

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Saša D. Vasilev

Efekat ekskretorno-sekretornog antigena  
mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i  
antihelmintika mebendazola na ćelije  
melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo*

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Saša D. Vasilev

The effect of excretory-secretory antigen of  
*Trichinella spiralis* muscle larvae and  
anthelmintic mebendazole on melanoma  
cells *in vitro* and *in vivo*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentor:

Dr Vitomir Ćupić, redovan profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Komentor:

Dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije – INEP

Članovi komisije:

Dr Zoran Kulišić, redovan profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Saša Vasiljić, docent, Univerzitet odbrane u Beogradu, Medicinski fakultet, Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2012. godine

## IZJAVE ZAHVALNOSTI

Iskreno se zahvaljujem mentoru prof dr Vitomiru Čupiću i komentoru naučnom savetniku dr Ljiljani Sofronić-Milosavljević na nesebičnoj pomoći, podršci, strpljenju, konstruktivnim kritikama, sugestijama, kao i za hrabrenje tokom rada.

Zahvaljujem se doc dr Saši Vasilijiću na pomoći tokom rada, strpljenju, i sugestijama

Zahvaljujem se prof dr Zoranu Kulišiću na ljubaznosti, korisnim sugestijama i savetima

Zahvaljujem se svim kolegama:

Odeljenja za imunologiju i imunoparazitologiju INEPa;

Laboratorije 61 IMI VMA;

Odeljenja za modifikatore biološkog odgovora, Instituta za onkologiju Srbije

Takođe se zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli u nastajanju ovog rada

Posebnu zahvalnost dugujem brigadnom generalu akademiku prof. dr Miodragu Čoliću na podršci i pomoći

Zahvalnost dugujem i Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, Načelniku Odeljenja za imunologiju i imunoparazitologiju naučnom savetniku dr Ljiljani Sofronić-Milosavljević i Upravi Instituta.

Najiskrenije hvala mojoj ćerki Emiliji i supruzi Nataši.

## **Efekat ekskretorno-sekretornog antigena mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i antihelmintika mebendazola na ćelije melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo***

### Rezime

Melanom je vrlo agresivna forma tumora kože, koja je u većini slučajeva rezistentna na konvencionalnu hemioterapiju. Zbog toga melanom predstavlja veliki izazov za istraživanje novih terapijskih pristupa. Rezultati, dobijeni na animalnim modelima, ukazuju da helminti ili njihovi ekskretorno-sekretorni (ES) produkti mogu da modulišu imuni sistem domaćina, i tako dovedu do smanjivanja intenziteta ili sprečavanja razvoja autoimunih, alergijskih i malignih bolesti. Sa druge strane, lekovi koji su odobreni za različite indikacije ali ne i za terapiju kancera, a koji poseduju prethodno neprepoznat citotoksični efekat prema malignim ćelijama, mogli bi se brzo naći u primeni i za ovu novu indikaciju. Rezultati dobijeni u *in vitro* i *in vivo* uslovima pokazuju da bi jedan od takvih lekova mogao biti mebendazol. Mebendazol je antihelmintik, pripada grupi benzimidazola i široko se koristi u veterinarskoj i humanoj medicini.

U ovom radu posebnu pažnju usmerili smo na analizu dejstva ES produkata mišićnih, infektivnih larvi (L1) *Trichinella spiralis* i mebendazola na melanomske ćelije

#### I) *In vitro* ispitivanja:

a) Ispitivali smo efekat ES L1 antigena i mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija. Humane (Fem-X) i mišje (B16) melanomske ćelije gajene su u jednom sloju i posle 20h tretirane sa po pet rastućih koncentracija ispitivanih supstanci (ES L1 antigen: 12.5–200 µg/ml, i mebendazol: 0.007-2.5µM) u kompletnom hranljivom medijumu. Kontrola se sastojala od ćelija gajenih u samom medijumu. Preživljavanje ćelija je određivano korišćenjem metode redukcije dimetiltiazol difenil tetrazolijum bromida (MTT test) 72 sata nakon dodavanja antigena. Dobijeni rezultati ukazuju da ES L1 antigen *T. spiralis* na statistički značajan način ispoljava blago smanjenje preživljavanja kod obe melanomske linije. Mebendazol je, takođe, doveo do smanjenja preživljavanja kod melanomskih ćelija. Kod obe ispitivane supstance

ustanovljeno je da je jači efekat prema humanim melanomskim ćelijama nego prema mišjim, ali to nije bilo statistički značajno.

b) Takođe, ispitivali smo efekat ES L1 antigena (50-200 µg/ml) i mebendazola (1.25-5µM) na apoptozu mišjih B16 melanomskih ćelija. Apoptoza je merena posle kultivacije ćelija tokom 72h sa ES L1 antigenom, i posle 24h sa mebendazolom. Apoptoza je detektovana posle bojenja ćelija sa propidijum jodidom, takođe posle bojenja sa annexin V-FITC i propidijum jodidom i izvođenja analize na EPICS XL-MCL, protočnom citometru (Coulter), kao i pomoću morfoloških kriterijuma posle fiksacije i bojenja ćelija sa Türk-ovim rastvorom. Ustanovili smo da obe ispitivane supstance indukuju apoptozu B16 melanomskih ćelija. ES L1 antigen indukuje blagu, ali statistički značajno veću apoptozu ovih ćelija u koncentracijama višim od 50µg/ml, i maksimalne vrednosti dostiže sa najvećom testiranom koncentracijom od 200µg/ml. Mebendazol takođe indukuje apoptozu, tako da u koncentraciji od 2.5µM indukuje vrlo značajno apoptozu ovih ćelija (33.3%) u poređenju sa kontrolnim, ne tretiranim ćelijama (14.4%). Slični rezultati su dobijeni sa sve tri korišćene metode.

U sledećim eksperimentima, ispitivali smo neke mehanizme uključene u apoptozu B16 ćelija. Ustanovili smo da inhibicija kaspaze -8 i -3 prevenira indukciju apoptoze sa ES L1 antigenom (200 µg/ml) i mebendazolom (2.5µM).

## II) *In vivo* ispitivanja

U ispitivanjima izvedenim u uslovima *in vivo* ispitivali smo efekat: a) infekcije sa *T. spiralis* i b) mebendazola na rast tumora, pri čemu smo koristili model implantiranja B16 ćelija pod kožu C57BL/6 miševima. Sve eksperimentalne procedure na životinjama su izvršene po odobrenju Etičke komisije.

a) Ispitivanje efekata hronične infekcije sa *T. spiralis* na rast tumora. Miševi C57BL/6 soja podeljeni su u dve grupe – eksperimentalnu i kontrolnu. U eksperimentalnoj grupi miševi su inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*, a 40 dana kasnije aplikovane su im melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$ ), dok je kontrolna grupa dobila samo tumorske ćelije. Posle 25 dana životinje su žrtvovane i tumori izvađeni. Ustanovili smo da infekcija sa *T. spiralis*

dovodi do statistički značajne inhibicije rasta tumora u poređenju sa kontrolnom grupom miševa koji nisu bili inficirani sa *T.spiralis*.

b) Ispitivanje efekta mebendazola na rast tumora. Miševi C57Bl/6 soja su podeljeni u dve grupe. Rast tumora je izazvan eksperimentalno subkutanom aplikacijom  $5 \times 10^5$  melanomskih ćelija svim miševima. Rast tumora je praćen 25 dana. Životinje u eksperimentalnoj grupi su tretirane peroralno mebendazolom (50mg/kg, tokom 5 dana, počev od pojave prvih palpabilnih tumora u grupi) što je dovelo do jakog antitumorskog efekta u poređenju sa kontrolom koja nije primala mebendazol.

U zaključku, naši rezultati sugerišu da ES L1 antigen *T. spiralis* i mebendazol smanjuju preživljavanje i indukuju apoptozu melanomskih ćelija *in vitro*. Taj efekat je bio više izražen pod dejstvom mebendazola. Sa druge strane, hronična infekcija sa *T. spiralis* ima jači inhibitorski efekat na rast B16 melanoma *in vivo* u poređenju sa efektom nastalim peroralnim davanjem mebendazola. Kod miševa mebendazol takođe značajno usporava rast tumora. Izvanredan bezbednosni profil mebendazola, i dobra podnošljivost, u kombinaciji sa ovim rezultatima preporučuju da se nastave ispitivanja ovog leka za primenu kao antikancerskog terapijskog sredstva. Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na melanom nastaje zbog prisustva ES L1 antigena u cirkulaciji inficiranih domaćina. Bolji efekat ES L1 antigena *in vivo* nego *in vitro* mogao bi se tumačiti upravo njegovim potencijalnim delovanjem na one ćelije imunskog sistema domaćina koje sprečavaju rast tumora. Ovakav *in vivo* efekat ES antigena usmerava dalja istraživanja u pravcu ispitivanja kako i na koje efektorne ćelije uključene u odbranu od tumora ovaj antigen deluje.

Ključne reči: ES L1 antigen *T. Spiralis*, Mebendazol, Melanom, Apoptoza

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Farmakologija i parazitologija

UDK broj: 619:615.017:576.89

## **The effect of excretory-secretory antigen of *Trichinella spiralis* muscle larvae and anthelmintic mebendazole on melanoma cells in vitro and in vivo**

### Summary

Melanoma is a very aggressive form of skin cancer. It is in most cases resistant to conventional chemotherapy. Because of that it represents a great challenge for investigation of new therapeutic approaches. It is well known that co infection with different pathogens, including helminths and in particular *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*), can ameliorate (alter) the progression of different diseases (autoimmune, allergic) including malignant one. Drugs approved for indications other than cancer that possess previously unrecognized cytotoxicity toward malignant cells could be rapidly used for this new indication. Data suggest that one of drugs with such indication could be mebendazole. Benzimidazole anthelmintics including mebendazole are widely used in human and veterinary medicine.

We studied the *in vivo* and *in vitro* effect of: a) *T. spiralis* excretory-secretory muscle larvae (ES L1) antigen and b) mebendazole on the melanoma cells.

#### I) *In vitro* studies:

a) We investigated the effect of ES L1 antigen and mebendazole on the survival of melanoma cells. Human melanoma (Fem-x), and mouse melanoma (B16) tumor cells were cultured as a monolayer and after 20h treated with five different concentrations of investigated compounds (ES L1 antigen: 12.5–200 µg/ml, and mebendazole: 0.007-2.5µM) in complete nutrient medium. Control consisted of cell cultivated in medium alone. Cell survival was determined 72 h later by using reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT test). Obtained results indicated that *T. spiralis* ES L1 antigen, in a statistically significant manner, exerted a mild survival inhibition of target tumor cell lines. Mebendazole exerted strong inhibition of the survival. With both compounds stronger effect was determined toward human melanoma tumor cells compared with the effect on mouse melanoma cells.

b) Also, we investigated the effect of ES L1 antigen (50-200 µg/ml) and mebendazole (1.25-5µM) on the apoptosis of mouse B16 melanoma cells. Apoptosis was



measured after cultivation of the cells for 72h with ES L1 antigen, and for 24h with mebendazole. Apoptosis were detected by staining cells with propidium iodide, also with staining by annexin V-FITC and propidium iodide and performing analysis on an EPICS XL-MCL, flow cytometer (Coulter), as well as by morphological criteria after the fixation and staining of the cells with Turk reagent. We found that both compounds induced apoptosis of B16 melanoma cells. ES L1 antigen induced mild, but statistically significant apoptosis of B16 cells at concentration higher than 50µg/ml, reaching maximal values at maximal used concentration of 200µg/ml. Mebendazole in concentration of 2.5µM induced statistically significant apoptosis of these cells (33.3%) compared to control, untreated cells (14.4%). Similar results were obtained with all three method used.

In the following experiments, we studied some mechanisms involved in the apoptosis of B16 cells. We found that inhibition of caspaze -8 and -3 prevented induction of apoptosis with ES L1 (200 µg/ml) and mebendazole (2.5µM).

## II) *In vivo* studies:

We studied the effect of: a) *T. spiralis* infection and b) mebendazole on growth of the tumor using a model of implanting B16 melanoma cells under the skin of C57BL/6 mice. All experimental procedures on the animals were conducted with the approval of the local Ethical Committee.

a) Investigation of the effect of chronic *T. spiralis* infection on the growth of solid melanoma tumor. *T. spiralis* infective L1 larvae were given p.o. in dose of 200 each to the experimental group of mice. After 40 days these animals and those from control group (healthy mice) were grafted with  $5 \times 10^5$  melanoma cells. After 25 days in *T. spiralis* infected animals a significant inhibition of melanoma tumors growth was found.

b) Investigation of the effect of mebendazole on tumor growth. Mice C57Bl/6 strain, were randomly divided into two groups. Solid tumor was experimentally induced by subcutaneous application of  $5 \times 10^5$  melanoma cells in both groups of mice and tumor growth was monitored for 25 days. Peroral application of mebendazole, that was performed in one - experimental group (50mg/kg, during 5 days, started from appearance

of the first palpable tumor in the group), elicited a strong antitumor effect compared to the control group.

In conclusion, our results suggest that ES L1 antigen and mebendazole inhibit survival and have proapoptotic effect on melanoma cells *in vitro*. Per oral application of mebendazole in mice bearing B16 melanoma tumor slow its growth. Excellent safety profile and good tolerability of mebendazole combined with obtained results recommends this drug for further investigation of its applicability as anticancer therapeutical agent. Chronic infection with *T. spiralis* exerted stronger inhibitory effect on B16 melanoma tumor *in vivo* than mebendazole. That could be ascribed to the presence of ES L1 antigen in circulation and activation of immune cells with anti-tumor effect. This topic will be in the focus of future investigations.

Key words: ES L1 antigen *T. Spiralis*, Mebendazole, Melanoma, Apoptosis

Naučna oblast: Veterinary medicine

Uža naučna oblast: Pharmacology and parasitology

UDK broj: 619:615.017:576.89

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>PREGLED LITERATURE</b>	<b>5</b>
2.1.	<i>TRICHINELLA SPIRALIS</i>	6
2.1.1.	Antigeni <i>T. spiralis</i>	14
2.1.1.1.	Ekskretorno – sekretorni (ES L1) antigen <i>T. spiralis</i>	17
2.1.2.	Uticaj <i>T. spiralis</i> i njenih antigena na tumorske ćelije	20
2.2.	MEBENDAZOL	21
2.2.1.	Osnovne fizičko-hemijske osobine	22
2.2.2.	Farmakokinetika	22
2.2.3.	Farmakodinamika	23
2.2.4.	Toksikološka ispitivanja	24
2.2.5.	Imunomodulatorni efekat mebendazola	25
2.2.6.	Efekat mebendazola na tumorske ćelije	26
2.3.	MELANOM	27
2.3.1.	Biologija melanoma	29
2.3.2.	Terapija melanoma	33
2.3.3.	Modeli melanoma na mišu	35
2.3.4.	Otpornost na apoptozu i hemioterapiju	36
2.4.	APOPTOZA	38
2.4.1.	Promene na melanomskim ćelijama tokom apoptoze	44
2.4.2.	Uticaj ES L1 antigena i mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija	45
<b>3.</b>	<b>CILJ I ZADACI ISPITIVANJA</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIJAL I METODE RADA</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>REZULTATI ISPITIVANJA</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>SPISAK LITERATURE</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>129</b>

## Skraćenice

<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
MBZ	Mebendazol
Fem-X	Ćelijska linija humanog melanoma
B16	Ćelijska linija mišjeg melanoma
NBL	Novorođena larva <i>Trichinella spiralis</i>
TS L1 larva	Mišićna, infektivna larva <i>Trichinella spiralis</i>
ES L1 antigen	Metabolički, ekskretorno - sekretorni (ES) produkti L1 larvi <i>T. spiralis</i>

## **1. UVOD**

U svetu su veoma aktuelna istraživanja uticaja infekcije različitim helmintima na oblikovanje imunskog odgovora i na sposobnost zaštite inficiranog domaćina ne samo od reinfekcije već i drugih infekcija (Harris, 2011), kao i od alregijskih (Yazdanbakhsh i sar., 2002; Maizels i sar., 2009), autoimunskih (Maizels i sar., 2004; Riet i sar., 2007; Gruden-Movsesijan i sar., 2010) i malignih bolesti (Wang i sar., 2008). Helmint *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) je parazitska nematoda, izaziva hroničnu infekciju, i ima tri stadijuma životnog ciklusa koji se odvijaju u jednom domaćinu (Pozio i sar., 2007). Stoga se imunski sistem domaćina kontinuirano nalazi pod uticajem molekula poreklom od različitih životnih stadijuma parazita, koji mogu da indukuju *de novo* i urođeni i adaptivni imunski odgovor u domaćinu (Despomer, 1998; Wu, 2008). Boonmars i saradnici (2004) su pokazali da *T. spiralis* moduliše proces apoptoze tokom stvaranja „ćelija negovateljica” od mišićnih ćelija domaćina. S druge strane produkti ovog parazita mogu da utiču na modulaciju imunog odgovora domaćina tako što štite samog parazita od dejstva komponenti komplementa i/ili ćelija imunskog sistema (Nagano i saradnici, 2009). Molinari i Ebersol (1977) su po prvi put pokazali da infekcija sa *T. spiralis* može da zaštiti domaćina od razvoja tumora. Oni su miševima koji su imali hroničnu infekciju sa *T. spiralis* aplikovali B16 melanomske ćelije. Na osnovu praćenja razvoja tumora zaključili su da životinje inficirane sa *T. spiralis* duže preživljavaju i da je tumorsko tkivo značajno manje u odnosu na kontrolne životinje. Novija istraživanja Wang-a i saradnika (2008), pokazala su da infekcija miševa sa *T. spiralis* ili njihova imunizacija sirovim ekstraktom odraslih parazita i novorođenih larvi može da uspori ili inhibira razvoj tumora izazvanih različitim tumorskim ćelijskim linijama (tumor želuca - MFC, hepatom - H22, sarkom – S180). Takođe, u *in vitro* ispitivanjima sirovi ekstrakt *T. spiralis* je indukovao apoptozu kod ćelijske linije humane hronične mieloidne leukemije - K562 i ćelijske linije hepatoma - H7402. Na osnovu dobijenih rezultata ova grupa autora je zaključila da *T. spiralis* sadrži aktivnu supstancu sa antitumorskim delovanjem. Literaturni podaci o uticaju infekcije izazvane *T. spiralis*, odnosno njenih antigena na maligne ćelije su vrlo oskudni (Molinari i Ebersol, 1977; Wang i sar. 2008). Posebno nema podataka o delovanju ekskretorno-sekretornog antigena mišićnih, infektivnih larvi *T. spiralis* (ES L1 antigena) na tumorske ćelije. Ovaj antigen je složena mešavina od oko 40 glikoproteina sa širokim rasponom bioloških efekata koji su tek u fazi otkrivanja i ispitivanja. Njegovo prisustvo se može detektovati u cirkulaciji već 3-4 nedelje nakon infekcije, a za pojedine komponente ovog

antigena je pokazano da po svom delovanju mogu biti parakini (slični citokinima), proteini toplotnog šoka, proteaze, endonukleaze i dr (Nagano i sar., 2009).

Takođe, u današnje vreme velika pažnja se poklanja razvoju novih lekova za terapiju tumora, ali se takođe istražuje koji se od postojećih lekova, posebno onih registrovanih za upotrebu kod ljudi, mogu koristiti u ovu svrhu. Uvođenjem dodatne indikacije već registrovanim lekovima postiglo bi se skraćenje vremena, smanjenje ulaganja i napora od početnih testiranja do uvođenja u kliničku praksu. Jedan od takvih lekova mogao bi biti mebendazol, sintetski antihelminetik širokog spektra delovanja, koji pripada grupi benzimidazola. To je beli do žućkasti prah, molekulske težine 295.29 i ima molekulsku formulu  $C_{16}H_{13}N_3O_3$ . Rastvara se u alkoholu, etru, hloroformu, dimetil sulfoksidu (DMSO). Zbog slabe rastvorljivosti u vodi posle peroralne aplikacije slabo se apsorbuje iz digestivnog trakta. Maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže za 2 do 4 sata od p.o. aplikacije, kumulira se u jetri, bubrezima i plućima. Malo se metaboliše i to dekarboksilacijom. Iz organizma se izlučuje u nepromenjenom obliku mokraćom (5-10%) i izmetom (80-90%). Mebendazol (MBZ) je bezbedan lek sa velikom terapijskom širinom (Ćupić i sar., 2007; Bai i sar., 2011). Antihelmintičko delovanje benzimidazola je dobro poznato, kao i mehanizam njihovog delovanja (inhibiraju polimerizaciju tubulina i prekidaju funkciju mikrotubula u ćelijama parazita (Ćupić i sar., 2007; Bai i sar., 2011). Posle primene nekih antikancerskih lekova takođe nastaje poremećaj dinamike polimerizacije i depolimerizacije tubulina i funkcije mikrotubula, što dovodi do zaustavljanja deobe i apoptoze kancerskih ćelija (Blagosklonny i sar., 1997). Zbog mehanizma delovanja mebendazola počela su ispitivanja njegovog antikancerskog delovanja, i pokazano je da indukuje depolimerizaciju tubulina kod nekoliko kancera (Mukhopadhyay, 2002; Sasaki, 2002). Prvi rad o uticaju mebendazola na tumorske ćelije objavili su Mukhopadhyay i saradnici 2002. Ova grupa autora je ustanovila da mebendazol indukuje dozno i vremenski zavisnu apoptozu kod linija humanih kancera pluća. Takođe, oni su pokazali da mebendazol aplikovan peroralno miševima snažno inhibira rast presađenog humanog tumora, kao i broj i veličinu tumora u eksperimentalnom modelu plućnih metastaza. Slične nalaze su objavili Sasaki i saradnici krajem iste godine. Obe grupe su pokazale da mebendazol ne utiče na normalne ćelije (W138 - ćelije endotela humane umbilikalne vene, odnosno normalne fibroblaste) *in vitro*, dok *in vivo* značajno redukuje vaskularizaciju tumora. Doudican i saradnici (2008) su pokazali da mebendazol

*in vitro* inhibira proliferaciju dve ćelijske linije humanog melanoma (M-14 i SK-Mel-19) i indukuje njihovu apoptozu. Literaturni podaci o uticaju mebendazola na maligne ćelije su oskudni (Mukhopadhyay, 2002; Sasaki, 2002; Doudican i sar., 2008), a podataka o njegovom delovanju na humane (Fem-X) i mišje (B16) melanomske ćelije uopšte nema.

Melanom je najagresivnija forma kancera kože. Loša prognoza za obolele u uznapredovaloj formi je rezultat rezistencije ove forme tumora na konvencionalnu hemioterapiju (citotoksične lekove) (Grossman i Altieri, 2001; Russo i sar., 2009). Pokazano je da melanomske ćelije imaju niski procenat spontane apoptoze *in vivo* i relativno su rezistentne na *in vitro* indukovanu apoptozu različitim lekovima (Soengas i Lowe, 2003; Gray-Schopfer i sar., 2007). Osnova rezistencije melanoma na lekove je disregulacija procesa apoptoze kod ovih tumorskih ćelija. Iz tog razloga supstance koje utiču na apoptotični proces kod melanoma mogu biti veoma interesantne za istraživanje novih terapijskih pristupa (Grossman i Altieri, 2001; Russo i sar., 2009).

Apoptoza (programirana ćelijska smrt) je evolutivno konzervisan, asinhron, genski kontrolisan mehanizam za eliminaciju nepotrebnih ili neželjenih ćelija iz organizma. Apoptoza se karakteriše promenama ćelijske morfologije, kao što su kondenzacija citoplazme i intracelularnih organela, kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra i konačno formiranjem apoptotskih tela (Zhivotovsky, 2004). Različite supstance mogu da utiču na procese apoptoze.

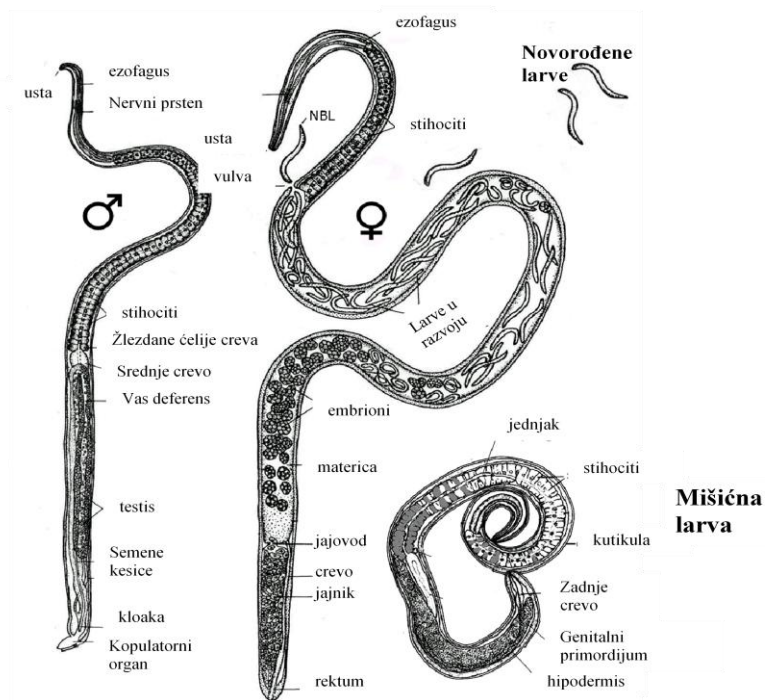


## **2. PREGLED LITERATURE**

## 2.1. *TRICHINELLA SPIRALIS*

U svetu su danas veoma aktuelna istraživanja uticaja infekcije različitim helmintima na oblikovanje imunskog odgovora i na sposobnost zaštite inficiranog domaćina ne samo od infekcije već i od alergijskih (Yazdanbakhsh i sar., 2002; Maizels i sar., 2009; Osada i Kanazawa, 2010), autoimunskih (Maizels i sar., 2004; Riet i sar., 2007; Gruden-Movsesijan i sar., 2010) i malignih bolesti (Wang i sar., 2008).

Helmin *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) je kosmopolitska parazitska nematoda koja pripada rodu *Trichinella*. Ovaj parazit izaziva hroničnu infekciju ljudi, ali i velikog broja sisara, kako domaćih tako i divljih životinja sa svih kontinenata (izuzev Antarktika). Bolest koju ovaj parazit izaziva kod ljudi označava se kao trihinelozu. Pošto kod životinja nema maifestnih znakova bolesti tu govorimo samo o infekciji *Trichinella*-om (Pozio i Murrell, 2006; Zarlenga i sar., 2006, Pozio i sar., 2007). Sve do otkrića nove vrste *Trichinella*-e od strane Britova (1971; 1972) infekcije uzrokovane parazitima roda *Trichinella* pripisivale su se vrsti *T. spiralis*. Vrste *Trichinella* morfološki se ne mogu razlikovati (shema 1.) osim po osobini stvaranja kapsule oko parazita u tkivu poprečno prugaste muskulature. Zato se identifikacija vrsta bazira na biološkim, biohemijskim i molekularnim markerima. Glavni biološki markeri su vrsta domaćina, podnošenje temperature, broj novostvorenih - novorođenih larvi (new born larvae - NBL) produkovanih u specifičnom domaćinu (Pozio i sar., 2001; Pozio i Bruschi, 2001; La Rosa i sar., 2003). Biohemijski markeri za identifikovanje vrsta *Trichinella* baziraju se na primeni izoenzimskih alomarkera (Zarlenga i La Rosa, 2000) i ranije su češće primenjivani. Tokom poslednje dve decenije primarni metod je postala reakcija lančane polimeraze – PCR (Zarlenga i sar., 1999; Zarlenga i La Rosa, 2000; Pozio i La Rosa, 2003). Ta savremena molekularna metoda primenjuje se danas i u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za trihinelozu Srbije (INEP laboratorija).



**Shema 1.** Morfološki izgled *Trichinella spiralis*

U okviru roda *Trichinella* danas je poznato 8 vrsta i 4 neklasifikovana genotipa, koji su podeljeni na dve grupe:

a) one koje prave kapsulu (*Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nativa*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella* T6, T8, T9, i T12); i

b) one koje ne formiraju kapsulu (*Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae*, i *Trichinella zimbabwensis*) (Zarlenga i sar., 2006; Pozio i sar., 2009; Gottstein i sar., 2009).

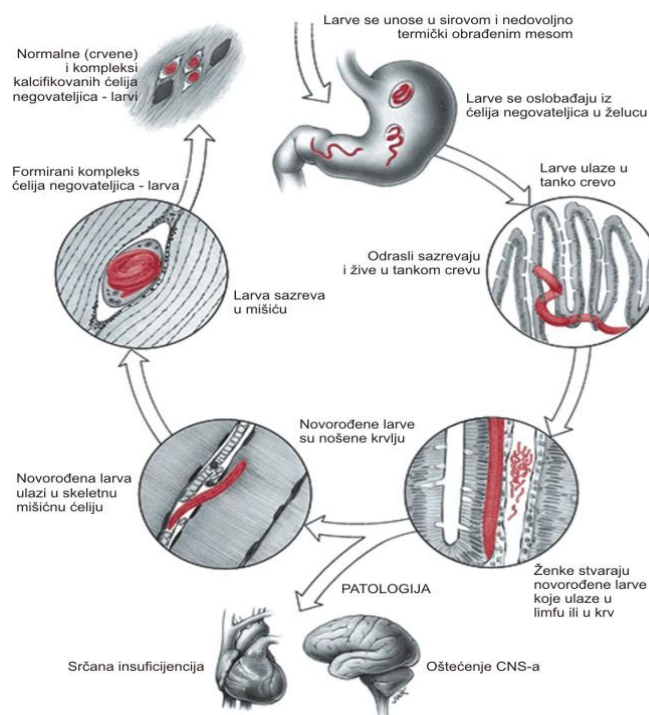
U Srbiji je do sada, primenom molekularne dijagnostike, kod domaćih svinja potvrđeno prisustvo samo *T. spiralis*, dok je kod divljači otkriveno prisustvo dve vrste: *T. spiralis* i *T. britovi* bilo kao pojedinačna ili mešana infekcija (Cvetković i sar., 2011,

Živojinović i sar., 2012). U ovoj disertaciji fokus će biti na vrsti *T. spiralis* čiji se soj održava u INEPu i sa kojim se obavljaju eksperimentalne infekcije glodara.

**Životni ciklus *T. spiralis*** odvija se u jednom domaćinu (shema 2.), a razvije se odvija kroz tri stadijuma: odrasli stadijum (adult), novorođenu larvu (NBL) i mišićnu, infektivnu larvu (TS L1 larva) (Wu i sar., 2001; Yopez-Mulia i sar., 2007; Wu i sar., 2009).

*Trichinella spiralis* je vrlo infektivna za ljude, domaće svinje, miševe, pacove (Pozio i sar., 1992a), konje (Arriaga i sar., 1995) i mnoge divlje sisare (Dame i sar., 1987; Murrell i sar., 1987; La Rosa i sar., 1992). Kod životinja infekcija nastaje konzumiranjem mesa koje sadrži vijabilne mišićne larve *T. spiralis*. Ustanovljeno je da postoje razlike u prijemčivosti različitih sojeva miševa i pacova na infekciju (Bell, 1980,1980a; Vasilev i sar., 2009).

Prisustvo parazita kod domaćih i divljih životinja nije dovoljno samo po sebi za infekciju koja se javlja u humanoj populaciji. Trihinelozu kod ljudi striktno je vezana za kulturu pripreme hrane. Izvor infekcije predstavlja konzumiranje sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa i mesnih preradevina, različitog animalnog porekla, koje sadrže infektivne, mišićne larve *T. spiralis* (Gajadhar, 2007). Nalaz larvi u egipatskoj mumiji je najstariji zabeležen slučaj postojanja infekcije *Trichinella*-om kod ljudi (de Boni i sar., 1977; Čuperlović i Đorđević, 2003).



**Shema 2.** Životni ciklus *T. spiralis*

U Srbiji je prva infekcija kod svinja otkrivena 1918. godine, a prvi slučajevi trihineloze kod ljudi zabeleženi su 1923. godine. Srbija i danas spada u zemlje sa visokom incidencijom trihineloze ljudi a suočena je i sa činjenicom da je infekcija kod domaćih svinja prisutna gotovo na celoj teritoriji zemlje, dok endemski fokusi zahvataju 1/3 njene teritorije (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2012).

