoreći zasniva se na različitim principima. Multipleksing, koji daje sposobnost prikupljanja više od jednog skupa podataka iz istog uzorka, je još jedna metodologija za detekciju apoptoze koja postaje sve popularnija. Na raspolaganju je veliki dijapazon testova, ali svaki od njih ima svoje prednosti i nedostatke koji mogu biti prihvatljivi za jednu aplikaciju, ali neodgovarajući za drugu aplikaciju (164, 165).

Razumevanje kinetike ćelijske smrti u svakom model sistemu je od kritične važnosti. Neki proteini kao što su kaspaze, eksprimiraju se samo kratkotrajno. Kultivirane ćelije koje uđu u proces apoptoze *in vitro*, na kraju će podleći sekundarnoj nekrozi. Apoptotične ćelije u bilo kom sistemu mogu umreti i nestati relativno brzo. Vreme od pokretanja do završetka apoptoze može biti i samo 2-3 časa. Stoga se lažno negativan rezultat može dobiti ako se testovi načine suviše rano ili kasno. Štaviše, apoptoza se može javiti kod pojedinačnih ćelija ili na određenim mestima unutar organa, tkiva i kultura. Generalno, ako se žele detaljne informacije o

mehanizmu ćelijske smrti, trajanje izloženosti toksinu, koncentracije agensa i izbor krajnje tačke testa postaju kritični faktori.

Apoptozni testovi, na osnovu metodologije, mogu se svrstati u šest velikih grupa:

1. Citomorfološke promene
2. DNK fragmentacija
3. Detekcija kaspaza, njihovih substrata, regulatora i inhibitora
4. Membranske promene
5. Detekcija apoptoze u kompletnom organu ili organizmu (engl. *whole mounts*)
6. Mitohondrijalni testovi.

1.6.2.1 *Citomorfološke promene*

Posmatranje hematoksilinom i eozinom bojenih tkivnih isečaka svetlosnim mikroskopom omogućava vizuelizaciju apoptoznih ćelija. Iako se pojedinačne apoptozne ćelije mogu detektovati ovom metodom, potvrda drugim metodama je neophodna. S obzirom da su morfološke promene kod apoptoze brze i fragmenti ćelija bivaju brzo fagocitirani, apoptoza se može javiti u nekim tkivima pre nego što je to histološki očigledno. Pored toga, ovaj metod detektuje kasnije apoptozne događaje, tako da ćelije u ranoj fazi apoptoze neće biti otkrivene.

Ultra tanki isečci iz epoksiresinskog bloka mogu se bojiti toluidin plavim ili metilen plavim čime se mogu otkriti intenzivno obojene apoptotične ćelije. Ova metodologija se zasniva na kondenzaciji nukleusa i citoplazme koji se dešavaju u toku apoptoze. Tkiva i detalji ćelija su očuvani ovom tehnikom i pregled velikih regiona tkiva daje određene prednosti. Međutim, manja apoptozna tela neće biti otkrivena i zdrave ćelije sa velikim gustim intraćelijskim granulama mogu dovesti istraživače u zabludu da su u pitanju apoptotične ćelije ili njihovi ostaci. Pored toga, postoji gubitak antigenosti tokom obrade, tako da imunohistohemijski ili enzimski testovi ne mogu biti obavljeni na istom tkivu. Međutim, ova tkiva se mogu koristiti za transmisionu elektronsku mikroskopiju (TEM).

TEM se smatra zlatnim standardom u potvrđi apoptoze. To je stoga što je kategorizacija ćelije kao apoptotične neopoziva ukoliko ćelija sadrži određene ultrastrukturne morfološke karakteristike (166). Ove karakteristike su: (a) elektronski gusta jezgra (marginalizacija u ranoj fazi), (b) fragmentacija jedra, (c) netaknute ćelijske membrane čak i kasno u fazi raspadanja ćelija, (d) neorganizovane citoplazmatske organele, (e) velike jasne vakuole i (f) *blebs*-ovi na površini ćelije. Kako apoptoza napreduje, ove ćelije gube adhezivne sposobnosti i odvajaju se od okolnih ćelija. Tokom kasnije faze apoptoze, ove ćelije će se fragmentisati u apoptotska tela sa intaktnom ćelijskom membranom i sadržaće citoplazmatske organele sa ili bez jedrovih fragmenata. Osnovni nedostaci TEM su troškovi, duga procedura, kao i nemogućnost da se istovremeno testira veći region.

1.6.2.2 DNK Fragmentacija

DNK *laddering* tehnika se koristi za vizuelizaciju proizvoda endonukleaznog sečenja tokom apoptoze (167). Ovaj test podrazumeva ekstrakciju DNK iz liziranih ćelija, a zatim sledi elektroforeza na agaroznom gelu. DNK apoptoznih ćelija razdvojena na agaroznoj gel elektroforezi daje karakteristične „DNK merdevine“ pri čemu je svaka „prečka“ merdevina veća za oko 180 baznih parova. Ova metodologija je jednostavna, ima osetljivost od 1×10^6 ćelija (to jest, može se detektovati u uzorku od milion ćelija) i koristi se za tkiva i ćelijske kulture sa visokim brojem apoptoznih ćelija po masi ili zapremini tkiva. S druge strane, ne preporučuje se u slučajevima sa niskim brojem apoptoznih ćelija. Postoje i drugi nedostaci ovog testa. Pošto se DNK fragmentacija javlja u kasnijoj fazi apoptoze, odsustvo DNK lestvica ne eliminiše mogućnost da su ćelije u ranoj apoptozi.

TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) metod se koristi za određivanje produkata razlaganja DNK lanaca endonukleazom, enzimskim označavanjem prekida lanaca (168). Terminalna transferaza se koristi za označavanje 3'-kraja DNK fragmenta obeleženim UTP-om. dUTP može biti označen različitim probama što omogućava detekciju svetlosnom ili fluorescentnom mikroskopijom ili protočnom citometrijom. Testovi su dostupni kao kitovi i mogu se nabaviti od različitih proizvođača. Ovaj test je veoma osetljiv, što omogućava otkrivanje jedne ćelije

fluorescentnom mikroskopijom ili približno 100 ćelija protočnom citometrijom. Nedostaci su visoka cena i nepoznati parametar koliko je prekida DNK lanaca neophodno za detekciju ovom metodom. Ovaj metod je takođe može dati lažno pozitivne rezultate iz nekrotičnih ćelija i ćelija u procesu popravke DNK i transkripcije gena. Iz ovih razloga, trebalo bi da bude uparen sa drugim testom.

1.6.2.3 Detekcija kaspaza i njihovih substrata, regulatora i inhibitora

Postoji više od 13 poznatih kaspaza (prokaspaze ili aktivne cistein kaspaze) koje mogu biti detektovane korišćenjem različitih testova kaspazne aktivnosti (169). Tu su i imunohistohemijski testovi koji mogu da detektuju sečenje substrata kao što je PARP ali i poznate ćelijske modifikacije, kao što je fosforilacija histona (170, 171). Inhibitori kaspaza konjugovanih fluorescentnim bojama se takođe mogu koristiti u cilju označavanja aktivnih kaspaza unutar ćelija (172). Aktivacija kaspaza se može detektovati na različite načine, uključujući western blot, imunoprecipitaciju i imunohistohemiju. I poliklonska i monoklonska antitela su dostupna kako za prokaspaze tako i za aktivne kaspaze.

Jedna od metoda detekcije kaspaza podrazumeva oblaganje otvora mikrotitar ploča anti-kaspazama, potom lizu ćelija, kako bi se enzim oslobodio u rastvor, posle čega sledi detekcija fluorescentno označenim substratom. Detekcija kaspazne aktivnosti ovom metodom obično zahteva 1×10^5 ćelija. Ova tehnika omogućava izbor pojedinačnih inicijatorskih ili izvršnih kaspaza, kao i brzu kvantifikaciju apoptoznih ćelija. Nedostatak ove metodologije je da je integritet uzorka je narušen čime se eliminiše mogućnost lokalizacije apoptoznog događaja u okviru tkiva ili određivanje tipa ćelija koje podležu apoptozi. Još jedna mana je to što aktivacija kaspaza ne ukazuje na to da će neminovno doći do apoptoze. Pored toga, postoje i značajna preklapanja u supstratima različitih kaspaza, koji utiču na specifičnost testa.

Apoptozni PCR mikroerej je relativno nova metodologija koja koristi RT-PCR u cilju dobijanja profila ekspresije najmanje 112 gena koji su uključeni u apoptozu (173, 174). Ovi PCR mikroereji su tako dizajnirani da je moguće odrediti profil ekspresije gena koji kodiraju ključne ligande, receptore, intracćelijske modulatore i

transkripcione faktore koji su uključeni u regulaciju programirane ćelijske smrti. Ekspresija gena koji su uključeni u inhibiciju apoptoze takođe se može procenjivati ovom metodologijom.

Hijerarhijska klaster analiza gena može otkriti različite vremenske obrasce transkripcione aktivacije i/ili represije. Međutim, interpretacija rezultata može biti jako teška zbog velikog broja analiziranih gena i metodološke složenosti. Ova metodologija koristi mikro titar ploče sa 96 otvora i svega 5 nanograma ukupne RNK. Svaka iRNK, ili transkript, je označen markerom, kao što su fluorescentne boje. RT-PCR instrument se koristi za dobijanje profila ekspresije. Mesto i intenzitet rezultujućeg signala daju podatke koji omogućavaju procenu količine svakog transkripta u uzorku. Mikroerej test treba kombinovati sa drugim metodama kako bi se potvrdila apoptoza.

1.6.2.4 Membranske promene

Eksternalizacija fosfatidilserinskih ostataka na spoljašnjosti plazma membrane apoptoznih ćelija omogućava detekciju apoptoze u tkivima, embrionima ili kultivisanim ćelija putem Annexin-a V (175). Kada apoptozne ćelije vežu fluorescein izotiocianatom (FITC) označen Annexin V mogu biti vizualizovane fluorescentnim mikroskopom. Prednosti ove metode je osetljivost (moguće je otkriti jednu apoptoznu ćeliju), kao i mogućnost da se potvrdi aktivnost inicijatorskih kaspaza. Nedostatak je da membrane nekrotičnih ćelija takođe dobro vezuju Annexin V. Stoga je neophodno pokazati i integritet membrane fosfatidilserin-pozitivnih ćelija. S obzirom da je gubitak integriteta membrane karakteristika nekrotične ćelijske smrti, nekrotične ćelije se boje specifičnim za membranu nepermeabilnim bojama nukleinskih kiselina kao što su propidium jodid i tripan plavo. Prenos fosfatidilserina prema spoljašnjosti ćelijske membrane omogućava prenos određenih boja u ćeliju na jednosmeran način. Kako ćelija tokom apoptoze smanjuje obim, sadržaj boje u ćeliji postaje koncentrisan i može biti vizualizovan svetlosnom mikroskopijom. Ovi bioeseji dobro funkcionišu na ćelijskim kulturama, ne označavaju nekrotične ćelije i imaju visok nivo osetljivosti.

1.6.2.5 Detekcija apoptoze u kompletnom organu ili organizmu (engl. *whole mounts*)

Apoptoza može biti vizualizovana u preparatima celog embriona ili tkiva korišćenjem boja, kao što su akridin oranž (AO), Nil sulfat plavo (engl. *Nile blue sulfate* - NBS), i neutral red (engl. *neutral red* - NR) (176). Pošto su ove boje acidofilne, koncentrisane su u oblasti visoke lizosomalne i fagocitozne aktivnosti. Iako su sve ove metode brze i imaju nisku cenu, one imaju određene nedostatke. Akridin oranž je otrovan i mutagen i pod standardnim uslovima se brzo smanjuje njegova fluorescencija (engl. *quenching*), dok NBS i NR ne prolaze dublja tkiva. *Lyso-Tracker Red* je boja koja se vezuje za iste strukture, ali ova boja može da se koristi sa laserskim konfokalnim mikroskopom u cilju obezbeđivanja 3-dimenzionalne slike apoptoznih ćelija. Ova boja je stabilna tokom obrade, prodire dublje u tkiva i otporna je na smanjivanje intenziteta fluorescence.

1.6.2.6 Mitohondrijalni eseji

Mitohondrijalni testovi i oslobađanje citohroma *c* omogućavaju otkrivanje promena u ranoj fazi unutrašnjeg puta apoptoze. Laserski skening konfokalni mikroskop (LSCM) stvara submikronske optičke isečke kroz žive ćelije koji se tokom vremena mogu koristiti za praćenje nekoliko mitohondrijalnih događaja u intaktnim pojedinačnim ćelijama (147, 177). Ovom metodologijom se može pratiti tranzicija propustljivosti mitohondrijalne membrane (engl. *Mitochondrial Permeability Transition* - MPT), depolarizacija unutrašnje mitohondrijalne membrane, fluks Ca^{2+} , mitohondrijalni redoks status i reaktivne vrste kiseonika. Glavni nedostatak je u tome što se mitohondrijalni parametri koji se prate ovom metodologijom mogu javiti i u toku nekroze. Elektrohemijski gradijent preko spoljašnje mitohondrijalne membrane pada u toku apoptoze, što omogućava detekciju fluorescentnim katjonskim bojama (178). U zdravim ćelijama ove lipofilne boje se akumuliraju u mitohondrijama, formirajući agregate koji emituju specifičnu fluorescenciju. U apoptoznim ćelijama, spoljašnje mitohondrijalne membrane ne održavaju elektrohemijski gradijent i

katjonske boje difunduju u citoplazmu gde emituju fluorescencu koja se razlikuje od fluorescence agregatne forme.

MitoTracker probe omogućavaju i praćenje očuvanosti membranskog potencijala mitohondrija i u ćelijama koje su fiksirane. MitoTracker probe su permeabilne boje selektivne za mitohondrije koje sadrže blago tiol-reaktivnu hlorometil strukturu. Hlorometil grupa je odgovorna za zadržavanje boje u mitohondrijama nakon fiksacije (179). Da bi se obeležile mitohondrije, ćelije se inkubiraju u submikromolarnim koncentracijama MitoTracker proba, koje pasivno difunduju kroz plazma membranu i akumuliraju se u aktivnim mitohondrijama. Kada su mitohondrije obojene, ćelije mogu biti tretirane fiksativima na bazi aldehida.

I druge mitohondrijalne boje mogu se koristiti u cilju merenja redoks potencijala ili metaboličke aktivnosti mitohondrija u ćelijama. Međutim, ove boje i odgovarajući testovi, ne daju uvid u mehanizam ćelijske smrti i trebalo bi ih koristiti u kombinaciji sa drugim metodama otkrivanja apoptoze, kao što su testovi za kaspaze.

Otpuštanje citohroma *c* iz mitohondrija može biti praćeno u živim ili fiksiranim ćelijama korišćenjem fluorescentne i elektronske mikroskopije (180). Međutim, citohrom *c* postaje nestabilan kada se oslobodi u citoplazmu (181). Stoga je potrebno koristiti ne apoptozne kontrolne ćelije da bi se osiguralo da su uslovi bojenja takvi da su u stanju da detektuju bilo koji dostupni citohrom *c*.

Pro ili anti apoptozni regulatorni proteini, kao što su Bax, Bid, and Bcl-2 takođe se mogu detektovati pomocu fluorescentne i konfokalne mikroskopije (182, 183). Međutim, fluorescentna proba može da izmeni interakciju nativnog proteina sa drugim proteinima.

1.6.3 Ostali oblici ćelijske smrti

1.6.3.1 Senescenca

Senescenca je termin koji odražava stalnu inaktivaciju proliferacije, koja je kao i apoptoza, regulisana genetičkim programom. Ćelije koje podležu senescenci ostaju metabolički aktivne ali ne prolaze kroz ćelijski ciklus i tako u slučaju tumorskih

ćelija, neće doprineti daljem rastu tumora. Senescenca je i normalan deo fiziologije koji se povećava sa starenjem organizama. Senescenca je prvi put primećena u kulturi primarnih ćelija koje pokazuju početni period ekspanzionalnog rasta, a zatim sledi trajni zastoj koji je nazvan replikativna senescenca (184). Replikativna senescenca korelira sa postepenim skraćivanjem telomera u toku perioda ekspanzionalnog rasta. Pored tog replikativnog oblika senescence, "prerana" senescenca se može podstaći raznim oblicima ćelijskog stresa kao što su oni izazvani onkogenom aktivacijom ili oštećenjem DNK (185, 186). U obe situacije, ćelije ulaze u stalni zastoj ćelijskog ciklusa koji se morfološki karakteriše povećanom granulanošću citoplazme, ili biohemijski - galaktozidaznom ekspresijom (187).

1.6.3.2 Mitotička katastrofa (hromozomske aberacije)

Mitotička katastrofa je termin koji je nastao u pokušaju da se obuhvati tip ćelijske smrti koji rezultira iz ili je posledica aberantne mitoze. To je često morfološki povezano sa akumulacijom multinuklearnih džinovskih ćelija koje sadrže nekondenzovane hromosome.

Smatra se da do ovog procesa dolazi kada ćelije prođu kroz mitozu na neodgovarajući način. Na primer, mitotička katastrofa se često javlja ako ćelije uđu u mitozu sa nesparenim ili na neodgovarajući način repariranim oštećenjima DNK. Smrt zbog mitotičke katastrofe je u kontrastu sa apoptozom i senescencom i po tome što je pre svega okidač za ćelijsku smrt, a ne genetički program za smrt ćelije. Prema tome, mitotička katastrofa rezultira u ćelijskoj fuziji, poliploidiji ili aberantnoj citokinezi, što naknadno može dovesti do smrti ćelije apoptozom, senescencom ili nekrozom (188). Bitna razlika je u tome da je smrt ćelija uzrokovana mitotičkom katastrofom, a ne početnim sopstvenim oštećenjem.

1.6.3.3 Autofagija

Autofagija je proces u kome ćelija digestira sopstvenu citoplazmu u cilju dobijanja malih makromolekula koji su od suštinskog značaja za opstanak ćelije.

Autofagija je indukovana u odgovoru na uklanjanje faktora rasta i smatra se da održava preživljavanje ćelije u vreme niskog nivoa nutrijenata u okolnoj sredini (189). Molekularne osnove autofagije i njen odnos prema mehanizmima opstanka ćelije, trenutno je aktivna oblast istraživanja. Nedavno je pokazano da DNK zavisna protein kinaza (DNA-PK) igra ključnu ulogu u autofagiji posle dejstva jonizujućeg zračenja (190). Sisarski ciljni protein rapamicinskog puta (mammalian target of rapamycin mTOR), koji je opšti senzor statusa hranljivih materija, izgleda da je neophodan za regulaciju autofagije (191). Unutarćelijske strukture nazvane fagofore zaokružuju delove citoplazme, formirajući vakuole ispunjene citoplazmom. Ove vakuole se naknadno spajaju sa lizozomima i u njima se razgrađuju. Smrt ćelije može rezultirati kao posledica prekomerne autofagije. Ova forma ćelijske smrti se razlikuje od apoptoze ili nekroze i karakteriše je proces autofagije (192, 193). Precizna funkcija autofagije kod sisarskih ćelija nije u potpunosti razjašnjena (194, 195) ali je u vezi sa nekim patološkim stanjima, uključujući i rak (196). Zaista, angažovanje mTOR puta, koji se aktivira signalizacijom PI3 kinaza, sugerise da autofagija može biti diferencijalno regulisana u toku maligne bolesti.