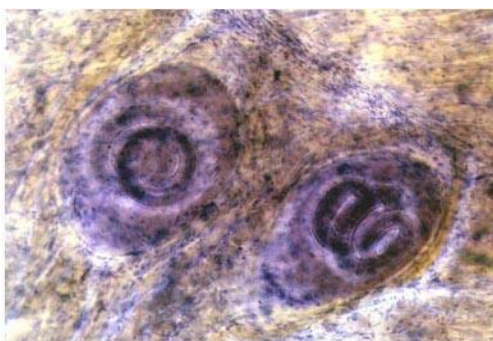
Posle unošenja mesa u kome su prisutne larve *Trichinella*, u želucu se kapsula oko larve razlaže pod dejstvom gastrointestinalnih enzima. Infektivne larve se oslobađaju i odlaze u epitel zida tankog creva i postavljaju se intramulticelularno. Tu larve rastu pri čemu se presvlače četiri puta (stadijumi L2-L4), i sazrevaju nakon nešto manje od dva dana (36h) u polno zrele jedinice (adulti, mužjaci su 1,0-1,8mm a ženke 1,37-3,7 mm dužine) koje kopuliraju, tako da već nakon 5-6 dana ženke proizvode novorođene larve (new born larvae – NBL, dužine 0,1mm). Polaganje NBL traje do kraja života ženki, tj. sve dok efektorni mehanizmi u koje je uključen i imunski odgovor ne izbace parazite iz creva

(obično po isteku 2 nedelje od infekcije kod glodara, a 5-6 nedelja kod ljudi) (Capó i Despommier, 1996; Bruschi i Murrell, 2002, Čuperlović i Đorđević, 2003). Broj novorođenih larvi zavisi od vrste domaćina, imunskog statusa domaćina, i vrste trihinele (Pozio i sar., 1992a; Pozio i sar., 1992b). Jedna ženka može da položi 500 - 15000 novorođenih larvi (kod svinja čak i do 50000 larvi, Teodorović, 2007), koje prodiru kroz submukozu i laminu propriu, i zatim dalje putem krvotoka i limfotoka dospevaju u skeletne mišiće. Pošto ostrim stiletom probiju membranu ćelije, larve se smeštaju u citoplazmi miofibrila gde se odvija sazrevanje u L1 stadijum koje traje 15-20 dana (Despommier i sar., 1998; Guiliano i sar., 2009; Gottstein i sar., 2009).

Mada parazit pokreće snažne efektorne mahinisme odbrane u koje spada i specifičan imunski odgovor u organizmu domaćina, on uspeva da ih izbegne i to prvo u intestinalnoj fazi infekcije (i tako ostvari svoju osnovnu funkciju reprodukcije), a zatim tokom diseminacije i na nivou mišićne faze infekcije. Snažan imunski odgovor štiti domaćina od reinfekcije, a dok god ima živih parazita u mišićima traje modulacija odgovora u pravcu Th2 i regulatornog tipa.

Kada se radi o mišićnim larvama *Trichinella-e*, za razliku od većine intracelularnih parazita one okupiraju ćelije domaćina ali ih ne ubijaju. Metabolički, ekskretorno - sekretorni (ES) produkti L1 larvi (ES L1 antigen) izazivaju reprogramiranje genetskog materijala napadnute mišićne ćelije te ona prolazi kroz fazu dediferencijacije pri čemu gubi sve karakteristike kontraktilne ćelije. Oko oštećene mišićne ćelije razvija se vremenski ograničena inflamatorna reakcija (Appleton i Romaris, 2001), a kao posledica traume izazvane prodorom parazita dolazi i do proliferacije satelitskih ćelija (mioblasta). ES produkti koče sazrevanje satelitskih ćelija u mišićne ćelije, dolazi do njihove nekompletne diferencijacije (mis-diferencijacija) i kao takve se fuzionišu sa oštećenom mišićnom ćelijom. U cilju svog opstanka u organizmu domaćina, *T. spiralis* svojim produktima uspešno moduliše proces apoptoze u fuzionisanim invadiranim miocitima i mioblastima tokom nastanka ćelija negovateljica (Boonmars i sar., 2004). Tako nastaje nova, organizmu potpuno nepoznata, vrsta ćelija čija je osnovna funkcija da omogući opstanak parazita. Ova ćelija se naziva ćelija negovateljica (Despommier, 1998; Wu, 2008). Budući da *T. spiralis* spada u vrste *Trichinella* koje stvaraju kapsulu proces dalje teče tako što: 1.) Sintetišu se

kolageni tipa IV i VI (tip VI je poreklom od ćelija fibroblasta domaćina) koji formiraju kapsulu oko ćelije negovateljice; i 2.) pod uticajem komponenti ES antigena stvara se mreža novih krvnih sudova koja obavija čitav kompleks. Tako nastaje evolucijom uspostavljen entitet: sistem parazit-domaćin (Slika 1.). Kapsula se ponaša kao polupropustljiva membrana kroz koju u pravcu parazita prolaze samo hranljive materije (male molekulske mase) ali ne i specifična antitela usmerena protiv komponenti parazita, dok u pravcu domaćina prolaze metabolički produkti parazita (ekskretorno-sekretorni - ES produkti). Zahvaljujući tome što: 1. efektorske ćelije prepoznaju inkapsuliranog parazita kao sopstveno tkivo i ne reaguju na njega i 2. što parazit putem ES produkata aktivno modulira imunski odgovor domaćina, gasi se inflamatorna reakcija oko parazita što mu sve obezbeđuje imunoprivilegovano mesto u organizmu domaćina. Time parazit izbegava specifični ćelijski i humoralni imunski odgovor, a konstantno komunicira sa domaćinom svojim produktima (Bruschi, 2002).



**Slika 1.** *T. spiralis* – inkapsulirana mišićna larva

Mada parazit pokreće snažan i specifičan imunski odgovor u organizmu domaćina, on uspeva da ga izbegne, kako u intestinalnoj fazi infekcije (i tako ostvari svoju osnovnu funkciju reprodukcije) tako i na nivou mišićnog tkiva (kapsula je nepropustljiva za imunoglobuline i imunokompetentne ćelije). Krajnji efekat ovakve imunske modulacije od strane parazita je kreiranje anti-inflamatorne sredine koja pogoduje i parazitu i domaćinu.

Ćelija negovateljica i parazit koji se u njoj nalazi formiraju stabilan kompleks koji može da opstane veoma dugo u imuno-kompetentnom domaćinu (doživotno kod kratkoživećih vrsta, više godina kod dugoživećih vrsta, odnosno decenija kod ljudi) (Despommier, 1990; Capó i Despommier, 1996; Pozio i Bruschi 2001; Bruschi i Murrell, 2002; Bruschi, 2002; Wu i sar., 2008). Tako se u literaturi navodi podatak da je živa larva *T. spiralis* nađena 39 godina posle infekcije u mišićima čoveka (Fröscher i sar., 1988.; Čuperlović i Đorđević, 2003.).

Produkti ovog parazita takođe mogu da utiču na modulaciju imunog odgovora domaćina (Nagano i sar., 2009). Metaboliti parazita utiču i na polarizaciju imunskog odgovora u pravcu Th2 i regulatornog, anti-inflamatornog tipa. To se ogleda i kroz održavanje citokinskog balansa u organizmu domaćina koji pogoduje dugotrajnom opstanku parazita (Wu i sar., 2008.), ali na određeni način može da pogoduje i domaćinu. Specifični imunski odgovor pruža zaštitu od reinfekcije, a parazitom indukovana imunomodulacija utiče na odgovor organizma i prema drugim, irelevantnim antigenima, kao što su autoantigeni (Riet i sar., 2007) i alergeni (Yazdanbakhsh i sar., 2002). Parazit i njegovi produkti po podacima Britova mogu imati efekat na tok malignih bolesti kod ljudi (Britov i Nivin, 2002; Britov, 2006; <http://www.britov.net/>). Po podacima malobrojnih autora, *T. spiralis* i njen sirovi ekstrakt utiče na različite tumorske ćelije *in vitro* i *in vivo* (Wang i sar., 2008).

Posle primarne infekcije razvija se parcijalni protektivni imunitet. Brzo izbacivanje infektivnih larvi iz creva u sekundarnoj infekciji je dobro opisano kod pacova, a dešava se zbog imunoglobulinom E (IgE) modulirane reakcije. Intestinalni IgE odgovor se javlja ranije, ima viši titar i specifičniji je nego serumski IgE odgovor posle infekcije pacova sa *T. spiralis* (Negrao-Correa, 2001). Međutim, izgleda da u ovaj proces nisu uključeni mastociti (Watanabe i sar., 2005). Inaba i saradnici (2003a,b) su opisali učešće imunoglobulina A (IgA) u ekspulziji ovog parazita iz creva kod miševa. U ponovljenoj eksperimentalnoj infekciji (*challenge infection*) svinja Marti i Murrell (1986) su utvrdili da se adulti izbacuju iz creva unutar 3 nedelje. Međutim, ovakva infekcija kod pacova dovodi do ekspulzije unutar nekoliko sati jer je imunitet usmeren na pre-adultne stadijume (Bell, 1998). Kod pacova, imunitet prema *Trichinella* najviše je izražen u crevima (Goyal i sar., 2002) gde su primarno uključene T ćelije (Wakelin i Goyal, 1996) i to Th2 (T-helper 2) tipa (Khan i



Collins, 2004). Delimični imunitet prema *Trichinella* infekciji može se postići vakcinacijom sa TSL-1 antigenima, naročito antigenom molekulske težine 43 kDa (Goyal i sar, 2002). Vakcinacija miševa ovim antigenom je pokazala redukovanje ukupnog broja larvi za 81% u poređenju sa kontrolnom grupom (Silberstein i Despommier, 1984). Takođe, rađeni su eksperimenti sa intranazalnom vakcinacijom homogenatom larvi ili peptidnim antigenom (kolera toksin, subjedinica B kao adjuvans) koji su pokazali smanjenje broja larvi u mišićima (McGuire i sar., 2002). Testiranje vakcine sa DNK materijalom *Trichinella* kod miševa je pokazalo da dolazi do razvoja specifičnog, protektivnog humoralnog i celularnog imunog odgovora i posledično do značajne redukcije broja larvi u mišićima (Wang i sar, 2005). Prilikom analize ili istraživanja interakcije domaćin - *Trichinella* treba posmatrati jednog domaćina i jednu vrstu *Trichinella*, pošto kod genetički različitih kombinacija podaci nisu uvek uporedivi (Wakelin i Goyal, 1996).

**Klinička slika.** – Simptomi akutne infekcije trihinelom javljaju se samo kod ljudi, dok se kod životinja retko zapažaju i to samo u slučaju infekcije sa velikim brojem larvi. Međutim, klinički znaci su nespecifični i zavise od faze infekcije koja može biti enteralna kada su paraziti prisutni u crevima, ili parenteralna kada se paraziti nalaze u cirkulaciji odnosno u mišićima. Simptomi koji se kod ljudi mogu javiti su: mučnina, dijareja, povišena temperature, bolovi u mišićima, periorbitalni edem, povišen nivo kreatin kinaze (CK), eozinofilija i drugi. Težina kliničke slike zavisi od vrste parazita, broja unetih infektivnih larvi, a zatim i od domaćina (pol, starost, stanje imunog sistema (Capó i Despommier, 1996; Bruschi i Murrell, 2002, Dupouy-Camet i sar., 2002). Kao posledica trihineloze može, ali izuzetno retko, nastati smrtni ishod zbog upale srčanog mišića (miokarditis), mozga (encefalitis), pluća (pneumonija), hipokaliemije i insuficijencije nadbubrežne žlezde (Bruschi; Murrell, 2002).

Prema Naučnom komitetu za veterinarske mere koje se odnose na javno zdravlje Evropske unije (*Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health – SCVPH, European Union*), minimalna infektivna doza za čoveka je 100 - 300 unetih larvi *T. spiralis* (European Commision, 2001; Dupouy-Camet, i Bruschi. 2007), dok unošenje 1000-3000 larvi dovodi do teške bolesti (Dupouy-Camet, i Bruschi. 2007). Smrtni ishod kod

ljudi se dešava nakon unošenja pet larvi po gramu telesne mase, dok kod svinja takav efekat ima unošenje deset larvi po gramu telesne mase (Olsen i sar., 1964).

**Dijagnoza.** – Postavljanje dijagnoze trihineloze kod ljudi, kao i detekcija infekcije sa *Trichinella spp* kod životinja vrši se direktnom i indirektnom metodom. Dijagnostikovanje se sprovodi iz medicinskih, naučnih ali i privrednih razloga (trgovina životinjama za klanje, mesom i proizvodima od mesa). Direktnom, parazitološkom metodom otkriva se prisustvo parazita mikroskopskim pregledom biopsijskog materijala mišića, ili uzorka nakon klanja životinja i urađene veštačke digestije. Indirektna metoda dijagnostike predstavlja nalaz specifičnih antigena ili specifičnih antitela u serumu ili telesnim tečnostima (Yepez-Mulia i sar., 2007). Nalaz antitela i antigena u serumu pacijenta je dovoljan za postavljanje sigurne dijagnoze, tako da se tada ne radi biopsija mišića.

**Terapija.** – U praksi se lečenje sprovodi kod ljudi ali ne i kod životinja. U terapiji se koriste atiparazitici, i cilj njihove upotrebe je eliminacija parazita a samim tim i smanjenje oštećenja mišića, dok se za otklanjanje opštih simptoma, zavisno od težine kliničke slike, koriste antipiretici, analgetici a po potrebi i kortikosteroidi (Bruschi i Murrell, 2002).

### **2.1.1. Antigeni *T. spiralis***

*T. spiralis* poseduje brojne molekule koji su karakteristični za pojedine stadijume životnog ciklusa dok su drugi prisutni u svim stadijumima. Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum dolazi do promena u ekspresiji antigena na površini tela parazita ali i ekskretorno-sekretornog (ES) antigena što je jedna od strategija izbegavanja odbrane domaćina (Nakada i sar., 2005). Isto tako, različiti stadijumi larvi imaju i različite antigene. Veruje se da je to jedan od mehanizama preživljavanja tj. opstanka vrste (Ortega-Pierres i sar., 1996).

*Trichinella spiralis* je sposobna da inficira puno različitih vrsta domaćina (Wakelin i Goyal, 1996). Delovanje imunskog sistema domaćina prema *Trichinella*-i deli se na tri osnovna odgovora čija je posledica: 1) izbacivanje infektivne larve (kod reinfekcije), 2) izbacivanje odraslih oblika i 3) imunitet prema novorođenim larvama (Bell, 1988).

Zavisno od lokalizacije antigeni *Trichinella* se dele na tri grupe: 1. Površinski; 2. Ekskretorno/sekretorni (ES); i 3. Rezidualni somatski antigeni (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999).

Prema sposobnosti da indukuju pojavu humoralnog imunskog odgovora u dva talasa antigeni *Trichinella-e* se mogu podeliti u dve grupe. Naime, pojava specifičnih antitela se može detektovati već dve nedelje posle infekcije (na kraju intestinalne faze kod miševa), a drugi talas antitela se javlja 4-5 nedelja od infekcije (mišićna faza). Antigenima prve grupe pripadaju antigeni koji dovode do sinteze antitela u ranoj (intestinalnoj) fazi infekcije kod domaćina. Ovi antigeni se nalaze u unutrašnjim slojevima kutikule, hemolimfi, embrionskim omotačima, hipodermalnoj žlezdi, stihocitima i egzokrinim granulama reproduktivnog trakta mišićnih larvi (Takahashi i sar., 1990; Takahashi i sar., 1993).

Pored toga, rana faza odgovora na prisustvo larvi specifična je za antigene koji sadrže fosforilholin (PC) (Morelle i sar., 2000; Takahashi i sar., 1993). PC grupa je prisutna kod nekoliko glikoproteina koji se oslobađaju tokom presvlačenja larvi, a ne nalaze se u sastavu ES produkata niti na površini mišićne larve.

Druga grupa antigena se označava kao grupa II ili TSL antigeni (Appleton i Romaris, 2001). Ovi antigeni indukuju kasnu fazu imunskog odgovora i izazivaju pojavu antitela 4-5 nedelja nakon infekcije (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999). Oni se nalaze na površini, stihocitnim granulama i ES produktima L1 larvi *T. spiralis* (Takahashi, 1997; Bolas-Fernandez i sar., 2006). Antigeni koji indukuju kasnu fazu odgovora organizma su uglavnom glikoproteini (Takahashi i sar., 1993). Primenom monoklonskih antitela i na osnovu imunohemijskih karakteristika, antigeni su klasifikovani u 8 grupa (TSL1- TSL8) (Yepez-Mulia i sar., 2007; Appleton i sar., 1991). TSL-1 antigeni privlače posebnu pažnju istraživača od kada je pokazano, na modelu infekcije kod miša, da mogu izazvati stvaranje antitela koja učestvuju u zaštiti od reinfekcije (Bolas-Fernandez i sar., 2006; Ortega-Pieres i sar., 1996). Ovi antigeni se oslobađaju (sekretuju ili ekskretuju) najpre u intestinalnom epitelu ubrzo nakon infekcije, a potom ponovo tek kada se NBL larve nasele u mišićima i

počne njihova transformacija u L1 formu. Ovo sve sugerise značajnu funkcionalnu ulogu pomenutih antigena u uspostavljanju i održavanju parazitizma.

Velika većina anti-TSL1 antitela prepoznaje glikoproteine molekulske mase između 40 i 70 kDa kako u homogenatu mišićne larve tako i u ES produktima u Western blotu (kada se SDS-PAGE izvodi pod redukujućim uslovima) (Ortega-Pierres i sar., 1996).

TSL-1 antigeni imaju karbohidratne epitope koji nose neuobičajeni di-deoksišećer (3,6-dideoksiarabinoheksosa – tivelozna), karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog roda *Trichinella* (Gomez-Morales i sar., 2008). Tivelozna je stadijum specifična kod *Trichinella* i antitivelozna antitela ne štite domaćina od odraslih stadijuma (Appleton i Romaris, 2001; Goyal i sar., 2002).

Mada neki glikoproteini (koji su komponente ES antigena) nose epitope specifične za mišićne larve *Trichinella*-e, ti proteini mogu biti prisutni i u sastavu ostalih stadijuma parazita. Tako je primenom 7C2C5 antitela dokazano prisustvo epitopa specifičnog samo za stadijum mišićnih larvi kod čitavog roda *Trichinella*. Epitop je lociran na tripletu antigena MW 45,49,53 kDa (Gamble i Graham, 1984a,b). Ovaj triplet je od izuzetnog imuno-dijagnostičkog značaja za otkrivanje prisustva specifičnih antitela i od naročite je koristi kada se prepozna u Westernblotu (metoda se koristi kao potvrдна u slučaju nejasnih ili kontradiktornih rezultata dobijenih sa ELISA i/ili imunofluorescentnim testovima).

Druga istraživanja su pokazala da je glikoprotein od 53 kDa prisutan u ES produktima ne samo mišićne larve *T. spiralis* već i odraslih parazita. Antitela protiv ove komponente se pojavljuju 8 dana posle infekcije (Romaris i sar., 2003) što ukazuje na ulogu ovog glikoproteina u indukciji ranog odgovora na infekciju sa *Trichinella*-om (Nagano i sar., 2008).

Istraživanja biološki aktivnih komponenti ES antigena su u punom zamahu, a jedan deo tih zapažanja opisan je u narednom odeljku.

Dok se pojedini antigeni *Trichinella*-e i dalje izučavaju u smislu njihove što bolje biološke i imunološke karakterizacije i dok se još samo naslućuju mehanizmi njihovog dejstva, dosadašnje poznavanje parazita omogućava korišćenje pojedinih antigena u dijagnostičke svrhe tj. za otkrivanje prisustva specifičnih antitela u krvi i/ili telesnim

tečnostima. Sirovi antigen mišićnih larvi (ekstrakt homogenta) se koristi kao dijagnostički antigen u komercijalnom Western blot kitu (LDBIO Diagnostics, Lyon, France) za detekciju *Trichinella* antitela (Yera i sar., 2003). Mada su somatski antigeni genetski konzervisani i manje specifični od drugih antigena, oni mogu biti korisni naročito u detekciji ranih stadijuma infekcije *Trichinella*-om (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999). Institut za primenu nuklearne energije - INEP proizvodi komercijalni imunofluorescentni test (antigen je parafinski isečak celih mišićnih larvi) koji služi za otkrivanje trihineloze kod ljudi. Za potrebe istraživanja u INEP-u se proizvodi i ELISA kit (antigen je ES L1 antigen), a namenjen je za detekciju antitela u serumu ljudi i svinja.

#### **2.1.1.1. Ekskretorno – sekretorni (ES L1) antigen *T. spiralis***

Kao što je to ranije već opisano, infekcija sa *T. spiralis* nastaje posle unošenja sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa koje sadrže infektivne mišićne larve. Larve se oslobađaju posle želudačne digestije mišićnog tkiva i sazrevaju u odrasle oblike u mukozni tankih creva. Adulti se pare i ženke donose na svet novorođene larve koje migriraju do poprečno prugastih mišića. Larva se razvija u mišićnu larvu, a u mišićima one dovode do proliferacije satelitskih ćelija (Wu i sar., 2001; Yopez-Mulia i sar., 2007) i transformacije mišićne ćelije u ćeliju negovateljicu u debeloj kolagenskoj kapsuli (Despommier i sar., 1990). Ova transformacija mišićne ćelije je inicirana ekskretorno – sekretornim antigenom mišićnih larvi (ES L1 antigen). To ističe njegovu ulogu u ostvarivanju parazitizma (Nagano i sar., 2009).

Ekskretorno-sekretorni (ES) antigen mišićnih larvi *Trichinella spiralis* (ES L1 antigen) je značajan za istraživanja ne samo zbog njegove uloge u formiranju ćelija negovateljica već i zbog njegovog značaja za održavanje sistema parazit-domaćin kao i zbog njegovih antigenih osobina. Istraživanja su napredovala korišćenjem modernih analitičkih tehnika tako da je u fokusu istraživanja danas identifikacija funkcija različitih proteina u sastavu ES L1 antigena. Ovo je neophodno da bi se rasvetlio odnos između parazita i domaćina (Nagano i sar., 2009).

Dvodimenzionalnom Western blot analizom Wu i saradnici su (1999) pokazali da se antigeni peptidi *T. Spiralis* sastoje od oko 100 proteinskih tačaka, molekulske težine od 22 do 80 kDa. Nove molekularne tehnike (MALDI-TOF) i laserska hromatografija - masena spektrometrija su pokazale da 43 proteinske tačke (od 52 analizirane) predstavljaju samo 13 različitih proteina, što ukazuje da su brojne izoforme proteina prisutne u ES L1 antigenu (Nagano i sar., 2009).

Glavni sastojci ES L1 antigena uključuju 43-, 53-, i 45 kDa glikoproteine koji nastaju u stihocitima mišićne larve.

Glikoproteini molekulske težine 43-, 53-, i 45- kDa su glavni antigeni, najviše su izučavani jer su oni imunodijagnostički značajni. Ovi glikoproteini pripadaju TSL1 antigenima i imaju eptiop koji je karakterističan za mišićne larve čitavog genusa *Trichinella*. Na njima je prisutan i šećer jedinstven samo za ovu vrstu parazita - taveloza (Nagano i sar., 2009).

Ovi glikoproteini su okarakterisani na molekularnom nivou a važni su za transformaciju mišićne ćelije, formiranje kapsule i parazitiranje.

ES L1 antigen pored glikoproteina molekulske težine 43-, 53-, i 45 kDa sadrži i mnogo drugih proteina kao što su proteini toplotnog šoka, endonukleaze, proteinaze, protein kinaze, inhibitore proteinaza, superoksid dismutaze, glikozidaze i druge proteine (Bola's-Fernandez i del Corral Bezara, 2006; Nagano i sar., 2009).

Proteini ES L1 antigena deluju na ćelije domaćina i tkiva da bi ostvarili funkciju. Tako da su značajni ne samo sa imunološkog stanovišta nego i u pogledu interakcije parazit – domaćin. Intracelularni paraziti sekretuju funkcionalne proteine u domaćinsku ćeliju da bi se uspostavio parazitizam i parazit preživeo u dužem periodu. Danas se funkcionalni proteini proizvode za mnoge potrebe uključujući i terapijsku primenu. Parazitski antigeni nisu izuzetak (Nagano i sar., 2009).

### **Glikoproteini u sastavu ES L1 antigena**

**Glikoprotein 43- kDa.** – Ovaj glikoprotein je izolovan 1990 godine (Gold i saradnici), ima 344 aminokiselina, a geni koji ga kodiraju se eksprimiraju u periodu

formiranja kapsule. Ovaj glikoprotein je odgovoran za formiranje kapsule što se dešava odmah po ulasku novorođene larve u mišićnu ćeliju. Ovaj glikoprotein utiče na mišićnu ćeliju da se formiraju ćelije negovateljice. Nova saznanja pokazuju da ovaj glikoprotein ima aktivnost deoksiribonukleaze, koja je kisela endonukleaza, nalazi se u lizozomima i nukleusu ali i sekretuje (Nagano i sar., 2009). Deoksiribonukleaza II koju sekretuje mišićna larva uklanja oslobođenu DNK koja nastaje usled apoptoze mišićnih ćelija tokom formiranja ciste u mišićnim ćelijama. Na taj način ovaj enzim sprečava razvoj autoimnskog odgovora koji ti nukleotidi mogu pokrenuti u organizmu domaćina.

***Glioprotein 53-kDa.*** – Geni koji ga kodiraju identifikovani su 1990 i 1995 godine (Zarlenga i Gamble). Ovi geni se eksprimiraju u larvi posle formiranja kapsule, kao i kod odraslih oblika ali ne i kod novorođenih larvi, niti u larvi pre formiranja kapsule (Wu i sar., 2002). Ovo ukazuje da 53-kDa glikoprotein nije odgovoran za transformaciju mišićne ćelije niti formiranje kapsule. Izgleda da ovaj protein ima ulogu u održavanju parazitizma i modulaciji imunskog odgovora domaćina (Nagano i sar., 2009). Upotrebom monoklonskog antitela US5 prema tom epitopu pokazano je da je prisutan samo kod *T. spiralis*. Ko i Fan (1996) su ovaj glikoprotein označili kao jedan od proteina toplotnog šoka (HSPs).

***Glikoprotein 45-kDa.*** – Ovaj glikoprotein se nalazi u beta granulama kod mišićnih larvi ali i u stihocotnim granulama tipa jedan kod odraslih parazita. Ovaj protein takođe ima tivelozu, a nalazi se u beta i gama stihocotima sekretornih organa mišićne larve. Ovaj protein pripada familiji tripsin sličnih serin proteaza (Nagano i sar., 2009). Novija istraživanja glikoproteina od 45 kDa pokazuju da on može da inhibira funkcije neutrofila kao što su mobilnost, hemotaksa, oksidativni metabolizam i vezivanje integrina koji su neophodni za imunski odgovor domaćina (Bruschi i sar., 2000). Bioinformatička analiza svrstala je ovaj protein u familiju tripsinu sličnih serin-proteinaza (Robinson i sar., 2007).

***Ostali proteini u ES L1 antigenu.*** – Osim glavnih glikoproteina u ES L1 antigenu se nalaze i proteini toplotnog šoka, koji štite parazite od stresa i oštećenja, i imaju važnu ulogu u invaziji tkiva i intracelularnom preživljavanju. Cistein proteinaze inhibitori (cistatini) su važni imunomodulatori, deluju kao proinflamatorni faktori. Glikozidaze se nalaze u ES produktima mnogih parazita. Uloga im je u invaziji ćelija, modifikaciji i remodelovanju površine ćelija. Serin treonin protein kinaze se nalaze u ES L1 antigenu,

imaju 70 i 135 kDa. Endonukleaze se takođe nalaze u ES L1 antigenu. Timidilat sintaza, kao i Faktor inhibicije makrofaga (*MIF*) se nalazi u ES L1 antigenu. Ovaj poslednji je parakin, produkt parazita koji je po svojim osobinama komplementaran istoimenom citokinu. Prisutne su i proteinaze, koje su dobro istražene. Mogu biti uključene u brojne funkcije: prodiranje u tkivo, migracija larvi, izbegavanje imunskog sistema, usporavanje koagulacije krvi, digestiju, topljenje i degradaciju celularnog matriksa. Mogu da služe i kao imunodominantni antigeni koji stimulišu protektivni imunski odgovor ili kao potencijalna meta u terapiji. U ES L1 antigenu nalaze se serin proteaze i metaloproteinaze. Proteinaze u ES L1 antigenu su molekulske težine 33, 62 i 230 kDa. Inhibitor serin proteinaze (serpin) inaktivira serin proteinaze tako što formira komplekse sa njima. Uloga je u modulaciji i inhibiciji imunskog odgovora domaćina. Serpin se nalazi u stihocitima mišićne larve i ranoj fazi infekcije (Nagano i sar., 2009).

### **2.1.2. Uticaj *T. spiralis* i njenih antigena na tumorske ćelije**

Literaturni podaci o uticaju infekcije *T. spiralis*, odnosno njenih antigena na maligne ćelije su vrlo oskudni. Postoje malobrojni podaci o delovanju sirovog ekstrakta *T. spiralis* na tumorske ćelije, ali ne i podaci o delovanju ES antigena. Pre nekoliko decenija Molinari i Ebersole (1977) su pokazali da infekcija sa *T. spiralis* može da zaštiti domaćina od razvoja tumora. Oni su miševima koji su imali 176 dana hroničnu infekciju sa *T. spiralis* aplikovali B16 melanomske ćelije. Na osnovu praćenja razvoja tumora zaključili su da životinje inficirane sa *T. spiralis* duže preživljavaju i da je tumorsko tkivo, koje se u njihovom organizmu razvija, značajno manje u odnosu na kontrolne životinje. Novija istraživanja Wang-a i sar. (2008), pokazala su da akutna infekcija miševa sa *T. spiralis*, kao i intravenozna aplikacija sirovog ekstrakta odraslih parazita i novorođenih larvi može da uspori ili inhibira razvoj tumora izazvanih različitim tumorskim ćelijskim linijama (tumor želuca - MFC, hepatom – H22, sarkom – S180). Takođe, u ispitivanjima *in vitro* sirovi ekstrakt *T. spiralis* je indukovao apoptozu kod ćelijske linije humane hronične mijeloidne leukemije – K562 i ćelijske linije hepatoma – H7402. Na osnovu dobijenih rezultata ova grupa autora je zaključila da *T. spiralis* sadrži aktivnu supstancu sa antitumorskim delovanjem (Wang i sar., 2008).



## 2.2. MEBENDAZOL

U današnje vreme velika pažnja se poklanja razvoju novih lekova za terapiju tumora, ali se takođe istražuje koji se od postojećih lekova registrovanih za upotrebu u humanoj i veterinarskoj medicini mogu koristiti u ovu svrhu. Uvođenjem dodatne indikacije već registrovanim lekovima postiglo bi se skraćanje vremena, smanjenje novčanih ulaganja, i uloženog rada od početnih testiranja do uvođenja u kliničku praksu.

Nova istraživanja ukazuju da bi jedan od takvih lekova mogao biti mebendazol, pripadnik grupe benzimidazola, zbog toga što sprečava rast različitih tumora (Mukhopadhy, 2002; Sasaki, 2002; Doudican, 2008). Benzimidazoli su antihelmintici širokog spektra delovanja, koji imaju visoku efikasnost i nisku toksičnost. To su sintetska jedinjenja koja u svom jezgru imaju 1,2-diaminobenzen. Prvi pripadnik ove grupe, tiabendazol, počeo je da se koristi u kliničkoj praksi 60-tih godina prošlog veka, a ubrzo za njim u primenu je uveden i mebendazol. Benzimidazoli efikasno deluju protiv nematoda, nekih cestoda i trematoda kod preživara, konja, svinja, pasa, mačaka, ptica i ljudi (Ćupić i sar., 2007; Adams, 2008; Bai i sar., 2011).

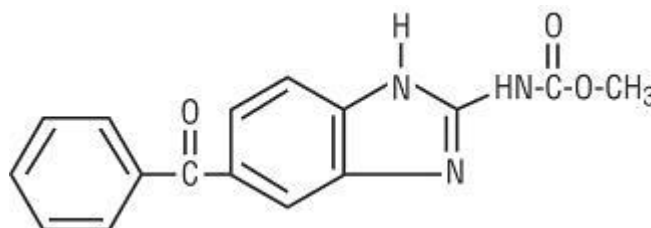
Benzimidazoli deluju na odrasle oblike, ali i larvicidno i ovicidno. U ćelijama parazita benzimidazoli se vezuju za tubulin i dovode do prekida polimerizacije za vreme formiranja mikrotubula. Zbog toga se smanjuje sekrecija mnogih enzima (npr. fumarat reduktaze). Takođe benzimidazoli blokiraju preuzimanje glukoze kod parazita i tako inhibiraju sintezu ATP-a. Kao posledica ovakvog delovanja parazit postaje potpuno nepokretan i uginjava. Važno je naglasiti da benzimidazoli imaju mnogo veći afinitet za tubulin nematoda nego sisara (Katz, 1982; Ćupić i sar., 2007; Adams, 2008). Za lekove ove grupe je potvrđeno da pored antihelmintskog delovanja ispoljavaju i druge efekte, kao što su: imunomodulatorni – potenciraju delovanje imunskog sistema ili omogućavaju ponovno uspostavljanje njegove aktivnosti. Pokazano je da thiabendazol vrši potenciranje makrofagne aktivnosti i poboljšavanje citoksičnog odgovora (Sajid i sar., 2006), dok oxfendazole poboljšava imuni odgovor na nematode, a fenbendazole kod zdravih miševa stimuliše proliferativni odgovor T i B limfocita na nespecifične poliklonske aktivatore.

takođe, ovi lekovi mogu inhibirati i proliferaciju tumora (Mukhopadhyay, 2002; Sasaki, 2002; Doudican, 2008).