2 CILJ RADA

Pronalaženje agenasa sa potencijalnim antitumorskim dejstvom je imperativ u modernoj onkologiji. Pri tome se sve više zapaža da određene hemijske strukture imaju specifičnije toksično dejstvo na maligne ćelije. Zbog toga se takva saznanja koriste u planiranju i organskoj sintezi novih jedinjenja od kojih se očekuje određeno dejstvo.

U ovom radu smo testirali citotoksično dejstvo, kao i moguće mehanizme dejstva šest mešovutih steroidnih tetraoksana prema pet tumorskih ćelijskih linija: HeLa (humani adenokarcinom cerviksa), Fem-x (humani melanom), MDA-MB-361 i MDA-MB-453 (tumor dojke), K562 (humana mijeloidna leukemija).

Eksperimenti koji rasvetljavaju intenzitet i mehanizme antitumorskog dejstva su pri tome nezaobilazni put u razvoju novih lekova u onkologiji.

Zbog toga je cilj ovog rada:

- 1) da se odredi nivo citotoksičnog dejstva grupe mešovutih tetraoksana prema različitim humanim malignim ćelijama,
- 2) da se odredi koeficijent selektivnosti u njihovom dejstvu u odnosu na zdrave imunokompetentne ćelije.

U cilju dobijanja uvida u mehanizam dejstva istitivanih jedinjenja koristiće se biohemijski citometrijski i fluorometrijski testovi čime će se:

- 3) odrediti tip ćelijske smrti koju indukuju ispitivani tetraoksani,
- 4) odrediti da li ispitivane supstance zaustavljaju rast tumorskih HeLa ćelija u određenoj fazi ćelijskog ciklusa,
- 5) odrediti produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta u Hela ćelijama nakon inkubacije sa ispitivanim tetraoksanima.

Cilj 3D QSAR studije o antiproliferativnoj aktivnosti trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanska derivata prema Hela i Fem-x tumorskim ćelijskim linijama, je bio da se utvrdi:

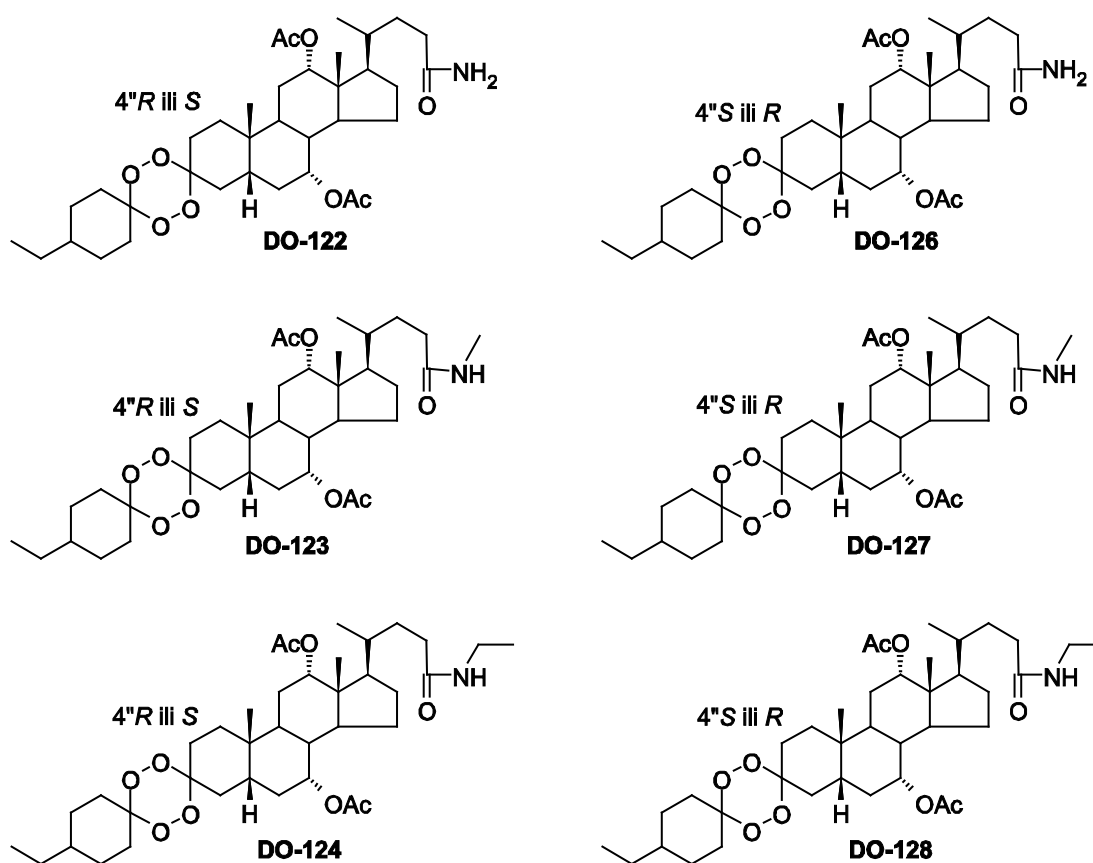
- 6) koje su najvažnije farmakofore steroidnih tetraoksana koje utiču na potenciju ispitivanih jedinjenja prema HeLa i Fem-x tumorskim ćelijskim linijama.

QSAR analiza može ukazati na strukturu novih jedinjenja sa potencijalno višom antitumorskom aktivnošću.

3 MATERIJAL I METODE

3.1 SINTEZE I STRUKTURE ISPITIVANIH JEDINJENJA

Jedinjenja **DO-122-124** i **DO-126-128** (slika 3-1) sintetisana su polazeći od odgovarajućih tetraoksanskih kiselina (49). Polazne kiseline prevedene su u mešovite anhidride upotrebom etil-hlorformijata, koji su u narednom koraku, kuplovanjem sa odgovarajućim aminima, prevedeni u željene amide, u prosečnom prinosu od 80 %. Strukture svih dobijenih amida potvrđene su uobičajenim spektroskopskim i analitičkim metodama (^1H i ^{13}C NMR, MS, IR, elementarna analiza).



Slika 3-1. Strukture ispitivanih tetraoksana

3.2 HRANLJIVA PODLOGA (MEDIJUM) I REAGENSI

RPMI 1640 medijum sa i bez fenol reda, L-glutamin, penicilin/streptomicin, HEPES i MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), nabavljeni su od "Sigma Chemicals Co". Serum fetalnog govečeta (FCS), dobijen je iz „Veterinarskog zavoda“ (Novi Sad).

3.3 PRIPREMA ISPITIVANIH SUPSTANCI

Stok rastvori ispitivanih tetraoksana su načinjeni u dimetil sulfoksidu (DMSO) u koncentraciji od 10 mM i potom razblaživani u hranljivoj podlozi do odgovarajućih radnih koncentracija. Korišćena hranljiva podloga je RPMI 1640 medijum u koji je dodato 3 mmol/L l-glutamina, 100 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicillina, 10 % FCS-a i 25 mM Hepesa, podesenog na pH 7.2 bikarbonatnim rastvorom. MTT je bio rastvoren u PBS-u pH 7,2 u koncentraciji od 5 mg/ml i filtriran kroz Millipore filter (0,22 µm) pre upotrebe.

3.4 ĆELIJSKE LINIJE

3.4.1 Tumorske ćelijske linije

U radu su korišćene tumorske ćelijske linije nabavljene od ATCC-a (American Type Culture Collection) i to: HeLa (humani adenokarcinom cerviksa), Fem-x (humani melanom), MDA-MB-361 i MDA-MB-453 (tumor dojke) i K562 (humana mijeloidna leukemija). Ćelije su gajene u jednoslojnoj kulturi, izuzev K562 ćelija koje su gajene u suspenziji u kompletnom hranljivom medijumu, na 37 °C u vazduhu obogaćenom sa 5% CO₂ i zasićenom vodenom parom. Za rast MDA-MB-361 i MDA-MB-453 ćelija kompletni hranljivi medijum je obogaćen sa 1,11g/l glukoze.

3.4.2 Priprema mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC)

Mononuklearne ćelije periferne krvi su izolovane iz heparinizirane venske krvi (dobrovoljnih davaoca), centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću Lymphoprep-a (Nycomed, Oslo, Norway). Interfazne ćelije su isprane tri puta Haemaccel-om (vodeni rastvor 145 mM Na⁺, 5.1 mM K⁺, 6,2 mM Ca²⁺, 145 mM Cl⁻ i 35 g/L polimera želatina, pH 7,4) izbrojane i resuspendovane u hranljivoj podlozi sa 10 % FCS.

3.5 ODREĐIVANJE INTENZITETA CITOTOKSIČNOG DEJSTVA ISPITIVANIH TETRAOKSANA

Citotoksično dejstvo agenasa može biti direktno kada se indukuje direktna smrt ćelije ili indirektno kada se indukuje reproduktivna ćelijska smrt, kada je ćelija živa, ali se ne umnožava. Citotoksično dejstvo ispitivanih tetraoksana je procenjeno indirektnim putem preko određivanja preživljavanja ciljnih ćelija nakon njihovog rasta u prisustvu tih agenasa.

Preživljavanje ćelija (S - engl. *Survival*) se definiše kao odnos broja preživelih ćelija u uzorku tretiranom ispitivanim agensom (N_L) i broja ćelija u kontrolnom uzorku u kome su ćelije rasle samo u prisustvu hranljive podloge (N_K). Obično se izražava u procentima (S %).

$$S (\%) = (N_L/N_K) \cdot 100$$

Iz dobijenih vrednosti načinjen je dijagram koji predstavlja procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanih jedinjenja. Iz tog dijagrama se određuje mera intenziteta citotoksičnog dejstva nekog jedinjenja koja je karakteristična za svako jedinjenje, IC₅₀ vrednost. IC₅₀ se definiše kao ona koncentracija koja snižava preživljavanja ciljnih ćelija na 50 % u odnosu na kontrolni uzorak. IC₅₀ je obrnuto srazmerna intenzitetu citotoksičnog dejstva nekog

jedinjenja. IC_{50} dobijena na osnovu izmerenih preživljavanja ćelija je mera i direktne i indirektno - reproduktivne toksičnosti.

Postoji niz metoda za određivanje preživljavanja ćelija, neke se baziraju na direktnom brojanju ćelija ili kolonija ćelija u uzorku, a neke su indirektno. Indirektno metode mogu biti kolorimetrijske ili su bazirane na merenju intenziteta ugradnje radionuklida u biomakromolekule.

3.5.1 Citotoksični MTT test za određivanje preživljavanja ćelija u kulturi

Kolorimetrijske metode bazirane na redukciji tetrazolijumskih soli, koriste se sa ciljem da omoguće kvantifikaciju ćelijske proliferacije. Tetrazolijumske soli se u metabolički aktivnim ćelijama brzo redukuju do formazana. S obzirom da su formazani intenzivno obojeni ove soli mogu biti kolorimetrijski reagens za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija. Ukratko, tetrazolijumska so se dodaje u kulture ćelija zasađenih u mikrotitar pločama sa 96 otvora i zatim se apsorbanca produkovanog formazana meri spektrofotometrijski na 570 nm (197).

3.5.2 Tretman tumorskih ćelija (određivanje ćelijskog preživljavanja)

Tumorske HeLa (2000 ćelija po otvoru u 100 μ l podloge), Fem-x (2000 ć/o.), MDA-MB-361 (10000 ć/o) i MDA-MB-453 (3000 ć/o) ćelije su sađene u mikrotitar ploče sa ravnim dnom sa 96 otvora i 20 h kasnije, posle ćelijske adherencije pet različitih koncentracija ispitivanih agenasa dodate su u otvore ploča da bi finalne koncentracije bile u opsegu od 3,125-50 μ M. Neadherentne K562 (5000 ć/o) ćelije sađene su 2 h pre dodavanja ispitivanih supstanci. Po dodavanju supstanci ćelije su inkubirane 72 h na 37 °C u vazduhu zasićenom vodenom parom i 5 % CO_2 . Po isteku 72 h ćelije su fotografisane na invertnom mikroskopu, a zatim je u otvore ploča dodato po 20 μ l rastvora MTT-a (5 mg/ml u PBS-u), potom su ćelije

inkubirane 4 h i zatim je redukcija MTT-a u obojeni formazan prekinuta dodavanjem 100 μ l 10 % SDS-a.

Apsorbanca je merena na 570 nm 24 h kasnije. S obzirom da je prethodno utvrđeno da je apsorbanca novonastalog formazana direktno srazmerna broju živih ćelija, da bi dobili preživljavanje ćelija (S %), A uzorka sa ćelijama tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih tetraoksana (A_L), podeljena je apsorbancom kontrolnih netretiranih ćelija (A_K) i potom je ta vrednost pomnožena sa 100. Apsorbanca blanka je uvek oduzeta od apsorbance odgovarajućeg uzorka.

$$S(\%) = (A_L/A_K) \cdot 100$$

Pri čemu je:

A_L - Apsorbanca uzorka u kome su ćelije rasle u prisustvu tetraoksana

A_K - Apsorbanca kontrolnih ćelija

3.5.3 Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane iz krvi dobrovoljnih davalaca, su sadene (150000 ćelija po otvoru mikrotitar ploča) u hranljivoj podlozi bez dodatka ili u podlozi sa dodatkom 5 μ g/mL fitohemaglutinina (phytohaemagglutinin-PHA, Welcome Diagnostics, England). Dva časa kasnije pet različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja su dodata PHA stimulisanim i nestimulisanim PBMC u opsegu koncentracija od 12,5-200 μ M.

3.6 MORFOLOŠKA ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI

U cilju određivanja tipa ćelijske smrti indukovane tretmanom ispitivanim tetraoksanima načinjena je morfološka analiza HeLa ćelija obojenih smešom akridin oranža i etidijum bromida. HeLa ćelije su sadene preko noći na pokrovna mikroskopska stakla ($5 \cdot 10^4$) u 2 ml kompletnog hranljivog medijuma i sledećeg dana

su tretirane ispitivanim agensima, čije su koncentracije odgovarale dvostrukim IC₅₀ vrednostima. Posle 24 h, ćelije su bojene sa 15 µl smeše DNK boja, akridin oranža i etidijum bromida (3 µg/ml AO i 10 µg/ml EB u PBS-u) i posmatrane fluorescentnim mikroskopom uz korišćenje FITC (fluorescein izotiocijanat) filter seta. Tipične morfološke odlike apoptoznih ćelija su veoma kondenzovan hromatin i/ili fragmentisano jedro. Tokom rane apoptoze samo AO ulazi u ćeliju i jedro fluoresceira zeleno dok je membrana nepropustljiva za EB. U kasnoj apoptozi, sa gubitkom membranskog integriteta i AO i EB ulaze u ćeliju i jedro se boji narandžasto.

3.7 ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA NA PROTOČNOM CITOMETRU

Alikvoti 5×10^5 kontrolnih HeLa ćelija ili ćelija tretiranih 24, 48 ili 72 h ispitivanim tetraoksanima (koncentracije odgovaraju IC₅₀ za 72 h inkubacije) fiksirane su 5-7 dana u 70 % etanolu na -20 °C i potom centrifugirane. Talog je tretiran 30 minuta sa RNase A (100 µg/ml) na 37 °C i zatim inkubiran 30 minuta sa 40 µg/ml propidijum jodida (PI).

Ćelije su analizirane pomoću FACSCalibur protočnog citometra (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) opremljenog sa 15 mW, vazdušno hlađenim 488 nm, argon-jonskim laserom za ekscitaciju propidijum jodida, čija je fluorescenca (FL2) prikupljena nakon prolaska kroz 585/42-nm band pass filter.

FACSCalibur protočni citometar je opremljen i sa FL2 modulom za diskriminaciju dubleta (engl. *doublet discrimination module* - DDM) koji omogućava da se prate, a potom i isključe dubleti, tripleti kao i otpatci uginulih ćelija, grafičkim pikazom FL2-površine u odnosu na FL2-širinu signala (198).

Minimum od 10^4 događaja su prikupljeni na svakom uzorku. Analiza raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je načinjena sa ModFit LT softverom (Verity Software House, Toshan, ME, USA).

3.8 ANALIZA DNK FRAGMENTACIJE

HeLa ćelije (5×10^5 u 3 ml kompletnog medijuma) posađene su preko noći i posle adherencije, bile su tretirane 24 h rastvorima ispitivanih jedinjenja (čija je koncentracija odgovarala dvostrukoj vrednosti IC_{50} za inkubaciju od 72 h).

Detekcija internukleozomalnog sečenja DNK apoptoznih ćelija načinjena je korišćenjem neznatno izmenjenog postupka *Martin-a* i saradnika (199).

Ukratko, ćelije su prikupljene tripsinizacijom i resuspendovane u puferu za lizu (10 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8, sa 0,5 % natrijum dodecil sulfata i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K) i inkubirane 1 h na 50 °C u vodenom kupatilu.

Zatim je dodata RNase A u finalnoj koncentraciji od 0,25 $\mu\text{g/ml}$, a potom je inkubacija produžena još za 1 h na 50 °C.

DNK je izdvojena smešom fenola/hloroforma/isoamil alkohola (25:24:1).

Nakon prenosa vodenih faza u nove epruvete, DNK je precipitirala preko noći na -20 °C, u smeši 1/2 zapremine 7,5 M amonijum acetata i 2 zapremine 100 % ledeno hladnog etanola.

DNK je staložena centrifugiranjem 15 minuta na $13000 \times g$, osušena na vazduhu na sobnoj temperaturi i resuspendovana u TE puferu (10 mM Tris-Cl, pH 8, 1 mM EDTA).

Uzorci su dopunjeni puferom za uzorak (0,25 % bromofenol plavo, 50 % glicerola, kao i 10 mM EDTA) u odnosu 5:1.

Uzorci DNK su elektroforetski razdvojeni 1 h u 1,8 % agaroznom gelu koji sadrži 1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromida, na 140 V korišćenjem TBE pufera (2 mM EDTA, pH 8, 89 mM Tris, 89 mM borne kiseline).

3.9 ODREĐIVANJE PRODUKCIJE INTRAĆELIJSKIH REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA (ROS)

Produkcija intraćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) je merena pomoću fluorescentne boje 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetata (H₂DCFDA - Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) nepolarnog jedinjenja koje lako difunduje u ćelije, gde se hidrolizuje (unutarćelijskim esterazama) do polarnog jedinjenja čiji je pasivni transport iz ćelije onemogućen. U prisustvu oksidativnog agensa, H₂DCFDA se konvertuje u snažno fluorescentni 2',7'-dichlorofluorescein (DCF).

Ćelije su inkubirane sa H₂DCFDA 30 minuta, potom tretirane sa naznačenom koncentracijom tetraoksana 1 h. Po tri kulture su bile pripremljene za svaki test. Intraćelijska oksidacija H₂DCFDA praćena je preko povećanja fluorescence koja je merena fluorometrom (Ascent FL – Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost relativnog intenziteta fluorescence (RFU) ± SD.

3.10 3D QSAR TEST - ISPITIVANJE RELACIJE IZMEĐU BIOLOŠKE AKTIVNOSTI JEDINJENJA I NJIHOVE STRUKTURE

Naćinjena je 3D QSAR studija bazirana na antiproliferativnoj aktivnosti trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanskih derivata prema HeLa i Fem-x ćelijskim linijama (tabela 3-1).




Trodimenzionalne strukture osnovnih steroidnih jezgara generisala je CORINA - 3D strukturni generator (200). Supstituenti na steroidna jezgra su dodati uz pomoć VEGA ZZ 2.3.1 (201). Jedinjenja **1-5** su skicirana u ISIS Draw 2.5 (202) i prebaćena u 3D uz pomoć VEGA ZZ. Molekularni potencijal lipofilnosti (MLP) (203) tj lipofilnost jedinjenja zavisao od konformacije izraćen je kao virtuelni *logP* i procenjen je od strane VEGA ZZ. Optimizovane strukture bile su ulazni parametar za Pentacle program (204).

Molekularna polja interakcije (MIF) dobijene su uz pomoć GRID 22b (205) i vizuelizovane sa GVIEW. Procena interakcionih energija (IE) MIF ćvorova dobijenih

Pentacle modelima, je takođe načinjena uz pomoć GRID. MIF izovolumeni su ekstrahovani uz pomoć BIOUCUBE (206) (moćne *in silico* strategije bazirane na kombinaciji dva računarska alata - MLP i MIF).

Svi proračuni su obavljena na Intel Dual Core procesoru (~ 5 GHz) u Windows okruženju.

Tabela 3-1. Strukture jedinjenja 1-33.

Jedinjenje broj	R ¹	R ²	Y	X
1	I	II	/	-OCH ₃
2	I	II	/	-OH
3	I	II	/	NH ₂
4	I	II	/	NHCH ₂ CH ₂ CH ₃
5	I	II	/	NHCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
6	I	V	/	-OCH ₃
7	I	V	/	-OH
8	I	V	-NH-	-H
9	I	V	-NH-	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
10	I	V	-N<	-(CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂
11	I	V	/	
12	III	V	-OMe	-H
13	III	V	-OMe	-CH ₃ (4''R)
14	III	V	-OMe	-CH ₃ (4''S)
15	III	V	-OMe	-spiro-cyclopentyl
16	III	V	-OMe	-spiro-cyclooctyl
17^a	V	V	-N<	-(CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂
18	V	V	/	
19	V	V	/	-H
20	V	V	-NH-	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
21	V	V	/	-OH
22^a	V	V	-NH-	-CH ₂ C(O)OCH ₃
23	V	V	/	
24	V	V	-NH-	-H
25	V	V	-NH-	-CH ₂ CH ₂ CH ₃
26	V	V	/	-OH
27	V	V	/	-OCH ₃
28 (Do122)	IV	V	-NH-	-H (4''R)
29 (Do126)	IV	V	-NH-	-H (4''S)
30 (Do123)	IV	V	-NH-	-CH ₃ (4''R)
31 (Do127)	IV	V	-NH-	-CH ₃ (4''S)
32 (Do124)	IV	V	-NH-	-CH ₂ CH ₃ (4''R)
33 (Do128)	IV	V	-NH-	-CH ₂ CH ₃ (4''S)

3D QSAR je načinjena pomoću GRIND metodologije, gde su deskriptori izvedeni iz GRID polja molekularne interakcije (engl. *Molecular interaction fields* - MIF). Polja molekularne interakcije (MIFs), dobijena su GRID metodologijom (205).

3D-QSAR model generisao je Pentacle. Pentacle softver je računarski alat za izračunavanje molekularnih deskriptora, koji se nazivaju GRid -INdependent Descriptors ili GRIND (207). U cilju dobijanja molekularnih deskriptora, prvi korak je izračunavanje MIF. MIF, dobijeni GRID programom, predstavljaju interakcije korišćenih proba i ciljnih molekula.

Sledeći korak je da se pojednostave dobijeni MIF u cilju dobijanja najrelevantnijih regiona interakcije proba sa ciljnim molekulima. Važne pozicije oko molekula (*hot spots*) su izdvojene iz MIF korišćenjem AMANDA algoritma za diskretizaciju (204). Završni korak je kodiranje filtriranih MIF u GRIND varijable i program Pentacle koristiti „*maximal auto- and cross-correlation*“ (MACC2) algoritam za ovu svrhu. Dobijena ključna mesta trebalo bi da predstavljaju 3D pozicije u tačkama interakcije molekula, i trebalo bi da oblikuju virtuelno receptorsko mesto (engl. *virtual receptor site* - VRS).

Svaka promenljiva sadrži informacije o međusobnoj udaljenosti cvor-cvor distance i proizvoda IE cvorova. Promenljive, koje predstavljaju interakciju između parova čvorova, proizvedenih od strane istih (*auto-correlograms*) ili drugačijih proba (*cross-correlograms*), su grupisane u blokove gradeći matricu deskriptora koji mogu ući u analizu glavnih komponenti (engl. *principal component analysis* - PCA) i parcijalnoj regresionoj analizi najmanjih kvadrata (engl. *partial least squares* - PLS) (208).

Cilj metode je da se korelišu podaci u vezi sa strukturnim fragmenatima jedinjenja sa numerickim vrednostima potencije. Važni strukturni fragmenti su kodirani u varijablama koje imaju visok intenzitet u modelima.

Za izračunavanje MIF, korišćene su četiri probe (O, N1, DRY, TIP). O proba predstavlja sp^2 karbonilni kiseonik - akceptor vodonične veze (HBA), N1 proba neutralni NH - donor vodonične veze (HBD), DRY je hidrofobna proba, a TIP proba je deskriptor oblika molekula.

Razmak mreže je podešen na 0,4 Å, a ostali parametri su zadržani na svojim standardnim vrednostima.

4 REZULTATI

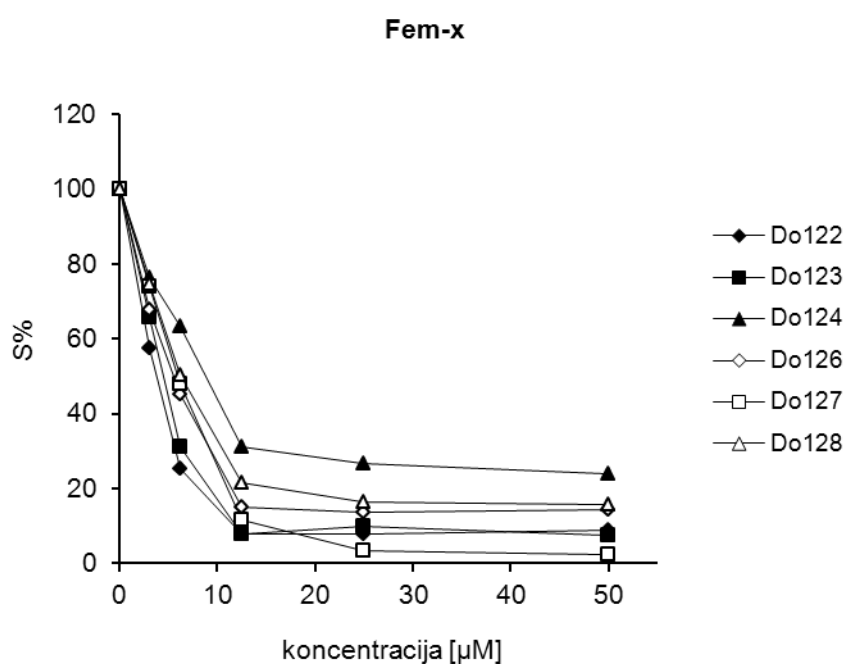
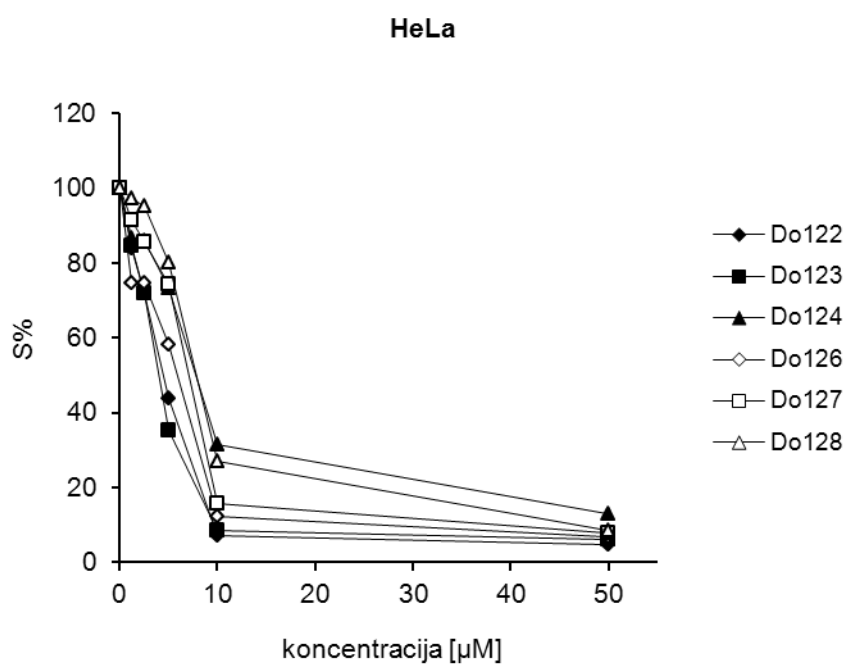
4.1 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST ISPITIVANIH TETRAOKSANA PREMA TUMORSKIM ĆELIJAMA I MONONUKLEARNIM ĆELIJAMA PERIFERNE KRVI DOBROVOLJNIH DAVALACA *IN VITRO*

Antiproliferativna aktivnost tetraoksana **DO-122 - DO-124** i **DO-126 - DO-128** utvrđena je prema pet humanih tumorskih ćelijskih linija:

- HeLa - ćelije cervikalnog karcinoma
- Fem-x - ćelije melanoma
- MDA-MB-361 i MDA-MB-453 - ćelijske linije raka dojke i
- K562 - ćelijska linija mijeloidne leukemije.

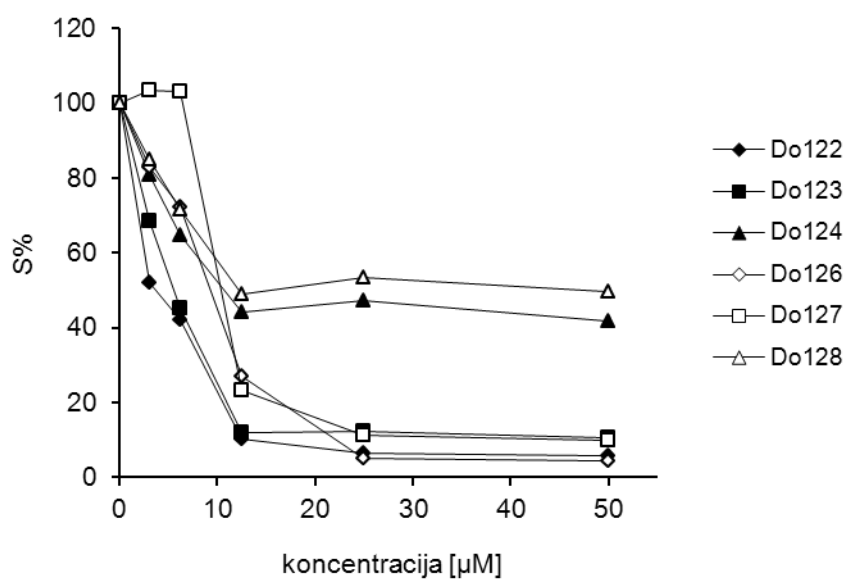
Sva jedinjenja su takođe ispitivana i u pogledu citotoksične aktivnosti prema mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC) dobrovoljnih davalaca stimulisanih ili nestimuliranih fitohemaglutininom (PHA).

Ispitivani tetraoksani pokazuju dozno-zavisnu antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim koncentracijama (opseg korišćenih koncentracija je bio od 3,125 - 50 μ M) prema ciljnim tumorskim ćelijama, što je određeno MTT testom, uz dobru selektivnost u aktivnosti prema tumorskim ćelijama, u odnosu na normalne imunokompetentne ćelije (slike 4-1-a-d, i tabele 4-1 i 4-2).

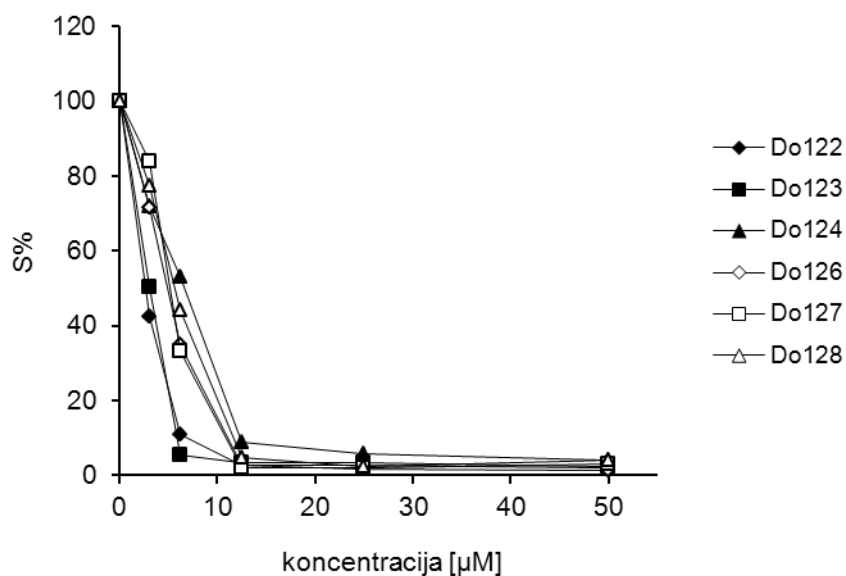


Slika 4-1-a. Preživljanje tumorskih HeLa i Fem-x ćelija utvrđeno MTT testom, posle 72 h kontinuiranog delovanja tetraoksana, prezentovano je u funkciji različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja.

MDA-MB-361

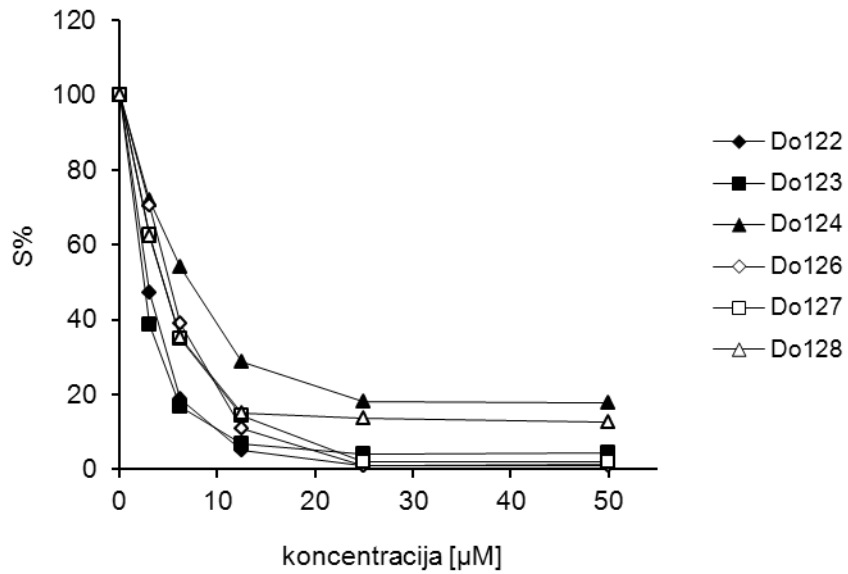


MDA-MB-453

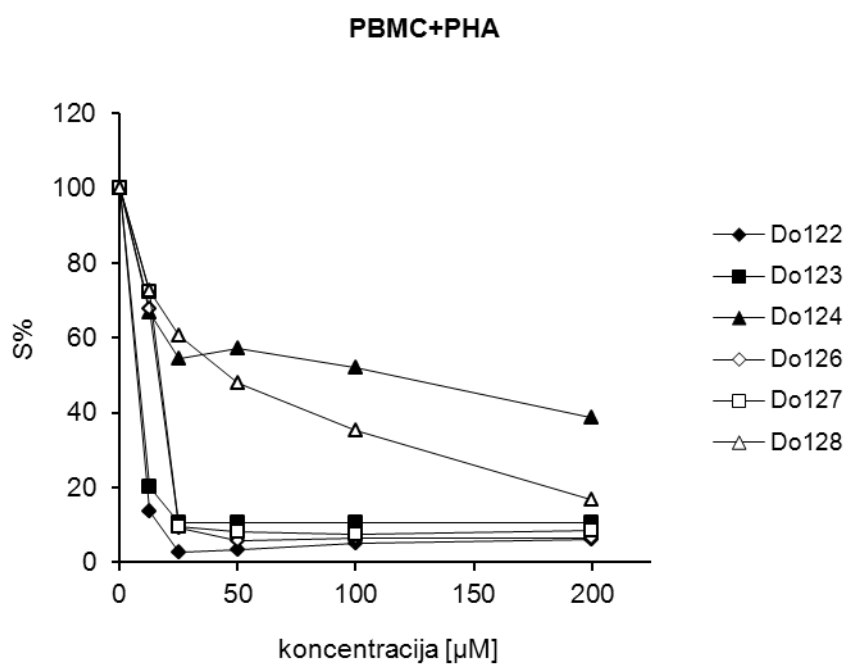
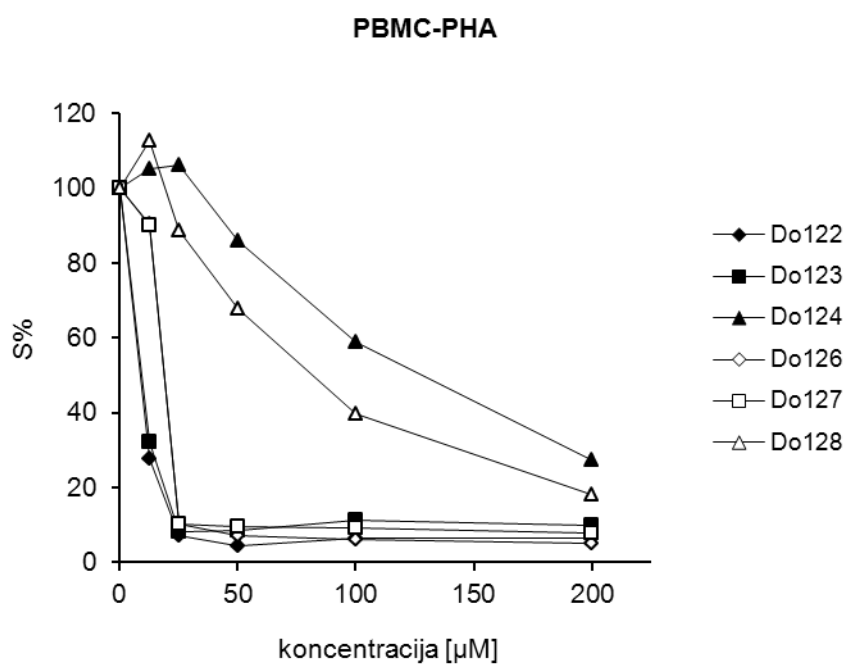


Slika 4-1-b. Preživljanje tumorskih MDA-MB-361 i MDA-MB-453 ćelija utvrđeno MTT testom, posle 72 h kontinuiranog delovanja tetraoksana, prezentovano je u funkciji različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja.