### 2.2.1. Osnovne fizičko-hemijske osobine

Mebendazol (5-benzoil-2-benzimidazol-karbamat ili methyl N-[6-(benzoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate) je sintetski antihelmintik širokog spektra delovanja koji pripada grupi benzimidazola. Efikasno se koristi više od 30 godina u humanoj i veterinarskoj medicini u terapiji infestacija izazvanih pre svega nematodama, ali i nekim cestodama kod ovaca, konja, magaraca, pasa, živine i ljudi. (Dayan, 2003; Ćupić i sar., 2007; Adams, 2008; Bai i sar., 2011; Yadav i Singh, 2011).

Mebendazol je beli do žućkasti prah, molekulske mase 295,29 i ima molekulsku formulu  $C_{16}H_{13}N_3O_3$  (shema 3.). Rastvara se u alkoholu, etru, hloroformu, dimetilsulfoksidu (DMSO).



Shema 3. Molekulska formula mebendazola

### 2.2.2. Farmakokinetika

**Apsorpcija, distribucija, biotransformacija i izlučivanje.** - Zbog slabe rastvorljivosti u vodi i organskim rastvaračima, mebendazol se posle peroralne aplikacije slabo apsorbuje iz digestivnog trakta (Ćupić 2007, Adams, 2008). Kod zdravih ljudi mebendazol se posle peroralne primene apsorbuje samo 5-22%. Tako, posle p.o. primene u dozi od 1,5g ovaj lek u plazmi postiže koncentraciju veću od 5 $\mu$ g/L. Ukoliko se mebendazol aplikuje u istoj dozi sa masnom hranom ili obrokom, tada mu nivo u plazmi iznosi 27-42 $\mu$ g/L. Kod pacijenata obolelih od ehinokokoze, mebendazol postiže

koncentraciju u plazmi od 500 µg/L. Koncentracija u plazmi je veća od one u cerebrospinalnoj tečnosti ili u cistama i do 10 puta. (Dayan, 2003). Maksimalnu koncentraciju u plazmi mebendazol postiže za 2 do 4 sata od p.o. aplikacije. Kumulira se u jetri, bubrezima i plućima. Mebendazol se malo metaboliše (dekarboksilacijom) i podleže metabolizmu prvog prolaza u zidu creva i jetri kod ljudi i životinja. Izlučuje se u obliku metabolita u žuči i urinu, ali se najveća količina izluči nepromenjena. Istovremena aplikacija cimetidina i mebendazola dovodi do povećanog nivoa mebendazola u plazmi, najverovatnije zbog inhibicije metabolizma preko citohroma P450 u jetri (Dayan, 2003). Poluvreme eliminacije mebendazola iznosi 2,8-9 sati (Ćupić i sar, 2007; Adams, 2008; Bai i sar., 2011).

### 2.2.3. Farmakodinamika

**Mehanizam delovanja.** - Mebendazol kao pripadnik grupe benzimidazola deluje, kao i drugi pripadnici ove grupe, tako što inhibira polimerizaciju tubulina i prekida funkciju mikrotubula u ćelijama parazita (Ćupić i sar, 2007; Adams, 2008; Bai i sar., 2011).

Posle primene nekih antikancerskih lekova takođe nastaje poremećaj dinamike polimerizacije i depolimerizacije tubulina, a time i funkcije mikrotubula, što dovodi do zaustavljanja deobe i apoptoze kancerskih ćelija (Blagosklonny i sar, 1997).

\*\*\*

**Terapijske doze.** - Mebendazol se aplikuje peroralno u dozi 10-15 mg/kg telesne mase (t.m.) ovcama, 5-10 mg/kg konjima, 25-50 mg/kg psima i 10 mg/kg t.m. živini (Ćupić 2007, Adams, 2008). Prihvatljiv dnevni unos - ADI (engl. Acceptable Daily Intake) mebendazola za upotrebu u veterinarskoj medicini prema Evropskoj agenciji za lekove (EMA) je 0,0125mg/kg/dan (Dayan, 2003). Obavezno je poštovanje karence (zabrana upotreba mesa i mleka poreklom od tretiranih životinja) tokom 14 dana od poslednje upotrebe.

U terapiji trihineloze ljudi mebendazol se primenjuje u dnevnoj dozi od 5 mg/kg/dan (mada u nekim zemljama kao što su Nemačka, Italija i Litvanija, preporučuju

upotrebu 20-25 mg/kg/dan) tokom 10-15 dana (Dupouy-Camet, i Bruschi, 2007). Kod cistične ehinokokoze primenjuju se veće doze mebendazola (30-70 mg/kg/dan) tokom 6-24 meseci (Vutova i sar., 1999). Kontraindikovana je terapijska primena mebendazola kod žena tokom trudnoće. Ne preporučuje se primena mebendazola kod dece mlađe od dve godine (Dayan, 2003; Dupouy-Camet, i Bruschi, 2007)

#### 2.2.4. Toksikološka ispitivanja

**Akutna toksičnost.** - Mebendazol je bezbedan lek, i kao svi pripadnici grupe benzimidazola ima veliku terapijsku širinu. Srednja akutna letalna doza (LD<sub>50</sub>) posle oralne primene iznosi: za mužjake Wistar pacova 1434 mg/kg, a za ženke 714 mg/kg, miševne 620 mg/kg, kuniće 1280 mg/kg i 1280 mg/kg za pse. Konjima se može aplikovati i 40 puta veća doza od terapijske, a živini 200 puta veća, bez pojave neželjenih efekata. Međutim, kod pasa i u terapijskim dozama može oštetiti jetru (Ćupić, 1999; Dayan, 2003).

**Hronična toksičnost.** – Kada je mebendazol davan u hrani Wistar pacovima tokom 13 nedelja (u dozama koje iznose do 127,3 mg/kg/dan (mužjaci), odnosno do 151,6 mg/kg/dan (ženke) zapaženo je nekoliko smrtnih slučajeva, gubitka telesne mase, anemije i povećanog nivoa alkaline fosfataze u serumu kod jedinki koje su dobile najveću testiranu dozu. Relativna masa jetre je bila povećana zbog vakuolizacije hepatocita i proliferacije žučovoda. Doza koja nije dovela do efekta - NOEL (engl. No Observed Effect Level) iznosila je 7,8 mg/kg/dan kod mužjaka i 8,4 mg/kg/dan kod ženki (Dayan, 2003).

Peroralno testiranje hronične toksičnosti mebendazola kod pasa u trajanju od 13 nedelja (koncentracije do 10 mg/kg/dan) pokazalo je da kod primene najviše testirane doze kod pojedinih jedinki nastaje anemija i povećani nivo aktivnosti alkaline fosfataze, bilirubina, holesterola i ukupnih proteina. NOEL je bio 2,5 mg/kg/dan. U drugom eksperimentu izvedenom na psima rase Bigl ustanovljeno je da mebendazol (40mg/kg/dan) davan p.o. 24 meseca nije doveo do dozno zavisnih efekata (Dayan, 2003).

**Mutageneza.**– Mebendazol ne dovodi do genotoksičnosti. Ovo je utvrđeno Amesovim testom, izvedenom na bakterijama *Salmonella tiphymurium*. Smatra se da nema rizika od aneuploidije kod ljudi, pošto se visoke doze koje *in vitro* dovode do poremećaja ne postižu u terapijskoj primeni ovog leka kod ljudi i životinja (Dayan, 2003).

**Reproduktivna toksičnost.** - Mebendazol ne izaziva teratogene efekte kod pacova (NOEL za fetotoksičnosti i teratogenost je 10 mg/kg/dan), kunića, svinja, pasa, mačaka, ovaca i konja (Ćupić, 1999). Međutim kod pacova u dozama višim od 10 mg/kg/dan dovodi do toksičnih i teratogenih efekata (Dayan, 2003).

**Karcinogenost.** – Karcinogen potencijal mebendazola nije zapažen kod pacova i miševa koji su dobijali ovaj lek u dozi od 40 mg/kg/dan tokom 24 meseca (Dayan, 2003).

### **2.2.5. Imunomodulatorni efekat mebendazola**

Pored sposobnosti da inhibira polimerizaciju tubulina i prekida funkcije mikrotubula u ćelijama parazita čime se narušava proces preuzimanja glukoze i reproduktivna funkcija parazita (Ćupić i sar., 2007) smatra se da efikasnosti mebendazola dobrinose i njegova imunomodulatorna svojstva (Tolstoj i sar., 2007). Mada je postojanje ovakvih osobina očekivano pošto ih benzimidazoli, grupa kojoj pripada poseduju, začuđujuće je mali broj podataka iz literature na ovu temu. Danas se zna da da mebendazol u dozi od 10 $\mu$ M *in vitro* dovodi do povećanog oslobađanja IL-8 i TNF $\alpha$  iz humanih monocita (linija THP-1) (Mizuno i Toyoda, 2011).

Efekti lekova ove grupe se ispoljavaju preko različitih mehanizama: tiabendazol povećava produkciju citokina (interleukina-1) kao i nivo ukupnih proteina seruma i imunoglobulina. Takođe povećava broj ćelija u limfnim čvorovima, slezini, kostnoj srži i timusu. Tiabendazol i fenbendazol aktiviraju proizvodnju superoksidnih anjona i fagocitnu aktivnost makrofaga. Aktivaciju humanih makrofaga vrši i mebendazol. Oksfendazol kao i neki drugi antiparazitici može da dovede do smanjenja broja leukocita i limfocita. U literaturi postoje podaci da fenbendazol i oksfendazol snižavaju produkciju specifičnih antitela. Tiabendazol uspostavlja normalnu funkciju imunog sistema naročito kod imunosuprimiranih organizama. Tako, nakon imunosupresije kod životinja izazvane radijacijom (450 Rad), tiabendazol gotovo potpuno uspostavlja odloženi hipersenzitivni odgovor. Tiabendazol u koncentracijama od 1, 3, 6, 12 i 25 mg/kg normalizuje proliferativni odgovor limfocita na mitogene, teladi tretiranih deksametazonom. Međutim u dozama od 50 i 100 mg/kg nije bio efikasan. Takođe tiabendazol nije mogao da normalizuje funkciju neutrofila kod teladi tretirane deksametazonom. Smatra se da

tiabendazol može imati ulogu kao adjuvant u terapiji kancera, zbog poboljšanog citotoksičnog odgovora i značajnog smanjenja rasta metastaza kod plućnog kancera. Tiabendazol poboljšava imuni status kod ovaca koje su prirodno inficirane nematodama (Lundy i Lovett, 1976; Sajid i sar., 2006).

### **2.2.6. Efekat mebendazola na tumorske ćelije**

Mesto delovanja antikancerskih lekova varira, i jedno od takvih mesta je tubulin (glavna proteinska komponenta mikrotubula) (Jordan i Wilson., 1998). Mnogi lekovi koji deluju na mikrotubule su visoko aktivni, sa značajnom kliničkom aktivnošću protiv ćelija tumora. Međutim, mnogi od ovih lekova su toksični, što ograničava njihovu upotrebu.

Za benzimidazole je poznato da se vezuju za tubule, a njihov efekat na ćelije tumora je nedovoljno izučen. Zbog mehanizma delovanja mebendazola počela su ispitivanja njegovog antikancerskog delovanja, a oskudni podaci iz literature pokazuju da on indukuje depolimerizaciju tubulina kod nekoliko kancera (Mukhopadhyay i sar., 2002; Sasaki i sar., 2002). Prvi rad o delovanju mebendazola na tumorske ćelije objavili su Mukhopadhyay i sar. 2002. Ova grupa autora je ustanovila da mebendazol indukuje, dozno i vremenski zavisnu, apoptozu kod nekoliko linija humanih kancera pluća. Takođe, oni su pokazali da mebendazol aplikovan peroralno (p.o.) miševima snažno inhibira rast presađenog humanog tumora, kao i broj i veličinu tumora u eksperimentalnom modelu plućnih metastaza (Mukhopadhyay i sar., 2002). Slične nalaze su objavili Sasaki i saradnici krajem iste godine. Obe grupe su pokazale da mebendazol ne utiče na normalne ćelije (W138 ćelije endotela humane umbilikalne vene, odnosno normalne fibroblaste) *in vitro*, dok *in vivo* značajno redukuje vaskularizaciju tumora. Doudican i sar. (2008) su pokazali da mebendazol u *in vitro* uslovima inhibira proliferaciju ćelija humanog melanoma (*M-14* и *SK-Mel-19*) i indukuje njihovu apoptozu.

## 2.3. MELANOM

Melanom je tumor kože koji se relativno često dijagnostikuje kod domaćih životinja (Morrison, 2008) i ljudi (Russo i sar., 2009). Ovi tumori kože potiču od neregulisanog rasta melanocita (Dutton-Regester i Hayward, 2012), ćelija koje proizvode pigment u koži a potiču iz neuroektoderma embriona (Modiano i sar., 1999). Melanom se osim kod ljudi (Russo i sar., 2009) javlja i kod pasa, mačaka, konja i drugih životinja (Babić i sar., 2009). Kod konja sive boje produženo izlaganje suncu može dovesti do razvoja melanoma (Morrison, 2012), mada se kod konja lipicanske rase smatra da i genetika ima uticaja na pojavu ovih tumora (Curik i sar., 2000; Rieder i sar., 2000). Melanom kod konja ima prevalencu od 4 do 15% i najčešći je tumor kože kod njih, i uglavnom se javlja kod starih životinja sive boje (MacGillivray i sar., 2002). Od svih tumora kod pasa melanom čini oko 4-7%, a kada se posmatraju samo tumori kože udeo melanoma se kreće od 9 do 20% (Modiano i sar., 1999; Coyner i Loeffler, 2011). Merlo i saradnici (2008) navode da se kod pasa u Đenovi, od svih kancera melanom javlja u 0,7% slučajeva. Pri tome je utvrđeno da se on javlja sa većom incidencom kod mužjaka nego kod ženki.

Povećanje incidence melanoma kod ljudi u prethodnih 30-50 godina je veće nego za bilo koji drugi kancer (Jemal i sar., 2007; Russo i sar., 2009). Iako je do ovoga porasta došlo zbog povećane pojave same bolesti, značaj ima takođe i povećanje pažnje pacijenata na promene na koži, ali i promene dijagnostičkih kriterijuma. Procena je da se u Sjedinjenim Američkim Državama (USA) svake godine pojavi 60000 novih slučajeva (Jemal i sar., 2007), dok se u Velikoj Britaniji (UK) broj novih slučajeva godišnje poveća 5 puta u odnosu na pre 30 godina (Zeidi i sar., 2008).

Kada se dijagnostikuje na koži hirurško lečenje je često dovoljno za izlečenje kod pasa (Modiano i sar., 1999; Coyner i Loeffler, 2011) i konja (MacGillivray, 2002). Međutim, u praksi se terapija kod konja često ne primenjuje, kako zbog benigne, sporo rastuće prirode tumora, tako i zbog njegove veličine, blizine krvnih sudova i vitalnih struktura. Najčešće se melanom javlja na ventralnom delu repa, perineumu, spoljnim genitalijama konja, dok se na ušima, vratu, očnim kapcima i nogama ređe javlja (MacGillivray, 2002). Kod pasa se melanom relativno često dijagnostikuje, najčešće u

usnoj duplji, na usnama, tabanu i oku (Bolon i sar., 1990; Modiano i sar., 1999; Young Kim, 2005; Manley i sar., 2011). Melanomi lokalizovani u ustima i na tabanu su agresivni i daju metastaze, a oni sa dlakom pokrivenih delova tela najčešće ne (Manley i sar., 2011).

Maligni melanom je relativno rezistentan na hemioterapiju kako kod ljudi, tako i kod pasa (Modiano i sar., 1999; Young Kim, 2005; Manley i sar., 2011). Iako sve rase pasa mogu da obole od melanoma prevalenca je veća kod rasnih pasa, posebno kod standardnih i minijturnih šnaucera, pinčer-dobermana, škotskih terijera, irskih i gordon setera, i zlatnih retrivera (Modiano i sar., 1999). Ovi podaci pokazuju da za razliku od ljudi kod pasa u razvoju melanoma značajnu ulogu imaju i predisponirajući, genetski faktori (Modiano i sar., 1999; Coyner i Loeffler, 2011).

U osnovi nastanka melanoma je promena u funkciji gena ili ekspresiji i sintezi proteina uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa i apoptozu (Modiano 1999; Coyner i Loeffler, 2011).

Procenat preživljavanja kod obolelih ljudi je visok (oko 80%) ako se bolest dijagnostikuje u ranoj fazi, jer se tada uspešno leči hirurškim putem. Međutim, kasniji stadijumi posebno oni udruženi sa udaljenim metastazama u mozgu, plućima, i kostima su otporni na postojeće terapije, prognoza je loša, i dovode do brze smrti, a srednje vreme preživljavanja je oko 6 meseci (O'Day i sar., 2002; Russo i sar., 2009; Ferrucci i sar., 2012). Melanom je najagresivnija forma kancera kože ljudi koji može dovesti do smrtnog ishoda. Loša prognoza za obolele u uznapredovaloj formi rezultat je: 1.) sposobnosti tumorskih ćelija da se beskrajno dele i kod kojih se neadekvatno aktiviraju apoptotski procesi važni za prirodnu regulaciju ćelijske smrti; 2.) nesposobnosti imunskog sistema da aktivira odgovarajuće efektorne mehanizme odbrane (prirodne ćelije ubice, citotoksične limfocite, molekule koji indukuju apoptozu); 3.) postojanja rezistencije ove forme tumora na konvencionalnu hemioterapiju (citotoksične lekove) (Grossman i Altieri, 2001; Russo i sar., 2009). Pokazano je da melanomske ćelije imaju niski procenat spontane apoptoze *in vivo* i relativno su rezistentne na *in vitro* indukovanu apoptozu različitim lekovima (Soengs i Lowe, 2003; Gray-Schopfer i sar., 2007). Osnova rezistencije melanoma na lekove je disregulacija procesa apoptoze kod ovih tumorskih ćelija. Iz tog razloga supstance koje



utiču na apoptotski proces kod melanoma su veoma interesantne za istraživanje novih terapijskih pristupa (Grossman i Altieri, 2001; Russo i sar., 2009).

Biologija ove bolesti još nije dobro proučena. Brojni su faktori rizika za razvoj melanoma. Genetska predispozicija i izlaganje različitim faktorima okoline (izlaganje UV zracima, i opekotine od sunčanja naročito u detinjstvu i mladosti, posebno ako se ponavljaju i teže su prirode) predstavljaju najozbiljnije faktore rizika za razvoj melanoma (Goldstein i Tucker, 2001; Zaidi i sar., 2008; Morrison, 2012; Dutton-Regester i Hayward, 2012). Oko 5 do 12% svih melanoma su kod pacijenata koji imaju u porodičnoj anamnezi ovu bolest (Goldstein i Tucker, 2001; Zaidi i sar., 2008). Kao i kod ljudi i kod nekih domaćih životinja (sisara) izlaganje suncu može dovesti do nastanka melanoma (Morrison, 2012).

### **2.3.1. Biologija melanoma**

Melanom najčešće nastaje od melanocita epiderma kože, mada može nastati i od melanocita koji nisu u koži (horioidni sloj u oku, gastrointestinalna i genitalna mukoza ili u meningama). Melanom je takođe čest uzrok metastatskih tumora nepoznatog porekla (Chin i sar., 2006). Melanom se razvija postepeno, počinje kao benigni mladež, koji je klonalana populacija melanocita u epidermisu. Ove ćelije mogu da mutiraju i postanu hiperplastična lezija, koja dalje ne napreduje zbog ćelijske senescence (tumor supresorski mehanizam kojim diploidne ćelije gube mogućnost da se dele, prestaje odvijanje ćelijskog ciklusa i time prestaje proliferacija). Međutim, ako se senescenca prevlada ćelije nastavljaju da se dele, nastaje displazija i površinsko širenje malignih ćelija. Ove ćelije odlaze u dermis što može dovesti do metastaza (Zaidi i sar., 2008). Ako su kod pacijenata od melanoma metastaze prisutne one se mogu najčešće naći u plućima, jetri, limfnim čvorovima, mozgu, kostima, nadbubrežnim žlezdama i bubrezima (Sulaimon i Kitchell, 2003). Mišji melanom se razlikuje od humanog po distribuciji melanocita. Kod ljudi oni su u bazalnom sloju dermisa a kod miševa se mogu naći u dlačnim folikulima dermisa (Zaidi i sar., 2008).

Razvoj melanoma se odvija kroz seriju diskretnih kliničkih i histoloških transformacija. Pigment produkujuće ćelije, melanociti, se nalaze u dermalno-epidermalnoj granici kao individualne ćelije i u prvom stadiju transformacije u melanom formiraju

melanocitni mladež (Friedman i Heilman 2002). On predstavlja fokalnu proliferaciju benignih ćelija koje mogu ali nemoraju da progrediraju dalje. Ovi mladeži su rizik faktor jer se oko 25% melanoma razvija od ovih nevusa (Bevona i sar., 2003). Drugi stepen transformacije udružen je sa formiranjem displastične lezije zbog abnormalnog ćelijskog rasta, zvanog hiperplazija, i atipičnom diferencijacijom ovih ćelija. Prisustvo displastičnih mladeža je znak visokog rizika od razvoja primarnog melanoma (Garbe i sar., 1994a; Marković i sar., 2007). Treći stepen progresije melanoma se označava kao faza radijalnog rasta, kada se primarni tumor širi površno a još uvek nije sposoban da daje metastaze. Melanom u ovoj fazi, ako se ne leči ulazi u poslednji stepen progresije tumora, koji se označava kao faza vertikalnog rasta. Kada melanom uđe u ovu fazu on stiče metastatski potencijal, sposoban je da invadira okolnu stromu i proliferiše vertikalno kroz epidermis što dovodi do pojave regionalnih i udaljenih metastaza (Marković i sar., 2007).

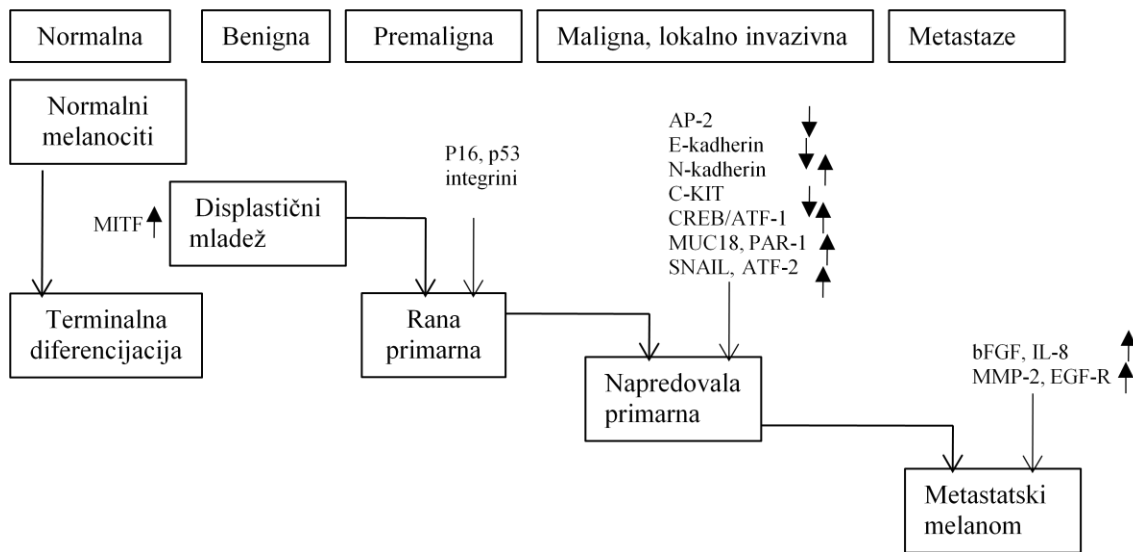
Tradicionalni sistemi klasifikacije melanoma se baziraju na mestu nastanka, debljini tkiva i histološkom subtipu. Primarna mesta gde melanoma nastaje su koža, mukoze, oko, a većina (90%) su na koži. Kožni melanoma se dele na četiri glavna histogenetska subtipa: 1. Oni koji se šire površno; 2. Lentigo maligna; 3. Akral lentigo; 4. nodularni (Fecher i sar., 2007).

Postoji više formi melanoma, neke od njih produkuju melanin i tamne su boje, dok su druge amelanotične i svetle su boje. Melanin produkujući melanomi koji se šire površno su oko 70% svih melanoma, a nastaju od displastičnog mladeža na prethodno zdravoj koži najčešće belaca, u regijama tela izloženim suncu (Naeyaert 2000). Nodularni melanom raste vertikalno, može biti melanin produkujući kada je tamne boje, ili da ne produkuje melanin kada je ružičast, a čini oko 5% svih melanoma. Ova forma tumora nema poznati prekursor, a raste i često krvari. Nalazi se najčešće kod starih osoba na telu ili ekstremitetima (Barnhill i Mihm 1993; Marković i sar., 2007). Kod Azijske, Hispano i Afričke populacije česta je forma označena kao Akral-Lentigo melanom i predstavlja oko 5% svih slučajeva melanoma, a javlja se na površinama tela koji nisu obrasli dlakom (prsti, dlan, taban) (Chen i sar., 1999; Barnhill, 2004; Marković i sar., 2007). Lentigo melanom obuhvata do 15% svih kožnih melanoma, čine ga ćelije koje nemaju osobine invazivnosti. Čest je kod starijih osoba na delovima tela jako izloženim suncu (lice i ruke) (Marković i

sar., 2007). Ljudi bele rase imaju 10 puta veći rizik oboljevanja od melanoma od ljudi crne, azijske ili hispano populacije (Marković i sar., 2007). Ljudi kod kojih je imunski sistem suprimiran (kao kod pacijentat posle transplantacije organa, npr. bubrega) imaju pet puta veći rizik oboljevanja od melanoma od zdrave populacije (Ferrucci i sar., 2012).

Prevenција melanoma može da se podeli na primarnu (prevenција pojave), sekundarnu (dijagnoza i tretman u ranom stadijumu), i tercijarnu (ograničenje morbiditeta i povećanje preživljavanja pacijenata sa napredovalom bolesti) (Marković i sar., 2007).

***Molekularne promene koje nastaju kod progresije melanoma.*** - Progresija melanocitnog mladeža u vertikalnu fazu rasta i formiranje metastaza uključuje mnoge genetske i molekularne promene, a mehanizam još uvek nije definisan. Za inicijaciju i progresiju malignog melanoma važni su: *tumor supresorski geni* (p16 -označava se i kao CDKI (ciklin-zavisan inhibitor kinaze) odnosno, INK4A/MTS-1/CDKN2A), PTEN (fosfataze i tenzin homolog na hromozomu 10) i p53 (kodira ga *TP53* gen), *transkripcioni faktori* (CREB/ ATF-1, AP-2), *onkogeni* (BRAF, NRAS), *tirozin kinaze* (c-kit, PDGF receptors), *ćelijski adhezioni molekuli* (E-kadherin) i *matriks metaloproteinaze* (MMP-2). U sve mogu biti uključeni citokini, integrini i dr. (Bar-Eli 2001; Deichmann i sar., 2002). Ove genetske promene su prikazane u shemi 4. Brojni su specifični antigeni koje ispoljavaju ćelije melanoma kao i melanociti (npr. Melan/MART-1, MART-2, gp100, tyrosinase, S100, TRP-1/2) (Ferrucci i sar., 2012). Interesantno je zapažanje da T regulatorni (T-reg) limfociti dovode do smanjenja fiziološkog imunskog odgovora, naročito kod pacijenata sa metastazama melanoma. Inhibiciju sazrevanja tumor specifičnih T limfocita pomoću T regulatornih limfocita indukuju melanomske ćelije oslobađanjem imunosupresorskih citokina (npr. TGFβ) ili indukcijom apoptoze preko receptora na površini T ćelija (Ferrucci i sar., 2012).

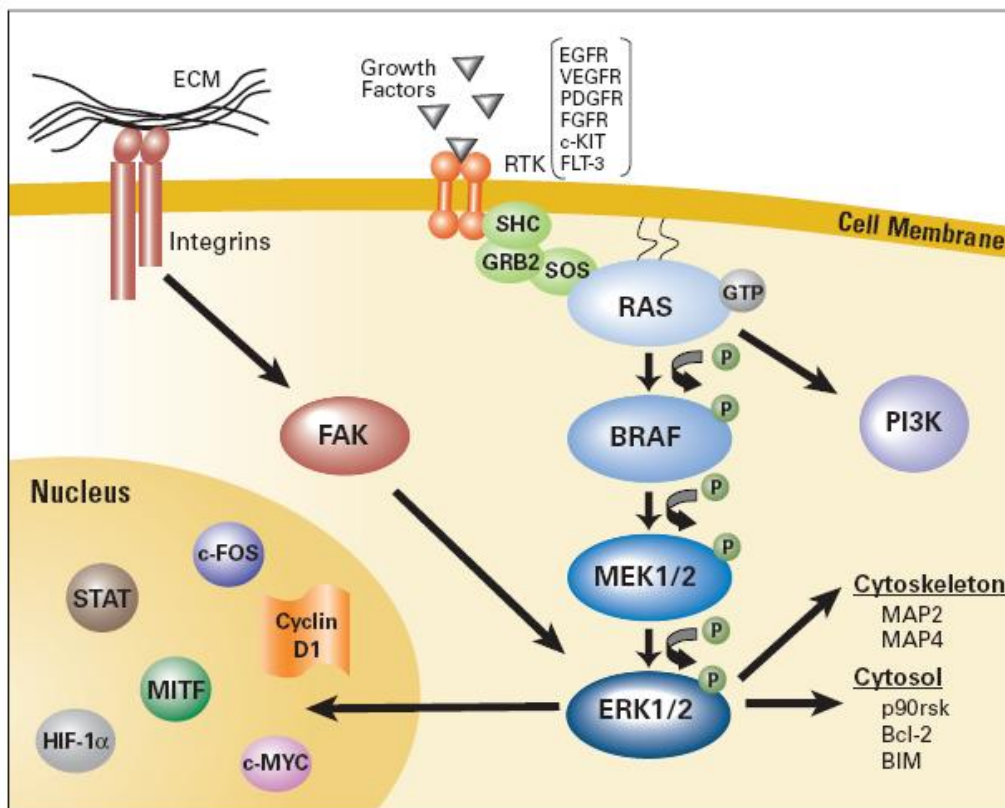


**Shema 4.** Prikaz molekularnih promena kod raznih faza progresije humanog melanoma

Jedan od dobro poznatih i opisanih puteva čija je funkcija povećana kod melanoma je mitogen aktivirajuća protein kinaza (MAPK), signalna kaskada (Shema 5.) odgovorna za ćelijski rast i preživljavanje. Mutacije su prisutne na NRAS (kod oko 10-20% melanoma), BRAF (oko 50%), a MAP2K1 i MAP2K2 (oko 8%) rezultiraju u visokoj aktivnosti ERK što vodi u povećanu proliferaciju, angiogenezu, invazivnost i metastaze (Dutton-Regester i Hayward, 2012). Mutacija NRAS takođe dovodi i do aktivacije PI3 kinaze puta, što vodi do povećane proliferacije ćelija, i rezistencije ćelije na apoptozu i hemioterapije.

Na genetskom nivou karakteristični događaj kod melanoma je aktivacija mutacije B-raf ili RAs i gubitak funkcije PTEN i INK4a/Arf lokusa koji kodiraju tumor supresore p16 i Afr, čija ekspresija pojačava funkciju supresije rasta Rb i p53. Ove mutacije i delecije su nađene u različitim fazama progresije melanoma. Genetske promene koje se javljaju kod progresije melanoma i metastaza još nisu jasno identifikovane (Chin i sar., 2006).

Drugi važan tumor supresor gen, CDKN2A, je takođe mutiran kod oko 50% melanoma. Većina melanoma ima defekte i u pRB, p53, MAPK i PI3K signalnim putevima. A za razvoj melanoma potrebna je mutacija i u drugim regulatornim putevima (Dutton-Regester i Hayward, 2012).



**Shema 5.** Signalna kaskada mitogen aktivirajuće protein kinaze (MAPK).

Vezivanje faktora rasta za receptor tirozin kinaze (RTKs) ili adhezija integrina za ekstracelularni matriks (ECM) aktivira RAS što dovodi do fosforilacije kaskade RAF/MEK/ERK. EGFR (receptor epidermalnog faktora rasta), VEGFR (faktor rasta vaskularnog endotela), PDGFR (receptor trombocitnog faktora rasta), FGFR (receptor faktora rasta fibroblasta), FLT-3 (fms zavisna tirozin kinaza 3), SHC (src homolog I kolagen), GRB2 (receptor vezujući protein faktora rasta), FAK (fokalna adhezijska kinaza), STAT (prenosnik signala i aktivator transkripcije), HIF1alfa (hipoksija inducibilni factor), MIF (transkripcioni factor) BIM (pripadnik familije bcl-2, reguliše ćelijsku smrt). Preuzeto iz Fecher i sar., 2007.

### 2.3.2. Terapija melanoma

Glavna teškoća u tretiranju kancerskih ćelija je što su one u osnovi sopstvene ćelije koje su mutirale. Ovo čini teškoću u dizajniranju specifične terapije koja neće dovesti do autoimunosti. Trenutna terapija (kao što je radioterapija i hemioterapija) pogađa ćelije koje se aktivno dele, a ne samo tumorske ćelije specifično, što znači da imaju mnoge neželjene

efekte (Chambers i sar., 2002). Prekid tolerancije je atraktivan pristup u tretiranju kancera, ali nosi rizik od indukovanja autoantitela i oštećenja sopstvenog tkiva. Mehanizam za prekid tolerancije je izazivanje inflamacije aplikovanjem živih BCG (Bacille Calmette Guerin) bacila u tumor, ali ovo može dovesti do pneumonije, hepatitisa i tuberkuloze (Wei i sar., 2008).

Ako se dijagnostikuje u ranoj fazi melanom se tretira hirurški, ali ako se dijagnoza postavi u kasnoj fazi (sa prisutnim metastazama) pacijenti imaju preživljavanje od najviše 6 meseci, nezavisno od tretmana (Marković i sar., 2007b; Zaidi i sar., 2008; Russo i sar., 2009; Krathen, 2012).

Danas postaje jasno da klinički efikasna terapija za maligni melanoma, pored hirurške intervencije, obuhvata kombinaciju citotoksičnih lekova sa biološkim agensima koji inhibiraju vaskularizaciju tumora, i stimulišu antitumorski imunitet (Marković i sar., 2007b). Od bioloških agenasa u terapiji tumora danas se koriste razni faktori rasta, citokini, hemokini, monoklonska antitela, inhibitori genske ekspresije, vakcine i dr.

Primer za kombinovanu terapiju matastatskog melanoma ljudi predstavlja primena dakarbazina i IL-2. Američka agencija za hranu i lekove (FDA) odobrila je upotrebu dakarbazina (alkilirajući lek koji uništava tumorske ćelije dodavanjem alkil ( $C_nH_{2n+1}$ ) grupe na DNK) i visokih doza interleukina-2 (IL-2) (Marković i sar, 2007b; Finn i sar., 2012). Pored toga poznate su studije gde se koriste kombinacije visokih doza IL-2 i dakarbazina, interferona alfa, cisplatine i vinblastina (Marković i sar, 2007b).

Postoje studije koje prikazuju adjuvantnu terapiju sa visokim dozama interferona alfa ( $IFN\alpha$ ), pri čemu su zapaženi korisni ali i nedovoljno efikasni efekti u uznapredovaloj fazi bolesti (Ascierto i sar., 2006; Marković i sar., 2007b). Dugi autori u terapiji melanoma uključuju visoke doze  $IFN\alpha$  u kombinaciji sa IL-2, što je nažalost bilo praćeno postojanjem visokog nivoa citotoksicnosti (Zbytek i sar., 2008, Caspi, 2008).

U kliničkim studijama primenjuje se i Faktor stimulacije rasta kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF) kao i vakcine (mogu biti autologe - od ćelija pacijnta ili sintetske, a daju se kod pacijenata sa visokim rizikom od pojave melanoma). U 2011 godini FDA je odobrila upotrebu *Ipilimumab* i *Vemurafenib*. *Ipilimumab* je humano IgG1 monoklonsko

antitelo koje antagonizuje efekat citotoksičnog T limfocitnog antigena četiri - CTLA-4. Ovo je važno jer je CTLA-4 molekul koji funkcioniše kao negativni kostimulatorni molekul za T limfocite. *Ipilimumab* blokira CTLA-4 i time povećava aktivnost T ćelija i promoviše njihovo antitumorsko delovanje. *Vemurafenib* je selektivni inhibitor gena BRAF (proto-onkogen B-Raf) koji kodira serin/treonin protein kinazu B-Raf. Mutacija na ovom genu se javlja kod 40-60% slučajeva melanoma. Ova mutacija aktivira mitogen aktiviranu protein kinaza put (MAPK) koji dovodi do povećane proliferacije ćelija i onkogene aktivnosti (Finn i sar., 2012).

Hemokini takođe imaju potencijal za upotrebu u terapiji kancera. Posebno se analizira upotreba angiostatskih hemokina (CXCL-9, -10, -11) u inhibiciji rasta tumora. *In vitro* studije su pokazale da CXCL-10 može da inhibira rast humanog melanoma *in vitro*. *In vivo* studije su pokazale da terapija sa IL-2 i IFN $\gamma$  može dovesti do produkcije CXCL-9, -10, -11, koji mogu imati anti tumorski efekat, posebno inhibišući rast tumora (Richmond i sar., 2009).

U imunoterapiji kancera uključuju se i vakcine protiv tumorskih antigena. Kod melanoma, potencijalni antigeni su gp100, MART 1, TRP1 i TRP2. Nažalost tumorske vakcine ne dolaze bez problema, imaju ograničenu efikasnost i mogu da dovedu do autoimunosti (Caspi, 2008).

Infuzija tumor specifičnih limfocita imala je dobar rezultat u 50% melanoma (Caspi, 2008).

### **2.3.3. Modeli melanoma na mišu**

***B16 mišji model melanoma.*** - B16 mišji model rasta i metastaze melanoma je dobro opisan i naziva se zlatnim standardom (Welch, 1997). B16 ćelije su dobijene od tumora koji se spontano razvio kod C57Bl/6 miša 1954. godine. Ovaj model se široko koristi kao model za ispitivanje humanog malignog melanoma. B16 ćelije gajene *in vitro* indukuju tumor kada se daju singenim miševima subkutano. Veličina tumora se povećava ako se aplikuje veći broj ćelija tumora, a smrt može nastati i bez vidljivih metastaza (Bystyn i sar., 1974).

Postoje i drugi modeli rasta tumora kao što je aplikovanje ljudskih tumorskih ćelija miševima sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom (severe combined immunodeficient -SCID) ali singeni tumorski model je bolji, pošto se uloga imunog sistema u razvoju tumora može tačnije odrediti, a metastatske humane ćelije ne rastu uvek u miševima (Welch, 1997). Postoji više varijanti B16 ćelija, originalne izolovane ćelije su poznate kao B16 F0. Ove ćelije poreklom iz originalnog tumora su kultivisane *in vitro*, zatim date intravenski C57Bl/6 miševima i onda kolonije iz pluća izdvojene i gajene u kulturi. Ovaj proces je izveden 10 puta da bi se dobila B16 varijanta koja je visoko specifična za pluća, poznata kao B16 F10 (Fidler, 1973).

**Rast B16 F0.** - Subkutana aplikacija B16 F0 ćelija dovodi do rasta tumora u koži koji se lako identifikuje jer B16 ćelije proizvode melanin (Nicolson i sar., 1978). B16 ćelije su histokompatibilne sa domaćinom i ekspresiraju tumorske antigene. B16 ćelije nemaju ili imaju vrlo nizak nivo molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) klase I i II, što znači da i ako ekspresiraju tumorske antigene one imaju slabu imunogenost. Interferon gama može da poveća ekspresiju MHC I molekula na B16 ćelijama, što dovodi do lize tumorskih ćelija citotoksičnim T limfocitima i NK ćelijama, kao i do povećanja ekspresije molekula CD95 i CD95L koji nakon aktivacije pokreću signalne puteve koji mogu dovesti do apoptoze (Bohm i sar., 1998; Pietra i sar., 2009).

#### **2.3.4. Otpornost na apoptozu i hemioterapiju**

Ćelije melanoma imaju niski nivo spontane apoptoze *in vivo* u poređenju sa drugim tipovima ćelija tumora i relativno su rezistentne na lekovima indukovanoj apoptozu *in vitro*. Pošto većina hemioterapeutika deluje tako što indukuje apoptozu u ćelijama kancera smatra se da je rezistencija na apoptozu glavni razlog rezistencije melanoma na lekove. U osnovi ove rezistencije je disregulacija unutrašnjeg puta apoptoze (Russo i sar., 2009).

Na šemama 6. i 7., datim u narednom poglavlju ove teze, prikazani su osnovni signalni putevi i molekularni mehanizmi apoptoze. Jedan od najvažnijih regulatora apoptoze ćelija je signalna mreža p53/Bcl-2. Pripadnici Bcl-2 familije su kako proapoptotski (BAX, BAK, BAD, BID, Bim, NOXA, PUMA) tako i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BCL-w, A1) molekuli. Posle ireverzibilnog oštećenja DNK, p53 se aktivira i indukuje



ekspresiju proapoptotskih članova porodice Bcl-2 molekula, što dovodi do permeabilizacije membrane mitohondrija i oslobađanja citohroma c. Oslobođeni citohrom c se vezuje za Apaf-1, što dovodi do aktiviranja efektorskih kaspaza i apoptoze (Russo i sar, 2009). U slučaju gubitka funkcije p53 omogućeno je ćeliji sa DNK oštećenjem da preživi i da se deli, što propagira prokancersku mutaciju. Takođe, i promene na drugim molekulima signalnog apoptotskog puta omogućavaju melanomu da preživi. Dešavaju se aberantne metilacije što dovodi do gubitka ekspresije Apaf-1, i nemogućnosti odvijanja apoptotskog puta nakon aktivacije p53. Rezistencija na neke hemioterapeutike kod melanoma je posledica preterane ekspresije Mcl-1 molekula, koji suprimira apoptozu izazvanu sa BAK a ne i sa BAX molekulom (Russo i sar, 2009).

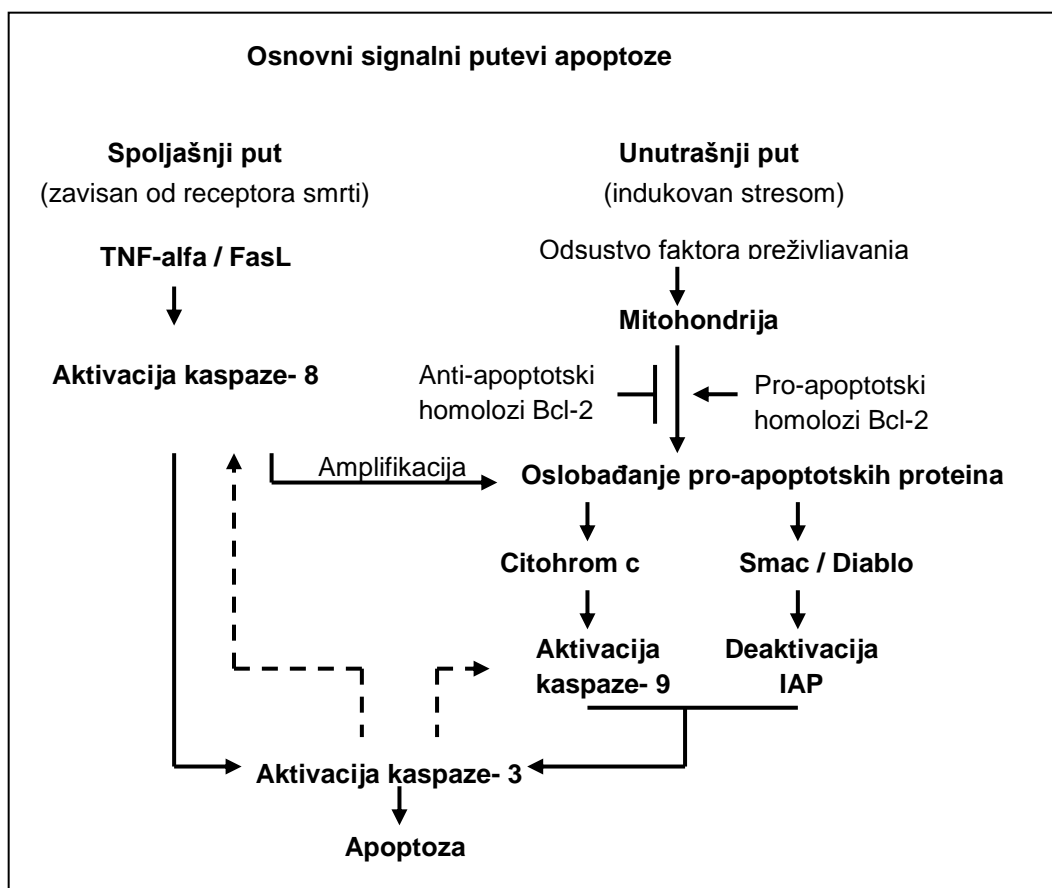
## 2.4. APOPTOZA

Apoptoza (programirana ćelijska smrt) je evolutivno konzervisan, asinhron, genski kontrolisan mehanizam za eliminaciju nepotrebnih ili neželjenih ćelija iz organizma (Kamm i Ferch, 2000; Dlamini, 2004; Zhivotovsky, 2004). Termin apoptoza su Kerr, Wyllie i Currie u literaturu uveli 1972. godine da označe mehanizam kontrolisane smrti ćelije, koja ima komplementarnu, ali suprotnu ulogu od mitoze u regulaciji brojnosti ćelijske populacije (Kerr i sar., 1972; Zhivotovsky, 2004). Apoptoza je komponenta i embrionalnog razvoja (Guimaraes i Linden, 2004), ali i različitih bolesti (Danial i Korsmeyer, 2004) i zahvata pojedinačne ćelije okružene zdravim ćelijama. Svaka ćelija poseduje potrebne molekule bitne za apoptozu, a apoptotski put se kontroliše (Guimaraes i Linden, 2004).

Apoptoza se definiše nizom molekularnih i morfoloških promena koje rezultuju obeležavanjem, obradom i eliminacijom umirućih ćelija. Prvo se zapažaju promene na citoplazmatskoj membrani poput izlaganja fosfatidil serina na spoljnoj, ekstracelularnoj, strani membrane (Bever i Williamson, 2010). *In vivo*, eksternalizovani fosfatidil serin i signali koji su indukovani omogućavaju prepoznavanje ćelija koje umiru od strane fagocita koji ih uklanjaju (Fadok i sar., 2000; Hanayama i sar., 2002). Postoje dva signalna puta koji dovode do apoptoze: spoljašnji i unutrašnji (mitohondrijski) put apoptoze (Tait i Green 2010).

***Spoljašnji put.*** - Vezivanje liganada smrti za receptore smrti (death receptor – DR obuhvata sledeće molekule: Fas, TNFR, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, DR3 i DR6) je odgovorno za indukciju spoljašnjeg puta (Muppidi i sar., 2004). Koji su to ligandi smrti: na primer faktor nekroze tumora (TNF) vezuje se za receptor smrti (TNFR) što dovodi do angazovanja adaptornog molekula FADDA (FAS associated death domain-a). Daljim prenosom signala počinje aktivacija kaspaze 8, dimerizacija, isecanje interdomena i njena finalna aktivacija (Oberst i sar., 2010). Ona dalje indukuje aktivaciju efektorskih kaspaza - 3, -6, -7. U nekim ćelijskim tipovima spoljašnji put saraduje sa mitohondrijskim putem preko kaspaze 8 koja aktivira BH3 interaktivni *domain death agonist* (BID), koji je

proapoptotski protein (Kaufmann i sar., 2007; Yin i sar., 1999). BID koji je kaspaza 8 aktivirala dalje aktivira mitohondrijski put (Sheme 6. i 7.).



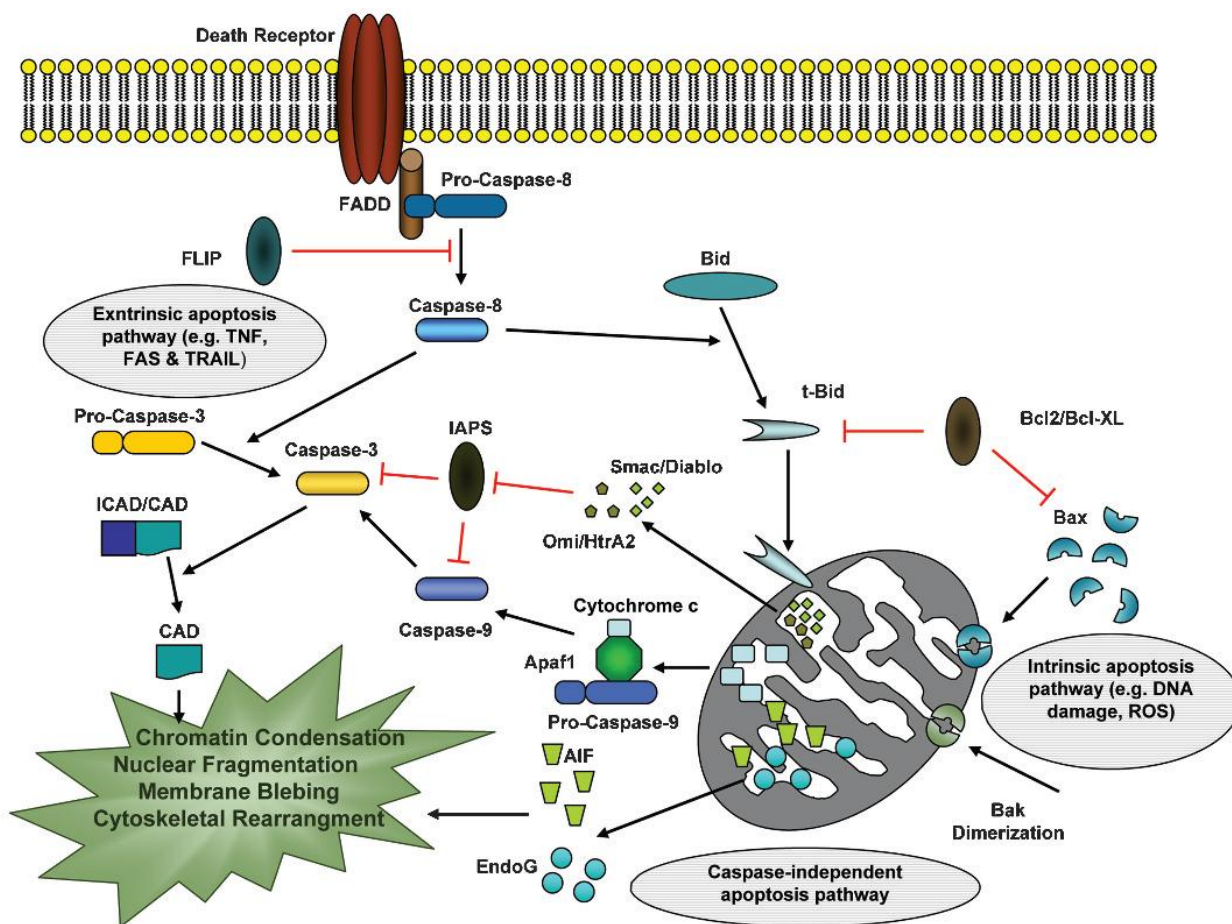
**Shema 6.** - Prikaz osnovnih signalnih puteva apoptoze

**Unutrašnji put.** - Mitohondrijski put se aktivira različitim razvojnim signalima ili citotoksičnim agensima. Odgovoran je za većinu apoptotske smrti kod kičmenjaka a počinje kao posledica celularnog stresa usled oštećenje DNK, defekata u ćelijskom ciklusu, hipoksije ili nedostatka ćelijskih faktora za preživljavanje (Vousden i Prives, 2009). Ovaj put je regulisan kompleksnim interakcijama između proteina Bcl-2 familije, koji regulišu integritet spoljašnje mitohondrijske membrane (Green i Evan, 2002; Ghavami i sar., 2009). Ključni događaj koji upućuje ćeliju da umre unutrašnjim putem je permeabilizacija spoljne

mitohondrijske membrane (Kluck i sar., 1997; Yang i sar., 1997). Kao rezultat toga oslobađa se citohrom c iz mitohondrijalnog intermembranskog prostora i indukuje oligomerizaciju proteaze označene kao apoptoza indukujući faktor (AIF) u kaspaza aktivirajuću platformu zvanu apoptozom (Zou i sar., 1997). Apoptozom se vezuje i promoviše dimerizaciju i aktivaciju inicijalne kaspaze -9 (Hao i sar., 2005; Pop i sar., 2006; Riedl i Salvesen, 2007), koja zatim aktivira izvršne kaspaze -3 i -7 (Li i sar., 1997; Salvesen and Dixit, 1997; Zou i sar., 1997). Izvršne kaspaze su odgovorne za fenotipske ključne znake promene ćelijske morfologije u apoptozi kao što su kondenzacija citoplazme i intracelularnih organela, kondenzacija hromatina i fragmentacija jedra, i konačno formiranjem apoptotskih tela (Kerr i sar., 1972; Hengartner, 2000; Zhivotovsky, 2004; Guimaraes i Linden, 2004; Ghavami i sar., 2009). Apoptotične ćelije fagocituju makrofagi, a nemogućnost da se reguliše apoptoza može dovesti do razvoja bolesti. Apoptoza ima centralnu ulogu u patogenezi mnogih bolesti koje nastaju kada su geni koji kontrolišu apoptotski proces suprimirani, previše eksprimirani ili oštećeni mutacijom (Thatte and Dahanukar, 1997; Kamm i Ferch, 2000; Dlamini i sar., 2004; Ghavami i sar., 2009). Deo molekula uključenih u unutrašnji put prikazan je na Shemi 6 i 7.

Apoptoza kao genetski regulisana forma ćelijske smrti i ima važnu ulogu u održanju homeostaze tkiva, diferencijaciji i razvoju (Guimaraes i Linden, 2004; Kerr i sar., 1972; Wyllie i sar., 1980), i regulaciji inflamacije. Pošto je apoptoza aktivna forma ćelijske smrti, ona zahteva utrošak energije i sintezu proteina (Wyllie i sar., 1995). Više autora je pokazalo da na smrt ćelija uzrokovanu apoptozom utiču različiti intracelularni i ekstracelularni stimulusi. Apoptotski proces ima dve faze: inicijalnu fazu i izvršnu fazu. Prva faza je vremenski varijabilna, a zavisi od tipa ćelija, i vrste signala. Zatim sledi kratka izvršna faza apoptoze i ista je kod svih ćelija: izražena dehidratacija ćelija, povećanje koncentracije kalcijumovih jona, kontrakcija citoskeleta i aktivacija većeg broja enzimskih sistema (cistein proteaze-kaspaze, transglutaminaze, endonukleaze) (Kamm i Ferch, 2000; Simon, 2003). Ovo za rezultat ima tipične morfološke promene u ćeliji poput kondenzacije citoplazme i intracelularnih organela, kondenzacije hromatina i fragmentacija jedra. Ove promene su praćene formiranjem apoptotskih tela koja će fagocitovati makrofagi

(Takahashi i Earnshaw, 1996; White, 1996; Zamzami i Kroemer, 1999; Maianski i sar., 2004).



**Shema 7.** Molekularni mehanizmi apoptoze (preuzeto iz Ghavami i sar., 2009)

Pored klasične apoptoze, savremeni literaturni podaci ukazuju da autofagija takođe predstavlja još jedan tip aktivne smrti ćelija (Guimaraes and Linden, 2004).

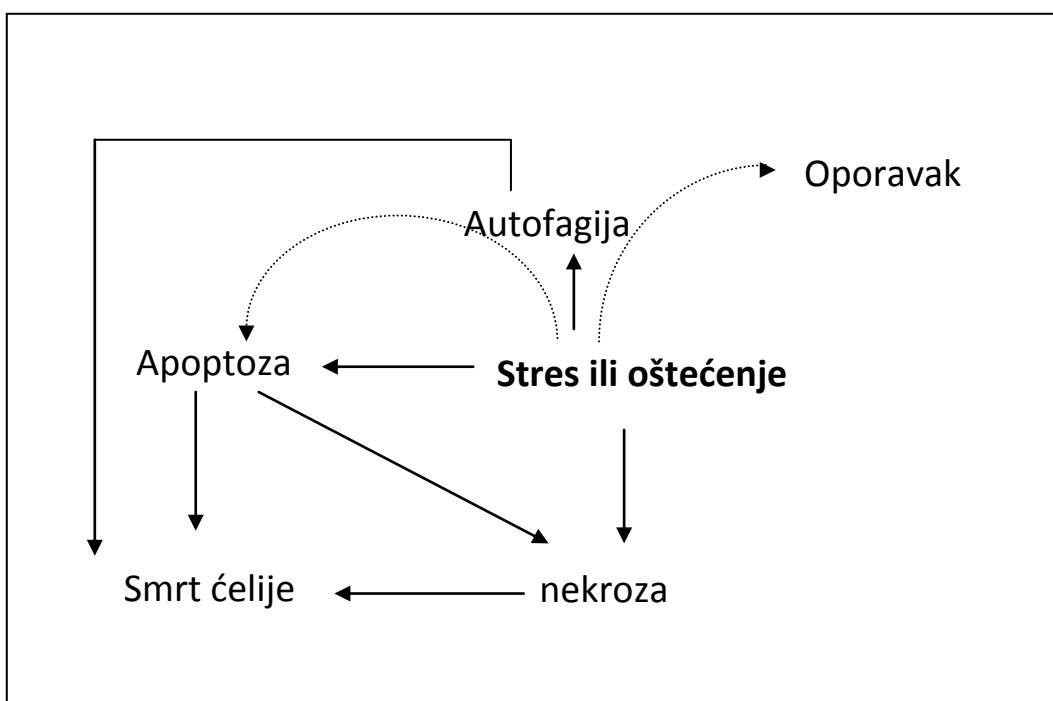
Smrt ćelija apoptozom, kao i autofagijom predstavlja normalni fiziološki proces, koji se odvija tokom embriogeneze (Oppenheim, 1991), kao i u toku stvaranja i oblikovanja delova tela (Haanen i Vermes, 1996). Ove procese mogu da iniciraju različiti apoptotski signali, kao što su: nedostatak trofičkih faktora, tretman lekovima i hormonima (Villa i sar., 1998; Xue i sar., 1999). U kasnim fazama autofagnog procesa zapažaju se tipične apoptotske promene (Xue i sar., 1999). Ovo ukazuje da su autofagija i apoptoza procesi koji se preklapaju. Smatra se da autofagni proces počinje u ćelijama u kojima signal aktivira promenu permeabiliteta mitohondrija u malom broju mitohondrija, što vodi do degradacije ovih mitohondrija u lizozomima (Lemasters i sar., 1998). Kada više mitohondrija podlegne promeni permeabiliteta, iz njih se oslobađaju proapoptotski faktori (citohrom c i apoptoza indukujući faktor - AIF) koji započinju proces apoptoze ćelije. Kada su sve mitohondrije zahvaćene promenom propustljivosti, nema ATP-a jer je prekinuta oksidativna fosforilacija i hidroliza ATP-a pomoću mitohondrijalne ATP-aze. Ove promene dovode do treće forme ćelijske smrti – nekroze (Zhivotovsky, 2004).

Nekroza ćelija nastaje vrlo brzo zbog akutnog prekida metabolizma ćelije, a označava se kao neprogramirana ili akcidentalna smrt ćelija. Nekroza ili zadesna smrt nastaje kod delovanja ekstremnih nefizioloških uslova (jaka hipoksija, visoka temperatura, dejstvo toksina), koji dovode do oštećenja ćelijske membrane i/ili poremećaja stvaranja energije, pa nastaje gubitak kontrole jonskog prometa i osmoregulacije. Kao posledica toga, povećava se intracelularna koncentracija jona kalcijuma, te ulazi voda u ćeliju, usled čega nastaje edem organela i ćelije. Ove promene uzrokuju rupturu organela i plazma membrane i oslobađanje intracelularnih sastojaka u okolinu, koji dovode do lokalne inflamacije i oštećenja okolnog tkiva. Najkarakterističniji morfološki parametar za raspoznavanje nekroze je edem i liza ćelija (Guimaraes i Linden, 2004; Zhivotovsky, 2004 ).

Uočena je i forma ćelijske smrti kod koje su prisutne molekulske i morfološke promene karakteristične i za apoptozu i nekrozu. Apoptotski proces može da pređe u nekrotični, a smatra se da je za to ključna tačka inhibicija aktivnosti kaspaze-3, koja je aktivna u apoptotskim ćelijama, ali ne i u nekrotičnim (Lemaire i sar., 1998; Formigli i sar., 2000). Razlike između apoptoze i nekroze su prikazane u tabeli broj 1, a odgovor ćelije na stres je prikazan na shemi broj 8.

**Tabela 1.** - Razlike između apoptoze i nekroze

<b>Apoptoza</b>	<b>Nekroza</b>
Fiziološka ili patološka	Uvek patološka
Asinhron proces na pojedinim ćelijama	Sinhrono na mnogim ćelijama
Genetski kontrolisan	Uzrokovano različitim stimulusima
Kasni gubitak integriteta membrane	Rani gubitak integriteta membrane
Smanjenje ćelije	Edem ćelije i jedra
Kondenzacija jedra	Dezintegracija hromatina jedra
Nema inflamatorne reakcije	Inflamatorna reakcija prisutna



**Shema 8.** - Odgovor ćelije na stres ili oštećenje

Antiapoptotski proteini koji se povišeno eksprimiraju u tumorima mogu biti razlog rezistencije tumora na hemio i radio terapiju (Sredni, 2012). Poremećaji u regulaciji apoptotskog procesa imaju važnu ulogu u patogenezi tumora. Ove promene dozvoljavaju neoplastičnim ćelijama da prežive duže od normalnog životnog veka, uklanjaju potrebu za egzogenim faktorom preživljavanja. Takođe, ove promene obezbeđuju zaštitu ćeliji od hipoksije i oksidativnog stresa kako tumorska masa raste i omogućavaju potrebno vreme za akumulaciju genetskih alteracija koje deregulišu proliferaciju ćelija. Na taj način disregulacija apoptoze utiče na diferencijaciju, promoviše angiogenezu i povećava pokretljivost ćelija i invazivnost tokom progresije tumora (Reed, 1999). Defekti u apoptozi se prepoznaju kao važne komponente aktivacije proto-onkogeni, jer mnogi deregulisani onko-proteini koji utiču na deobu ćelija takođe utiču na apoptozu (Green and Evan, 2002). Slično tome defekti u reparaciji DNK i segregaciji hromozoma započinju apoptotski proces kao odbrambeni mehanizam za eliminaciju genetski nestabilnih ćelija, što omogućava selekciju progresivno agresivnih klonova (Ionov i sar., 2000). Defekti apoptoze utiču na nastajanje metastaza jer dozvoljavaju tumorskim ćelijama da prežive u suspenziji bez dodira sa ekstracelularnim matriksom (Frisch and Screaton, 2001).

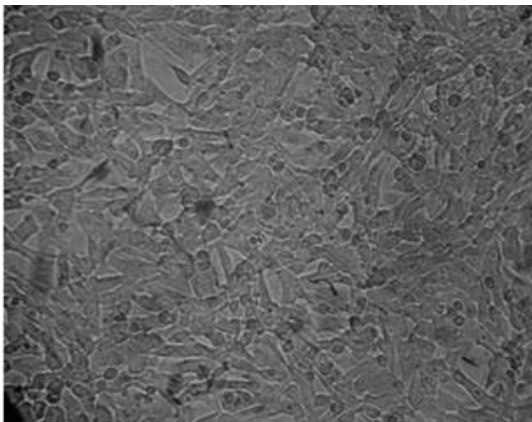
Ćelijska smrt je važna kao i život ćelije, i to je razlog zašto je apoptoza regulisana na kompleksan način.

#### **2.4.1. Promene na melanomskim ćelijama tokom apoptoze**

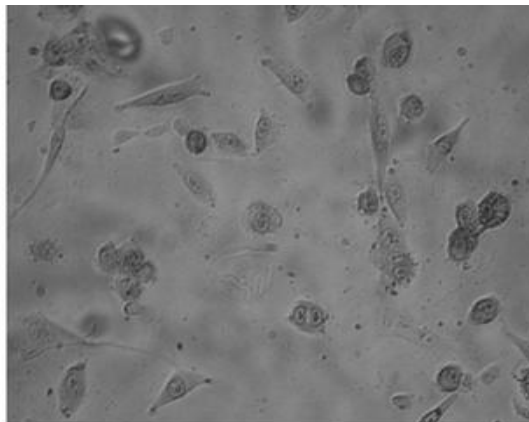
*Morfološke promene.* - Morfološki kriterijumi za procenu apoptoze su zlatni standard za identifikaciju apoptotičnih ćelija, ali postoje ograničenja, kao što je na primer iskustvo istraživača (Davis, 2002). Morfološki na apoptotičnoj ćeliji se zapaža smanjenje ćelije, kondenzacija citoplazme i intracelularnih organela, kompakcija hromatina, gubitak karakterističnog multilobarnog oblika jedra, i stvaranje apoptotskih tela (slika 2.)



A)



B)



**Slika 2.** Invertni mikroskop (uvećanje 125X), A) izgled melanomskih B16 ćelija; B) promenjena morfologija ćelija i skupljanje ćelija

*Promene na molekularnom nivou.* – Radi se o molekularnim promenama na površini ćelije koje nastaju ili zbog manje ekspresije nekih receptora ili pojave novih molekula. Fosfatidilserin, marker apoptotičnih ćelija, se pojavljuje na površini apoptotičnih ćelija. Ovaj molekul prepoznaju makrofagi nakon čega dolazi do fagocitoze ćelija. U dijagnostičke svrhe on služi kao marker za prepoznavanje rane faze apoptoze jer se za ovaj molekul veže annexin-V (Akgul, 2001, Maianski, 2004).