K562



Slika 4-1-c. Preživljanje tumorskih K562 ćelija utvrđeno MTT testom, posle 72 h kontinuiranog delovanja tetraoksana, prezentovano je u funkciji različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja.



Slika 4-1-d. Preživljanje stimuliranih (+PHA) ali nestimuliranih (-PHA) mononuklearnih celij periferne krvi dobrovoljnih davalca utvrđeno MTT testom, posle 72 h kontinuiranog delovanja tetraoksana, prezentovano je u funkciji različnih koncentracija ispitivanih jedinjenja.

In vitro citotoksične aktivnosti ispitivanih tetraoksana prema ćelijama karcinoma grlića materice (HeLa), malignog melanoma (Fem-x), raka dojke (MDA-MB-361 i MDA-MB-453) i mijeloidne leukemije (K562), određene su MTT testom. Vrednosti IC₅₀ ispitivanih jedinjenja su sumarno prikazane na tabeli 4-1.

Najsnažnije citotoksično dejstvo ispoljavaju supstance **DO-122** (IC₅₀=3.9±0,8 μM na K562 ćelijama) i **DO-123** (IC₅₀=3.6±0,8 μM na K562 ćelijama). Uopšteno govoreći K562 ćelije su i najosetljivije na dejstvo svih agenasa sa 1,2 - 2 puta nižim IC₅₀ vrednostima u odnosu na ostale ćelijske linije. Jedini izuzetak je citotoksični efekat supstance **DO-126** kod koje je aktivnost najveća prema melanomskim Fem-x ćelijama (IC₅₀=5,0±0,7 μM), pa zatim prema K562 ćelijama (IC₅₀=5,6±0,3 μM). S druge strane najnižu aktivnost su ispoljile supstance **DO-124** (IC₅₀=11,2±0,4 μM na MDA-MB-361 ćelijama) i **DO-128** (IC₅₀=12,0±0,4 μM na MDA-MB-361 ćelijama). Sve ispitivane supstance su ostvarile najniži efekat prema MDA-MB-361 ćelijama koje se od svih ispitivanih tumorskih ćelija najređe dele, pa je u skladu sa tim i zabeležena nešto niža aktivnost ispitivanih citotoksičnih agenasa.

Tabela 4-1. Koncentracije ispitivanih tetraoksana koje indukuju 50 % pad u preživljavanju (IC₅₀) tumorskih i mononuklearnih ćelija periferne krvi.

ćelijska linija	IC ₅₀ [μM] Av±SD*					
	DO-122	DO-123	DO-124	DO-126	DO-127	DO-128
HeLa	5,3±0,8	4,9±1,2	6,9±0,7	6,1±0,3	6,7±0,3	6,9±0,8
Fem-x	4,3±0,3	4,5±0,1	8,82±0,01	5,0±0,7	7,0±1,4	6,7±0,4
MDA-MB-361	6,4±2,1	6,5±1,4	11,2±0,4	7,7±1,8	10,1±0,6	12,0±0,4
MDA-MB-453	4,6±1,4	4,8±1,2	9,3±2,4	6,6±1,4	8,4±2,3	8,6±2,4
K562	3,9±0,8	3,6±0,8	6,5±1,8	5,6±0,3	6,2±1,1	5,5±0,7
PBMC-PHA	11,8±3,2	9,22±0,03	135,0±7,0	19,0±0,2	19,3±0,6	84,8±3,1
PBMC+PHA	7,6±0,4	8,0±0,1	126,3±11,2	16,4±0,1	17,1±0,2	54,6±8,6

* Rezultati su srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta

Ono što je posebno važno je da su epimerni N-etil-amidi, **DO-124** i **DO-128** pokazali dobru selektivnost (SI vrednost) u antitumorskoj aktivnosti, za red veličine veću u odnosu na ostale agense (tabela 4-2). Za supstance koje imaju SI vrednost veću od 3 smatra se da imaju visoku selektivnost (209), te se za supstance **DO-124** i **DO-128** može reći da poseduju veoma visoku selektivnost.

Tabela 4-2. Indeks selektivnosti (SI) ispitivanih tetraoksana kao odnos IC_{50} vrednosti za PBMC (bez ili sa 5 μ g/ml PHA) i IC_{50} vrednosti za K562 ćelije.

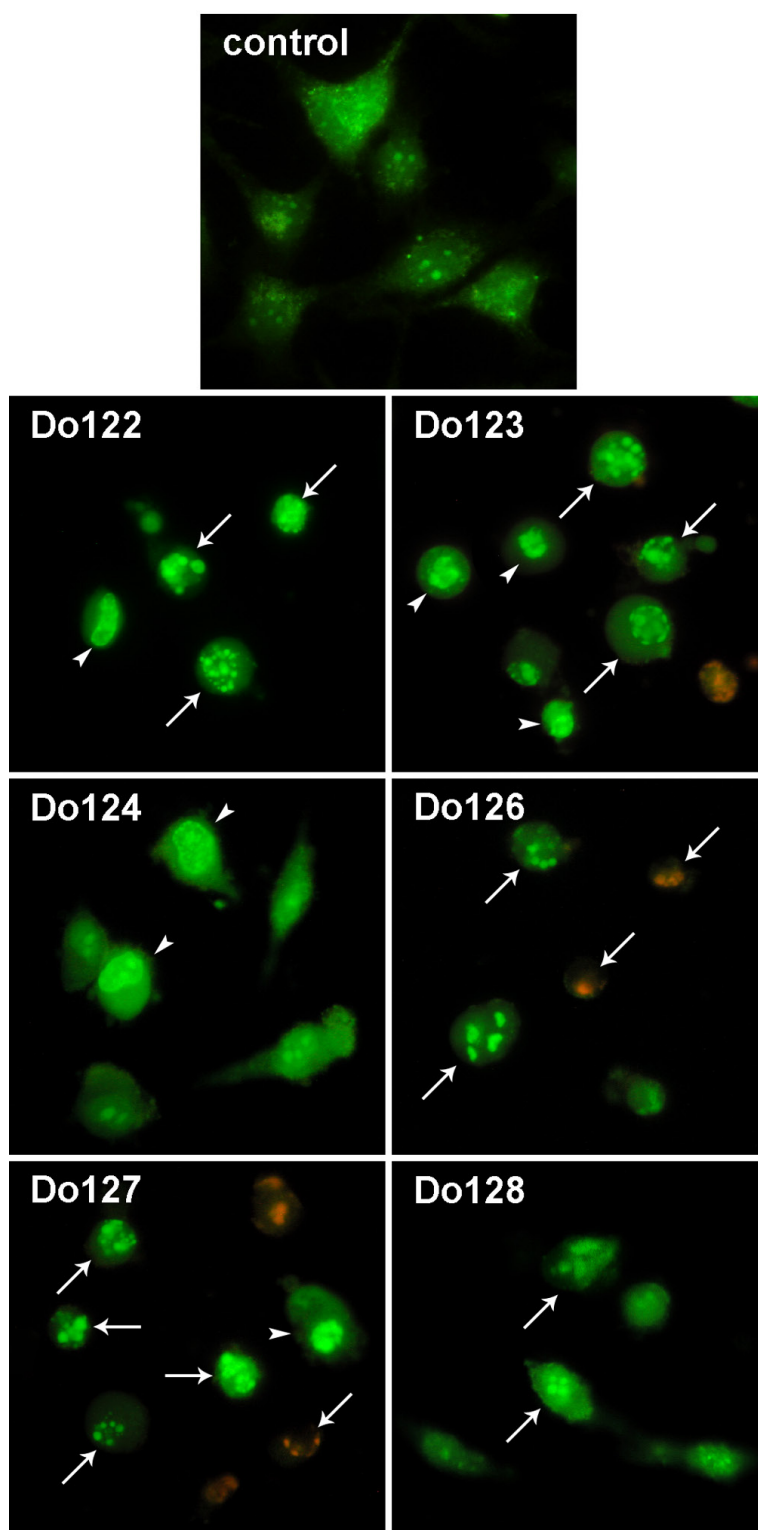
	SI*					
	DO-122	DO-123	DO-124	DO-126	DO-127	DO-128
IC_{50} PBMC-PHA/ IC_{50} K562	3.0	2.6	20.8	3.4	3.1	15.4
IC_{50} PBMC+PHA/ IC_{50} K562	1.9	2.2	19.4	2.9	2.8	9.9

*Rezultati selektivnosti za ostale ćelijske linije su izostavljeni zbog preglednosti.

4.2 REZULTATI MORFOLOŠKE ANALIZE ĆELIJSKE SMRTI HELA ĆELIJA I BIOHEMIJSKOG TESTA FRAGMENTACIJE INTERNUKLOZOMALNE DNK

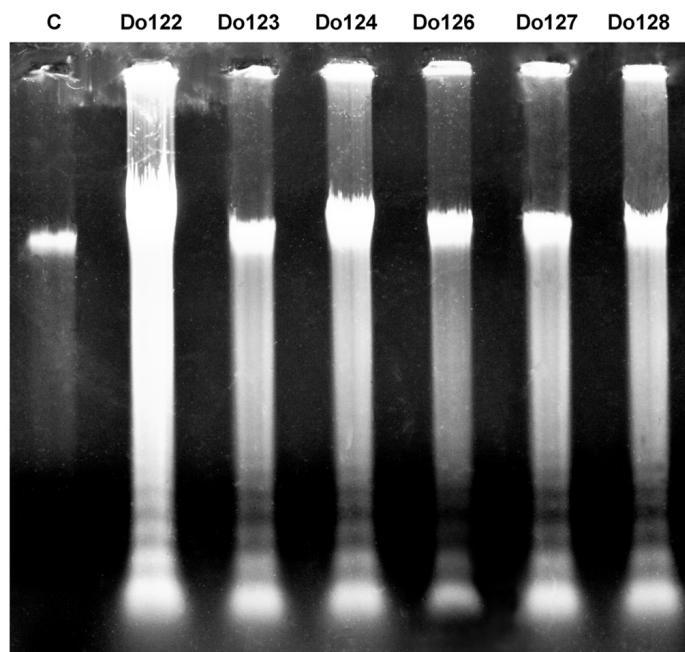
U cilju određivanja tipa ćelijske smrti HeLa ćelija izazvane inkubacijom sa ispitivanim tetraoksanima, načinjena je morfološka analiza mikroskopskim pregledom ćelija obojenih akridin oranžom i etidijum bromidom na fluorescentnom mikroskopu.

Na slici 4-2 je prikazano da 24-časovni tretman HeLa ćelija sa svim ispitivanim tetraoksanima (koncentracije odgovaraju $2 \times IC_{50}$ u tretmanu od 72 h) indukuju tipične morfološke karakteristike kasne apoptoze (kondenzovana i/ili fragmentisana jedra).



Slika 4-2. Indukcija apoptoze u HeLa ćelijama tretmanom ispitivanim tetraoksanima. Sveže gajene HeLa ćelije tretirane su ispitivanim agensima 24 časa na 37 °C, kao što je opisano u „Materijalima i metodama“. Duge strelice ukazuju na apoptotične ćelije sa fragmentisanim jedrom, dok kratke strelice označavaju ćelije sa kondenzovanim hromatinom.

Ovi rezultati su potvrđeni testom fragmentacije DNK (slika 4-3). Biohemijsko obeležje apoptoze je fragmentacija genomske DNK, nepovratni događaj koji neumitno dovodi do smrti ćelije.



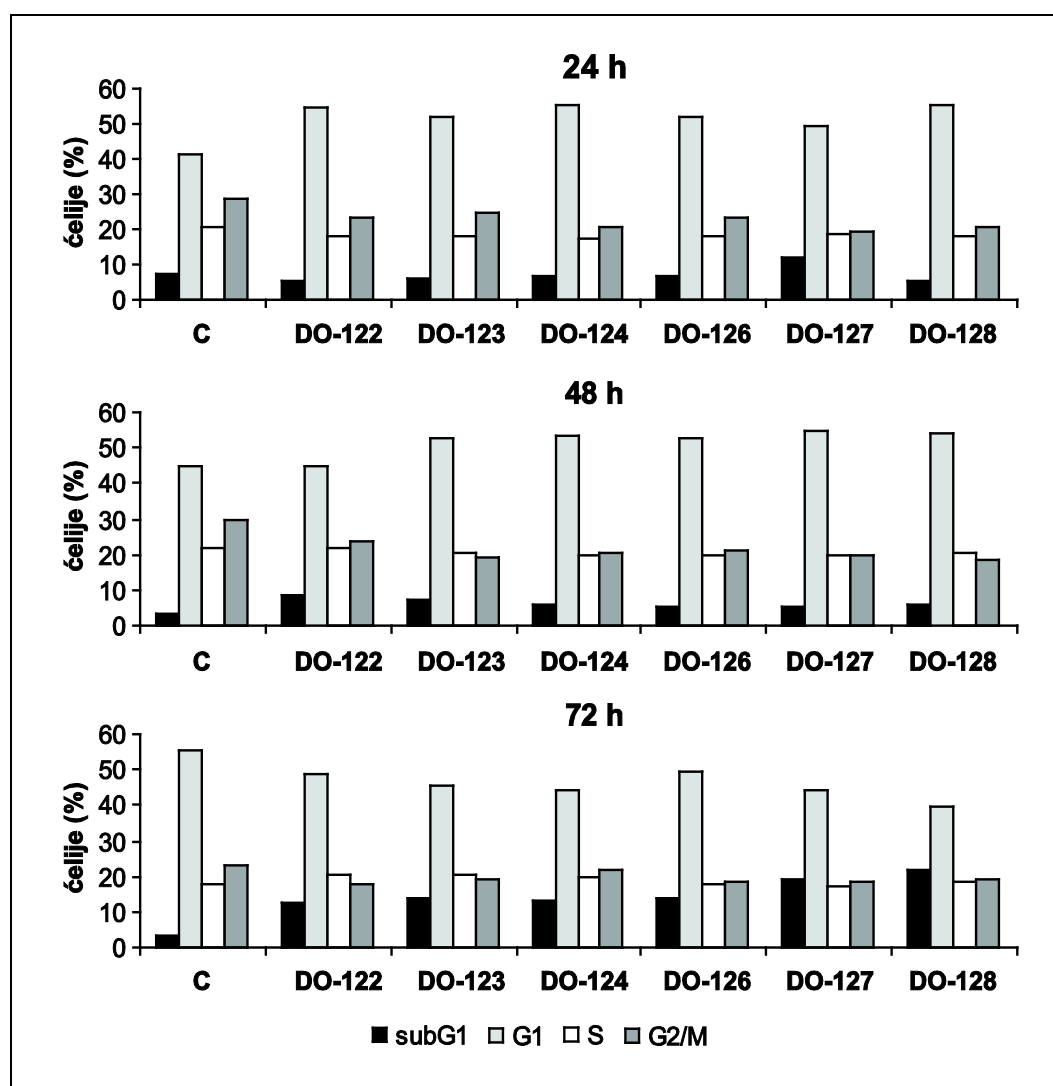
Slika 4-3. Internukleozomalna DNK fragmentacija (DNK laddering formacija) u HeLa ćelijama izazvana tretmanom od 24 h sa ispitivanim jedinjenjima. DNK iz netretiranih kontrolnih HeLa ćelija (traka C) i ćelija tretiranih tetraoksanima je elektroforetski razdvojena na 1,8% agaroznom gelu i bojena etidijum bromidom.

U mnogim sistemima, pokazano je da je DNK fragmentacija rezultat aktiviranja endogene endonukleaze. Ovaj enzim selektivno cepa DNK na mestima lociranim između nukleozoma (tzv. linker DNK) dajući mono i oligonukleozomalne DNK fragmente.

Ovi fragmenti DNK, razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu daju prepoznatljiv uzorak lestvice i sastoje se od umnožaka DNK od oko 180 bp (167).

4.3 REZULTATI ODREĐIVANJA DISTRIBUCIJE FAZA ĆELIJSKOG CIKLUSA HELA ĆELIJA TRETIRANIH ISPITIVANIM TETRAOKSANIMA

U cilju daljeg utvrđivanja mehanizma delovanja ispitivanih jedinjenja u HeLa ćelijama učinjeno je određivanje distribucije faza ćelijskog ciklusa na protočnom citometru. Kao što se vidi na slici 4-4, posle 24 i 48 časova inkubacije sa tetraoksanima, broj HeLa ćelija u G1 fazi se značajno uvećava.

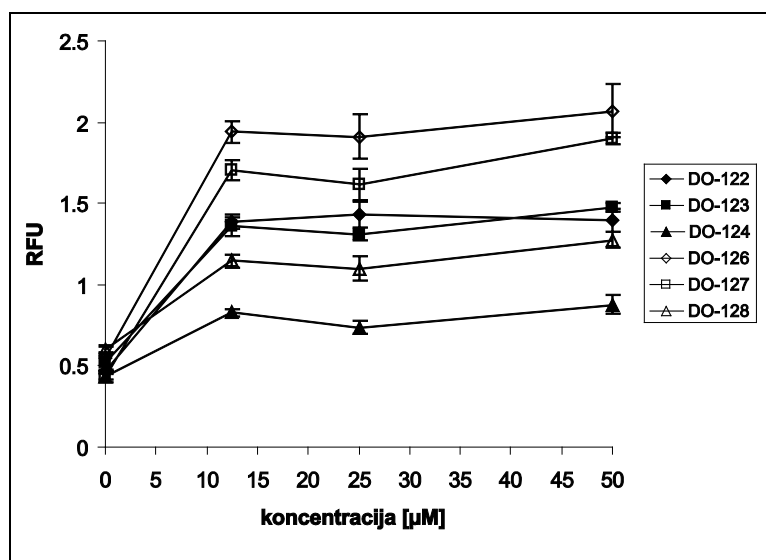


Slika 4-4. Distribucija faza ćelijskog ciklusa posle 24, 48 i 72 h kontinuiranog delovanja ispitivanih tetraoksana na HeLa ćelije. Nakon izlaganja tetraoksanima za označene vremenske periode (koncentracija je odgovarala vrednosti IC_{50} za 72 h inkubacije), ćelije su prikupljene, bojene propidijum jodidom i podvrgnute protočnoj citometriji. (C - kontrolne HeLa ćelije).

Procenat ćelija u sub-G1 frakciji nije značajno viši od kontrolnih ćelija posle 24 i 48 h tretmana, ali posle 72 h broj ćelija u sub-G1 se uvećava kod svih ispitivanih jedinjenja (od 12.35% za **DO-122** do 21.65% za **DO-128**, prema 3,3% kod kontrolnih ćelija).

4.4 REZULTATI ODREĐIVANJA PRODUKCIJE REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA U HELA ĆELIJAMA

Mnogi endoperoksidi indukuju snažan oksidativni stres, koji može dovesti do indukcije apoptoze u osetljivim ćelijama. S obzirom da tumorske ćelije sadrže veću količinu gvožđa od zdravih korespondirajućih ćelija, bilo je realno verovati da i tetraoksani mogu reagovati sa gvožđem, generišući alkoksi radikale (RO \cdot) ili čak i snažno reaktivne hidroksilne radikale (HO \cdot) koji nastaju u Fentonovoj reakciji. Da bismo dobili dublji uvid u mehanizam ćelijske smrti indukovane tetraokasnima, testirali smo produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u HeLa ćelijama tretiranim ovim jedinjenjima.



Slika 4-5. Rezultati određivanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika u HeLa ćelijama. Ćelije su pretretirane sa H₂DCFDA, tretirane naznačenim koncentracijama tetraoksana, a produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta je merena kako je opisano u poglavlju „Materijali i metode“. Tri kulture ćelija su pripremljene za svaki test, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD.

Nakon tretmana HeLa ćelija ispitivanim tetraoksanima, nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta je značajno porastao (slika 4-5) ukazujući na mogući oksidativni stres, možda i kao rezultat produkcije reaktivnih alkoksi ili hidroksilnih radikala. Uzeti svi zajedno, ovi rezultati pokazuju da tetraoksani potentno generišu ROS i dovode do apoptoze ciljnih HeLa ćelija.

4.5 3D QSAR STUDIJA ANTIPROLIFERATIVNE AKTIVNOSTI 1,2,4,5-TETRAOKSANA

Na kraju istraživanja načinjena je 3D QSAR studija o antiproliferativnoj aktivnosti trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanskih derivata prema tumorskim HeLa i Fem-x ćelijskim linijama. Korišćena je GRIND metodologija, gde su deskriptori izvedeni iz GRID polja molekularnih interakcija (MIF).

Utvrđeno je da su farmakofore kojima se može pripisati najznačajnije dejstvo, amidni NH primarnih ili sekundarnih amida i acetoksi fragmenti na pozicijama 7 i 12 steroidnog jezgra, koji su zajedno sa tetraoksanskim prstenom, zajednički za sva ispitivana jedinjenja.

Nezavisno od toga, jednostavni model multipne regresije dobijen korišćenjem celih molekularnih svojstava, potvrdio je da su hidrofobnost i svojstva donora vodoničnih veza glavni parametri koji utiču na potenciju jedinjenja prema humanim ćelijskim linijama karcinoma grlića materice (HeLa) i malignog melanoma (Fem-x). Posledica toga je i da su slični strukturni motivi važni za potenciju prema obe ispitivane ćelijske linije. Rezultati su sumarno predstavljeni na tabelama 4-3 i 4-4.

Tabela 4-3: Molekularne osobnosti jedinjenja 1-33 dobijene Vega ZZ i GRID/BIOCUBE programima

Comp N°	PSA (Å ²)	Virtual log <i>P</i>	Lipole (Broto)	O isovolume	N1 isovolume	DRY isovolume	p(IC ₅₀) (HeLa)	p(IC ₅₀) (FemX)
1	84.7	2.97	1.55	0	0.62	0.38	4.12	4.14
2	134.8	2.38	2.28	54.00	1.00	0.38	3.92	3.81
3	141.4	1.86	3.12	48.12	0.75	0.38	3.94	3.92
4	86.8	3.15	1.32	22.50	0.25	0.88	3.93	3.99
5	154.7	1.47	3.87	127.25	0.38	0.38	3.87	3.92
6	119.1	6.52	1.77	2.38	1.00	1.00	4.74	5.20
7	171.0	6.02	2.09	55.50	0.75	1.38	5.16	4.60
8	177.2	5.40	2.50	45.75	1.62	1.12	5.28	5.22
9	120.9	6.67	1.77	22.12	2.00	1.50	5.19	4.88
10	104.5	8.93	1.93	2.75	2.00	3.00	4.55	4.41
11	102.6	7.04	1.51	1.88	1.25	3.25	5.14	5.04
12	140.9	6.00	1.01	2.62	1.12	0.88	4.73	4.28
13	141.5	6.08	0.99	2.75	1.12	0.75	4.96	4.13
14	141.5	6.05	1.09	2.62	1.12	0.62	5.30	4.60
15	149.5	5.52	1.09	2.88	1.50	0.88	4.97	4.37
16	136.2	6.69	1.62	1.75	1.25	1.75	4.99	4.29
17	213.0	13.12	0.24	7.38	4.50	9.25	3.98	4.32
18	223.0	8.82	0.30	9.00	4.12	4.75	4.05	4.10
19	359.1	6.10	0.15	91.25	5.25	1.00	5.43	5.51
20	256.1	8.34	0.15	44.12	4.38	2.25	4.48	4.64
21	343.7	7.14	0.19	108.88	3.12	1.25	5.28	5.38
22	329.9	6.06	2.26	34.50	5.00	1.00	5.44	5.33
23	219.0	8.99	1.21	8.75	3.75	3.50	3.92	3.99
24	361.9	6.14	1.99	88.88	3.12	1.50	5.22	5.21
25	215.9	9.60	0.72	39.88	4.12	2.75	5.08	4.59
26	342.3	7.25	1.44	113.25	2.62	1.75	5.04	5.12
27	244.1	8.33	1.09	6.25	2.50	1.12	4.69	4.71
28 (DO-122)	201.9	5.35	2.04	45.50	1.75	0.62	5.28	5.30
29 (DO-126)	202.3	5.40	2.08	49.25	2.00	1.38	5.39	5.37
30 (DO-123)	150.6	5.79	1.71	21.75	2.12	0.88	5.31	5.16
31 (DO-127)	149.4	5.83	1.95	22.38	2.00	1.38	5.17	5.35
32 (DO-124)	147.3	6.11	1.64	22.62	1.62	1.25	5.16	5.17
33 (DO-128)	145.3	6.11	1.87	22.50	1.62	1.38	5.16	5.05

Tabela 4-4. GRIND varijable sa najvišim uticajem (pozitivnim ili negativnim) na finalni PLS model i strukturni elementi jedinjenja 1-33 u vezi sa tim varijablama

Proba	Varijabla br.	Distanca(Å)	Uticaj	Regioni
N1-N1	247	2.88-3.20	-	Dve blisko pozicionirane HBA grupe. Prisutne na svim jedinjenjima izuzev, 3-5
N1-N1	260	7.04-7.36	+	Acetoksi (OAc) grupe i karbonilni kiseonik prstena D steroidnog jezgra. Prisutne na svim jedinjenjima izuzev, 3-5
DRY-O	539	20.16-20.48	+	Primarni ili sekundarni amidni NH (O čvor) i angularna metil grupa (za 19, 20, 22, i 24-26) ili cikloheksil struktura (za 7, 8, 9, 28-33)
O-N1	849	5.12-5.44	-	Primarno ili sekundarno amidno NH i proksimalna OAc grupa (N1 čvor). Prisutno na molekulimas 2-5, 19-22, and 24-26
O-N1	880	15.04-15.36	+	O čvor proksimalan primarnom ili sekundarnom amidnom NH, i N1 čvor asociiran tetraoksanskom prstenu (7, 8, 9, 28-33) ili OAc grupi (19-22, 24-26)
O-TIP	977	8.00-8.32	-	Čvor O probe je asociiran sa amidnim azotom; TIP čvor je lociran na N-alkil substituentu ili metil ili proksimalnoj acetoksi strukturi
O-TIP	1016	20.48-20.80	+	O čvorovi su pozicionirani blizu primarnog ili sekundarnog amida i TIP čvor je blizu distalne alkil grupe (4"-Et, OAc, amido alkil substituenti). Prisutne na najpotentnijim jedinjenjima (7-9, 19-22, 24-26, 28-33)
N1-TIP	1125	17.28-17.60	+	N1 čvor je uglavnom blizu OAc fragmenata i TIP čvor je u blizini metilen grupa vezanih za C24 atom, ili blizu distalnog OAc fragmenta. Prisutan na svim jedinjenjima izuzev 1-4

Potencije oba epimera u parovima epimera (**DO-122/DO-126** [jedinjenja **28-29** na tabeli 4-3], **DO-123/DO-127** [30-31] i **DO-124/DO-128** [32-33]) su eksperimentalno dobijene u ovom radu, ali se konfiguracija svakog epimera, ne može za sada pripisati sa sigurnošću. Stereohemija epimera, je načinjena po analogiji sa 4" - metil analogizima za koje je konfiguracija na relevantnim ugljenikovim atomima nedvosmisleno pokazana analizom X-zraka (71).

Kako su epimeri unutar svakog para pokazivali slične potencije (razlika u potencijama epimera je gotovo na nivou eksperimentalne greške, tabela 4-3), naši modeli nisu mogli da objasne tako male varijacije potencija. Stoga smo razvili dva modela. U svakom modelu, jedan set vrednosti potencija je dodeljen jednom od epimera (4R" ili 4S") iz odgovarajućih parova epimera, u cilju provere da li jedna kombinacija pokazuje bolju predvidljivost od ostalih, ali dobijeni modeli su skoro identični. Neznatne razlike u korelogramima odražavaju različite prostorne položaje između 4" - etil grupe i ostatka steroidnog jezgra, ali ove razlike nemaju značajan uticaj na konačne rezultate.

5 DISKUSIJA

Rak je bolest koja ugrožava život i vodeći je uzrok smrtnosti u ljudskoj populaciji. Poboljšanje kvaliteta života i preživljavanja pacijenata obolelih od raka će biti znatno unapređeni razvojem visoko efikasnih lekova koji selektivno ubijaju maligne ćelije. Kontrola malignih bolesti je veoma teška, mada su na raspolaganju brojne konvencionalne terapije bazirane na hemioterapiji, hirurgiji i radioterapiji, a u novije vreme i imunoterapija pogotovo u kombinaciji sa hemioterapijom pokazuje uspješnije rezultate. Ipak ovi pristupi su u mnogim slučajevima ograničene efikasnosti. Štaviše, sadašnji antikancerski terapijski režimi su često povezani sa značajnim nivoima toksičnosti i pojavom rezistencije na lekove. Jedan veliki izazov koji stoji pred savremenom naukom je da se razviju efikasni lekovi koji specifično ubijaju maligne ćelije, ali imaju malo ili nimalo sporednih efekata na normalnim ćelijama.

Mnogi istraživački projekti su fokusirani na razvijanje novih hemioterapeutika bilo istraživanjem antikancerskog potencijala novih jedinjenja ili ispitivanjem lekova konvencionalno korišćenih u terapiji drugih bolesti. U prethodne dve dekade, organski peroksidi došli su u centar pažnje hemičara i istraživača na polju dizajniranja lekova s obzirom da mnoga od ovih jedinjenja pokazuju antimalarijsku i antitumorsku aktivnost. Pa tako artemizinin i njegovi derivati, koji se najčešće koriste u terapiji malarije, imaju i potentnu antikancersku aktivnost u nano- i mikromolarnim koncentracijama, posebno prema ćelijskim linijama osetljivim ili otpornim na zračenje i lekove (27, 210, 211). Posebno je važno istaći da je artemizinin jedan od retkih lekova koji je u širokoj upotrebi kao antimalarik, a koji nema značajnih neželjenih efekata (212) i ne pokazuje kliničku rezistenciju, iako je prijavljena tolerancija (213).

Danas, ciklična jedinjenja kakvi su tetraoksani, ozonidi i trioksani predstavljaju sintetičke perokside koji najviše obećavaju kada je u pitanju antimalarijska i antitumorska aktivnost. Neka od ovih jedinjenja pokazuju visoku aktivnost koja je približno jednaka ili viša od aktivnosti prirodnog endoperoksida artemizininina.

Svih 6 ispitivanih **DO** tetraoksana pokazuju sličnu citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijama (IC_{50} je u rasponu od 3,6 do 12,0 μ M). Epimerni N-etilamidi, **Do-124** i **Do-128** pokazuju nešto niži citotoksični efekat u odnosu na N-metilamide (**DO-123** i **DO-127**) i primarne amide (**DO-122** i **DO-126**), ali sa druge strane pokazuju izuzetno dobru selektivnost u antitumorskoj aktivnosti (za red veličine veći u odnosu na ostale agense; $SI=20,8$ za **DO-124** prema K562). To govori da je toksičnost ova dva jedinjenja prema imunokompetentnim ćelijama izuzetno mala i da bi bili izuzetno dobri kandidati za dalja ispitivanja u *in vivo* prekliničkim sistemima.

Interesantno i produkcija ROS prouzrokovana jedinjenjima **DO-124** i **DO-128** je niža u odnosu na ostale ispitivane tetraoksane, što verovatno i doprinosi izuzetno niskoj toksičnosti prema kontrolnim mononuklearnim ćelijama, a sa druge strane u manjoj meri smanjuje i citotoksičnost prema tumorskim ćelijama. S obzirom da i neki drugi mehanizmi, a ne samo oštećenja ćelija produkovanim slobodnim radikalima mogu imati ulogu u citotoksičnosti prema tumorskim ćelijama, moguće je da je produkcija ROS kod jedinjenja **DO-124** i **DO-128** uslovno govoreći optimalna i da u maloj meri narušava strukturu mononuklearnih ćelija, što je od izuzetne važnosti za uspešnu primenu ovih jedinjenja u terapiji malignih bolesti, s obzirom da je rast tumora i pod kontrolom imunog sistema, pa bi svako narušavanje funkcija ovog sistema značilo i narušavanje imune kontrole rasta tumora, a sa druge strane bi se otvorio i put sekundarnim virusnim i bakterijskim infekcijama.

Nekontrolisana progresija ćelijskog ciklusa i izbegavanje apoptoze su glavne osobnosti maligne transformacije (73). Stoga su veoma poželjni, terapijski agensi kao što su tetraoksani, koji mogu promovisati apoptozu u tumorskim ćelijama. *In vivo* studije antimalarijske aktivnosti srodnih tetraoksana pokazala su da ova jedinjenja mogu biti primenjena i u visokim dozama, bez vidljivih toksičnih efekata (50, 214). Do nedavno, osnovni uzrok raka pripisivan je povećanju ili poremećenoj regulaciji proliferacije koja dovodi do ćelijske ekspanzije i akumulacije tkivne mase. U mnogim tipovima tumora ključni regulatori ćelijskog ciklusa su izmenjeni, sa posledničnim uticajem na elemente proliferativne kontrole, kao što su kontrolne tačke ćelijskog ciklusa i odgovor na oštećenja DNK. Iz tog razloga, mnoge sadašnje hemioterapijske strategije su dizajnirane da iskoriste takve abnormalnosti u cilju podsticanja citotoksičnosti i regresije tumora ili citostaze odnosno zaustavljanje napredovanja

tumora. Nenormalan proliferativni kapacitet, međutim samo je deo slike. Nedavni napredak u istraživanju je proširio naše razumevanje etiologije raka i obuhvatio je i aberantno ćelijsko preživljavanje, kao posledicu neuspeha da se adekvatno indukuje apoptoza ili smrt ćelije, kao veliki doprinos u transformaciji ćelija.

Cilj svake antitumorske terapijske strategije je da se utiče na ciljne ćelije tumora sa ograničenim štetnim dejstvom na funkcije zdravih ćelija. Čest je slučaj da poremećaj funkcije tumorskih ćelija toliko ozbiljno ugrožava normalnu ćelijsku homeostazu da je terapijska intervencija ograničene kliničke vrednosti. Izazov leži u činjenici da sve zdrave ćelije takođe imaju kapacitet da se uključe u apoptotski program i, štaviše, često to učine lakše nego njihove korespondirajuće tumorske ćelije. Problem postizanja selektivnost leka je jasno pokazan na mnogim konvencionalnim hemioterapeuticima koji su dizajnirani u cilju korišćenja ubrzanog proliferativnog odgovora karakterističnog za mnoge vrste tumora (215), sa razarajućim posledicama na proliferaciju zdravih ćelija. Dakle, možemo se nadati da će apoptoza moći da se iskoristi kao terapijska strategija i da će se postići selektivno ubijanje tumora bez ugrožavanja funkcija normalnih ćelija? U principu, to može biti moguće ako možemo iskoristiti ekspresiju i/ili funkciju za apoptozu vezanih molekula koji su isključivo svojstveni za održavanje funkcija tumorskih ćelija, odnosno molekula koji su regulisani na drugačiji način u tumorskim i u zdravim ćelijama.

Apoptoza je samo jedan od oblika ćelijske smrti. Ćelije mogu biti eliminisane od strane nekoliko alternativnih mehanizama, uključujući i nekrozu. Nekrozu karakterišu rupturi plazma membrane sa posledičnim lokalizovanim zapaljenskim odgovorom i oštećenjem okolnih ćelija i tkiva. Nasuprot tome, apoptoza je povezana sa brzim uklanjanjem mrtvih ćelija fagocitima koje prepoznaju signale prikazane na spoljašnjoj površini apoptotskih ćelija. Apoptozna ćelijska smrt je posledica niza precizno regulisanih događaja koji su često izmenjeni u tumorskim ćelijama. Ovo pruža mogućnost za primenu selektivnih hemioterapeutika koji bi doveli do smrti tumorskih ćelija, bez oštećenja zdravih ćelija. Ove osnovne razlike između ova dva procesa ćelijske smrti naglašavaju razlog zašto je apoptoza, a ne nekroza, najpoželjniji mehanizam za indukciju ćelijske smrti u tumorskim ćelijama.

U ovom istraživanju došli smo do biohemijskih dokaza da mešoviti steroidni tetraoksani indukuju apoptoznu smrt HeLa ćelija, kao i da testirana jedinjenja poseduju nisku toksičnost sa veoma povoljnim indeksom selektivnosti dobijenim iz odnosa IC_{50} vrednosti za PBMC i maligne ćelije. Pošto do DNK fragmentacije dolazi i nakon tretmana od 24 časova što je i potvrđeno *DNA laddering* testom, postavlja se pitanje zašto analiza na protočnom citometru ne otkriva povećanje broja ćelija u sub-G1 fazi posle istog tretmana sa tetraoksanim u odnosu na kontrolne ćelije. Jedno od mogućih objašnjenja može biti da oligonukleozomalni fragmenti potiču iz relativno malog broja apoptoznih tela izbačenih iz ćelija u terminalnoj fazi apoptoze (216). Osim toga, apoptozna tela ne mogu biti efikasno diskriminisana od otpada te su isključena iz analize na protočnom citometru postavljanjem praga (engl. *threshold*) FL-2 detektora u linearnom modu. Takođe je moguće, da posle tretmana od 24 h, oštećenje plazma membrane nije veliko i da fiksacija ćelija etanolom nije dovoljna za ekstrakciju oligonukleozomalnih fragmenata. Nakon dužeg tretmana, brojne ćelije ulaze u kasnu apoptozu, što rezultira i u intenzivnom oštećenju plazma membrana te i oligonukleozomalni fragmenti mogu izaći nakon fiksacije, što doprinosi povećanju broja ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa.

Dobijeni rezultati pokazuju da ispitivani tetraoksani, a posebno **DO-124** i **DO-128** zbog visoke selektivnosti mogu biti veoma dobri agensi za tretman ljudskih tumora i predstavljaju kandidate za dalje analize na eksperimentalnim životinjama, *in vivo*.