#### **2.4.2. Uticaj ES L1 antigena i mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija**

O efektu ES L1 antigena na apoptozu melanomskih ćelija nema podataka u literaturi.

Mebendazol indukuje depolimerizaciju tubulina kod nekoliko kancera (Mukhopadhyay i sar., 2002; Sasaki i sar., 2002). Prvi rad o delovanju mebendazola na tumorske ćelije objavili su Mukhopadhyay i saradnici 2002. Ova grupa autora je ustanovila da mebendazol indukuje, dozno i vremenski zavisnu, apoptozu kod nekoliko linija humanih kancera pluća. Takođe, oni su pokazali da mebendazol aplikovan peroralno miševima snažno inhibira rast presađenog humanog tumora, kao i broj i veličinu tumora u eksperimentalnom modelu plućnih metastaza (Mukhopadhyay i sar., 2002). Slične nalaze su

objavili Sasaki i saradnici krajem iste godine. Obe grupe su pokazale da mebendazol ne utiče na normalne ćelije (W138, ćelije endotela humane umbilikalne vene, odnosno normalne fibroblaste) *in vitro*, dok *in vivo* značajno redukuje vaskularizaciju tumora. Doudican i saradnici (2008) su pokazali da mebendazol *in vitro* inhibira proliferaciju ćelija humanog melanoma (M-14 и SK-Mel-19) i indukuje njihovu apoptozu.

### **3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA**

U današnje vreme velika pažnja se poklanja razvoju novih lekova za terapiju tumora, ali se takođe istražuje koji se od postojećih već registrovanih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini a namenjenih za lečenje drugih bolesti mogu koristiti i u ovu svrhu. Takođe, u svetu su veoma aktuelna istraživanja uticaja infekcije uzrokovanih različitim helmintima na oblikovanje imunskog odgovora i na sposobnost zaštite inficiranog domaćina ne samo od infekcije već i od alergijskih, autoimunskih i malignih bolesti.

Melanom je najagresivniji kancer kože, sa lošom prognozom u uznapredovalim formama zbog rezistencije na konvencionalnu hemioterapiju. Retka istraživanja su pokazala da *T. spiralis* i njeni antigeni mogu da utiču na rast nekih tumorskih ćelija, kao i da mebendazol inhibiše proliferaciju nekih tumora. Imajući u vidu da postoji vrlo malo literaturnih podataka o uticaju infekcije sa *T. spiralis*, odnosno njenih antigena na maligne ćelije, dok uticaj ES L1 antigena na ćelije melanoma do sada nije ispitivan, uvođenje ovih istraživanja predstavlja značajan doprinos u daljem proučavanju efekata ovog antigena. S druge strane novija istraživanja ukazuju da mebendazol inhibiše proliferaciju nekih tumora, ali nema podataka o delovanju na ćelijske linije mišjeg (B16) i humanog (Fem-X) melanoma. Iz navedenih razloga postoji potreba za ovim istraživanjima.

Cilj ove doktorske disertacije je da se u uslovima *in vitro*, kao i *in vivo* utvrde efekti:

1. metaboličkog, ES L1 antigena poreklom od helminta *T. spiralis* kao i same infekcije uzrokovane trihinelom na rast ćelija melanoma.
2. Antiparazitskog leka – mebendazola na rast ćelija melanoma.

Za ova ispitivanja postavljeni su sledeći zadaci:

D) Ispitivanja u uslovima *in vitro*

1. Da se ispita efekat ES L1 antigena i mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija;

2. Da se ispita efekat ES L1 antigena i mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija;
3. Da se ispita put ili mehanizam nastajanja apoptoze posle primene ES L1 antigena i mebendazola, korišćenjem inhibitora kaspaza -3, -8, -9;

II) Ispitivanja u uslovima *in vivo*

4. Da se ispita efekat hronične infekcije uzrokovane sa *T. spiralis* na rast melanoma kod miša;
5. Da se ispita efekat peroralne primene mebendazola na rast melanoma kod miša.

## **4. MATERIЈAL I METODE RADA**

## **4.1. ISPITIVANJA U USLOVIMA *IN VITRO***

### **4.1.1. Kulture ćelija korišćene u ogledu**

U ogledima su korišćene ćelije humanog (Fem-X) i mišjeg (B16) melanoma (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije).

### **4.1.2. Postupak kultivisanja melanomskih ćelija**

Ćelije humanog (Fem-X) i mišjeg (B16) melanoma gajene su u flaskovima (Falcon, Nemačka) u medijumu RPMI 1640 (PAA) sa dodatkom 10% fetalnog seruma teleta (FCS, Sigma). Tokom gajenja flaskovi su čuvani u inkubatoru na 37<sup>0</sup>C, u vlažnoj atmosferi i sa dodatkom 5% CO<sub>2</sub>. Ćelije su dva puta nedeljno presađivane, a jedan flask se koristi za gajenje ćelija do mesec dana. Za eksperimente su ćelije skidane iz flaska primenom tripsinizacije (0,25% tripsin, Torlak). Medijum iz flaska je odlivan i flask ispiran sa 0,25%-tnim tripsinom. Zatim je flask naliven sa tripsinom koji je ostavljan da deluje da bi se ćelije odlepile od dna flaska. Čitav proces je praćen pod mikroskopom i kad ćelije započnu odvajanje od dna flaska dodavan je u flask RPMI medijum obogaćen sa 10% FCS da bi se zaustavila dalja aktivnost tripsina. Ćelije su pokupljene špricom sa iglom i/ili plastičnom pasterovom pipetom za jednokratnu upotrebu u plastičnu epruvetu od 15ml. Ćelije su isprane u centrifugi pri 2000 obrtaja (652xG) u minuti tokom 10 minuta, resuspendovane u medijumu, a broj i vijabilnost ćelija su određeni brojanjem u 0,2% rastvoru Tripan plavog (Superlab, Beograd). Prisutne ćelije su u visokom procentu bile vijabilne (94-96%). Za upotrebu u eksperimentima korišćene su samo one ćelije koje su imale vijabilnost veću od 90%.

### **4.1.3. Supstance korišćene u ispitivanjima**

U *in vitro* ispitivanjima smo koristili: ES L1 antigen *T. spiralis* (INEP, Srbija), i mebendazol (Sigma, Nemačka).

### **4.1.4. Priprema rastvora ispitivanih supstanci**

Štok rastvor mebendazola (Sigma, Nemačka) je pripreman pre svakog eksperimenta rastvaranjem u DMSO u koncentraciji od 40mM i sterilisan filtriracijom preko membrane sa otvorima prečnika 0,22 μm (Millipore, USA). Neposredno pre

upotrebe razređivan je u potpunom medijumu prvo do radnog pod štoka, koncentracije 0,4mM, i zatim do radnih koncentracija. Kompletni, hranljivi medijum korišćen u radu sastojao se od RPMI 1640 medijuma sa dodatkom L-glutamina (3mM), streptomicina (100ug/ml), penicilina (100 IU/ml), 10% fetalnog telećeg seruma (FCS) (inaktivisan 30 minuta na 56<sup>0</sup>C) i 25mM Hepesa, a pH medijuma je bio podešen na 7,2 rastvorom bikarbonata.

ES L1 antigen *T. spiralis* (INEP, Beograd) je pripreman na način opisan odeljku 4.2.3. , rastvoren u fosfatnom puferskom rastvoru (PBS), filtriran kroz Millipore filter, 0,22um i tako čuvan u alikvotima na -80<sup>0</sup>C do upotrebe. Pre dodavanja u kulturu je odmrzavan, a zatim razređen u potpunom medijumu do radnih koncentracija.

#### **4.1.5. Postupak kultivacije melanomskih ćelija sa ispitivanim supstancama**

Posle određivanja broja melanomskih ćelija (Fem-X, i B16), za ispitivanje efekta na preživljavanje u ploču sa 96 mesta je postavljano po 2x10<sup>3</sup> ćelija/bazenu. Za ispitivanja efekta na apoptozu u ploču sa 24 mesta postavljano je po 2x10<sup>4</sup> B16 ćelija/bazenu. Ploče sa postavljenim ćelijama su ostavljane u inkubatoru 20 sati da se ćelije zalepe za dno ploče i nastave rast i deobu. Po isteku ovih 20 sati dodavan je mebendazol (Sigma, Nemačka), tako da su finalne koncentracije bile 0-2,5μM, odnosno ES L1 antigen *T. spiralis* (INEP, Srbija) u finalnoj koncentraciji od 0 do 200μg/ml. Finalna zapremina u bazenčiću ploča sa 96 mesta je bila 200μl, a u ploči sa 24 mesta 1ml. Kontrola se sastojala od melanomskih ćelija u punom hranljivom medijumu.

Ovako pripremljene ploče sa ćelijama i ispitivanim supstancama su kultivisane u termostatu, u trajanju tretmana od 72 sata za određivanje preživljavanja (Fem-X i B16 ćelije). Kultivacija za određivanje apoptoze (na B16 ćelijama) je trajala 6-24-48 sati za tretman mebendazolom, odnosno 48-72 sata za tretman ES L1 antigenom *T. spiralis*. Kultivacije su se odvijale na temperaturi od 37<sup>0</sup>C i koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5%. Posle isteka perioda inkubacije ploče su vađene i određivana je proliferacija ćelija, odnosno procenat apoptotičnih ćelija:



#### 4.1.6. Postupak kultivacije fibroblasta sa ispitivanim supstancama

Posle određivanja broja ćelija fibroblasta zelenog majmuna (COS-7), za ispitivanje efekta na preživljavanje u ploču sa 96 mesta je postavljano po  $5 \times 10^3$  ćelija/bazenu. Ploče sa postavljenim ćelijama su ostavljane u inkubatoru 20 sati da se ćelije zalepe za dno ploče i nastave rast i deobu. Po isteku ovih 20 sati dodavan je mebendazol (Sigma, Nemačka), tako da je finalna koncentracija bila  $1,25 \mu\text{M}$ , odnosno ES L1 antigen *T. spiralis* (INEP, Srbija) u finalnoj koncentraciji od  $200 \mu\text{g/ml}$ . Finalna zapremina u bazenčiću ploča sa 96 mesta je bila  $200 \mu\text{l}$ , Kontrola se sastojala od ćelija fibroblasta u punom hranljivom medijumu.

Ovako pripremljene ploče sa ćelijama i ispitivanim supstancama su kultivisane u termostatu, u trajanju tretmana od 72 sata za određivanje preživljavanja. Kultivacija se odvijala na temperaturi od  $37^\circ\text{C}$  i koncentraciji  $\text{CO}_2$  od 5%. Posle isteka perioda inkubacije ploče su vađene i određivano je preživljavanje ćelija.

#### 4.1.7. Postupak određivanja preživljavanja ćelija metodom MTT

Preživljavanje ćelija (engl. *Survival*) se definise kao odnos broja živih ćelija u uzorku ćelija tretiranih agansom (N) i broja živih ćelija (Nk) u kontrolnom uzorku, uzorku u kome su ćelije rasle samo u hranljivom medijumu. Preživljavanje ćelija je mereno korišćenjem metode redukcije dimetiltiazol difenil tetrazolijum bromida (MTT test). To je standardni kolorimetrijski test kojim se meri aktivnost enzima dehidrogenaze. Ovaj enzim redukuje (cepa) tetrazolni prsten rastvorljivog MTT (dimetiltiazol difenil tetrazolium bromid) i tako nastaje netopivi formazan. Boja se tokom ove reakcije menja iz žute u ljubičastu, a vrednost absorbance nastalog obojenja, očitane na talasnoj dužini od 570 nm, je mera mitohondrijske aktivnosti. Test smo izvodili tako što smo posle isteka perioda inkubacije vadili ploču sa 96 mesta iz termostata. U ploču je dodavan MTT ( $5 \text{mg/ml}$  u 10% FSC u PBS), i to  $10 \mu\text{l}$ /otvoru ploče, koja je ostavljana 4h u inkubator na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon isteka perioda inkubacije od 4h reakcija je prekidana dodavanjem  $100 \mu\text{l}$  SDS (sodijum dodecil sulfat, 10% rastvor u vodi). Nakon toga se ploča ostavlja u inkubatoru (minimalno 6h). Vrednosti su sutradan očitavane na spektrofotometru na 570nm (ELISA čitač, Behring EL 311, microplate reader). Apsorbanca uzorka ćelija na 570nm je srazmerna broju živih ćelija u uzorku, obično se izražava u procentima kao S% ( $S\% = (N/Nk) \times 100$ ). Da bi se dobilo preživljavanje ćelija (S%), apsorbanca uzorka sa tretiranim ćelijama (A) se podeli

sa apsorbancom ćelija raslih u kontrolnom uzorku ( $A_k$ ) i pomnoži sa 100 ( $S\% = (A/A_k) \times 100$ ). Podrazumeva se da se apsorbanca slepe probe (medijum bez ćelija uvek oduzima od apsorbanca odgovarajućeg uzorka i kontrole. Dobijeni podaci o preživljavanju ćelija se unose na grafikon kao funkcija primenjene koncentracije ispitivanog agensa. Sa dobijenog grafikona se dobije vrednost srednje efektivne koncentracije ( $IC_{50}$ ) kao ona koncentracija agensa koja izaziva smanjenje preživljavanja ćelija na 50% u odnosu na kontrolni uzorak (100%). Svi eksperimenti su rađeni u triplikatima i ponavljani najmanje tri puta.

#### **4.1.8. Postupci detektovanja apoptoze**

Apoptoza na B16 ćelijama je detektovana bojenjem ćelija sa propidijum jodidom, odnosno aneksin V-FITC i propidijum jodidom i analizom na EPICS XL-MCL, protočnom citofluorimetru (Coulter), kao i morfološkom analizom na svetlosnom mikroskopu (Zeiss).

*a) Postupak merenja apoptoze bojenjem ćelija propidijum jodidom (PI).* - Propidijum-jodid (PI) (Sigma, Nemačka), je fluorescentna boja koje se vezuje za nukleinske kiseline. Molekulska masa PI je 668,4, a rastvaran je u vodi u koncentraciji od 1mg/ml i čuvan zaštićen od svetla na +4°C. Dodavan je ćelijama u finalnoj koncentraciji od 100 µg/ml.

Zbog toga što apoptotične ćelije zbog fragmentacije jedra imaju manju količinu dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), što se označava kao hipodiploidija, intenzitet fluorescence jedara ovih ćelija obojenih PI (koji se vezuje za DNK) je smanjen u odnosu na žive ćelije. Po isteku inkubacije ćelije su sakupljane, na taj način što su tripsinom (0,25%, Torlak Srbija) odlepljeni od podloge, i ispirane medijumom, a nakon toga i PBS-om. Nakon ispiranja u suspenziju ćelija je dodavan PI rastvoren u hipotonom rastvoru u finalnoj koncentraciji od 0,1mg/ml, a do analize suspenzija je čuvana najmanje 3 sata u frižideru. Ekscitirajuća svetlost na Epics-XL-MCL citofluorimetru za uzorke obeležene PI je bila talasne dužine 488nm. Rezultati su dobijeni u obliku histograma fluorescence, a procenat jedara sa hipodiploidnom DNK predstavlja procenat apoptotičnih ćelija.

*b) Postupak merenja apoptoze bojenjem ćelija sa aneksin-V-FITC i propidijum jodid-om (PI).* - Jedna od prvih promena u ćelijskoj membrani tokom apoptoze je izlaganje fosfatidil serina na spoljnoj strani membrane. To je iskorišćeno za ovaj test kojim je moguće

ustanoviti ranu apoptozu (ćelije koje su vezale samo aneksin), kasnu (ćelije koje su vezale i aneksin i PI) i ćelije u nekrozi (vezale samo PI). Vijabilne ćelije ne vezuju ni aneksin V-FITC ni PI. Posle skupljanja ćelija nakon odlepljivanja tripsinom, ćelije su isprane u medijumu i pripremljene za merenje apoptoze korišćenjem komercijalnog kita (R&D, Mineapolis, USA) po uputstvu proizvođača.

**c) Postupak merenja apoptoze morfološkom metodom.** - Morfološka analiza apoptoze je rađena na ćelijama skupljenim posle isteka inkubacije i odstranjivanja supernatanta. Ćelije su fiksirane i obojene Türkovim reagensom, a analiza je rađena na Zeis-ovom svetlosnom mikroskopu brojanjem 500 ćelija po preparatu. Morfološki se razlikuju vijabilne ćelije od apoptotičnih, kod kojih se zapaža kondenzacija hromatina, piknoza i fragmentacija jedara.

**d) Postupak ispitivanja puta apoptoze primenom inhibitora kaspaza -3, -8 i -9.** - Put apoptoze kod B16 ćelija je ispitivan primenom pretretmana ćelija sa inhibitorima kaspaza -3, -6, -9 (R&D, Mineapolis, USA) prema uputstvima proizvođača. Nakon preinkubacije ćelijama je dodavan mebendazol, odnosno ES L1 antigen *T. spiralis*. Nakon isteka inkubacije ćelije su skupljene standardnom tripsinizacijom, obojene PI i procenat apoptoze određen na protočnom citofluorimetru.

## **4.2. ISPITIVANJA U USLOVIMA *IN VIVO***

### **4.2.1. Eksperimentalne životinje**

U eksperimentima izvedenim u uslovima *in vivo* korišćen je *in vivo* eksperimentalni model sistem za rast subkutano implantiranih ćelija melanoma kod miševa C57BL/6 soja, muškog pola, starosti 6-8 nedelja. Životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja, Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Sve procedure u radu sa životinjama bile su u skladu sa zakonskim propisima i odobrenjima Etičkog komiteta INEpa i Etičkog komiteta Fakulteta veterinarske medicine. U svim eksperimentima životinje su birane metodom slučajnog uzorka i smeštane po 10 u jasno označene kaveze.

Životinje su hranjene briketiranom hranom za laboratorijske životinje (Veterinarski zavod "Subotica" iz Subotice), i pojene po volji (*ad libitum*) vodom iz pojilica.

#### **4.2.2. Postupak izolovanja infektivnih mišićnih larvi *T. spiralis***

Parazit *Trichinella spiralis* održava se u INEP-u serijskom pasažom na pacovima Wistar soja, koji su odgajeni na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske Akademije u Beogradu. Primenom izoenzimskih analiza izvršenih 1991. god. u Referentnoj laboratoriji za *Trichinella*-u (*Trichinella* Reference Center, Institute Superiore di Sanita, Rome, Italy) potvrđena je pripadnost ovog izolata rodu *T. spiralis*, a izolat je obeležen kao ISS161.

Nakon žrtvovanja pacova koji služe za održavanje soja, uklanjanja kože i unutrašnjih organa, vrši se usitnjavanje tkiva u blenderu i izvođenje veštačke digestije (u skladu sa direktivom Evropske unije broj 2075/2005). Ukratko, na magnetnoj mešalici u veštačkoj digestivnoj tečnosti (pepsin i HCl) na temperaturi od 56<sup>0</sup>C, pola sata se vrši digestija. Zatim se preko sita sa otvorima promera 180 mikrometara sadržaj prelije u levak za sedimentaciju. U njemu digestivna tečnost ostaje 30 minuta, kada se ispušta 40ml u tubu za centrifugiranje. Posle 10 minuta primenom vakuuma pokupi se gornjih 30 ml, a preostalih 10 ml prelije u petri šolju. Tuba se ispere sa još 10 ml toplog PBSa, ispirak ulije u prethodno sipanih 10 ml u petri šolju, radi brojanja L1 larvi *T. spiralis* na stereomikroskopu.

Larve su potom isprane toplim PBSom i korišćene za infekciju životinja kao i za pripremu ekskretorno-sekretornog (ES) antigena L1 larvi ovog parazita.

#### **4.2.3. Postupak dobijanja ekskretorno-sekretornog (ES) antigena L1 larvi *T. spiralis***

Nakon dobijanja larvi korišćenjem metode magnetne mešalice (kao što je već opisano) one se tri puta u trajanju od 20 minuta ispiranju u medijumu za ispiranje (DMEM, Sigma Nemačka, sa 10mM Hepesa, 2mM L-glutamina, 1mM Na-piruvata i dodatkom 100IU/ml gentamicina (duplo više antibiotika nego u medijumu za kultivaciju) u inkubatoru na 37<sup>0</sup>C, u vlažnoj atmosferi sa dodatkom 5% CO<sub>2</sub>. Ekskretorno-sekretorni (ES) antigen L1 larvi *T. spiralis* dobijen je kultivacijom izolovanih i ispranih larvi u kompletnom medijumu - Dulbeccoes Modified Eagles Medium (DMEM, Sigma, Nemačka) sa 10mM Hepesa, 2mM L-glutamina, 1mM Na-piruvata i 50 U/ml gentamicina, tokom 18-

20 h na 37°C, uz prisustvo 5% CO<sub>2</sub>. Nakon kultivacije larve su izdvojene spontanom taloženjem u konusnim epruvetama, a medijum sa prisutnim ES antigenom ispran u fiziološkom rastvoru i koncentrovan preko Amicon sistema (Stirred cells 8400 i 8010, Amicon Corp, USA) uz korišćenje membrana za ultrafiltraciju čija je veličina pora 10000 NMWL (nominal molecular weight limit) (Amicon PM 10 Ultrafiltration Discs, polyethersulfone). Dobijeni ES L1 antigen parazita *T. spiralis* filtriran je preko membrane sa otvorima prečnika 0,22 µm (Millipore, USA). Kvalitet izolovanog antigena je testiran u ELISA testu a antigen je čuvan na -80°C do upotrebe.

#### **4.2.4. Postupak inficiranja C57Bl/6 miševa mišićnim (L1) larvama *T. spiralis***

Mušjaci C57Bl/6 soja miševa, starosti 6-8 nedelja, inficirani su parazitom *T. spiralis* peroralno, korišćenjem infektivnih (L1) larvi dobijenih iz skeletnih mišića pacova posle digestije. Za infekciju je upotrebljavano 200 L1 larvi *T. spiralis* po životinji u 500µl PBSa. Larve su aplikovane peroralno korišćenjem metalne, zakrivljene gastrične sonde.

#### **4.2.5. Postupak ispitivanja efekta hronične infekcije sa *T. spiralis* na rast melanomskih B16 ćelija**

Životinje su metodom slučajnog izbora za potrebe svakog ogleda deljene u dve grupe od po 10 jedinki.

Grupa I – eksperimentalna, jedinke su inficirane sa po 200 mišićnih (L1) larvi *T. spiralis* i 40 dana posle infekcije (p.i.) subkutano su im aplikovane ćelije mišjeg (B16) melanoma. Rast tumora je potom praćen tokom 25 dana nakon čega su životinje žrtvovane, a tumori izvađeni i izmereni.

Grupa II – kontrolna grupa, životinjama su aplikovane samo tumorske ćelije. Rast tumora je praćen 25 dana kada su životinje žrtvovane, a tumori izvađeni i izmereni.

B16 melanomske ćelije su aplikovane svim miševima u desni bok, subkutano u količini od  $5 \times 10^5$  ćelija u 200µl PBSa.

Tokom perioda praćenja miševi su svakodnevno posmatrani i pregledani na rast tumora, a 11., 14., 18., 21. i 25-og dana je veličina tumora merena preko kože (upotrebom mikrometra) i određivana zapremina.

#### **4.2.6. Postupak ispitivanja efekta mebendazola na rast melanomskih B16 ćelija**

Životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u dve grupe od po 10 jedinki.

Grupa I – eksperimentalna, životinjama su aplikovane mišje (B16) melanomske ćelije i zatim su životinje svakodnevno posmatrane i pregledane da bi se ustanovila pojava palpabilnih tumora na mestu aplikacije tumorskih ćelija. Nakon pojave prvih palpabilnih tumora u grupi jedinke su tretirane mebendazolom (50 mg/kg/dan p.o.) (Galenika, Srbija) pet dana uzastopno. Rast tumora je praćen 25 dana od aplikovanja B16 ćelija, kada su životinje žrtvovane a tumori izvađeni i izmereni.

Grupa II – kontrolna grupa, životinjama su aplikovane samo tumorske ćelije. Rast tumora je praćen tokom 25 dana, nakon čega su životinje žrtvovane a tumori izvađeni i izmereni.

B16 melanomske ćelije su aplikovane svim miševima u desni bok, subkutano u količini od  $5 \times 10^5$  ćelija u 200 $\mu$ l PBSa. Mebendazol je aplikovan peroralno, upotrebom metalne gastrične sonde.

Tokom perioda praćenja (25 dana od aplikacije tumorskih ćelija) miševi su svakodnevno posmatrani i pregledani na rast tumora, a 11., 14., 18., 21. i 25-og dana je veličina tumora merena preko kože (upotrebom mikrometra) i određivana njihova zapremina.

#### **4.2.7. Žrtvovanje životinja i makroskopsko određivanje karakteristika tumora**

Životinje su žrtvovane metodom cervikalne dislokacije 25 dana nakon aplikovanja melanomskih ćelija. Nakon žrtvovanja životinja tumori su vađeni u celini, izvršena su merenja dimenzija i masa, nakon čega je sledilo fiksiranje u 4% puferizovanom formalinu.

Zapremina tumora je računata po formuli ( $0,52 \times a \times b^2$ ), gde je a = dužina, dok je b = širina tumora.

***Kalupljenje tkiva tumora u parafinu i pravljenje histoloških isečaka.*** - Tkiva tumora su pripremana za kalupljenje u parafinu tako što su iz formalina tkiva prebacivana i inkubirana 2 dana u 95% alkoholu, 3 dana u apsolutnom alkoholu (sa promenom alkohola svaki dan). Posle isteka ovog perioda tkiva tumora su držana 10 minuta u mešavini sastavljenoj od 2 dela alkohola i 1 dela ksilola, zatim 10 minuta u mešavini 2 dela ksilola i 1 dela alkohola. Nastavljeno je držanje 3 puta 20 minuta u ksilolu nakon čega su tkiva tumora u parafinskom kupatilu držana 4 puta po 10 minuta. Usledilo je kalupljenje u parafinu (Paraplast embedding media, Sigma, Nemačka), a kalupi su čuvani u frižideru do sečenja na mikrotomu. Parafinski isečci za histološka ispitivanja pripremani su na mikrotomu (Reichert, Austrija) u debljini od 5 um.

***Bojenje isečaka tkiva tumora hematoksilin – eozinom.*** - Mikroskopske pločice na kojima su po dva isečka tkiva tumora su prvo prošle postupak deparafinizacije po 10 min ksilolom I i II, po 5 min apsolutnim alkoholom I i II i 96 % etanolom u staklenim histološkim kivetama. Posle ispiranja pločica u PBS-u 3 puta po 5 min usledilo je bojenje histoloških isečaka hematoksilinom po Majeru 10-15 sekundi. Posle kratkog ispiranja u destilovanoj vodi isečci su obojeni Eoziniom (1%) tokom 3 sekunde, nakon čega su preparati isprani. Na kraju je urađeno fiksiranje preparata u staklenim kivetama po 5 minuta u: 70 % alkoholu, 96 % alkoholu, apsolutnom alkoholu, ksilolu I i ksilolu II. Histološke pločice su obrisane gazom i napravljeni su trajni preparati sa D.P.X.-om, pokriveni ljuspicom tako da se ne formiraju mehurići vazduha i posmatrani pod svetlosnim mikroskopom (Carl-Zeiss Axio Imager A1).

#### **4.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA**

Svi podaci su izraženi kao srednja vrednost +/- standardna devijacija. Svaki *in vitro* test je rađen u triplikatu i ponovljen najmanje 3 puta. *In vivo* eksperimenti ponovljeni su dva puta. Za statističku analizu ispitivanih parametara je korišćen Student-t test. Statistička analiza izvršena je primenom *SPSS software version 16.0* (SPSS Inc, Chicago, IL).

## **5. REZULTATI ISPITIVANJA**

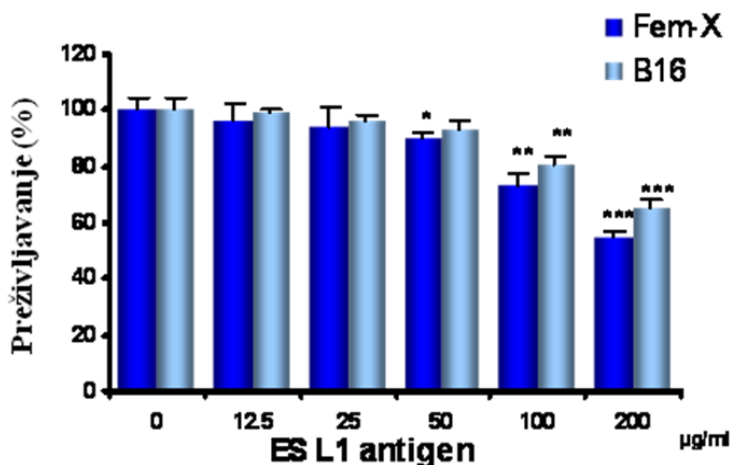


## **5.1. ISPITIVANJA U USLOVIMA *IN VITRO***

## 5.1.1. Uticaj ES L1 antigena *T spiralis* i mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija

### 5.1.1.1. Efekat ES L1 antigena na preživljavanje melanomskih ćelija

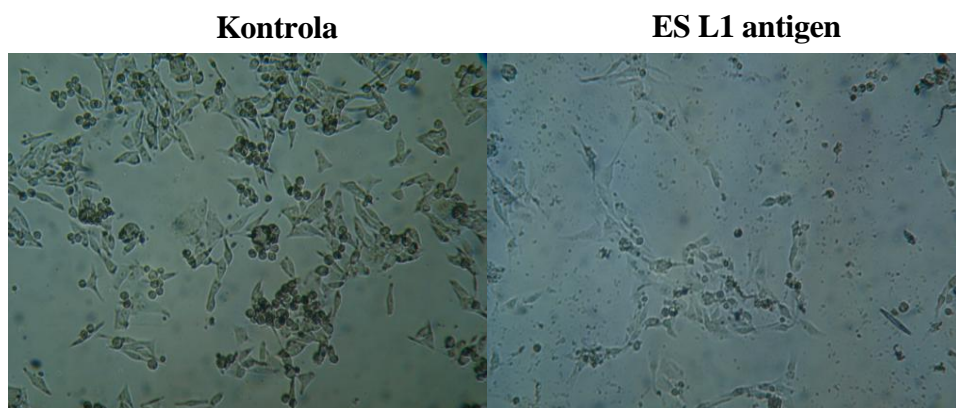
Posle inkubacije melanomskih ćelija sa ES L1 antigenom *T. Spiralis*, analiza uticaja na preživljavanje pomoću metode MTT, pokazala je da ES L1 antigen počev od koncentracije od 50 µg/ml blago, ali statistički značajno inhibira preživljavanje humanih (Fem-X) melanomskih ćelija, dok se na mišijim (B16) melanomskim ćelijama ovaj fenomen zapaža počev od 100 µg/ml. Koncentracije od 100 i 200 µg/ml ES L1 antigena dovode do statistički vrlo značajne inhibicije preživljavanja ( $p < 0,01$  za 100 µg/ml,  $p < 0,001$  za 200 µg/ml). ES L1 antigen pokazao je jači efekat na humane nego na mišje melanomske ćelije, ali to nije bilo statistički značajno. IC<sub>50</sub> nije mogao biti izračunat ali je ES L1 antigen u koncentraciji od 200 µg/ml preživljavanje obe vrste malignih ćelija snizio i to kod Fem-X sa  $100 \pm 4,7\%$  na nivo od  $54,6 \pm 2,7\%$ , onosno sa  $100 \pm 4,5\%$  na  $65,3 \pm 3,0\%$  za B16 u odnosu na kontrole (grafikon 1).



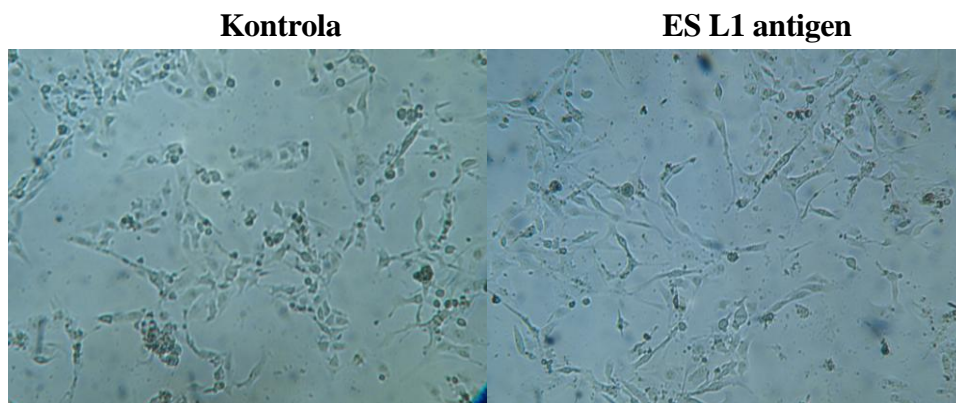
**Grafikon 1. - Efekat ES L1 antigena na preživljavanje humanih i mišjih melanomskih ćelija.** Melanomske ćelije (2000/otvoru) su postavljene u ploču sa 96 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen u rastućim koncentracijama. Preživljavanje je određivano metodom MTT nakon 72h inkubacije (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode rada). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u triplikatu, od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

Mikroskopskom opservacijom obe vrste tumorskih ćelija u kulturi vizuelno je bila uočljiva smanjena gustina i raširenost kao i promenjen morfološki izgled ćelija (izmenjen oblik) u onim otvorima ploča za kultivaciju u kojima su ćelije bile izložene dejstvu ES L1 antigena (slika 3).