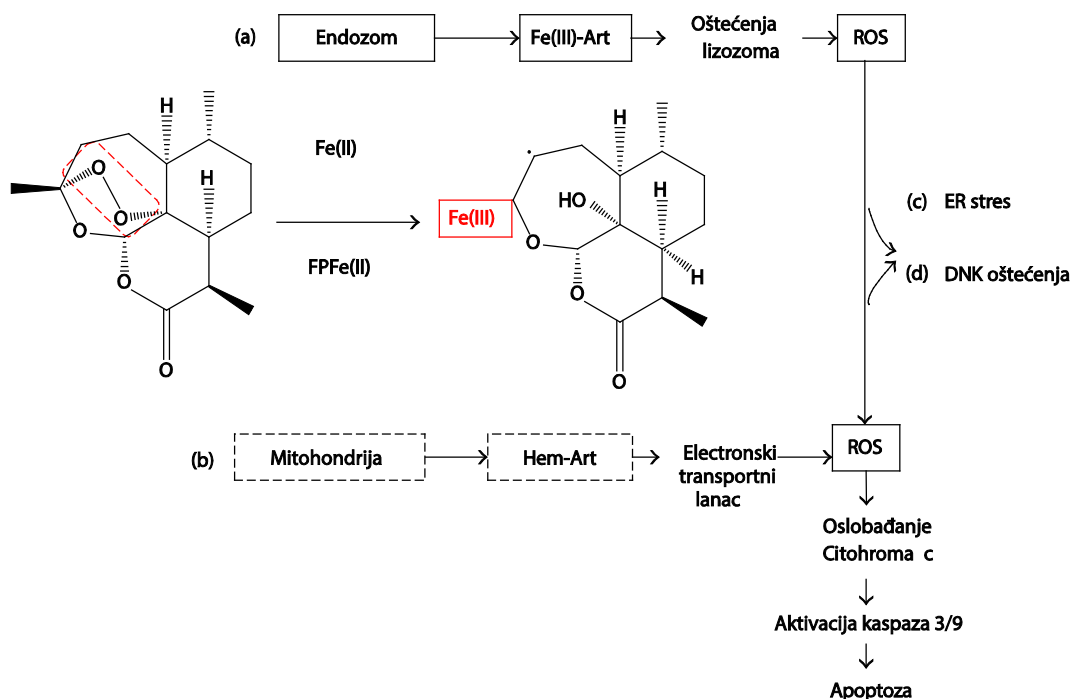
Iako tačan mehanizam koji leži u osnovi antitumorskog i antimalarijskog efekta peroksida tek treba da bude razjašnjen, pretpostavlja se da u antimalarijskoj aktivnosti ugljenični radikali generisani hemskim (217) ili ne hemskim (218) gvožđem imaju glavnu ulogu.

Pokazano je da je endoperoksidna funkcionalna grupa artemizininina farmakološki važna i odgovorna za antimalarijsku aktivnost (219, 220). Smatra se da se endoperoksidna veza aktivira redukovanim hemom (FPFeII) ili fero gvožđem (FeII) (221), što dovodi do generisanja citotoksičnih ugljenično centriranih radikala koji su visoko potentni alkilirajući agensi (222). Radikali mogu oštetiti bitne makromolekule parazita što izaziva njegovu smrt. Međutim, precizan mehanizam

delovanja i primarni ciljni molekuli artemizininina za sada nisu poznati. Postulirano je da u plazmodijumu, artemizinin oštećuje mitohondrije, endoplazmatični retikulum i digestivne vakuole (223). Neke pretpostavljene molekularne mete uključuju alkilaciju hema, alkilaciju proteina, inhibiciju Ca^{2+} ATPase (SERCA), oštećenja membrane i gubitak mitohondrijalnog potencijala (223). Uprkos stalne rasprave o aktivaciji artemizininina i specifičnih ciljnih molekula, prateći dokazi ukazuju da je hem ili fero gvožđe potrebno za visoku aktivnost (224). Ovo zapažanje je podkrepljeno i u drugim sistemima. U *Schistosoma*-ma, artemeter ima izuzetnu aktivnost protiv tegumenta (spoljašnje dvostruke membranske strukture), a ova aktivnost je pojačana u prisustvu gvožđa (225).

Potentna antikancerska aktivnost artemizininina se takođe može pripisati endoperoksidnoj vezi (slika 5-1) i hemijska baza je zapravo ista kao i kod aktivnosti prema *Plasmodijum*-u.

Odsustvo endoperoksidne funkcionalne grupe ne ukida u potpunosti antitumorsku aktivnost (226), ali značajno smanjuje citotoksičnost na pedeseti deo u odnosu na ona jedinjenja sa trioksanskim prstenom (227-229). Rezidualna antitumorska aktivnost može biti povezana sa alternativnim peroksid-nezavisnim mehanizmom (227). Prema opštem konsenzusu, gvožđe i hem ili hem vezani proteini su uključeni u bioredukciono aktiviranje artemizininina (230-232). U većini sistema, preinkubacija tumorskih ćelija sa gvožđem ili gvožđem zasićenim holotransferinom (difero transferin) pojačava citotoksičnost artemizininina (233-236) sa rastom aktivnosti artemizininina i do 100 puta u nekim ćelijskim linijama (29). Štaviše, artemizininini vezani za jedinjenja koja nose gvožđe pokazuju veću aktivnost u poređenju sa samim artemizininom (237-239).



Slika 5-1. Postulirani antitumorski mehanizam delovanja artemizinina. (a)

Predpostavlja se da se bioaktivacija artemizinina odvija u endozomima nakon pH indukovanog oslobađanja gvožđa od internalizovanog transferina. Gvožđem aktivirani artemizinin generiše ugljenično centrirane radikale koji mogu dovesti do poremećaja u lizozomima i generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta što dovodi do oštećenja mitohondrija, aktiviranje kaspaza i ćelijske smrti. (b) Alternativno, predloženo je da samo specifična aktivacija artemizinina hemom ili hem vezanim proteinom stvara citotoksične ugljenično centrirane radikale. U mitohondrijama, ovi adukti ometaju lanac prenosa elektrona, interakcijom sa hemom ili hem vezanim proteinima koji dovode do generisanja ROS i apoptoze. (c) produkcija ROS može izazvati stres endoplazmatičnog retikuluma i (d) genotoksičnost. Iz Maria P. Crespo-Ortiz and Ming Q. Wei, „Antitumor Activity of Artemisinin and Its Derivatives: From a Well-Known Antimalarial Agent to a Potential Anticancer Drug,“ Journal of Biomedicine and Biotechnology, vol. 2012, Article ID 247597.

Nedavno je pokazano da hemijska modulacija korišćenjem sukcinilacetona, inhibitora sinteze hema, smanjuje citotoksičnost dihidroartemizinina (DHA) prema HL-60 (ćelije promijeloidne leukemije čoveka) (236). To je u skladu sa prethodnim studijama koje pokazuju da indukcija hem oksidaze praćena smanjenom ekspresijom gena uključenih u sintezu hema, može inhibirati citotoksičnost artemisininskih dimera u istoj tumorskoj liniji (240). Slično tome, tretman sa desferokaminom (DFO), helatorom gvožđa, čini ova jedinjenja neaktivnim (241).

Gvožđe i metabolizam hema mogu imati značajnu ulogu u selektivnoj antitumorskoj aktivnosti artemizina. Neprekidna proliferacija i rast malignih ćelija zahtevaju viši nivo metabolizma gvožđa kako bi se postigao ćelijski opstanak (236). Stoga, ćelije raka pokazuju porast ekspresije transferinskih receptora (TfR) koji su odgovorni za usvajanje gvožđa i regulaciju intraćelijske koncentracije. Nivoi ekspresije TfR u tumorskim ćelijama variraju u zavisnosti od ćelijske linije, međutim oni se značajno razlikuju od zdravih ćelija što vodi do visokog indeksa selektivnosti artemizina i njegovih derivata. Efferth i sar. su saopštili da leukemijske (CCRF-CEM) i astrocitoma (U373) ćelije ekspimiraju TfR u 95 % i 43 % populacije ćelija respektivno, dok je to slučaj sa oko 1 % normalnih monocita (40, 242). Odsustvo TfR na monocitima svakako može biti razlog i za visoku selektivnost ispitivanih tetraoksana prema tumorskim u odnosu na zdrave mononuklearne ćelije periferne krvi čoveka.

Postavljena je hipoteza da gvoždem aktiviran artemizin izaziva oštećenja visoko alkilirajućim ugljenično centriranim radikalima i reaktivnim vrstama kiseonika (ROS) (slika 5-1) (229, 236). Radikali mogu igrati ulogu u ćelijskim izmenama primećenim kod artemizinom tretiranih tumorskih ćelija, kao što su indukcija apoptoze, zastoj u rastu, inhibicija angiogeneze i oštećenje DNK (slika 5-1). Nekoliko studija je takođe povezalotoksičnost artemizina sa oštećenom citokinezom, pojačanim nivoom oksidativnog stresa, inhibicijom tumorske invazije, migracije i metastaziranja (243).

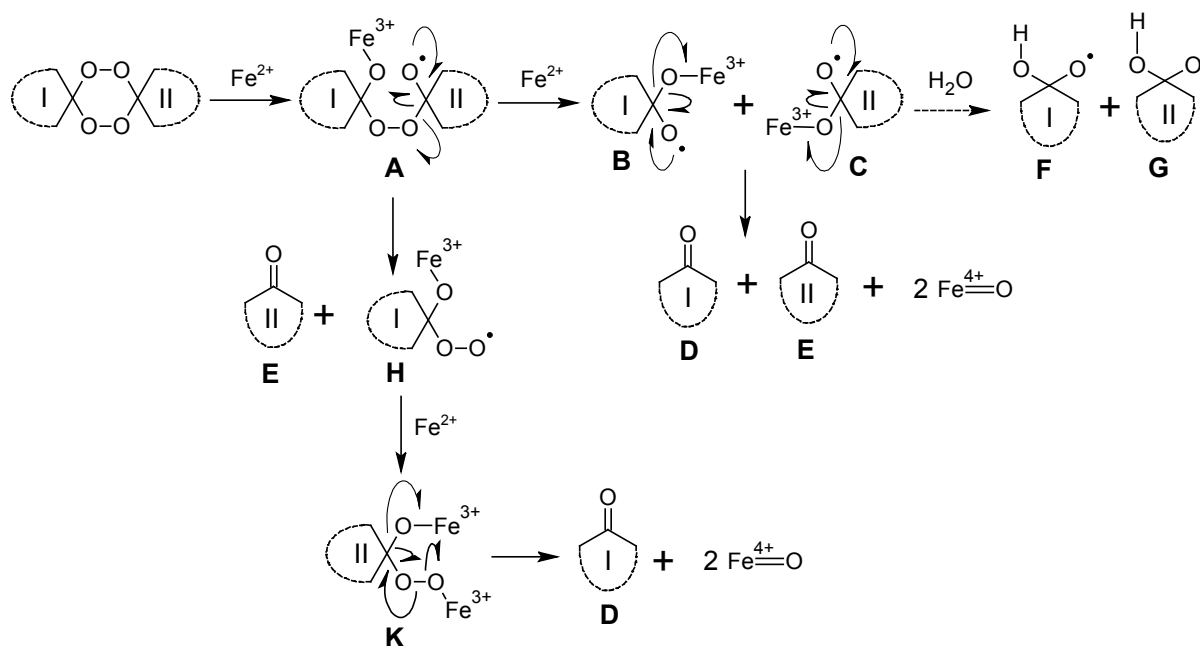
Generisanje ROS može da doprinese selektivnom delovanju endoperoksida na tumorske ćelije, s obzirom da pokazuju manju ekspresiju antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaze, katalaze i glutation peroksidaze u poređenju sa normalnim ćelijama (244, 245). Stoga je povećanje oksidativnog stresa čest mehanizam antitumorskih agenasa (246). Pored toga, selektivnost tetraoksana i drugih endoperoksida može biti pojačana preferencijalnim ciljanjem biomarkera prekomerno ekspimiranih tumorskih gena i proteina koji nisu detektibilni u zdravim diferenciranim tkivima (247).

Mehanizam dejstva tetraoksana prema *Plasmodium*-u je istraživao Šolaja sa saradnicima korišćenjem model eksperimenata (214). Mehanicistička studija

sprovedena na brojnim endoperoksidima otkrila je da ova jedinjenja ubijaju *P. falciparum* ugljeničnim radikalima stvorenim hemskim (217) ili nehemskim (218) gvoždem. Pokazano je da je početni korak ove reakcije Fe(II)- indukovano genisanje O radikala, koji se preuređuju u C centrirane radikale preko 1,5-H premeštanja ili β -raskidanja, koji su potencijalni alkilirajući agensi i reaguju sa hemom (4) ili drugim biomolekulima. I membrane eritrocita i parazita podležu fatalnoj lipidoj peroksidaciji u prisustvu artemisinina i hema (33), međutim, nema dokaza o formiranju alkoksi radikala kao mogućeg pokretača ovog lanca događaja. Kako bi se dobio uvid o načinu delovanja tetraoksanskih antimalarika i da bi se ispitala sposobnost tetraoksana da generišu C radikale (248, 249), izučavane su reakcija Fe(II) sa tetraoksanima (250, 251).

U model reakcijama, tri tetraoksana bili su podvrgnuti Fe(II)-indukovanom cepanju O-O veze u acetonitrilu. Vrste radikala koje su generisane u toku Fe(II)-indukovane razgradnje tetraoksana su zarobljene i proučavane EPR metodom (engl. *Electron Paramagnetic Resonance*). Tetraoksani su kombinovani sa $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ u prisustvu nitron spin *trap*-a za O- i C- radikale, 5, 5-dimetil-1- pirrolidin N-oksida (DEPM-PO) (252).

U okviru 5-6 min, jak EPR signal se pojavio i analiza rezultata je pokazala da su samo RO \cdot radikali generisani tokom ovih reakcija. Dalja istraživanja su potvrdila formiranje visoko valentnih gvožđe-okso-vrsta Fe(IV)=O u ovim reakcijama, a postojanje ovih vrsta je potvrđeno i u slučaju Fe(II) redukcione razgradnje artemisinina (253-255). Ovaj eksperiment jasno otkriva postojanje RO \cdot radikala koji mogu imati ključnu ulogu u mehanizmu ubijanja *Plasmodium*-a.



Slika 5-2. Postulirani antitumorski mehanizam delovanja tetraoksana. Iz

Opsenica, D.M., Šolaja, B.A. Antimalarial peroxides. (2009) *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74;1155-1193.

U nedavnoj studiji, ispitivana je reakcija artimisinina i tetraoksana sa nezasićenim fosfolipidima u prisustvu Fe(II) i odsustvu O₂ ESI-MS analizom (engl. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) (256). Spektralna analiza reakcione smeše pokazala je da nije bilo reakcije između fosfolipida i artemizina. S druge strane, reakciona mešavina fosfolipida i tetraoksana dala je brojne nove ESI-MS pikove koji su dodeljeni proizvodima oksidativne degradacije fosfolipida. O prisustvu slobodnih radikala u ovoj reakciji se spekuliralo, s obzirom da se može inhibirati dodavanjem fenolnih antioksidanata. Ova istraživanja otkrivaju da iako i trioksani i tetraoksani ubijaju parazite zahvaljujući sposobnosti da stvaraju radikale, priroda radikala može biti različita u ova dva slučaja.

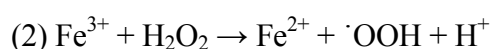
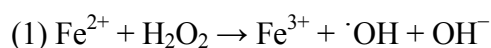
Važno je ovde napomenuti da su najčešći neželjeni proizvodi sinteze tetraoksana 1,2,4,5,7,8-heksaoksonani i da iako sadrže peroksidnu vezu, ova klasa jedinjenja pokazuju vrlo lošu antimalarijsku aktivnost (257). Istraživana je razlika u reaktivnosti tetraoksana i heksaoksonana sa Fe(II) (257). Tetraoksani podležu potpunoj degradaciji u prisustvu FeSO₄, dok heksaoksonani nisu pokazivali nikakvu

reakciju sa FeSO₄. Nedostatak reaktivnosti heksaoksonana sa gvoždem može biti odgovorna za njihovu nisku antimalarijsku aktivnost (257).

Takođe je predloženo i da membrane crvenih krvnih zrnaca i *Plasmodium*-a mogu biti podvrgnute fatalnoj lipidnoj peroksidaciji u prisustvu artemizina i hema (33). Međutim, u nedavnoj studiji je sugerisano da tetraoksani svoju aktivnost ostvaruju preko produkcije RO[•] (alkoksi) radikala čije dejstvo dovodi do smrti parazita (214).

S obzirom da tumorske ćelije sadrže više gvožđa od zdravog tkiva (32), realno je da tetraoksani mogu reagovati sa intraćelijskim gvoždem, generisanjem RO[•] radikala ili čak visoko reaktivnih HO[•] (hidroksilnih) radikala u Fentonovoj reakciji. Stoga, indukcija apoptoze u tumorskim ćelijama, posle tretmana tetraoksanima, može biti posledica oksidativnog stresa, na šta i ukazuju rezultati određivanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika.

U Fentonovoj reakciji fero (II) gvožđe se oksiduje vodonik peroksidom do feri (III) gvožđa, hidroksilnog radikala i hidroksilnog anjona. Feri gvožđe se potom redukuje do fero gvožđa, hidroperoksidnog radikala i protona istim vodonik peroksidom. Hidroksilni radikal je snažan neselektivni oksidans, koji može oštetiti brojne makromolekule u ćeliji.



U 3D QSAR studiji o antiproliferativnoj aktivnosti trideset tri 1,2,4,5-tetraoksanska derivata prema dve humane tumorske ćelijske linije, utvrdili smo da najvažnije farmakofore uključuju amidni NH primarnih ili sekundarnih amida i acetoksi fragmente na pozicijama 7 i 12 steroidnog jezgra koje su sa tetraoksanskim prstenom, zajedničke svim ispitivanim jedinjenjima. Jednostavni multipni regresioni model dobijen pomoću celih molekularnih karakteristika, potvrdio je da su hidrofobnost i donorske osobine vodoničnih veza osnovni parametri koji utiču na potenciju ispitivanih jedinjenja prema HeLa i Fem-x ćelijskim linijama.

Do sličnog rezultata došla je i druga grupa istraživača, koja je analizirala odnos između antiproliferativne aktivnosti prema HeLa i Fem-x ćelijskim linijama kao

zavisne varijable i strukturnih deskriptora kao nezavisne varijable sedam parova izomernih cis-trans bis steroidnih tetraoksana (258). Sledeći molekularni deskriptori su identifikovani kao najuticajni faktori na antiproliferativnu aktivnost prema Fem-x i HeLa ćelijskim linijama: molarni volumen (MV), *hydrogen bonding* (HB), refraktivnost (Ref), polarizabilnost (Pol). Pored toga, polarnost površine molekula (SP), molekularna širina (MWe) i *hydrogen bond donor* (donorske osobine vodoničnih veza - HBD) pokazuju visok uticaj na antiproliferativnu aktivnost prema Fem-x ćelijama. Regresioni vektori dobijenih modela pokazuju da deskriptori HB HBD i SP utiču na antiproliferativnu aktivnost u negativnom smislu, dok ostali pokazuju značajan pozitivan efekat (258).

Kada sumarno pogledamo podatke iz literature, o antiproliferativnoj aktivnosti gotovo stotinu do sada sintetisanih bissteroidnih i mešoviti tetraoksana možemo videti nekoliko trendova. Pre svega uvođenje holne kiseline kao nosača jako povećava citotoksičnost s obzirom na njene hidrofobne osobenosti i olakšan transport agensa kroz ćelijsku membranu. Drugo, kod bisteroidnih tetraoksana, cis serije su u proseku oko 2 puta aktivnije, što govori i o značaju sterne orijentacije ovih molekula na njihovu antiproliferativnu aktivnost. Potom, uvođenje amidnih C(24) terminus(a) i u mešovite i u bissteroidne tetraoksane značajno poboljšavaju i antimalarijsku i antitumorsku aktivnost u odnosu na odgovarajuće metil-estre.

Utvrđeno je da se farmakofora, koju čine dva akceptora vodonične veze (lipidni) i jedno hidrofobno mesto (alifatično), dobro preklapa sa strukturama aktivnih analoga kao i sa strukturama nekih poznatih trioksanskih antimalarika, uključujući artemizinin, arteetar, artesunatnu kiselinu kao i sa strukturama nekih drugih tetraoksana (259). Za dobru aktivnost ove klase jedinjenja važno je prisustvo bar jednog akceptora vodonične veze na trioksanskom ili tetraoksanskom delu strukture (259).

Pojava rezistencije *P. falciparum*-a na konvencionalne antimalarijske lekove, kao i tumorskih ćelija na antitumorske hemioterapeutike stavila je ogroman pritisak na zdravstveni sistem za uvođenje novih hemijskih agenasa kako bi se prevazišao problem rezistencije na ove lekove. U tom cilju, sintetisan je veliki broj peroksida sa antimalarijskom aktivnošću, a među njima klasa tetraoksanskih jedinjenja najviše

obećava. Neka od ovih jedinjenja su pokazala impresivne *in vitro* i antiproliferativne i antituberkulozne aktivnosti, ali većina jedinjenja pokazuje nisku aktivnost nakon oralnog unosa. Pošto je samo za nešto preko 250 tetraoksana ocenjena antimalarijska aktivnost i za još manji broj antiproliferativna aktivnost, raspoloživi biološki podaci nisu dovoljni da se proceni pravi potencijal ovih jedinjenja.

Neki od testiranih tetraoksana su pokazali dobru aktivnost i mogu poslužiti kao vodeći molekuli za dalja SAR istraživanja. Dobar klinički kandidat iz ove klase jedinjenja može se pozabaviti i pitanjem neurotoksičnosti, što je čest problem sa artemizininu srodnim endoperoksidima. S obzirom da su nove sintetičke metode razvijene za pripremu ove klase jedinjenja, još potentniji tetraoksani sa boljim farmakokinetskim osobinama će biti realnost u narednim godinama.

6 ZAKLJUČCI

Na osnovu kompletne analize dobijenih rezultatata, izvedeni su sledeći zaključci:

- Ispitivani tetraoksani pokazuju dozno-zavisnu antiproliferativnu aktivnost u mikromolarnim koncentracijama prema ciljnim tumorskim ćelijama, uz dobru selektivnost u aktivnosti prema tumorskim ćelijama, u odnosu na normalne imunokompetentne ćelije.
- Posebno dobru selektivnost u antitumorskoj aktivnosti (za red veličine veći u odnosu na ostale agense), pokazuju epimerni N-etil-amidi, **DO-124** i **DO-128**.
- 24-časovni tretman HeLa ćelija sa svim ispitivanim tetraoksanima indukuje tipične morfološke karakteristike kasne apoptoze (kondenzovana i/ili fragmentisana jedra).
- Apoptozna ćelijska smrt tetraoksanima tretiranih HeLa ćelija je potvrđena i testom fragmentacije DNK.
- U cilju daljeg utvrđivanja mehanizma delovanja ispitivanih jedinjenja u HeLa ćelijama učinjeno je određivanje distribucije faza ćelijskog ciklusa na protočnom citometru. Posle 24 i 48 časova inkubacije sa tetraoksanima, broj HeLa ćelija u G1 fazi se značajno uvećava.
- Nakon tretmana HeLa ćelija ispitivanim tetraoksanima, nivo reaktivnih kiseoničnih vrsta je značajno porastao ukazujući na mogući oksidativni stres, možda i kao rezultat produkcije reaktivnih alkoksi ili hidroksilnih radikala.
- Sumarno, ovi rezultati pokazuju da tetraoksani potentno generišu ROS i indukuju apoptozu HeLa ćelija.
- Načinjena je 3D QSAR studija o antiproliferativnoj aktivnosti

dejstvo, amidni NH primarnih ili sekundarnih amida i acetoksi fragmenti na pozicijama 7 i 12 steroidnog jezgra, koji su zajedno sa tetraoksanskim prstenom, zajednički za sva ispitivana jedinjenja..

- Nezavisno od toga, jednostavni model multipne regresije dobijen korišćenjem celih molekularnih svojstava, potvrdio je da su hidrofobnost i svojstva donora vodoničnih veza glavni parametri koji utiču na potenciju jedinjenja prema humanim ćelijskim linijama karcinoma grlića materice (HeLa) i malignog melanoma (Fem-x).

Na osnovu dobijenih rezultata konstatujemo da bi ispitivani tetraoksani bili izuzetno dobri kandidati za dalja ispitivanja u *in vivo* prekliničkim sistemima, a posebno jedinjenja **DO-124** i **DO-128** koja su pokazala izuzetno visoku selektivnost u aktivnosti, prema tumorskim u odnosu na normalne imunokompetentne ćelije.

7 LITERATURA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. 2010.
2. Sachs J, Malaney P. The economic and social burden of malaria. *Nature*. 2002; 415(6872):680-5.
3. Haynes RK, Vonwiller SC. From Qinghao, marvelous herb of antiquity, to the antimalarial trioxane Qinghaosu - And some remarkable new chemistry. *Accounts Chem Res*. 1997; 30(2):73-9.
4. Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Meunier B. From mechanistic studies on artemisinin derivatives to new modular antimalarial drugs. *Accounts Chem Res*. 2002; 35(3):167-74.
5. Wu YK. How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemists view. *Accounts Chem Res*. 2002; 35(5):255-9.
6. Dong Y. Synthesis and antimalarial activity of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2002; 2(2):113-23.
7. Tang Y, Dong Y, Vennerstrom JL. Synthetic peroxides as antimalarials. *Medicinal Research Reviews*. 2004; 24(4):425-48.
8. Wiesner J, Ortmann R, Jomaa H, Schlitzer M. New Antimalarial Drugs. *Angewandte Chemie International Edition*. 2003; 42(43):5274-93.
9. Padmanaban G, Nagaraj VA, Rangarajan PN. Drugs and drug targets against malaria. *Current Science*. 2007; 92(11):1545-55.
10. Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 2002; 415(6872):686-93.
11. Knell AJ. *Malaria*. Oxford: Oxford University Press; 1991.
12. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science (New York, NY)*. 1985; 228(4703):1049-55.
13. Butler AR, Wu YL. Artemisinin (qinghaosu): A new type of antimalarial drug. *Chemical Society Reviews*. 1992; 21(2):85-90.
14. Klayman DL. *Artemisia annua*. *Human Medicinal Agents from Plants: ACS Symposium Series*. 1993. p. 242-55.
15. O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *Journal of medicinal chemistry*. 2004; 47(12):2945-64.
16. Haynes RK. From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. *Current topics in medicinal chemistry*. 2006; 6(5):509-37.

17. Posner GH, O'Neill PM. Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides. *Accounts Chem Res.* 2004; 37(6):397-404.
18. Jefford CW. New developments in synthetic peroxidic drugs as artemisinin mimics. *Drug discovery today.* 2007; 12(11-12):487-95.
19. Vennerstrom JL, Fu HN, Ellis WY, Ager AL, Jr., Wood JK, Andersen SL, et al. Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: a new class of antimalarial peroxides. *Journal of medicinal chemistry.* 1992; 35(16):3023-7.
20. Fichter F, Lurie S. Lävulinsäure-äthylester-keton-peroxyd. *Helvetica Chimica Acta.* 1931; 14(6):1445-8.
21. Masuyama A, Wu JM, Nojima M, Kim HS, Wataya Y. 1,2,4,5-tetraoxacycloalkanes: Synthesis and antimalarial activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2005; 5(11):1035-43.
22. Story PR, Busch, P. *Advances in organic chemistry*, vol. 8. Taylor EC, editor. New York: Wiley; 1972. 67-95.
23. Harding MJC, Whalen DM. Synthesis of Hexadecanolide. *Product R&D.* 1975; 14(4):232-9.
24. Terent'ev AO, Kutkin AV, Starikova ZA, Antipin MY, Ogibin YN, Nikishin GI. New preparation of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Synthesis.* 2004(14):2356-66.
25. Kim HS, Nagai Y, Ono K, Begum K, Wataya Y, Hamada Y, et al. Synthesis and antimalarial activity of novel medium-sized 1,2,4,5-tetraoxacycloalkanes. *Journal of medicinal chemistry.* 2001; 44(14):2357-61.
26. Sun WC, Han JX, Yang WY, Deng DA, Yue XF. Antitumor activities of 4 derivatives of artemisic acid and artemisinin B in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica.* 1992; 13(6):541-3.
27. Woerdenbag HJ, Moskal TA, Pras N, Malingré TM, El-Feraly FS, Kampinga HH, et al. Cytotoxicity of artemisinin-related endoperoxides to Ehrlich ascites tumor cells. *Journal of Natural Products.* 1993; 56(6):849-56.
28. Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica.* 1994; 60(1):54-7.
29. Lai H, Singh NP. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer Letters.* 1995; 91(1):41-6.
30. Beekman AC, Barentsen ARW, Woerdenbag HJ, Van Uden W, Pras N, Konings AWT, et al. Stereochemistry-dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. *Journal of Natural Products.* 1997; 60(4):325-30.
31. Yeung S, Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Mills AJ, White NJ. Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2004; 71(2 SUPPL.):179-86.

32. Shterman N, Kupfer B, Moroz C. Comparison of transferrin receptors, iron content and isoferritin profile in normal and malignant human breast cell lines. *Pathobiology*. 1991; 59(1):19-25.
33. Berman PA, Adams PA. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997; 22(7):1283-8.
34. Krishna S, Uhlemann AC, Haynes RK. Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*. 2004; 7(4-5):233-44.
35. Efferth T, Oesch F. Oxidative stress response of tumor cells: Microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines. *Biochemical Pharmacology*. 2004; 68(1):3-10.
36. Efferth T, Briehl MM, Tome ME. Role of antioxidant genes for the activity of artesunate against tumor cells. *International journal of oncology*. 2003; 23(4):1231-5.
37. Efferth T, Volm M. Glutathione-related enzymes contribute to resistance of tumor cells and low toxicity in normal organs to artesunate. *In Vivo*. 2005; 19(1):225-32.
38. Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981; 78(7):4515-9.
39. Gatter KC, Brown G, Stowbridge I. Transferrin receptors in human tissues: Their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical Pathology*. 1983; 36(5):539-45.
40. Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004; 37(7):998-1009.
41. Moore JC, Lai H, Li JR, Ren RL, McDougall JA, Singh NP, et al. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Letters*. 1995; 98(1):83-7.
42. Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sciences*. 2001; 70(1):49-56.
43. Lai H, Sasaki T, Singh NP, Messay A. Effects of artemisinin-tagged holotransferrin on cancer cells. *Life Sciences*. 2005; 76(11):1267-79.
44. Posner GH, Oh CH. A regiospecifically oxygen-18 labeled 1,2,4-trioxane: A simple chemical model system to probe the mechanism(s) for the antimalarial activity of artemisinin (Qinghaosu). *Journal of the American Chemical Society*. 1992; 114(21):8328-9.
45. Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, Kuypers F, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37(5):1108-14.

46. Butler AR, Gilbert BC, Hulme P, Irvine LR, Renton L, Whitwood AC. EPR evidence for the involvement of free radicals in the iron-catalysed decomposition of qinghaosu (artemisinin) and some derivatives; antimalarial action of some polycyclic endoperoxides. *Free Radical Research*. 1998; 28(5):471-6.
47. Yang YZ, Little B, Meshnick SR. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 48(3):569-73.
48. Opsenica D, Pocsfalvi G, Juranic Z, Tinant B, Declercq JP, Kyle DE, et al. Cholic acid derivatives as 1,2,4,5-tetraoxane carriers: Structure and antimalarial and antiproliferative activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000; 43(17):3274-82.
49. Solaja BA, Terzic N, Pocsfalvi G, Gerena L, Tinant B, Opsenica D, et al. Mixed steroidal 1,2,4,5-tetraoxanes: antimalarial and antimycobacterial activity. *Journal of medicinal chemistry*. 2002; 45(16):3331-6.
50. Terzić N, Opsenica D, Milić D, Tinant B, Smith KS, Milhous WK, et al. Deoxycholic acid-derived tetraoxane antimalarials and antiproliferatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007; 50(21):5118-27.
51. Ledaal T. A simple laboratory method for the preparation of (Dimeric) ketone peroxides. *Acta Chem Scand*. 1967; 21:1656-7.
52. Story PR, Lee B, Bishop CE, Denson DD, Busch P. Macrocyclic synthesis. II. Cyclohexanone peroxides. *Journal of Organic Chemistry*. 1970; 35(9):3059-62.
53. Sanderson JR, Paul K, Story PR, Denson DD, Alford JA. Macrocycles. The synthesis and thermal decomposition of some disubstituted dicyclohexylidene diperoxides. *Synthesis*. 1975:159-61.
54. Sanderson JR, Zeiler AG. A simple synthesis of dicyclohexylidene diperoxide and tricyclohexylidene triperoxide. *Synthesis*. 1975:125-7.
55. Sanderson JR, Zeiler AG, Wilterdink RJ. An improved synthesis of dicyclohexylidene diperoxide. *Journal of Organic Chemistry*. 1975; 40(15):2239-41.
56. Sanderson JR, Wilterdink RJ, Zeiler AG. The preparation of dicyclohexylidene diperoxides by a two-step procedure. *Synthesis*. 1976:479-81.
57. Jefford CW, Boukouvalas AJJ. Efficient preparation of 1,2,4,5-tetroxanes from bis(trimethylsilyl) peroxide and carbonyl compounds. *Synthesis*. 1988:391-3.
58. Todorović NM, Stefanović M, Tinant B, Declercq JP, Makler MT, Šolaja BA. Steroidal geminal dihydroperoxides and 1,2,4,5-tetraoxanes: Structure determination and their antimalarial activity. *Steroids*. 1996; 61(12):688-96.
59. Vennerstrom JL, Fu HN, Ellis WY, Ager Jr AL, Wood JK, Andersen SL, et al. Dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes: A new class of antimalarial peroxides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992; 35(16):3023-7.

60. Kim HS, Tsuchiya K, Shibata Y, Wataya Y, Ushigoe Y, Masuyama A, et al. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*. 1999:1867.
61. Dong Y. Synthesis and antimalarial activity of 1,2,4,5-tetraoxanes. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2002; 2(2):113-23.
62. Iskra J, Bonnet-Delpon D, Bégué JP. One-pot synthesis of non-symmetric tetraoxanes with the H₂O₂/MTO/fluorous alcohol system. *Tetrahedron Letters*. 2003; 44(33):6309-12.
63. Žmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. Iodine as a catalyst for efficient conversion of ketones to gem-dihydroperoxides by aqueous hydrogen peroxide. *Organic Letters*. 2006;8(12):2491-4.
64. Žmitek K, Zupan M, Stavber S, Iskra J. The effect of iodine on the peroxidation of carbonyl compounds. *Journal of Organic Chemistry*. 2007;72(17):6534-40.
65. Žmitek K, Zupan M, Iskra J. α -Substituted organic peroxides: Synthetic strategies for a biologically important class of gem-dihydroperoxide and perketal derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2007;5(24):3895-908.
66. Das B, Krishnaiah M, Veeranjanyulu B, Ravikanth B. A simple and efficient synthesis of gem-dihydroperoxides from ketones using aqueous hydrogen peroxide and catalytic ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Letters*. 2007; 48(36):6286-9.
67. Das B, Veeranjanyulu B, Krishnaiah M, Balasubramanyam P. Synthesis of gem-dihydroperoxides from ketones using silica-supported sodium hydrogen sulfate as a heterogeneous catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2008; 284(1-2):116-9.
68. Opsenica I, Terzić N, Opsenica D, Milhous WK, Šolaja B. 7,8,15,16-tetraoxa-dispiro[5.2.5.2]hexadecane-3-carboxylic acid derivatives and their antimalarial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2004; 69(11):919-22.
69. Opsenica I, Opsenica D, Jadranin M, Smith KS, Milhous WK, Stratakis M, et al. On peroxide antimalarials. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2007; 72(12):1181-90.
70. Opsenica I, Opsenica D, Smith KS, Milhous WK, Šolaja BA. Chemical stability of the peroxide bond enables diversified synthesis of potent tetraoxane antimalarials. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008; 51(7):2261-6.
71. Opsenica D, Angelovski G, Pocsfalvi G, Juranić Z, Žižak Ž, Kyle D, et al. Antimalarial and antiproliferative evaluation of bis-steroidal tetraoxanes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2003; 11(13):2761-8.
72. Opsenica DM, Solaja BA. Antimalarial peroxides. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2009; 74(11):1155-93.
73. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
74. Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA. Growth factors. *Cancer Medicine*. 1997:41-64.

75. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995; 81(3):323-30.
76. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell*. 1990; 63(2):245-7.
77. Datto MB, Hu PPC, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor β -mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Molecular and Cellular Biology*. 1997; 17(4):2030-7.
78. Hannon GJ, Beach D. p15(INK4B) is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994; 371(6494):257-61.
79. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62(11):1180-90.
80. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 1989; 9(7):3088-92.
81. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal*. 1992; 11(5):1921-9.
82. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer Part A*. 1997; 33(5):787-91.
83. Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999; 11(3):318-24.
84. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO Journal*. 1995; 14(17):4240-8.
85. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Advances in Cancer Research*. 1996; 69:135-74.
86. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Cancer Medicine*. 1997:181-204.
87. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86(3):353-64.
88. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993; 362(6423):841-4.
89. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet*. 1996; 347(9012):1377-81.
90. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994; 266(5192):1821-8.
91. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003; 36(3):165-75.

92. Liebermann DA, Hoffman B, Steinman RA. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene*. 1995; 11(1):199-210.
93. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation*. 2003; 36(3):131-49.
94. Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*. 2000; 33(5):261-74.
95. King RJB. *Cancer Biology*. Harlow, England; New York: Prentice Hall, 2000.
96. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *Journal of Clinical Oncology*. 1998; 16(9):3158-68.
97. Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific American*. 1996; 275(3):62-70.
98. DeVita Jr VT HS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.
99. Fearon ER. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science*. 1997; 278(5340):1043-50.
100. Wang X, Ohnishi T. p53-Dependent Signal Transduction Induced by Stress. *Journal of Radiation Research*. 1997; 38(3):179-94.
101. Bergman PJ, Harris D. Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance. The past, present, and future. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 1997; 27(1):47-57.
102. McDonnell TJ, Meyn RE, Robertson LE. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*. 1995; 6(1):53-60.
103. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991; 254(5035):1138-46.
104. Kam PCA, Ferch NI. Apoptosis: Mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*. 2000; 55(11):1081-93.
105. Dixon SC, Soriano BJ, Lush RM, Borner MM, Figg WD. Apoptosis: Its role in the development of malignancies and its potential as a novel therapeutic target. *Annals of Pharmacotherapy*. 1997; 31(1):76-82.
106. Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. Radiation induced apoptosis. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology*. 1996; 366(2):171-9.
107. Bellamy COC. P53 and apoptosis. *British Medical Bulletin*. 1997; 53(3):522-38.
108. Taya Y. Rb kinases and Rb-binding proteins: new points of view. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997; 22(1):14-7.
109. Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 and Bcl-X(L) antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research*. 1997; 57(1):62-7.