**A**



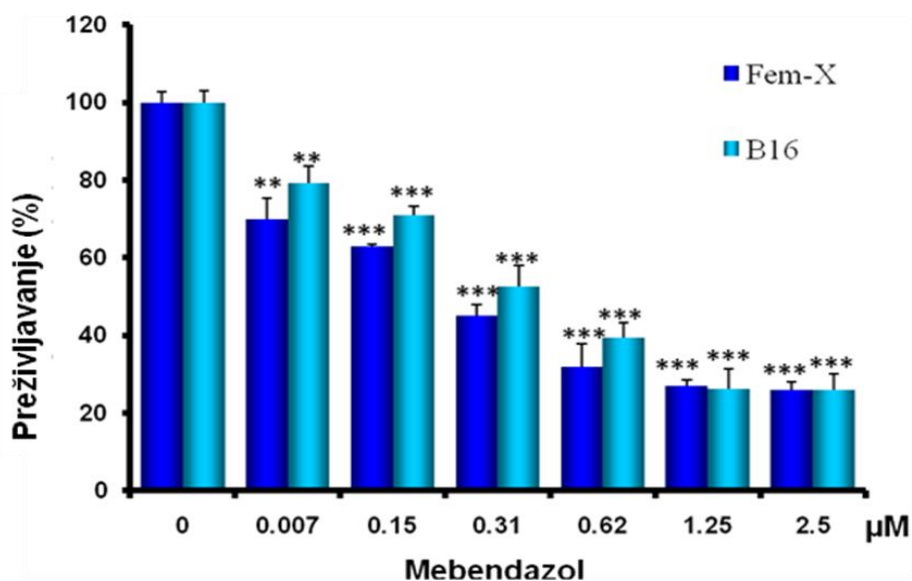
**B**



*Slika 3. Morfološki izgled melanomskih ćelija kultivisanih sa ES L1 antigenom, svetlosna mikroskopija (uveličanje 200 puta). Tumorske ćelije posle 72h kultivacije u medijumu (levo) i sa 200 µg/ml ES L1 antigena (desno). A) ćelije humanog (Fem-X) melanoma. B) ćelije mišjeg (B16) melanoma*

### 5.1.1.2. Efekat mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija

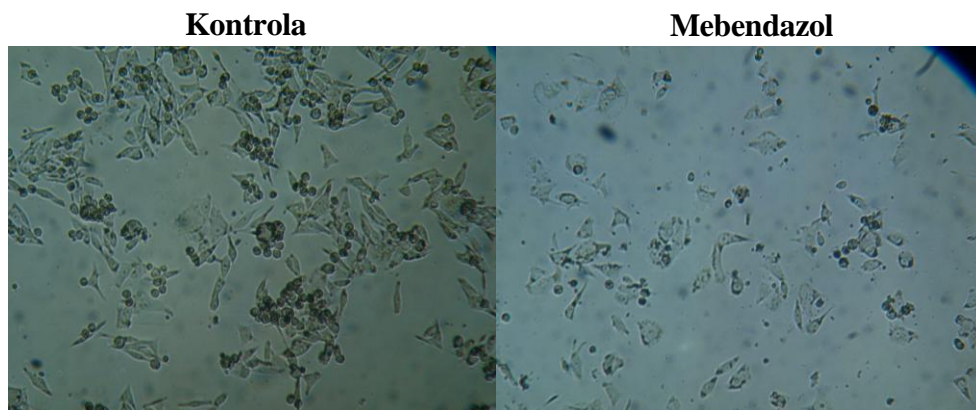
Posle inkubacije melanomskih ćelija sa mebendazolom i analize uticaja na preživljavanje pomoću metode MTT, utvrđeno je da mebendazol u koncentraciji od 0,007 do 2,5  $\mu\text{M}$  statistički značajno ( $p < 0.001$ ) inhibira preživljavanje humanih (Fem-X) i mišjih (B16) melanomskih ćelija (grafikon 2). Preživljavanje ćelija kontrole kod Fem-X sa  $100 \pm 3,1\%$  i B16 sa  $100 \pm 2,7\%$  pala je posle tretmana sa 2,5  $\mu\text{M}$  na  $26 \pm 4,1\%$  kod Fem-X, a kod B16 na  $26 \pm 2,03\%$ . Na osnovu dobijenih vrednosti izračunata je srednja efektivna doza ( $\text{IC}_{50}$ ) koja iznosi: 0,31  $\mu\text{M}$  za Fem-X, a za B16 0,33  $\mu\text{M}$ . Pri tome je postignut jači efekat na humane nego na mišje melanomske ćelije, ali to nije statistički značajno.



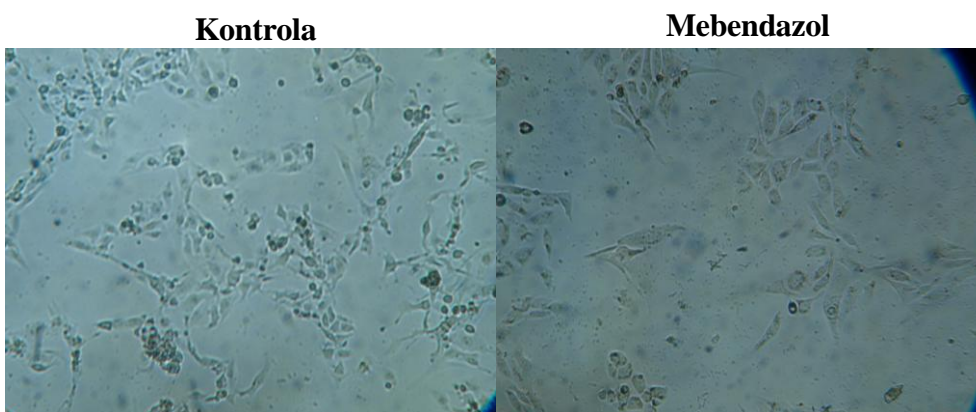
**Grafikon 2. - Efekat mebendazola na preživljavanje humanih i mišjih melanomskih ćelija.** Melanomske ćelije (2000/otvoru) su postavljene u ploču sa 96 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol u rastućim koncentracijama. Preživljavanje je određivano metodom MTT nakon 72h inkubacije (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode rada). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u triplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0.001$  u odnosu na kontrolu.

Mikroskopskom opservacijom obe vrste tumorskih ćelija u kulturi vizuelno je bila uočljiva smanjena gustina i raširenost kao i promenjen morfološki izgled ćelija (izmenjen oblik) u onim otvorima ploča za kultivaciju u kojima su ćelije bile izložene dejstvu mebendazola (slika 4).

**A**



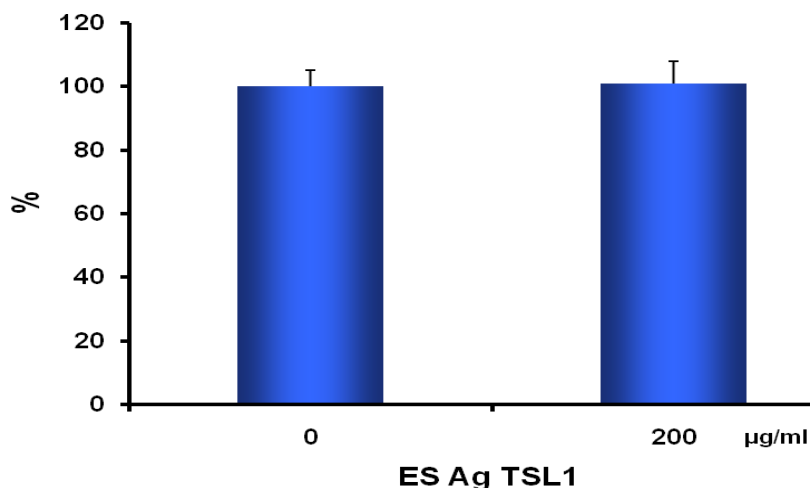
**B**



*Slika 4. Morfološki izgled ćelija kultivisanih sa mebendazolom, svetlosna mikroskopija (uveličanje 200X). Tumorske ćelije posle 72h kultivacije u medijumu (levo) i sa 1,25 $\mu$ M mebendazola (desno). A) ćelije humanog (Fem-X) melanoma. B) ćelije mišjeg (B16) melanoma.*

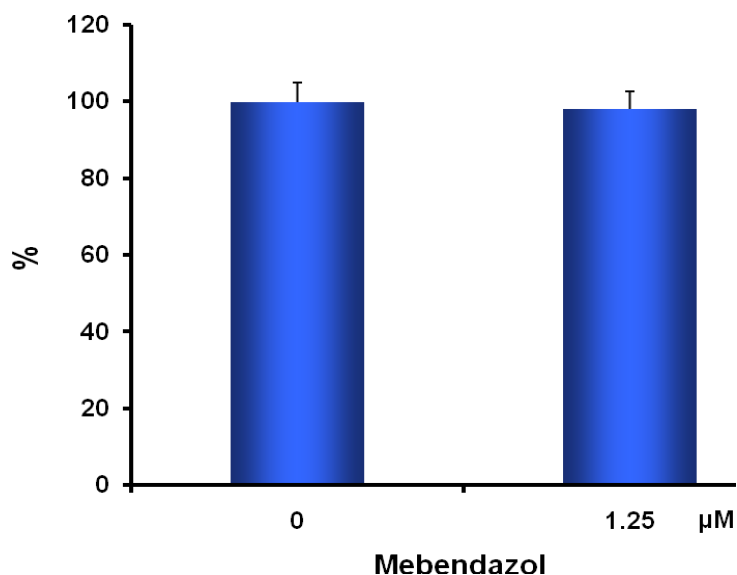
### 5.1.1.3. Efekat ES L1 antigena i mebendazola na preživljavanje zdravih ćelija (fibroblasta)

ES L1 antigen *T. Spiralis* ni u najvećoj dozi primenjenoj u ovim istaživanjima (200 $\mu$ g/ml) nije, pod istim uslovima kultivacije kao za ćelije melanoma, uticao na preživljavanje zdravih ćelija (u te svrhe korišćeni su fibroblasti zelenog majmuna, ćelijska linija COS-7) (grafikon 3).



**Grafikon 3. - Efekat ES L1 antigena na preživljavanje fibroblasta zelenog majmuna.** COS-7 ćelije (5000/w) su postavljene u ploču sa 96 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen u koncentraciji od 200  $\mu$ g/ml. Preživljavanje je određivano metodom MTT nakon 72h inkubacije (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode rada). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u triplikatu, od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima.

Mebendazol je potvrdio svoje karakteristike bezbednog leka pošto nije uticao na preživljavanje zdravih ćelija (fibroblasti zelenog majmuna, ćelijska linija COS-7) čak ni kada je ispitivan u visokoj koncentraciji od 1,25  $\mu\text{M}$ , a pod istim uslovima kultivacije zdravih ćelija kao što su bili za ćelije melanoma (grafikon 4).



**Grafikon 4. - Efekat mebendazola na preživljavanje fibroblasta zelenog majmuna.** COS-7 ćelije (5000/otvoru) su postavljene u ploču sa 96 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol u koncentraciji od 1,25  $\mu\text{M}$ . Preživljavanje je određivano metodom MTT nakon 72h inkubacije (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode rada). Rezultati su prikazani kao procenat preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u triplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima.

## 5.1.2. Uticaj ES L1 antigena *T. spiralis* i mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija

### 5.1.2.1. Efekat ES L1 antigena *T. spiralis* na apoptozu melanomskih ćelija

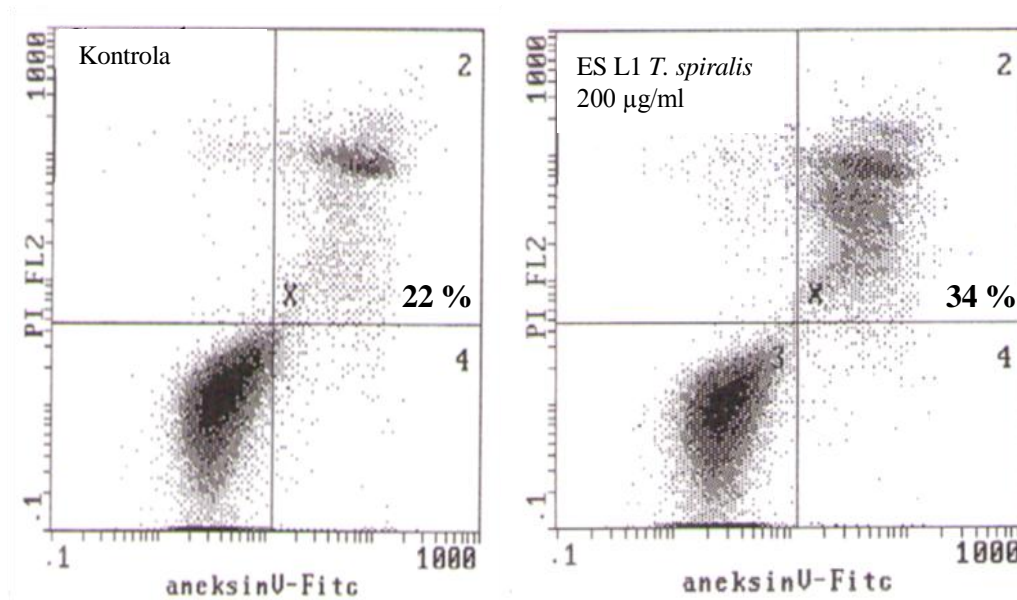
Posle inkubacije melanomskih ćelija u prisustvu ES L1 antigena i analize apoptoze na protočnom citofluorimetru posle bojenja ćelija sa PI (grafikon 5), utvrđeno je da ES L1 antigen u koncentracijama od 100 i 200 µg/ml dovodi do statistički značajne ( $p < 0,01$ ; grafikon 5) apoptoze mišjih melanomskih ćelija. Ovaj efekat je vremenski zavisian ( $p < 0,01$ ; grafikon 6). Procenat apoptotičnih B16 ćelija je kod kontrole posle 72h iznosio  $18,13 \pm 0,71\%$ , a posle tretmana sa 200 µg/ml je  $29,47 \pm 1,95\%$ .

Posle inkubacije melanomskih ćelija u prisustvu ES L1 antigena i analize apoptoze na citofluorimetru, posle bojenja ćelija sa aneksin V-FITC / PI (slika 5), kao i morfološkom metodom (bojenje Turkovim rastvorom, tabela 2) dobijeni su slični rezultati.

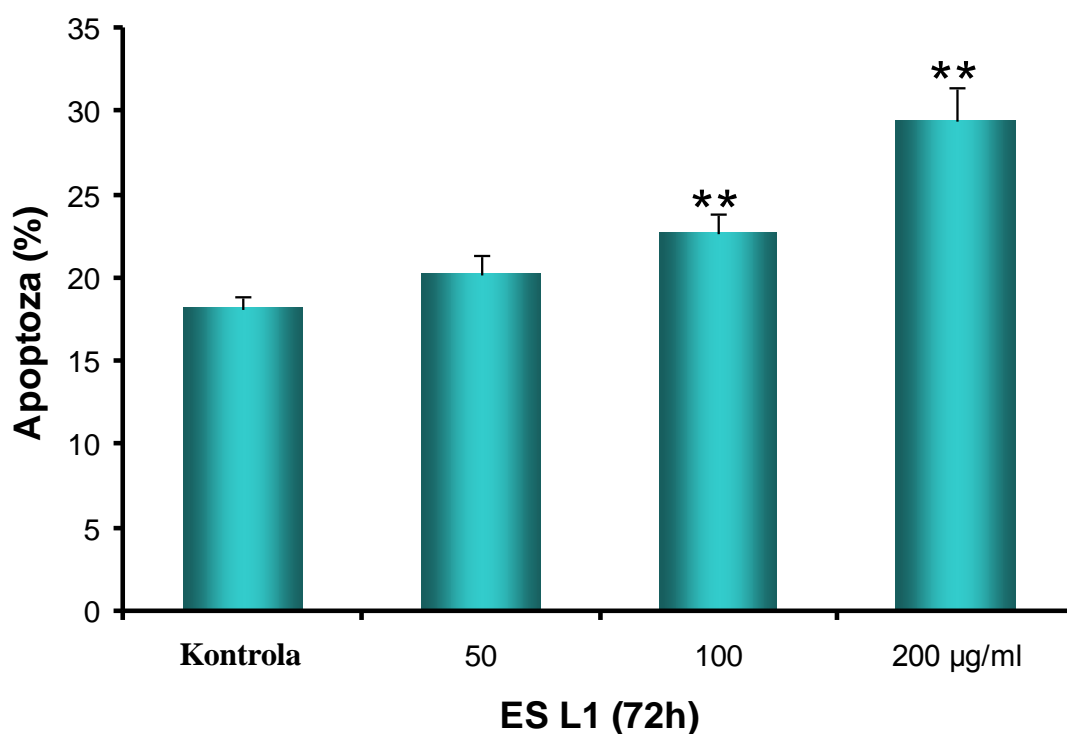
	Koncentracija ES L1 antigena (µg/ml)			
	0	50	100	200
48h	$8 \pm 0,71$	$9,8 \pm 2,4$	$11,6 \pm 1,5 *$	$16,4 \pm 2 **$
72h	$10,2 \pm 1,2$	$11,3 \pm 1,4$	$14,8 \pm 1,05 **$	$20,4 \pm 1,9 **$

**Tabela 2. - Efekat ES L1 antigena na apoptozu mišjih melanomskih ćelija mereno morfološkom metodom.** Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen. Nakon 48 i 72h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu ES L1 antigena (0, 50, 100, i 200 µg/ml), apoptoza je određivana metodom morfološke analize nakon bojenja Tirkovim rastvorom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu.

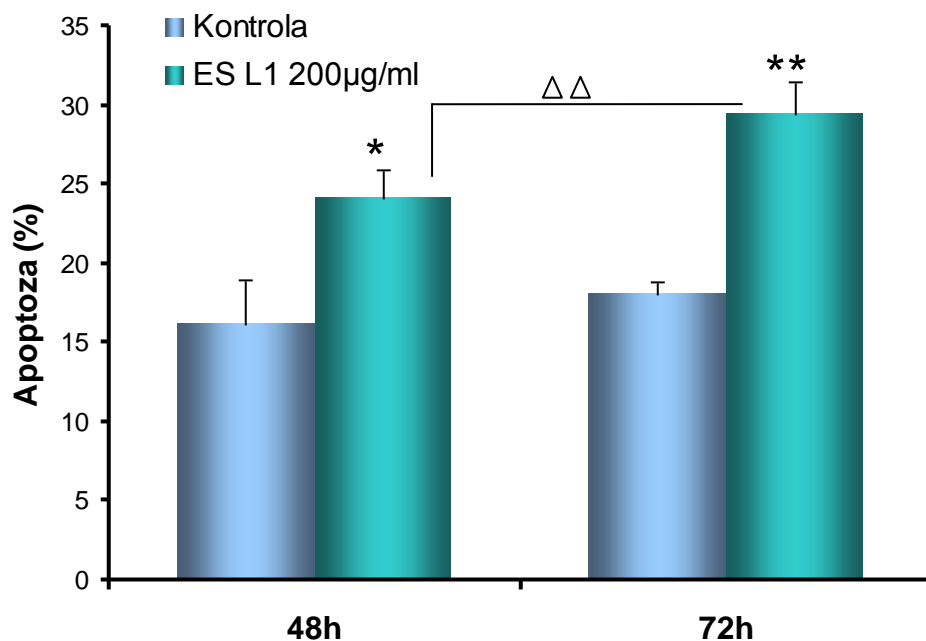




**Slika 5. –Efekat ES L1 antigena na apoptozu mišjih melanomskih ćelija, mereno posle bojenja ćelija anexin V-FITC i PI. Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen. Nakon 72h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu ES L1 antigena (200 µg/ml), apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja anexin V-FITC / PI (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Rezultati su prikazani kao histogram distribucije ćelija, a vrednosti procenta apoptotičnih ćelija koje se nalaze u kvadrantima 2 i 4 unete su u kvadrantu 2. Prikazan je histogram iz jednog reprezentativnog eksperimenta od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima.**



**Grafikon 5.** –Efekat ES L1 antigena na apoptozu mišjih melanomskih ćelija. Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen u rastućim koncentracijama. Nakon 72h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu različitih koncentracija ES L1 antigena (od 50 do 200 µg/ml), apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja PI (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost ± standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu.



**Grafikon 6. – Vremenski zavisan efekat ES L1 antigena na apoptozu mišjih melanomskih ćelija.** Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat ES L1 antigen. Nakon 48 i 72h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu ES L1 antigena (200 µg/ml), apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja propidijum jodidom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost ± standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu.  $\Delta\Delta < 0,01$ .

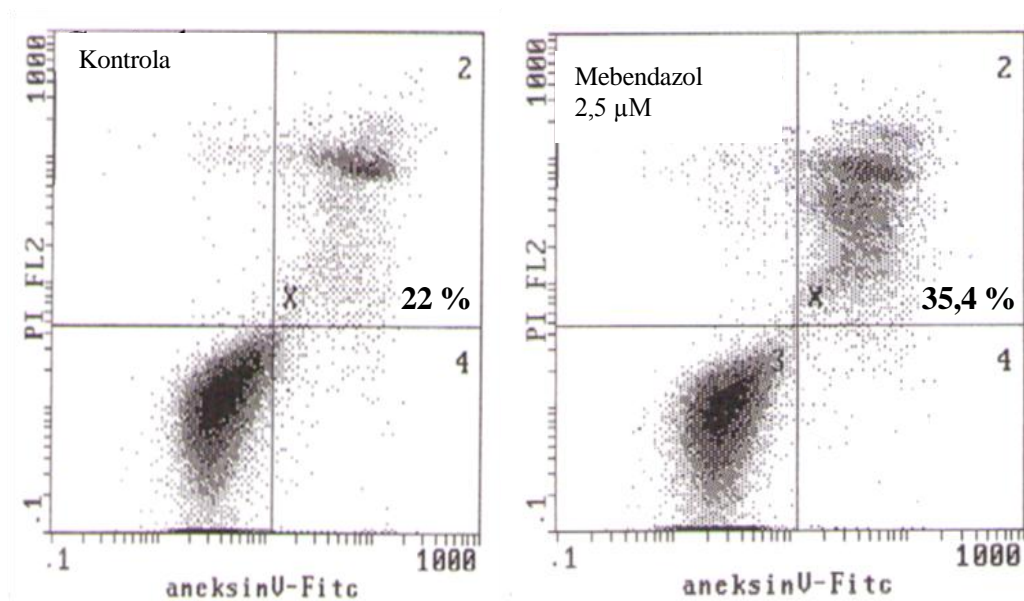
### 5.1.2.2. Efekat mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija

Posle inkubacije melanomskih ćelija u prisustvu mebendazola, i bojenja ćelija sa propidijum jodidom, utvrđeno je analizom apoptoze na protočnom citofluorimetru da mebendazol u koncentracijama od 1,25; 2,5 i 5  $\mu\text{M}$  dovodi do statistički vrlo značajne apoptoze mišjih melanomskih ćelija ( $p < 0,001$ , grafikon 7). Ovaj efekat je vremenski zavisian ( $p < 0,001$ , grafikon 8). Procenat apoptotičnih B16 ćelija je kod kontrole posle 24h iznosio  $14,17 \pm 0,76\%$  a posle tretmana sa 5  $\mu\text{M}$  je  $50,3 \pm 2,05\%$ .

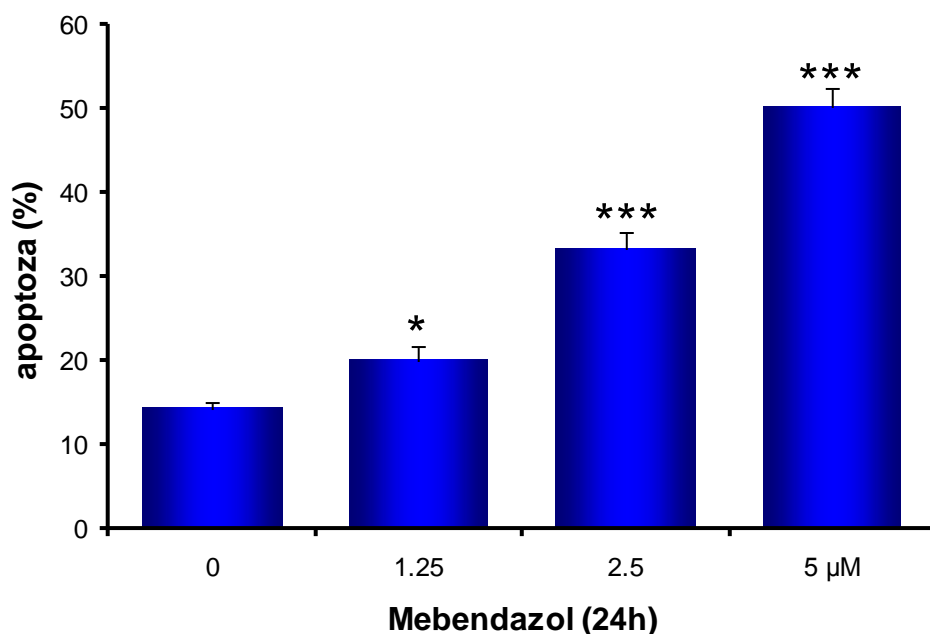
Posle inkubacije melanomskih ćelija sa mebendazolom i analize apoptoze na citofluorimetru, posle bojenja ćelija sa aneksin V-FITC / PI (slika 6), kao i morfološkom metodom (bojenje Turkovim rastvorom, tabela 3) dobijeni su slični rezultati.

	Koncentracija mebendazola ( $\mu\text{M}$ )			
	0	1,25	2,5	5
6h	$2 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,5$ *	$4,2 \pm 0,3$ **	$8,3 \pm 1,2$ ***
24h	$6,1 \pm 0,8$	$15 \pm 1,6$ ***	$22,3 \pm 1,2$ ***	$38,3 \pm 2$ ***
48h	$8 \pm 0,71$	$17,7 \pm 1,7$ ***	$37 \pm 4,4$ ***	$50,5 \pm 5,45$ ***

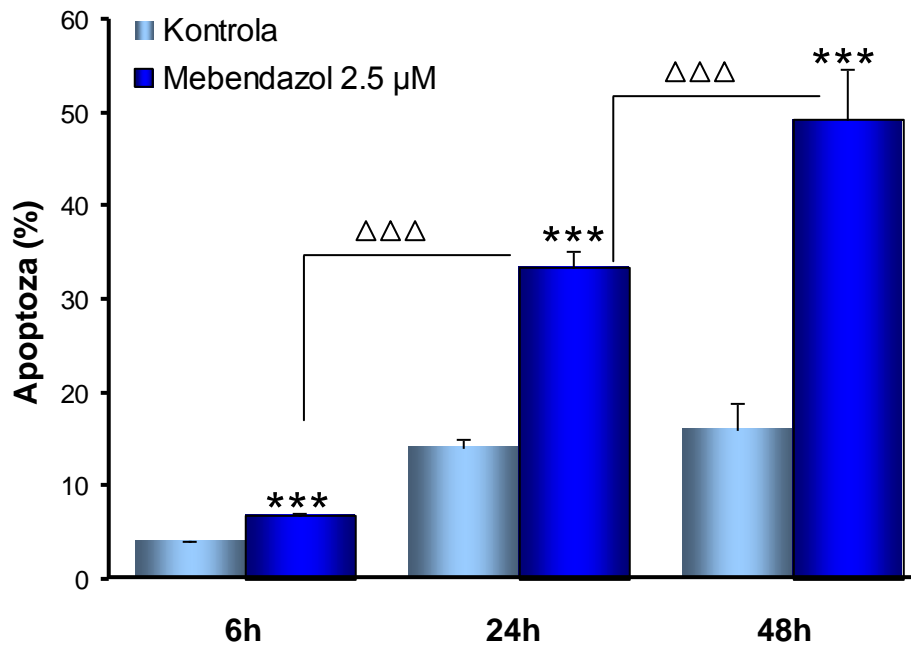
**Tabela 3. Efekat mebendazola na apoptozu mišjih melanomskih ćelija mereno morfološkom metodom.** Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol. Nakon 6, 24, i 48h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu mebendazola (0; 1,25; 2,5; i 5  $\mu\text{M}$ ), apoptoza je određivana metodom morfološke analize nakon bojenja Tirkovim rastvorom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.



**Slika 6. –Efekat mebendazola na apoptozu mišjih melanomskih ćelija, mereno posle bojenja ćelija aneksin V-FITC i PI. Melanomske ćelije (50000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol. Nakon 24h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu mebendazola (2,5 μM) apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja aneksin V-FITC / propidijum jodid (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao histogram distribucije ćelija, a vrednosti procenta apoptotičnih ćelija koje se nalaze u kvadrantima 2 i 4 unete su u kvadrantu 2. Prikazan je histogram iz jednog reprezentativnog eksperimenta od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima.**



**Grafikon 7. –Efekat mebendazola na apoptozu mišjih melanomskih ćelija.** Melanomske ćelije (50000/w) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol u rastućim koncentracijama. Nakon 24h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu mebendazola (1,25 - 5 µM), apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja PI (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost ± standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

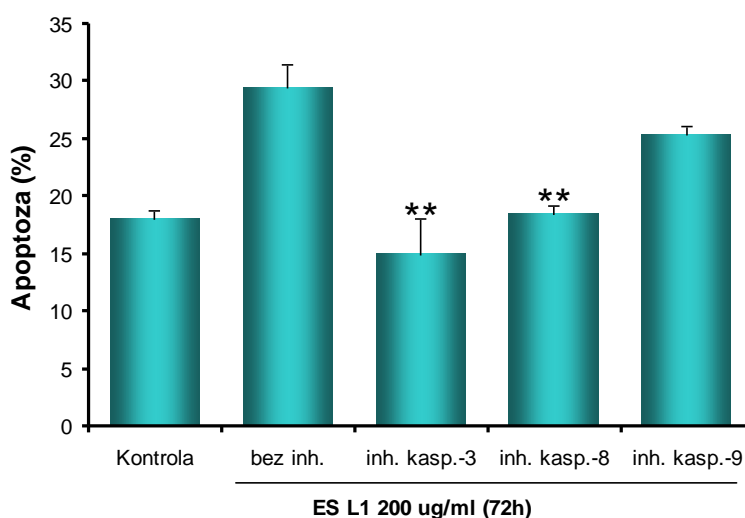


**Grafikon 8. – Vremenski zavisan efekat mebendazola na apoptozu mišjih melanomskih ćelija.** Melanomske ćelije (50000/w) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada im je dodat mebendazol. Nakon 6, 24 i 48h časovne kultivacije melanomskih ćelija u prisustvu mebendazola (2,5 µM) apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja propidijum jodidom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost ± standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu; ΔΔΔ  $p < 0,001$ .