110. Story M, Kodym R. Signal transduction during apoptosis; implications for cancer therapy. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 1998; 3:d365-75.
111. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998; 281(5381):1317-22.
112. Green DR. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science*. 1997; 278(5341):1246-7.
113. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997; 275(5303):1129-32.
114. Guimarães CA, Linden R. Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271(9):1638-50.
115. Sattler M, Liang H, Nettekheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, et al. Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex: Recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 1997; 275(5302):983-6.
116. Hattori H, Kuroda M, Ishida T, Shinmura K, Nagai S, Mukai K, et al. Human DNA damage checkpoints and their relevance to soft tissue sarcoma. *Pathology International*. 2004; 54(1):26-31.
117. Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes to Cells*. 2002; 7(11):1173-82.
118. Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: A mini review. *International Journal of Clinical Practice*. 2004; 58(12):1134-41.
119. Deng CX, Scott F. Role of the tumor suppressor gene Brcal in genetic stability and mammary gland tumor formation. *Oncogene*. 2000; 19(8):1059-64.
120. Blegen H, Einhorn N, Sjövall K, Roschke A, Ghadimi BM, McShane LM, et al. Prognostic significance of cell cycle proteins and genomic instability in borderline, early and advanced stage ovarian carcinomas. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2000; 10(6):477-87.
121. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*. 1999; 68:383-424.
122. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature reviews Cancer*. 2004; 4(8):592-603.
123. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature*. 1996; 379(6560):88-91.
124. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73(8):2013-26.
125. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002; 108(2):153-64.

126. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; 26(4):239-57.
127. Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 2002; 181-182:471-4.
128. Paweletz N. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2(1):72-5.
129. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001; 41:367-401.
130. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 1997; 15(13):1573-81.
131. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: Insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*. 2003; 40(5):481-95.
132. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2000; 301(1):5-17.
133. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000; 407(6805):784-8.
134. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *Journal of Immunology*. 2003; 171(9):4672-9.
135. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 185(8):1481-6.
136. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001; 58(3):356-70.
137. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: Apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 1999; 18(54):7719-30.
138. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *American Journal of Pathology*. 1995; 146(1):3-15.
139. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: Oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology*. 1997; 25(1):82-8.
140. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Cellular injury and cellular death. *Pathologic Basis of Disease*. 1994:1-34.
141. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(4):277-88.

142. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005; 22(3):355-70.
143. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805):770-6.
144. Nemes Jr Z, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *European Journal of Cell Biology*. 1996; 70(2):125-33.
145. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 1995; 5(1):21-6.
146. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(42):26159-65.
147. Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry*. 1999; 35(3):181-95.
148. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005; 123(2):321-34.
149. Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature Medicine*. 2000; 6(1):41-8.
150. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*. 1998; 60:601-17.
151. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73(8):2013-26.
152. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 9(6):1799-805.
153. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988; 335(6189):440-2.
154. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*. 2001; 2(4):293-9.
155. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994; 263(5154):1759-62.

156. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Ninomiya I, et al. Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape. *International journal of oncology*. 2001; 18(1):33-9.
157. Koyama S, Koike N, Adachi S. Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2001; 127(1):20-6.
158. Wang XW, Harris CC. P53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 1997; 173(2):247-55.
159. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002; 181-182:475-81. Epub 2002/12/31.
160. Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome - A molecular and clinical review. *British Journal of Cancer*. 1997; 76(1):1-14.
161. Gu J, Kawai H, Wiederschain D, Yuan ZM. Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain. *Cancer Research*. 2001; 61(4):1741-6.
162. Kitagawa R, Kastan MB. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*. 2005 70:99.
163. Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair*. 2004; 3(8-9):889-900.
164. Watanabe M, Hitomi M, Van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, et al. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microscopy and Microanalysis*. 2002; 8(5):375-91.
165. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods - From morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 2003; 38(3):275-339.
166. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2004; 285:105-11.
167. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284(5756):555-6.
168. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research*. 1994; 278(3):549-56.
169. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry*. 1997; 251(1):98-102.
170. Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain*. 1999; 122(2):247-53.
171. Talasz H, Helliger W, Sarg B, Debbage PL, Puschendorf B, Lindner H. Hyperphosphorylation of histone H2A.X and dephosphorylation of histone H1

- subtypes in the course of apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9(1):27-39.
172. Grabarek J, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Use of fluorescently labeled caspase inhibitors as affinity labels to detect activated caspases. *Human cell : official journal of Human Cell Research Society*. 2002; 15(1):1-12.
 173. Hofmann WK, De Vos S, Tsukasaki K, Wachsman W, Pinkus GS, Said JW, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*. 2001; 98(3):787-94.
 174. Vallat L, Magdelénat H, Merle-Béral H, Masdehors P, De Montalk GP, Davi F, et al. The resistance of B-CLL cells to DNA damage-induced apoptosis defined by DNA microarrays. *Blood*. 2003; 101(11):4598-606.
 175. Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods in Enzymology*. 2000; 322:15-8.
 176. Zucker RM, Hunter 3rd ES, Rogers JM. Confocal laser scanning microscopy of morphology and apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2000; 135:191-202.
 177. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR. Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Experimental Cell Research*. 1999; 249(1):1-12.
 178. Poot M, Pierce RH. Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry*. 1999; 35(4):311-7.
 179. Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA. MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2003; 793(1):141-50.
 180. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental Cell*. 2002; 2(1):55-67.
 181. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology*. 2000; 2(3):156-62.
 182. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*. 1998; 67:509-44.
 183. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3(12):906-18.
 184. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961; 25:585-621.
 185. MacLaren A, Black EJ, Clark W, Gillespie DA. c-Jun-deficient cells undergo premature senescence as a result of spontaneous DNA damage accumulation. *Molecular and cellular biology*. 2004; 24(20):9006-18.

186. Meng A, Wang Y, Van Zant G, Zhou D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. *Cancer research*. 2003; 63(17):5414-9.
187. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(20):9363-7.
188. Chu K, Teele N, Dewey MW, Albright N, Dewey WC. Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3sigma and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiation research*. 2004; 162(3):270-86.
189. Huang WP, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell structure and function*. 2002; 27(6):409-20.
190. Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer research*. 2005; 65(10):4368-75.
191. Noda T, Ohsumi Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273(7):3963-6.
192. Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *Journal of cell science*. 2000; 113 (Pt 7):1189-98.
193. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(3):980-4.
194. Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, et al. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*. 1999; 91(1):233-49.
195. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Molecular and cellular neurosciences*. 1999; 14(3):180-98.
196. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999; 402(6762):672-6.
197. Ohno M, Abe T. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*. 1991; 145(1-2):199-203.
198. Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. A unified procedure for conservative (morphology) and integral (DNA and immunophenotype) cell staining for flow cytometry. *Cytometry*. 2001; 44(2):120-5.

199. Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *Journal of Immunology*. 1990; 145(6):1859-67.
200. http://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo.html, Molecular networks, GmbH, Erlangen, Germany.
201. Pedretti A, Villa L, Vistoli G. VEGA--an open platform to develop chemobio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *Journal of computer-aided molecular design*. 2004; 18(3):167-73.
202. MDL ISIS Draw 2.5, MDL information System Inc. 2002.
203. Gaillard P, Carrupt PA, Testa B, Boudon A. Molecular lipophilicity potential, a tool in 3D QSAR: method and applications. *Journal of computer-aided molecular design*. 1994; 8(2):83-96.
204. Duran A, Martinez GC, Pastor M. Development and validation of AMANDA, a new algorithm for selecting highly relevant regions in Molecular Interaction Fields. *Journal of chemical information and modeling*. 2008; 48(9):1813-23.
205. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of medicinal chemistry*. 1985; 28(7):849-57.
206. Ermondi G, Anghilante C, Caron G. A combined in silico strategy to describe the variation of some 3D molecular properties of beta-cyclodextrin due to the formation of inclusion complexes. *Journal of molecular graphics & modelling*. 2006; 25(3):296-303.
207. Pastor M, Cruciani G, McLay I, Pickett S, Clementi S. GRid-INdependent descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *Journal of medicinal chemistry*. 2000; 43(17):3233-43.
208. Höskuldsson A. PLS regression methods. *Journal of Chemometrics*. 1988; 2(3):211-28.
209. Mahavorasirikul W, Viyanant V, Chaijaroenkul W, Itharat A, Na-Bangchang K. Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells in vitro. *BMC complementary and alternative medicine*. 2010; 10:55.
210. Reungpatthanaphong P, Mankhetkorn S. Modulation of multidrug resistance by artemisinin, artesunate and dihydroartemisinin in K562/adr and GLC4/adr resistant cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25(12):1555-61.
211. Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, Rauch P, Weber HO, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Molecular Pharmacology*. 2003; 64(2):382-94.
212. Gordi T, Lepist EI. Artemisinin derivatives: Toxic for laboratory animals, safe for humans? *Toxicology Letters*. 2004; 147(2):99-107.

213. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyto AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(5):455-67.
214. Opsenica I, Terzić N, Opsenica D, Angelovski G, Lehnig M, Eilbracht P, et al. Tetraoxane antimalarials and their reaction with Fe(II). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006; 49(13):3790-9.
215. Shapiro GI, Harper JW. Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *The Journal of clinical investigation*. 1999; 104(12):1645-53.
216. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1997; 45(7):923-34.
217. O'Neill PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004; 47(12):2945-64.
218. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2003; 424(6951):957-61.
219. Jefford CW, Velarde J, Bernardinelli G. Synthesis of tricyclic arteannuin-like compounds. *Tetrahedron Letters*. 1989; 30(34):4485-8.
220. Posner GH, Oh CH, Gerena L, Milhous WK. Extraordinarily potent antimalarial compounds: New, structurally simple, easily synthesized, tricyclic 1,2,4-trioxanes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1992; 35(13):2459-67.
221. Meshnick SR, Thomas A, Ranz A, Xu CM, Pan HZ. Artemisinin (qinghaosu): The role of intracellular hemozoin in its mechanism of antimalarial action. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991; 49(2):181-9.
222. Olliaro PL, Haynes RK, Meunier B, Yuthavong Y. Possible modes of action of the artemisinin-type compounds. *Trends in Parasitology*. 2001; 17(3):122-6.
223. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin - The debate continues. *Molecules*. 2010; 15(3):1705-21.
224. Klonis N, Crespo-Ortiz MP, Bottova I, Abu-Bakar N, Kenny S, Rosenthal PJ, et al. Artemisinin activity against *Plasmodium falciparum* requires hemoglobin uptake and digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(28):11405-10.
225. Shuhua X, Binggui S, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5):717-24.
226. Galal AM, Ross SA, ElSohly MA, ElSohly HN, El-Ferally FS, Ahmed MS, et al. Deoxyartemisinin derivatives from photooxygenation of anhydrodeoxydihydroartemisinin and their cytotoxic evaluation. *Journal of Natural Products*. 2002; 65(2):184-8.
227. Beekman AC, Wierenga PK, Woerdenbag HJ, Van Uden W, Pras N, Konings AWT, et al. Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential

- antitumour compounds: Cytotoxic action against bone marrow and tumour cells. *Planta Medica*. 1998; 64(7):615-9.
228. Meunier B, Robert A. Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs. *Accounts of Chemical Research*. 2010; 43(11):1444-51.
 229. Mercer AE, Maggs JL, Sun XM, Cohen GM, Chadwick J, O'Neill PM, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(13):9372-82.
 230. Zhang S, Gerhard GS. Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target. *PLoS ONE*. 2009; 4(10).
 231. Berger TG, Dieckmann D, Efferth T, Schultz ES, Funk JO, Baur A, et al. Artesunate in the treatment of metastatic uveal melanoma--first experiences. *Oncology reports*. 2005; 14(6):1599-603.
 232. Hamacher-Brady A, Stein HA, Turschner S, Toegel I, Mora R, Jennewein N, et al. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(8):6587-601.
 233. Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Research*. 2004; 24(4):2277-80.
 234. Lu JJ, Meng LH, Shankavaram UT, Zhu CH, Tong LJ, Chen G, et al. Dihydroartemisinin accelerates c-MYC oncoprotein degradation and induces apoptosis in c-MYC-overexpressing tumor cells. *Biochemical Pharmacology*. 2010; 80(1):22-30.
 235. Lu JJ, Chen SM, Zhang XW, Ding J, Meng LH. The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells. *Invest New Drugs*. 2010; 7:1-8.
 236. Mercer AE, Copple IM, Maggs JL, O'Neill PM, Park BK. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials. *Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(2):987-96.
 237. Lai H, Nakase I, Lacoste E, Singh NP, Sasaki T. Artemisinin-transferrin conjugate retards growth of breast tumors in the rat. *Anticancer Research*. 2009; 29(10):3807-10.
 238. Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 354(1-2):28-33.
 239. Lai H, Sasaki T, Singh NP. Targeted treatment of cancer with artemisinin and artemisinin-tagged iron-carrying compounds. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2005; 9(5):995-1007.
 240. Stockwin LH, Han B, Yu SX, Hollingshead MG, Elsohly MA, Gul W, et al. Artemisinin dimer anticancer activity correlates with heme-catalyzed reactive

- oxygen species generation and endoplasmic reticulum stress induction. *International Journal of Cancer*. 2009; 125(6):1266-75.
241. Huang XJ, Ma ZQ, Zhang WP, Lu YB, Wei EQ. Dihydroartemisinin exerts cytotoxic effects and inhibits hypoxia inducible factor-1 α activation in C6 glioma cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2007; 59(6):849-56.
 242. Kwok JC, Richardson DR. The iron metabolism of neoplastic cells: Alterations that facilitate proliferation? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 42(1):65-78.
 243. Xu Q, Li ZX, Peng HQ, Sun ZW, Cheng RL, Ye ZM, et al. Artesunate inhibits growth and induces apoptosis in human osteosarcoma HOS cell line in vitro and in vivo. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 2011; 12(4):247-55.
 244. May Jr WS, Cuatrecasas P. Transferrin receptor: Its biological significance. *Journal of Membrane Biology*. 1985; 88(3):205-15.
 245. Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan A, Qian J, Santella RM, et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer*. 2000; 89(1):123-34.
 246. Das UN. A radical approach to cancer. *Medical Science Monitor*. 2002; 8(4):RA79-RA92.
 247. Hansen JB, Fisker N, Westergaard M, Kjærulff LS, Hansen HF, Thruue CA, et al. SPC3042: A proapoptotic survivin inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008; 7(9):2736-45.
 248. Tonmunphean S, Wijitkosoom A, Tantirungrotechai Y. Influence of stereoisomer of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes on their binding mode with heme and on antimalarial activity: Molecular docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2004; 12(9):2005-12.
 249. Liu HH, Wu YK, Shen X. Alkylation of sulfur ligand in cysteinate-iron chelates by a 1,2,4, 5-tetraoxane. *Chinese Journal of Chemistry*. 2003; 21(7):875-7.
 250. O'Neill PM, Miller A, Bishop LPD, Hindley S, Maggs JL, Ward SA, et al. Synthesis, antimalarial activity, biomimetic iron(II) chemistry, and in vivo metabolism of novel, potent C-10-phenoxy derivatives of dihydroartemisinin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001; 44(1):58-68.
 251. Jefford CW, Vicente MGH, Jacquier Y, Favarger F, Mareda J, Millasson-Schmidt P, et al. 124. The deoxygenation and isomerization of artemisinin and artemether and their relevance to antimalarial action. *Helvetica Chimica Acta*. 1996; 79(5):1475-87.
 252. Frejaville C, Karoui H, Tuccio B, Le Moigne F, Culcasi M, Pietri S, et al. 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: A new efficient phosphorylated nitron for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1995; 38(2):258-65.
 253. Posner GH, Cumming JN, Ploypradith P, Oh CH. Evidence for Fe(IV) = O in the molecular mechanism of action of the trioxane antimalarial artemisinin. *Journal of the American Chemical Society*. 1995; 117(21):5885-6.

254. Kapetanaki S, Varotsis C. Ferryl-oxo heme intermediate in the antimalarial mode of action of artemisinin. *FEBS Letters*. 2000; 474(2-3):238-41.
255. Kapetanaki S, Varotsis C. Fourier transform infrared investigation of non-heme Fe(III) and Fe(II) decomposition of artemisinin and of a simplified trioxane alcohol. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2001; 44(19):3150-6.
256. Kumura N, Furukawa H, Onyango AN, Izumi M, Nakajima S, Ito H, et al. Different behavior of artemisinin and tetraoxane in the oxidative degradation of phospholipid. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2009; 160(2):114-20.
257. Dong Y, Creek D, Chollet J, Matile H, Charman SA, Wittlin S, et al. Comparative antimalarial activities of six pairs of 1,2,4,5-tetraoxanes (peroxide dimers) and 1,2,4,5,7,8-hexaoxonanes (peroxide trimers). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; 51(8):3033-5.
258. Šegan S, Andrić F, Radoičić A, Opsenica D, Šolaja B, Zlatović M, et al. Correlation between structure, retention and activity of cholic acid derived cis-trans isomeric bis-steroidal tetraoxanes. *Journal of Separation Science*. 2011; 34(19):2659-67.
259. Bhattacharjee AK, Carvalho KA, Opsenica D, Šolaja BA. Structure-activity relationship study of steroidal 1,2,4,5-tetraoxane animalarials using computational procedures. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2005; 70(3):329-45.

Biografija

Mr Željko S. Žižak rođen je 31. decembra 1965. u Zemunu. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirao je 1998. Posle diplomiranja, 1999. godine, zaposlio se kao istraživač pripravnik u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu u kojem radi i danas. Magistarsku tezu „Prirodni citotoksični efekat mononuklearnih ćelija periferne krvi i serumskih faktora bolesnika sa melanomom i vitiligom prema melanomskim ćelijama *in vitro*.“ odbranio je 2004. godine, na Biološkom fakultetu u Beogradu.

U periodu od 2002. godine do danas učestvovao je kao istraživač na četiri projekta koje je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i na jednom projektu u okviru bilateralne saradnje sa Slovenijom.

Stručno se usavršavao na: Evropskoj školi onkologije 2001. godine u Beogradu i Evropskoj letnjoj školi onkologije 2002. godine u Bordou, Francuska.

Željko Žižak je član: Srpskog društva istraživača raka (SDIR), Evropskog društva za istraživanje raka (European Association for Cancer Research, EACR), Balkanske unije za onkologiju (Balkan Union of Oncology, BUON), Društva imunologa Srbije i Mikološkog društva Srbije.

Rezultati istraživanja Željka Žižka su prikazani u 12 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 6 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 11 radova u međunarodnim časopisima (M23) i 2 rada u vodećim časopisima nacionalnog značaja (M51). Autor je i 22 saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Жељко Жижак

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антитуморски ефекат стероидних тетраоксана на малигно трансформисане ћелијске линије човека

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.11.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Жељко Жижак

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Антитуморски ефекат стероидних тетраоксана на малигно
трансформисане ћелијске линије човека

Ментор Проф др Лидија Раденовић

Потписани Жељко Жижак

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.11.2012.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Антитуморски ефекат стероидних тетраоксана на малигно трансформисане ћелијске линије човека

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 20.11.2012.