### 5.1.3. Uticaj inhibitora kaspaza na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu ES L1 antigenom i mebendazolom

#### 5.1.3.1. Efekat inhibitora kaspaza na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu ES L1 antigenom

Melanomske ćelije, koje su pretretirane sa inhibitorima kaspaza -3, -8, i -9, i nakon toga inkubirane 72 sata sa ES L1 antigenom *T. spiralis*, analizirane su na protočnom citofluorimetru posle bojenja sa propidijum jodidom. Utvrđeno je da pretretman sa inhibitorima kaspaze -3 i -8 dovodi do statistički značajne ( $p < 0,01$ ) inhibicije apoptoze indukovane sa 200  $\mu\text{g/ml}$  ES L1 antigena. Vrednost apoptoze indukovane ES L1 antigenom je sa  $29,4 \pm 1,9\%$  smanjena na  $15,03 \pm 3\%$  kod ćelija pretretiranih sa inhibitorom kaspaze -3, odnosno  $18,5 \pm 0,6$  kod pretretiranih sa inhibitorom kaspaze -8, što odgovara vrednostima apoptoze kontrolnih ćelija u samom medijumu ( $18,1 \pm 0,3\%$ ). Pretretman sa inhibitorom kaspaze -9 doveo je do blagog smanjivanja procenta indukovane apoptoze, ali to nije bilo statistički značajno (grafikon 9)

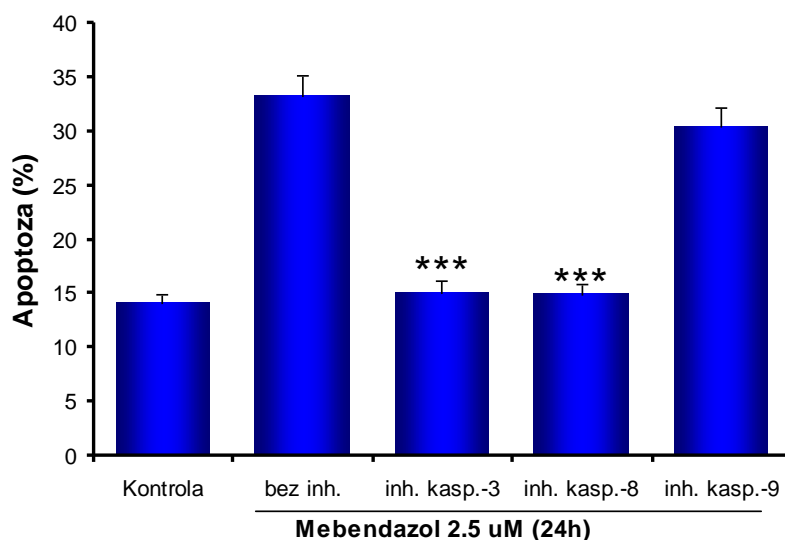


**Grafikon 9. - Efekat pretretmana inhibitorima kaspaza na apoptozu mišjih melanomskih ćelija indukovanu ES L1 antigenom.** Melanomske ćelije (20000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada su im dodati inhibitori kaspaza -3, -8, -9 tokom 2h. Po isteku 2h apoptoza je indukovana sa ES L1 antigenom (200  $\mu\text{g/ml}$ ), apoptoza je određivana metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja PI (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*\*  $p < 0,01$  u odnosu na kontrolu.



### 5.1.3.2. Efekat inhibitora kaspaza na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu mebendazolom

Posle 24 časovne inkubacije melanomskih ćelija sa mebendazolom (a koje su predhodno bile pretretirane tokom 2h sa inhibitorima kaspaza -3, -8, i -9) i bojenja ćelija sa propidijum jodidom, analiza apoptoze na protočnom citofluorimetru pokazala je da pretretman sa inhibitorima kaspaze -3 i -8 dovodi do statistički veoma značajne inhibicije apoptoze indukovane mebendazolom u koncentraciji od 2,5  $\mu$ M. Vrednost apoptoze je sa  $33,3 \pm 1,8\%$  kod indukovane apoptoze mebendazolom, smanjena na  $15 \pm 1,2\%$  kod ćelija pretretiranih sa inhibitorom kaspaze -3, odnosno  $14,8 \pm 1$  kod pretretiranih sa inhibitorom kaspaze -8, što odgovara vrednostima apoptoze kontrolnih ćelija u samom medijumu ( $14,2 \pm 0,7\%$ ). Pretretman sa inhibitorom kaspaze -9 doveo do blagog smanjivanja procenta indukovane apoptoze ali to nije bilo statistički značajno (grafikon 10)



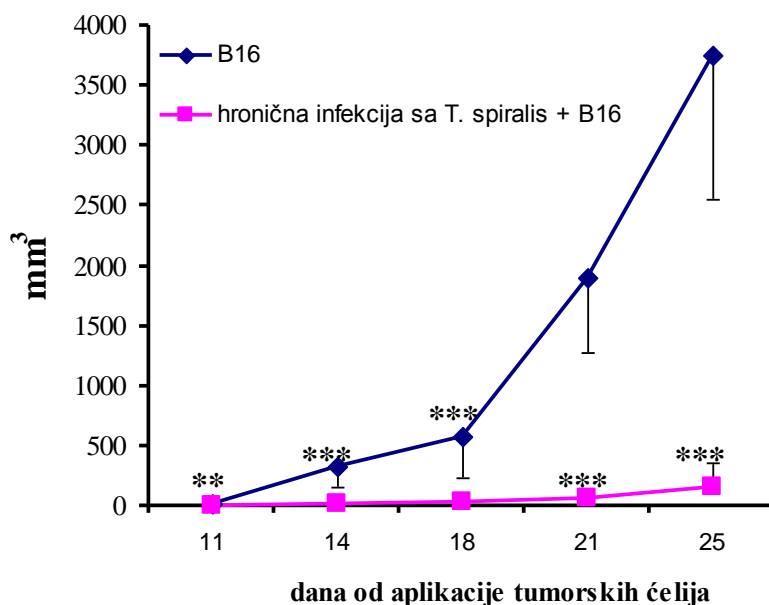
**Grafikon 10. - Efekat pretretmana inhibitorima kaspaza na apoptozu mišjih melanomskih ćelija indukovanu mebendazolom.** Melanomske ćelije(50000/otvoru) su postavljene u ploču sa 24 mesta i ostavljene 20h, kada su im dodati inhibitori kaspaza -3, -8, -9 tokom 2h. Po isteku 2h apoptoza je indukovana sa mebendazolom (2,5  $\mu$ M). Apoptoza je određivana nakon 24h metodom citofluorimetrijske analize nakon bojenja PI (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao procenat apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrolu (srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija) iz jednog eksperimenta rađenog u duplikatu od tri različita eksperimenta sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

## **5.2. ISPITIVANJA U USLOVIMA *IN VIVO***

## 5.2.1. Uticaj ES L1 antigena *T. spiralis* i mebendazola na rast melanomskih ćelija *in vivo*.

### 5.2.1. 1. Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na zapreminu melanoma

Hronična infekcija miševa sa *T. spiralis* dovela je do inhibicije rasta subkutano aplikovanih ćelija tumora melanoma. Tokom 25 dana praćenja rasta tumora njihova zapremina je bila statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod inficiranih miševa u odnosu na zapreminu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 11). Zapremina tumora kod miševa prethodno inficiranih *Trichinella*-om je 11, 14, 18, 21, i 25 dana bila  $20 \pm 15$ ,  $80 \pm 55$ ,  $150 \pm 50$ ,  $200 \pm 80$ ,  $220 \pm 100$  mm<sup>3</sup>. Zapremina tumora kod kontrolne grupe je 11, 14, 18, 21, i 25 dana bila  $50 \pm 30$ ,  $400 \pm 80$ ,  $700 \pm 180$ ,  $2000 \pm 520$ ,  $3800 \pm 1200$  mm<sup>3</sup>.

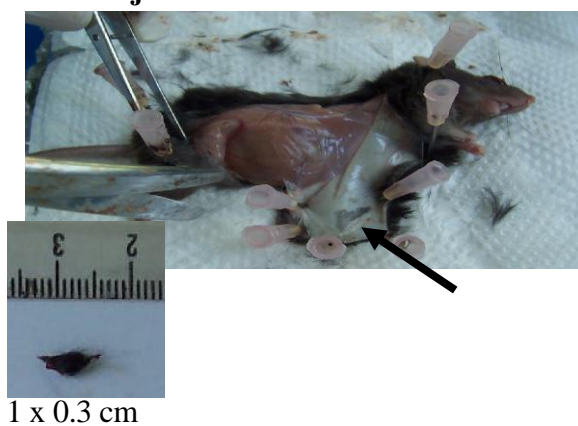


#### Grafikon 11. - Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na zapreminu melanoma *in vivo*.

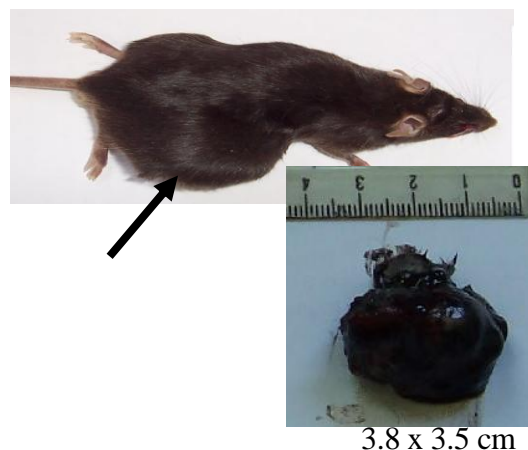
Miševi su peroralno inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*. Kada je infekcija ušla u hroničnu fazu, 40-og dana od infekcije, aplikovane su im B16 melanomske ćelije. Tumorske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu$ l PBS) su aplikovane subkutano u desni bok, kako inficiranim tako i zdravim miševima (po 10 u grupi). Životinje su svakodnevno posmatrane a tumori mereni preko kože mikrometrom 11, 14, 18, 21 i 25-og dana od aplikovanja B16 ćelija. Zapremina tumora je izračunata korišćenjem formule  $0,52 \times a \times b^2$  (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost zapremine tumora  $\pm$  standardna devijacija, u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

Inhibicija rasta tumora melanoma kod inficiranih miševa sa *T. spiralis* potvrđena je i direktnim merenjem izolovanog tumorskog tkiva kod žrtvovanih životinja, 25. Dana nakon aplikacije tumorskih ćelija. Tumorska masa (dimenzije, zapremina, težina) bila uočljivo višestruko manja (4 puta, 10 puta, odnosno više od 20 puta) kod inficiranih miševa (slika 7) u odnosu na kontrolne životinje (primili samo ćelije melanoma).

**A) Uticaj hronične infekcije sa *T. spiralis* na razvoj melanoma**

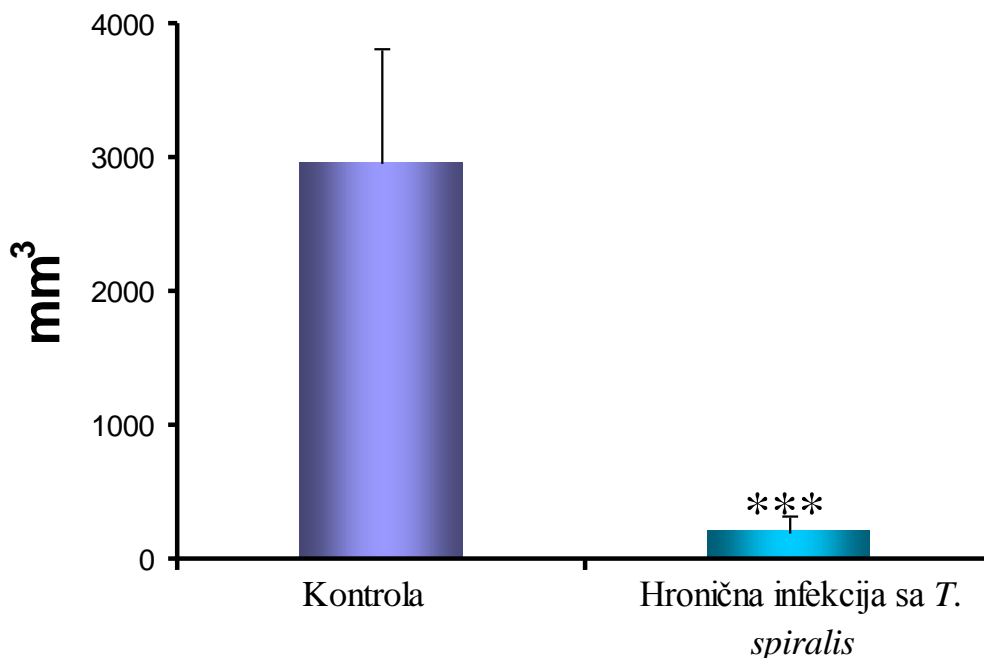


**B) Bez infekcije, melanom raste**



**Slika 7. - Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na melanom in vivo.** Miševi su peroralno inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*. Kada je infekcija ušla u hroničnu fazu, 40-og dana od infekcije, aplikovane su im B16 melanomske ćelije. Tumorske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu$ l PBS) su aplikovane subkutano u desni bok, kako inficiranim tako i zdravim miševima (po 10 u grupi). Nakon isteka 25 dana posmatranja i merenja tumora preko kože, miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i mereni (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Na slici se uočava razlika u veličini tumora između inficiranih miševa i kontrolne grupe koja je dobila samo B16 melanomske ćelije.

Merenjem zapremine izolovanih tumora ustanovili smo da je bila statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod miševa u infekciji u odnosu na zapreminu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 12). Zapremina tumora kod miševa inficiranih *Trichinella*-om je 25-og dana bila  $198,8 \pm 120,8 \text{ mm}^3$ . Zapremina tumora kod kontrolne grupe je 25-og dana bila  $2969 \pm 851,2 \text{ mm}^3$ .

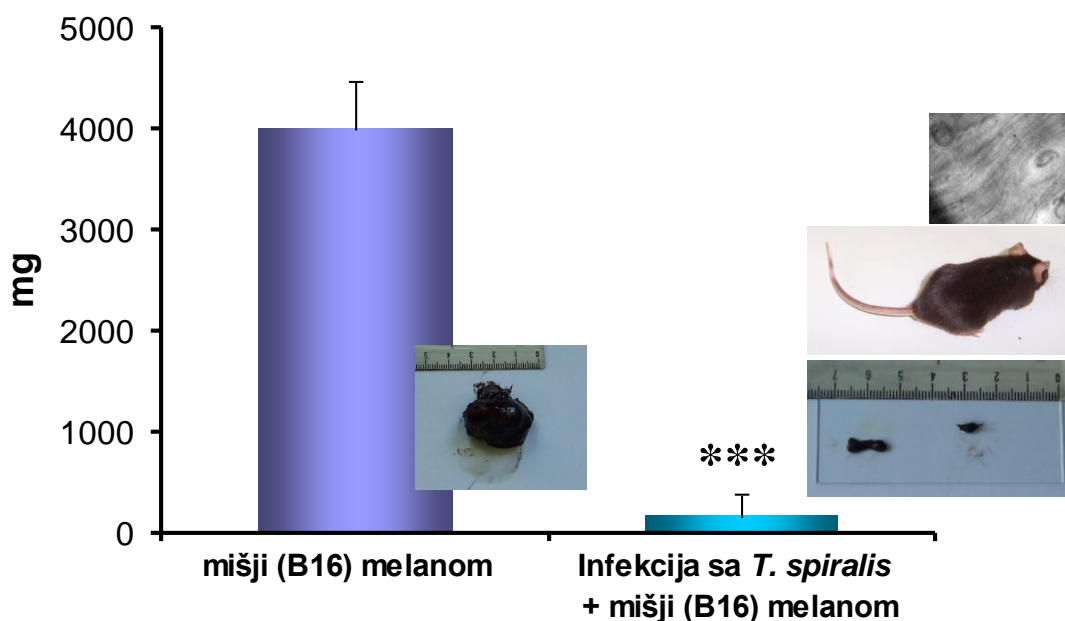


**Grafikon 12. - Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na zapreminu izvađenog melanoma.** Miševi su peroralno inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*. Kada je infekcija ušla u hroničnu fazu, 40-og dana od infekcije, aplikovane su im B16 melanomske ćelije. Tumorske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu\text{l}$  PBS) su aplikovane subkutano u desni bok, kako inficiranim tako i zdravim miševima (po 10 u grupi). Nakon isteka 25 dana posmatranja i merenja tumora preko kože, miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i izmerene dimenzije. Zapremina tumora je izračunata korišćenjem formule  $0,52 \times a \times b^2$  (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

### 5.2.1.2. Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na masu melanoma

Merenje mase izolovanog tumorskog tkiva takođe je potvrdilo da hronična infekcija miševa sa *T. spiralis* dovodi do inhibicije rasta subkutano aplikovanih ćelija tumora melanoma. Nakon 25 dana praćenja rasta tumora miševi su žrtvovani i tumori izvađeni. Utvrdili smo da je masa tumora statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod inficiranih miševa u odnosu na masu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 13). Masa tumora kod miševa u infekciji sa *Trichinella*-om je 25-og dana bila  $171,8 \pm 222,9$  mg. Masa tumora kod kontrolne grupe je 25-og dana bila  $3998 \pm 476,6$  mg.

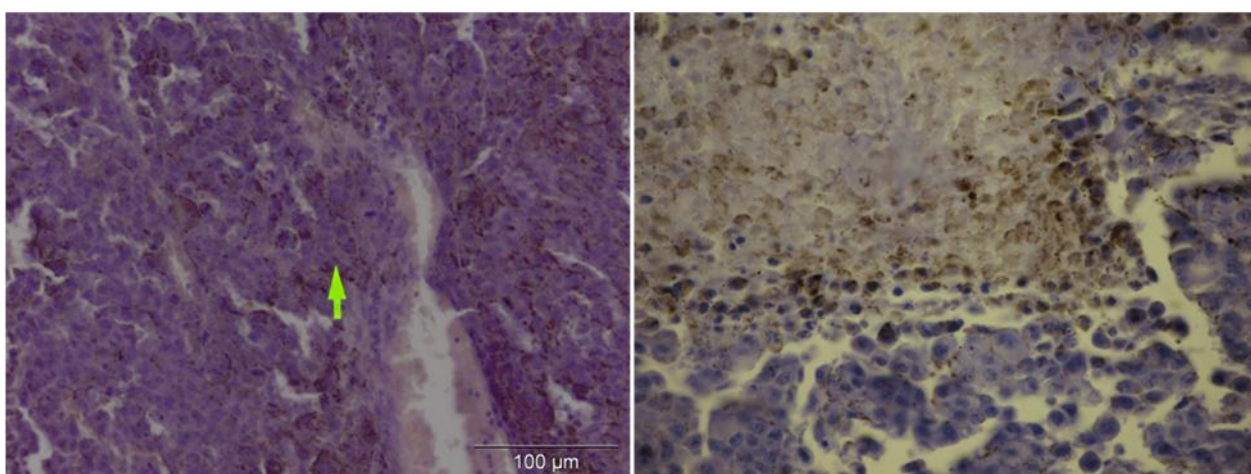
Radi kompletiranja parazitološkog nalaza uradili smo i digestiju mišićnog tkiva miševa u infekciji sa *Trichinella*-om. Našli smo  $18685 \pm 5850$  larvi/mišu (što je  $1773 \pm 546$  larvi po gramu - LPG).



**Grafikon 13. - Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na masu melanoma in vivo.** Miševi su peroralno inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*. Kada je infekcija ušla u hroničnu fazu, 40-og dana od infekcije, aplikovane su im B16 melanomske ćelije. Tumorske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu$ l PBS) su aplikovane subkutano u desni bok, kako inficiranim tako i zdravim miševima (po 10 u grupi). Nakon isteka 25 dana posmatranja i merenja tumora preko kože, miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i mereni (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

## Histopatološki nalaz

Histopatološka analiza uzoraka tumora inficiranih i kontrolnih životinja ukazala je na postojanje razlike u morfologiji tumora između miševa u infekciji i kontrolne grupe koja je dobila samo B16 melanomske ćelije (slika 8). Kod kontrolnih životinja melanomske ćelije su masivno proliferisale, a zapaža i dobra vaskularizacija tumora. Za razliku od kontrolnih, kod inficiranih miševa zapaža se puno apoptotičnih i nekrotičnih tumorskih ćelija kao i prisustvo infiltrirajućih mononuklearnih ćelija.



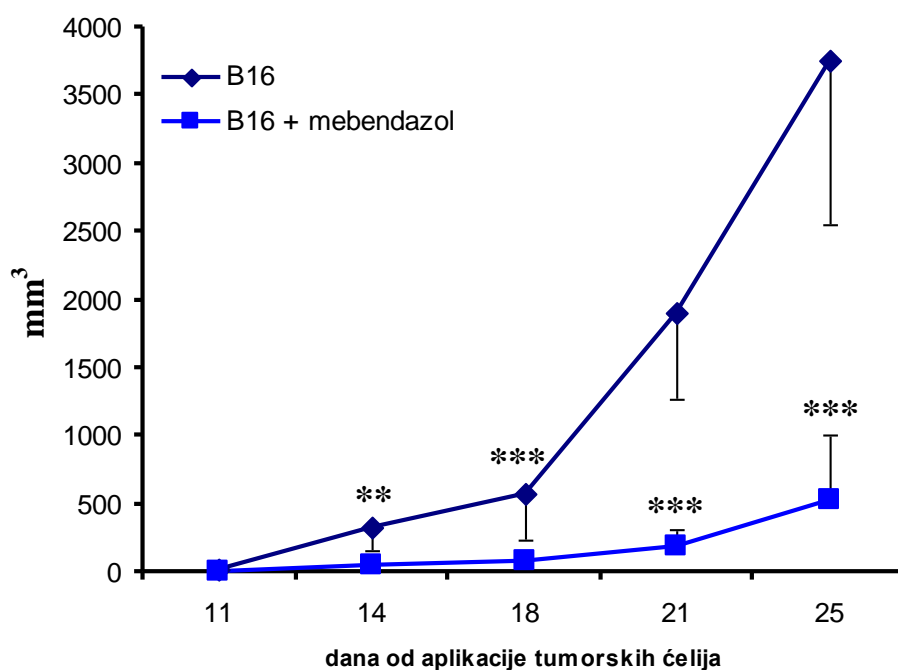
Kontrola

Hronična infekcija sa *T. spiralis*

**Slika 8. Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na morfologiju tumora melanoma indukovano kod C57Bl/6 miševa.** Miševi su peroralno inficirani sa po 200 L1 larvi *T. spiralis*. Kada je infekcija ušla u hroničnu fazu, 40-og dana od infekcije, aplikovane su im B16 melanomske ćelije. Tumorske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200 µl PBS) su aplikovane subkutano u desni bok, kako inficiranim tako i zdravim miševima (po 10 u grupi). 25 dana nakon aplikovanja melanomskih ćelija, miševi su žrtvovani, a histopatološka opservacija je vršena na parafinskim isjecima bojenim sa hematoxilin-eozinom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metod). Dobra vaskularizacija tumora i rast ćelija melanoma prisutni su kod kontrolnih životinja (levo), dok se kod inficiranih miševa zapaža puno apoptotičnih i nekrotičnih ćelija (desno).

### 5.2.1.3. Efekat mebendazola na zapreminu melanoma *in vivo*

Peroralno davanje mebendazola dovelo je do inhibicije rasta subkutano aplikovanih ćelija tumora melanoma. Tokom 25 dana praćenja rasta tumora njihova zapremina je bila statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod miševa tretiranih mebendazolom u odnosu na zapreminu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 14). Zapremina tumora kod miševa tretiranih mebendazolom je 11, 14, 18, 21, i 25 dana bila  $20 \pm 20$ ,  $80 \pm 35$ ,  $150 \pm 46$ ,  $250 \pm 60$ ,  $520 \pm 380$  mm<sup>3</sup>. Zapremina tumora kod kontrolne grupe je 11, 14, 18, 21, i 25 dana bila  $50 \pm 30$ ,  $400 \pm 80$ ,  $700 \pm 180$ ,  $2000 \pm 520$ ,  $3800 \pm 1200$  mm<sup>3</sup>.

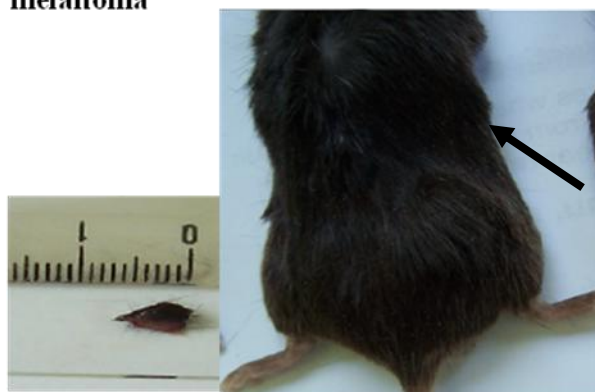


**Grafikon 14.** - Efekat tretmana mebendazolom na zapreminu melanoma *in vivo*. Miševima podeljenim u dve grupe su subkutano u desni bok aplikovane B16 melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu$ l PBS). Grupe su se sastojale od po 10 životinja. Životinje su svakodnevno posmatrane i kod pojave prvih tumora započeta je terapija jedne grupe mebendazolom (50 mg/kg p.o., tokom 5 dana uzastopno). Tumori su mereni preko kože mikrometrom 11, 14, 18, 21 i 25-og dana od aplikovanja B16 ćelija. Zapremina tumora je izračunata korišćenjem formule  $0,52 \times a \times b^2$  (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost zapremine tumora  $\pm$  standardna devijacija, u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.



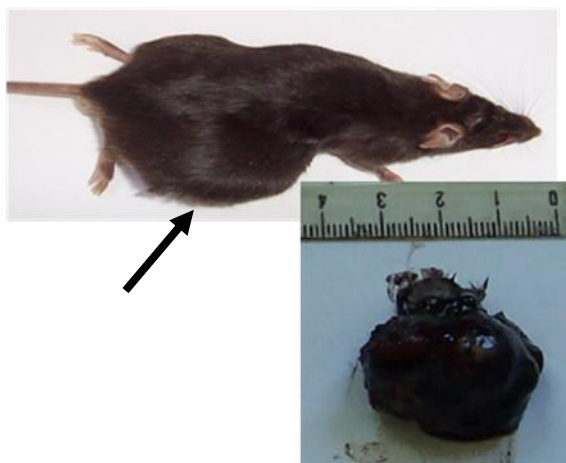
Inhibitorni efekat mebendazola na rast tumora melanoma potvrđen je direktnim merenjem izolovanog tumorskog tkiva. Dvadesetpetog dana nakon aplikacije tumorskih ćelija tumorska masa (dimenzije, zapremina, težina) kod žrtvovanih životinja je bila uočljivo višestruko manja (4 puta, 6 puta, odnosno više od 15 puta) kod tretiranih miševa (slika 9) u odnosu na kontrolne životinje (primili samo ćelije melanoma).

**A) Uticaj tretmana mebendazolom na razvoj melanoma**



0.6 x 0.3 cm

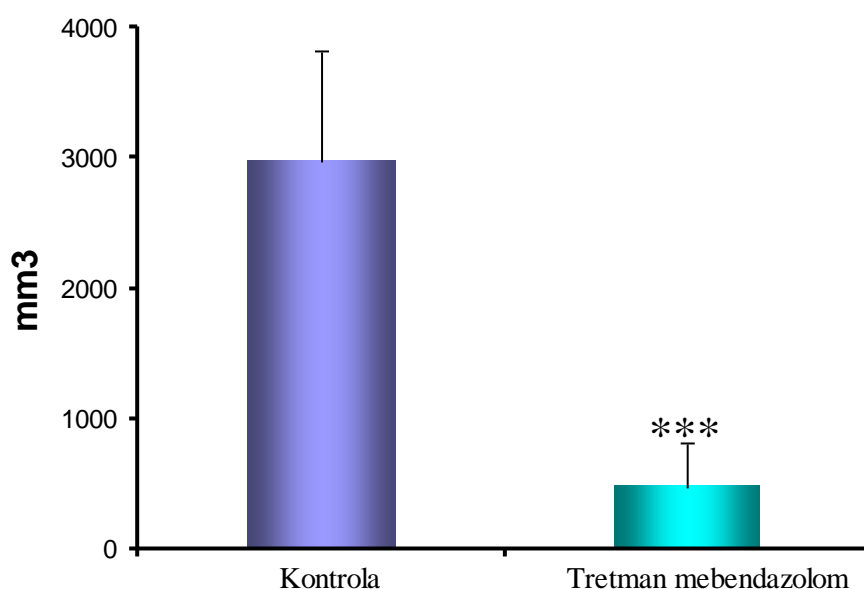
**B) Kontrola, melanom raste**



3.8 x 3.5 cm

*Slika 9. - Efekat tretmana mebendazolom na masu melanoma in vivo. Miševima podeljenim u dve grupe (po 10 u grupi) su subkutano u desni bok aplikovane B16 melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$  u  $200 \mu\text{l}$  PBS. Životinje su svakodnevno posmatrane i kod pojave prvih tumora započeta je u jednoj grupi terapija mebendazolom ( $50 \text{ mg/kg p.o.}$ , tokom 5 dana uzastopno). Nakon isteka 25 dana posmatranja miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i izmerene dimenzije i masa (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Na slici se uočava razlika u veličini tumora između miševa tretiranih mebendazolom i kontrolne grupe.*

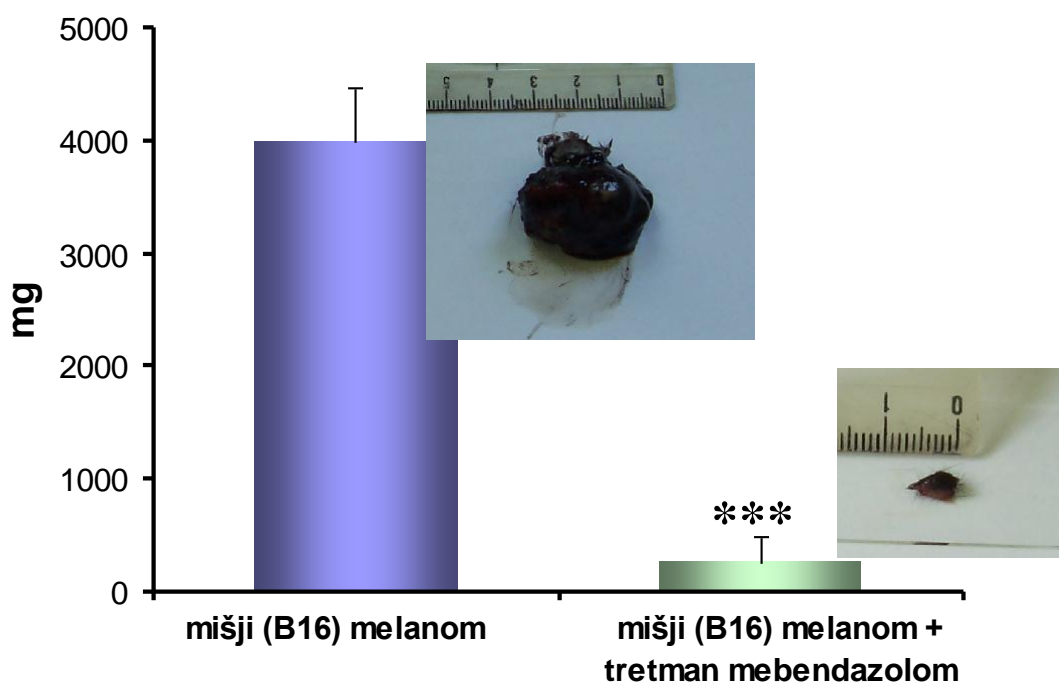
Peroralno davanje mebendazola dovelo je do inhibicije rasta subkutano aplikovanih ćelija tumora melanoma. Nakon 25 dana praćenja rasta tumora miševi su žrtvovani i tumori izvađeni. Utvrdili smo da je zapremina tumora statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod miševa kojima je dat mebendazol u odnosu na zapreminu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 15). Zapremina tumora kod miševa tretiranih mebendazolom je 25-og dana bila  $477,5 \pm 329,8 \text{ mm}^3$ , dok je kod kontrolne grupe 25-og dana bila  $2969 \pm 851,2 \text{ mm}^3$ .



**Grafikon 15. - Efekat tretmana mebendazolom na zapreminu izvađenog melanoma.** Miševima podeljenim u dve grupe (po 10 u grupi) su subkutano u desni bok aplikovane B16 melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu\text{l}$  PBS. Životinje su svakodnevno posmatrane i kod pojave prvih tumora započeta je u jednoj grupi terapija mebendazolom (50 mg/kg p.o., tokom 5 dana uzastopno). Nakon isteka 25 dana posmatranja i merenja tumora preko kože, miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i izmerene dimenzije. Zapremina tumora je izračunata korišćenjem formule  $0,52 \times a \times b^2$  (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost zapremine tumora  $\pm$  standardna devijacija, u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

#### 5.2.1.4. Efekat mebendazola na masu melanoma

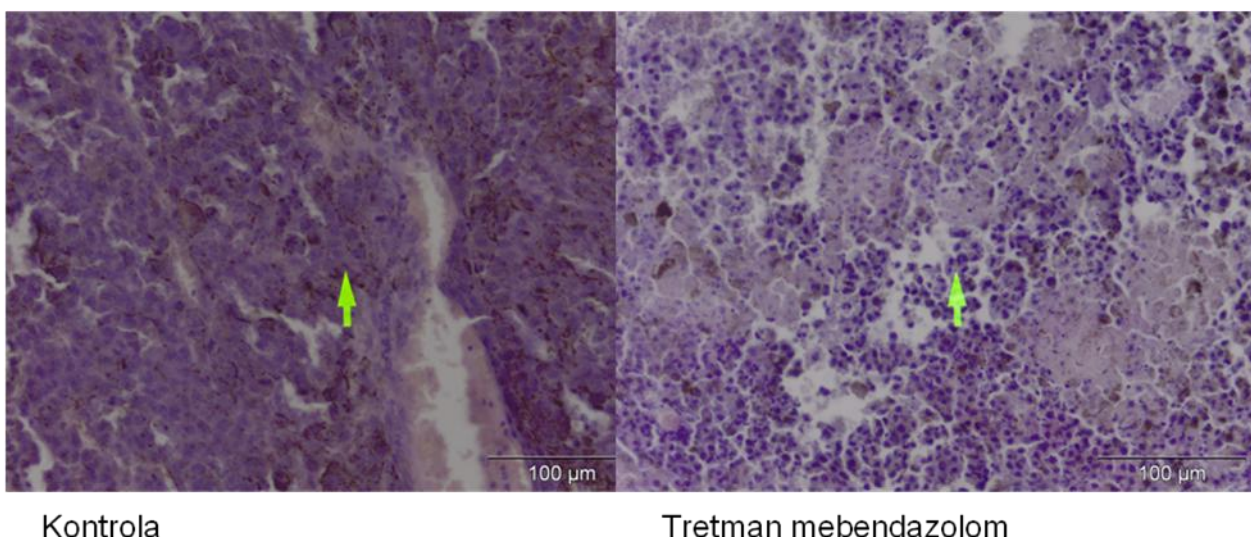
Merenje mase izolovanog tumorskog tkiva je slično merenju zapremine ukazalo da peroralno davanje mebendazola dovodi do inhibicije rasta subkutano aplikovanih ćelija tumora melanoma. Nakon 25 dana praćenja rasta tumora miševi su žrtvovani i tumori izvađeni. Utvrdili smo da je masa tumora statistički značajno manja ( $p < 0,001$ ) kod miševa kojima je dat mebendazol u odnosu na masu tumora kod kontrolnih životinja (grafikon 16). Masa tumora kod miševa tretiranih mebendazolom je 25-og dana bila  $260,5 \pm 226$  mg, dok je masa tumora kod kontrolne grupe 25-og dana bila  $3998 \pm 476,6$  mg.



**Grafikon 16. - Efekat tretmana mebendazolom na masu melanoma.** Miševima podeljenim u dve grupe (po 10 u grupi) su subkutano u desni bok aplikovane B16 melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$  u  $200 \mu\text{l}$  PBS). Životinje su svakodnevno posmatrane i kod pojave prvih tumora započeta je u jednoj grupi terapija mebendazolom ( $50 \text{ mg/kg p.o.}$ , tokom 5 dana uzastopno) korišćenjem želudačne sonde. Nakon isteka 25 dana posmatranja miševi su žrtvovani. Tumori su izvađeni i izmerene dimenzije i težina (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, u odnosu na kontrolu. Prikazani rezultati su iz jednog eksperimenta od dva različita sa sličnim rezultatima. \*\*\*  $p < 0,001$  u odnosu na kontrolu.

### Histopatološki nalaz

Histopatološka analiza uzoraka tumora tretiranih i kontrolnih životinja ukazala je na postojanje razlike u morfologiji tumora između miševa tretiranih mebendazolom i kontrolne grupe koja je dobila samo B16 melanomske ćelije (slika 10). Kod kontrolnih životinja melanomske ćelije su masivno proliferisale, a zapaža se i dobra vaskularizacija tumora. Za razliku od kontrolnih, kod tretiranih miševa zapaža se puno apoptotičnih i nekrotičnih tumorskih ćelija kao i prisustvo masivne infiltracije sa mononuklearnim ćelijama.



*Slika 10. Efekat tretmana mebendazolom na morfologiju tumora melanoma. Miševima podjeljenim u dve grupe (po 10 u grupi) su subkutano u desni bok aplikovane B16 melanomske ćelije ( $5 \times 10^5$  u 200  $\mu$ l PBS). Životinje su svakodnevno posmatrane i kod pojave prvih tumora započeta je u jednoj grupi terapija mebendazolom (50 mg/kg p.o., tokom 5 dana uzastopno). 25 dana nakon aplikovanja melanomskih ćelija, miševi su žrtvovani, a histopatološka opservacija je vršena na parafinskim isjecima bojenim sa hematoksilin-eozinom (kao što je objašnjeno u poglavlju Materijal i metode). Dobra vaskularizacija tumora i rast ćelija melanoma prisutni su kod kontrolnih životinja (levo), dok se kod miševa tretiranih mebendazolom zapažaju plaže tumorskog tkiva sa puno apoptotičnih i nekrotičnih ćelija (desno) između kojih se vidi bogat limfocitni infiltrat.*

## **6. DISKUSIJA**

Istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom su se odnosila na ispitivanje efekta ES L1 antigena parazitske nematode *T. spiralis* i antihelminatika mebendazola na preživljavanje Fem-X i B16 melanomskih ćelija, kao i na apoptozu B16 ćelija u *in vitro* uslovima. U *in vivo* uslovima ispitivali smo efekat hronične infekcije nematodom *T. spiralis*, odnosno tretmana mebendazolom na rast B16 melanomskih ćelija u mišjem modelu rasta ovih tumora.

Osim lekova koje nudi moderna (zapadna) medicina, koja se oslanja i na uzore iz prirode za dobijanje i sintetisanje različitih lekova, u tradicionalnoj medicini koriste mnogo toga što se u prirodi moglo naći stotinama i hiljadama godina. Tako na primer neki živi organizmi kao što su pijavice i helminti pokazuju značajnu sposobnost da uspešno tretiraju hirurške infekcije, inflamatorne bolesti creva i alergije. Helminti su takođe značajan izvor medicinski korisnih proizvoda, tako da neki imaju substance sa antimikrobnim i antineoplastičnim delovanjem. Danas se predlažu i nove indikacije za ove organizme i/ili njihove produkte (ekstrakte i antigene). Trenutno se čine napori da se izoluju molekuli iz ovih organizama ili da se sintetišu njihove kopije koje bi imale iste ili bolje farmakološke efekte (Cooper i Weng, 2004; Cherniack, 2011).

## **6.1. ISPITIVANJA U USLOVIMA IN VITRO**

Jedan od ciljeva izučavanja melanoma je popravljavanje terapijskog efekta kod obolelih od ove bolesti (Dutton-Regester i Hayward, 2012). Uprkos novim pristupima i novim lekovima za mnoge pacijente terapijske opcije su limitirane a proces uvođenja novih lekova u kliničku praksu je vrlo spor. Pored toga, malo testiranih lekova uđe u kliničku primenu jer od momenta bazičnih istraživanja do uvođenja u kliničku praksu mnogo supstanci biva eliminisano (Hoelder i sar., 2012). Jedan od prvih koraka u ispitivanju antitumorske aktivnosti neke supstance je ispitivanje uticaja na preživljavanje i apoptozu tumora

### **6.1.1. Uticaj na preživljavanje ćelija melanoma**

**6.1.1.1. Efekat ES L1 antigena *T. spiralis* na preživljavanje ćelija melanoma.** – Ispitivanje uticaja ES L1 antigena *Trichinella spiralis* na preživljavanje melanomskih ćelija pokazalo je da ovaj antigen dovodi do statistički značajnog smanjenja preživljavanja humanih (Fem-X) i mišjih (B16) melanomskih ćelija. Nešto je jači efekat postignut na

humani melanom nego na mišji, ali ova razlika nije statistički značajna. Analiziranjem dobijenih podataka nismo mogli da izračunamo IC<sub>50</sub> (polu maksimalne inhibitorne koncentracije). Možda bi se primenom većih koncentracija mogao ustanoviti IC<sub>50</sub>, ali mi ih nismo testirali jer se radi o visokim koncentracijama, značajno višim od onih koje se postižu tokom infekcije parazitom. Limit testova koji mere ES antigen u cirkulaciji je do 8 µg/ml, pri čemu nalaz antigena zavisi od doze infekcije i model sistema, dok je opisani pik koncentracije bio oko 0,4 µg/ml (Ivanoska i sar., 1989; Li i Ko, 2001). Ispitivanje uticaja ES L1 antigena na preživljavanje nezavisne ćelijske linije – fibroblasta pokazalo je da ovakav efekat izostaje tj da ES L1 antigen ne utiče na preživljavanje kontrolnih, zdravih ćelija. Inhibicija preživljavanja može da ukaže na delovanje ES L1 antigena na ćelijski ciklus ili pak na indukciju ćelijske smrti.

Wang i saradnici (2009) su ustanovili da sirovi („crude“) antigen *T. spiralis* ima dozno zavisni antiproliferativni efekat na ćelijsku liniju hronične humane mijeloidne leukemije (K562), mišji karcinom želuca (MFC), hepatom (H22) i sarkom (S180) u koncentracijama od 0,035 – 0,07 – 0,14 mg/ml. Naša ispitivanja korišćenjem ES L1 antigena su inicirana time što se on kontinuirano produkuje i nalazi u kontaktu sa organizmom domaćina onoliko dugo koliko traje i život mišićnih larvi. Pored toga sastav ES L1 antigena je manje složen u odnosu na „crude“ antigen koji je sastavljen od mnoštva molekula somatskih antigena parazita od kojih mnogi mogu biti dostupni organizmu domaćina samo tokom destrukcije larvi. Naravno da je korišćenje „crude“ antigena u ispitivanjima pogodnije sa stanovišta lakoće izdvajanja i dobijene količine antigena. Dobijanje ES L1 antigena u količinama potrebnim za ispitivanja je kompleksnije i vremenski dugotrajnije, ali je najveća prednost u tome što se molekulima iz njegovog sastava mogu pripisati glavne biloške aktivnosti i dejstva na organizam domaćina.

Po našim saznanjima u literaturi nema podataka o delovanju ES L1 antigena *T. spiralis* na Fem-X i B16 melanomske ćelije *in vitro*, tako da su ovo prva istraživanja u kojima se ispituje uloga ES L1 antigena *T. spiralis* na preživljavanje i rast melanomskih ćelija.

**6.1.1.2. Efekat mebendazola na preživljavanje ćelija melanoma.** - Ispitivanje uticaja mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija pokazalo je da ovaj lek dovodi do statistički značajne inhibicije preživljavanja humanih (Fem-X) i mišjih (B16) melanomskih ćelija. Nešto je jači efekat postignut na humani melanom nego na mišji, ali

ova razlika nije statistički značajna. Analiziranjem ovih podataka utvrđena je  $IC_{50}$  vrednost (pola maksimalne inhibitorne koncentracije) mebendazola, i ona iznosi  $0.31 \mu M$  za Fem-X i  $0.33 \mu M$  za B16 ćelije melanoma.

Ovaj naš nalaz je u skladu sa nalazom Doudican i saradnika (2008) koji su na M-14 i SK-Mel-19 ćelijskoj liniji melanoma pokazali da mebendazol utiče inhibitorno na preživljavanje, pri čemu je  $IC_{50}$  bio  $0,30 \mu M$ , odnosno  $0,32 \mu M$ . Naš rezultat, kao i rezultat Doudican i saradnika pokazuje da mebendazol ima antiproliferativni efekat već u koncentracijama koje se klinički postižu pri njegovoj upotrebi kao antiparazitika. Tada se u plazmi vrlo lako postižu koncentracije od  $1,5$  i  $1,67 \mu M$  (Doudican i sar., 2008; Bai i sar., 2011). Pri tome naš nalaz odgovara nalazu Doudican i saradnika (2008) da mebendazol ne utiče na preživljavanje normalnih ćelija.

Takođe, mebendazol je pokazao u predkliničkim ispitivanjima antiproliferativnu aktivnost kod adrenokortikalnog karcinoma, kancera pluća i jajnika (Sasaki i sar., 2002; Mukhopadhy i sar., 2002), zatim kod leukemije, kolorektalnih kancera, kao i glioblastoma (Bai i sar., 2011).

U literaturi se navodi da i drugi antiinfektivni lekovi imaju efekat na tumorske ćelije. Tako na primer: tiazolidi (koji deluju protiv parazitskih helminata, protozoa, anaerobnih bakterija i gljivica) značajno *in vitro* inhibiraju proliferaciju ćelija tumora kolona (Caco 2) (Muller i sar., 2008). Isto tako i makrolidni antibiotik ivermektin, koji se koristi kao antiparazitik, inhibira proliferaciju nekoliko ćelijskih linija ovarijalnog kancera kada se primeni *in vitro*, a  $IC_{50}$  je bio  $5-20 \mu M$  (Hashimoto i sar., 2009).

Po našim saznanjima u literaturi nema podataka o delovanju mebendazola na Fem-X i B16 melanomske ćelije, tako da su ovo prva istraživanja u kojima se ispituje njegova uloga na preživljavanje i rast ovih ćelija.

### **6.1.2. Uticaj na apoptozu ćelija melanoma**

Apoptoza je visoko organizovan proces programirane ćelijske smrti za uklanjanje neželjenih ćelija iz organizma tokom razvića, remodelovanja tkiva i imunskog odgovora. Defekt u apoptotskom putu vodi do razvoja kancera i njegove rezistencije na hemioterapiju (Brunelle i Zhang, 2010). Većina lekova koji se koriste u terapiji tumora inhibira njihovu proliferaciju i/ili indukuje apoptozu, i takve apoptotične ćelije zatim uklanjaju fagociti (Sredni, 2012).



Apoptozu smo određivali korišćenjem tri metode: 1) analiza na citofluorimetru posle bojenja: a) propidijum jodidom, b) posle bojenja aneksin V-FITC / PI, kao i 2) morfološki (posle bojenja tirkovim rastvorom i analizom na svetlosnom mikroskopu). Analiza na citofluorimetru je savremena metoda, zahteva korišćenje skupe opreme (EPICS) i reagenasa. Morfološka analiza je tzv. zlatni standard u određivanju apoptoze, metoda koja je vremenski zahtevna i potrebno je iskustvo. Dobijeni rezultati primenom sve tri metode su imali isti trend. Dobijene vrednosti su se donekle razlikovale (morfološkom analizom su dobijene manje vrednosti) što je i očekivano s obzirom na prirodu i preciznost samih metoda.

**6.1.2.2. Efekat ES L1 antigena *T. spiralis* na apoptozu.** – Ispitivanje uticaja ES L1 antigena *Trichinella spiralis* na apoptozu melanomskih ćelija pokazalo je da ovaj antigen dovodi do statistički značajne indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija. Ovaj efekat je vremenski zavisian.

Na osnovu pregleda nama dostupne literature, ustanovili smo da do sada nije bilo ispitivanja uticaja ES L1 antigena ovog parazita na tumorske ćelije *in vitro*. Kao što smo više puta ranije istakli, samo ovaj produkt *Trichinella* je u kontaktu sa domaćinom u dužem vremenskom periodu. Naime iako ovaj parazit ima razvojni ciklus samo u jednom domaćinu antigeni drugih stadijuma (adulta i novorođene larve) su u kratkotrajnom kontaktu sa domaćinom dok antigeni mišićne larve to čine tokom celog trajanja života kod kratko živećih vrsta domaćina (Gruden-Movsesijan i sar., 2011), dok kod dugo živećih vrsta domaćina parazit ugine ranije od domaćina (Čuperlović i Đorđević, 2003).

U literaturi se nalaze podaci o delovanju ES L1 antigena na apoptozu mišićnih ćelija tokom stvaranja „ćelije negovateljice“ (Boonmars i sar., 2004). Poznato je da posle ulaska novorođene larve u ćelije poprečno-prugaste muskulature pod dejstvom vrlo složenih instrukcija od strane produkata parazita dolazi do preusmeravanje genske ekspresije domaćina, zbog čega nastaje tzv. „miss-diferencijacija“ mišićne ćelije. U roku od 15-20 dana nastaje ćelija negovateljica, za organizam potpuno nepoznata vrsta ćelije, čija je jedina svrha da služi potrebama parazita (Despommier, 1998). Proces stvaranja ćelije negovateljice bi se mogao podeliti u više faza.

1) parazit prvo daje instrukcije za programiranu ćelijsku smrt preko oba puta apoptoze (u toku sazrevanja novorođene u mišićnu larvu, pre formiranja ciste). Indukuje autokrinu sekreciju TNF $\alpha$  koji preko TNFR i TRADD aktivira kaspaze -8 (spoljašnji put) i

efektorsku kaspazu -3. Osim spoljašnjeg puta, *Trichinella* dovodi i do aktivacije unutrašnjeg puta apoptoze preko pro-apoptotskih faktora: BAX (*Bcl-2 associated protein X*), Apaf-1 (*apoptotic protease activatig factor 1*) i kaspaze 9. Domaćin reaguje na ove “signale ćelijske smrti” i pokušava da “popravi oštećenje” slično kao kod traume. Satelitske ćelije prolaze kroz faze aktivacije, proliferacije i diferencijacije sve do G2/M faze. Parazit je medijator ne samo proapoptotskih već i antiapoptotskih procesa koje pokreće preko akt specifične serin/treonin protein kinaze ( poznate još i kao protein kinaza B – PKB). Ova kinaza ne samo da inhibira apoptozu već dovodi i do povećane sinteze proteina i hipertrofije mišićne ćelije u toku nastanka ćelije negovateljice.

2) U narednoj fazi, u periodu zrele mišićne larve od 7-mog dana posle invazije i dalje, parazit preuzima kontrolu, zaustavlja diferencijaciju satelitskih ćelija u nove mišićne ćelije i indukuje fuziju sa izmenjenom mišićnom ćelijom (Boonmars i sar, 2004; Wu i sar., 2005a). Wu i saradnici (2005b) su pokazali da se u skeletnim mišićima posle infekcije *Trichinella*-om mobilise čitav spektar gena, tako da 184 gena (uključujući gene odgovorne za ćelijsku diferencijaciju; proliferaciju; ćelijski ciklus; apoptozu) povećavaju ekspresiju više od 3 puta.

Wang i saradnicu (2009) su pokazali da sirovi („crude“) anatičen *T. Spiralis* značajno indukuje apoptozu dve ćelijske linije kancera ljudi (mieloidne leukemije - K562 i hepatoma - H7402).

Podatak da ES L1 antigen, u koncentracijama koje se mogu naći u krvi kod jakih infekcija *Trichinella*-om, dovodi do indukcije apoptoze ćelija melanoma je vrlo značajan nalaz kojim se proširuje znanje o njegovim delovanjima. Takođe, ovim nalazom se delom može objasniti inhibitorni efekat infekcije ovim parazitom na rast kancerskih ćelija.

**6.1.2.1. Efekat mebendazola na apoptozu.** – Ispitivanje uticaja mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija pokazalo je da ova supstanca dovodi do statistički značajne indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija. Ovaj efekat je vremenski zavisna.

Postoji malo publikacija o delovanju mebendazola na različite tipove kancerskih ćelija. Doudican i saradnici (2008) su ustanovili da, posle inkubacije od 24h, mebendazol u koncentraciji od 1 $\mu$ M indukuje apoptozu M14 i SK Mel-19 kancerskih ćelija. Mukhopadhyay i saradnici (2002) su ustanovili da mebendazol indukuje, dozno i vremenski zavisnu, apoptozu kod nekoliko linija humanih kancera pluća. Slične nalaze su objavili

Sasaki i saradnici krajem iste godine. Obe grupe su pokazale da mebendazol ne utiče na normalne ćelije (W138, ćelije endotela humane umbilikalne vene, odnosno normalne fibroblaste) *in vitro*.

U literaturi se navodi da i drugi antiinfektivni lekovi mogu da dovedu do apoptoze tumorskih ćelija. Na primer, Muller i saradnici (2008) navode da *in vitro* kultivacija ćelija kancera kolona (Caco2) sa RM4829 (pripadnikom grupe tiazolida) indukuje apoptozu ovih ćelija. Drugi antiinfektivni lek, salinomycin (antibiotik koji se koristi u prevenciji kokcidioze pilića) indukuje apoptozu ćelija hronične limfocitne leukemije *in vitro* (Desheng i sar., 2011).

Postoje podaci da i neke druge grupe lekova, kao na primer fenotiazini (antipsihotici) imaju sposobnost da indukuju apoptozu više različitih ćelijskih linija tumora, među njima i melanoma (Gil-ad i sar., 2006)

Naši rezultati se slažu sa nalazima drugih autora koji su ispitivali efekat mebendazola na različite kancerske ćelije. Na osnovu rezultata ispitivanja može se zaključiti da mebendazol ima inhibitorski uticaj na preživljavanje i indukuje apoptozu melanomskih ćelija. Podatak da mebendazol u koncentracijama koje se postižu u krvi prilikom njegove terapijske primene, u *in vitro* uslovima dovodi do smanjenog preživljavanja i indukcije apoptoze melanoma i drugih tumora je vrlo značajan nalaz. Ovim podacima se može dopuniti znanje o njegovom delovanju, a delom i o mehanizmu kojim on utiče na kancerske ćelije.

### **6.1.3. Uticaj inhibitora kaspaza -3, -8, i -9 na indukovanu apoptozu**

Dobro su poznata dva puta apoptoze: preko receptora smrti (spoljašnji) i mitohondrijski (unutrašnji put). Kada se aktivira spoljašnji put proteolitički se aktivira kaspaza -8 a zatim efektorska kaspaza -3. U unutrašnjem putu, signal smrti dovodi do promena permeabiliteta spoljne membrane mitohondrija, oslobađanja citohroma c, koji formira apoptozom sa Apaf-1 i kaspazom -9, što posledično dovodi do aktiviranja efektorske kaspaze -3 (Ishibashi i Ohtsuki, 2008). Kaspaze se mogu inhibirati primenom inhibitora kaspaza kao što su pan kaspaza inhibitor, ili inhibitori pojedinačnih kaspaza. Dodavanje ovih inhibitora u kulturu ćelija sasara je jednostavan i moćan metod za inhibiranje kaspaza u cilju sprečavanja progresije apoptotskog puta (Sauerwald, 2003).

**6.1.3.1. Efekat inhibitora kaspaza -3, -8, i -9 na apoptozu indukovanu ES L1 antigenom *T. spiralis* kod B16 melanomskih ćelija.** – Ispitivanje uticaja inhibicije kaspaza -3, -8, -9 na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu ES L1 antigenom pokazalo je da inhibicija kaspaza -3 i -8 dovodi do statistički značajne inhibicije indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija ovim antigenom. Pretretman inhibitorom kaspaze -9 je pokazao slabu, statistički ne značajnu inhibiciju indukovane apoptoze.

Ovo ukazuje da u našim uslovima ES L1 antigen indukuje apoptozu ovih ćelija preko spoljašnjeg puta (receptora smrti) i efektorske kaspaze -3. Ovo je u saglasnosti sa literaturnim navodima da *T. spiralis* tokom formiranja „ćelije negovateljice“ moduliše apoptotske puteve i da može da indukuje apoptozu i preko spoljašnjeg i unutrašnjeg puta (Boonmars i sar, 2004; Wu i sar., 2005a).

**6.1.3.2. Efekat inhibitora kaspaza -3, -8, i -9 na apoptozu indukovanu mebendazolom kod B16 melanomskih ćelija.** – Ispitivanje uticaja inhibicije kaspaza -3, -8, -9 na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu mebendazolom pokazalo je da inhibicija kaspaza -3 i -8 dovodi do statistički značajne inhibicije indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija ovom supstancom posle 24h inkubacije. Pretretman inhibitorom kaspaze -9 je pokazao slabu, statistički ne značajnu, inhibiciju indukovane apoptoze

U našim uslovima mebendazol posle inkubacije od 24 sata indukuje apoptozu ovih ćelija preko spoljašnjeg puta (receptora smrti) i efektorske kaspaze -3. Ovakav put apoptoze su pokazali posle istog trajanja inkubacije mebendazola sa tumorskim ćelijama i Doudican i saradnici (2008), mada oni navode i da se prvo uključuje unutrašnji put a tek posle 18 sati inkubacije i spoljašnji. Naš nalaz da mebendazol posle inkubacije od 24 sata indukuje apoptozu ovih ćelija preko spoljašnjeg puta je u saglasnosti sa njihovim nalazima

Poznato je da se kod smrti ćelija tumora apoptozom povećava količina tumorskih antigena koja se oslobađa i koje prezentuju zrele dendritične ćelije (DC) što dovodi do boljeg imunskog odgovora T limfocita (Steer i sar., 2010). Ovom procesu doprinosi i kalretikulin, molekul koji se izlaže na membrani ćelija tumora koje umiru apoptozom pa takve ćelije bivaju uspešnije prepoznate i fagocitovane (Michalak i sar., 2009; Steer i sar., 2010). Kalretikulini (CRT) kičmenjaka su multifunkcionalni intra- i ekstracelularni proteini. U endoplazmatskom retikulumu vežu kalcijum i deluju kao šaperoni. Kalretikulin ljudi je antiangiogen i suprimira rast tumora, a kako je potvrđeno prisustvo ovih molekula i kod parazita to može da ima posledice na interakcije parazit/domaćin. Jedan od parazita

koji poseduju kalretikulin je *Trypanosoma cruzi*. Ovaj molekul ispoljava antiangiogeni efekat koji doprinosi inflamatornom i antineoplastičnom efektu, sa velikom koristi za parazita i njegovog domaćina kičmenjaka. Ovi nalazi otvaraju interesantne mogućnosti za razvoj novih pristupa terapije tumora, posebno kada se ima u vidu da molekuli poreklom iz parazita ispoljavaju jače antiangiogeno i antitumorsko delovanje nego isti molekuli poreklom iz ljudi (Lopez i sar., 2010). Kalretikulin poseduju i helminti (na primer: *Taenia solium*, *Heligmosomoides polygyrus* *Nippostrongylus brasiliensis*) a ima ulogu u imunomodulaciji (Hewitson i sar., 2009; Nava-Castro i sar., 2012).

## 6.2. ISPITIVANJA U USLOVIMA *IN VIVO*

### 6.2.1. Efekat hronične infekcije sa *T. spiralis* na rast tumora *in vivo*

Ispitivanje uticaja hronične infekcije sa *Trichinella spiralis*, pokazalo je da infekcija ovim parazitom dovodi do statistički značajne supresije rasta melanoma, kada se B16 ćelije aplikuju 40-og dana od infekcije ovom nematodom. Rast melanoma je sporiji u odnosu na kontrolne životinje koje su dobile samo melanom, tako da je kod inficiranih životinja zapremina i težina tumora statistički značajno manja nego kod kontrolnih. Time smo potvrdili da je uočeni efekat na rast melanoma zapravo efekat larvi *T. spiralis*.

U svetu su malobrojna istraživanja ovog tipa. Pre više decenija Molinari i Ebersole (1977) su pokazali da infekcija sa *T. spiralis* može da zaštiti od razvoja tumora. Oni su miševima koji su imali hroničnu infekciju (176 dana) sa *T. spiralis* aplikovali B16 melanomske ćelije. Na osnovu praćenja razvoja tumora zaključili su da životinje inficirane sa *T. spiralis* duže preživljavaju (više meseci) i da je tumorsko tkivo koje se u njihovom organizmu razvija statistički značajno manje u odnosu na kontrolne životinje. Novija istraživanja Wang-a i saradnika (2009), pokazala su da akutna infekcija miševa sa *T. spiralis*, kao i intravenozna aplikacija sirovog ekstrakta odraslih parazita, odnosno novorođenih larvi može da uspori ili inhibira razvoj tumora izazvanih različitim tumorskim ćelijskim linijama (tumor želuca - MFC, hepatom – H22, sarkom – S180). Na osnovu dobijenih rezultata ova grupa autora je zaključila da *T. spiralis* sadrži aktivnu supstancu sa antitumorskim delovanjem. Gong i saradnici su 2011 godine pokazali da imunizacija sirovim antigenom (80µg), ES antigenom (80µg) i istom količinom mijeloma udruženog antigena (tropomiozina) *T. spiralis*, kao i infekcija sa 400 larvi ovog parazita, kod Balb/C

miševa koji su zatim tri dana kasnije dobili mijelomske ćelije (SP2/0) dovodi do inhibicije rasta ovog tumora.

Naši rezultati su u saglasnosti sa nalazom navedenih autora (Molinari i Ebersole, 1977; Wang i sar., 2009; Gong i sar., 2011) da infekcija sa *T. spiralis* dovodi do smanjenog rasta tumora.

Pored toga što ovaj parazit moduliše imunski odgovor domaćina, moguće je i nespecifično delovanje na povećanje otpornosti organizma domaćina prema drugim antigenima i uzročnicima. Ovakvo povećanje otpornosti se delom postiže i preko aktivacije makrofaga i lučenja tumor nekrotizujućeg faktora alfa (TNF $\alpha$ ). Mi smo ustanovili da u *in vitro* eksperimentima ES L1 antigen *T. spiralis* ima blag, ali statistički značajan inhibitorni efekat na preživljavanje kao i proapoptotski efekat na mišje (B16) melanomske ćelije. Ovime bi mogao da se delom objasni naš nalaz, ali i nalaz Ebersola i saradnika da kod miševa u hroničnoj infekciji sa *Trichinella spiralis* dolazi do usporenja rasta tumora i dužeg preživljavanja životinja. Međutim, *in vitro* efekat na tumorske ćelije je blag, dok je *in vivo* antitumorski efekat ES L1 antigena znatno snažnije izražen. Moguća prisutna aktivacija efektorskih ćelija imunskog sistema posredstvom ES L1 antigena ostaje predmet budućih istraživanja.

Postoje podaci da i drugi paraziti mogu da utiču na rast tumorskih ćelija *in vivo*. Tako su na primer Chen i saradnici (2001) ustanovili da infekcija malarijom kod miševa, kod kojih je rast tumora izazvan eksperimentalno, suprimira proliferaciju (primenom markera proliferacije Ki-67), odnosno indukuje apoptozu (primenom TUNEL testa) ćelija mišjeg Lewis plućnog tumora.

Infekcija sa helmintima, ili sistemski tretman sa ekstraktima parazita, imaju protektivan efekat kod alergijskih bolesti (astma) ( Yazdanbakhsh i sar., 2002), autoimunskih bolesti (multipla skleroza, reumatoidni artritis, dijabetes tip I, inflamatorne bolesti creva) (Kuijick i van Die, 2010), ali i kod tumora (Wang i sar, 2009). Za infekciju sa *T. spiralis* je pokazano da može povećati otpornost domaćina na tumore, odnosno da ima antitumorsku aktivnost (Molinari i Ebersole, 1977; Wang i sar., 2009; naši rezultati). Međutim, peroralno davanje živih larvi *T. spiralis* predstavlja potencijalni rizik (Gong i sar., 2011). Kako istraživanja pokazuju ne samo infekcija, već i sirovi antigen (Wang i sar., 2009; Gong i sar., 2011), i ES L1 antigen (Gong i sar., 2011; naši rezultati) poreklom od ovog parazita poseduju antitumorsko (antiproliferativno) delovanje *in vivo*. Ovaj efekat

nastaje zbog toga što su tokom duge koevolucije parazitskih helminata sa domaćinima, crvi razvili mehanizme koji vode do tolerancije u domaćinu čime preveniraju oštećenje svog okruženja i time omogućće sebi preživljavanje. Ovo svojstvo parazita postalo je vrlo interesatno kao terapijski pristup. Identifikacija i karakterizacija imunomodulatornih komponenti helminata bi omogućila sintezu ovih molekula, ili sličnih, koji bi mogli da se iskoriste u terapiji nekoliko inflamatornih poremećaja. Tokom infekcije helmintima imunski sistem je suočen sa mnogo različitih molekula (proteina, lipida, glikoproteina) na površini parazita ili sekretovanih molekula (Kuijik i van Die, 2010).

Mnoge studije su pokazale da infekcija helmintima snižava rizik od autoimunosti i alergija. Helminti mogu da suprimiraju bolesti Th1, Th2 i Th17 tipa. (Osada i Kanazawa, 2012). Helminti često dovode do aktivacije T regulatornih ćelija, ali takođe i B ćelija koje su uključene u suprimiranje bolesti preko IL-10 (Osada i Kanazawa, 2012)

Substance koje se nalaze u telu helminta i/ili u ES produktima prepoznaju ćelije prirodnog imuniteta preko receptora molekulskih obrazaca patogena (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMP) kao što su receptori slični Toll-u (engl. *Toll-like receptors* - TLR). Promene koje se dešavaju u imunskim ćelijama obuhvataju manju ekspresiju IL12/23p40 u dendritskim ćelijama, alternativnu aktivaciju makrofaga, i produkciju IL-10 od strane T regulatornih i B ćelija, kao i produkciju IL-4 kod bazofila. Pored toga, zapaža se supresija drugih imunskih poremećaja preko inhibicije „patogenih“ subtipova pomoćničkih T limfocita (Th1 i Th 17 i alergijskog Th2) (Osada i Kanazawa, 2012).

Primena helminata u terapiji, čak i onih koji nisu infektivni za čoveka (*Trichuris suis* kod Kronove bolesti, *Necator americanus* kod astme i drugih alergijskih bolesti) nosi sa sobom ne zeljene komplikacije (Cherniack, 2011). Tretiranje pacijenata antihelminthicima kod zadesnih infekcija helmintima rezultiralo je pogoršanjem udružene bolesti alergijske ili autoimunske etiologije Međutim, iako je nedopustiva direktna upotreba visoko patogenih helminata u kliničkoj primeni, prečišćeni ili sintetski imunomodulatorni produkti iz takvih helminata se mogu razmatrati za kliničku primenu (Osada i Kanazawa, 2012)

U eksperimentalnim studijama na životinjama infekcija vijabilnim helmintima je superiornija od administracije antigena ili mrtvih helminata u terapijske svrhe. To je verovatno zato sto vijabilni helminti regulišu sekreciju imunomodulatornih molekula na najbolji način za njihovo preživljavanje. Optimalna atenuacija humanih parazita preko

genetske manipulacije mogla bi biti korisna u kliničkoj upotrebi helminata u budućnosti (Osada i Kanazawa, 2012)

U cilju potencijalne terapijske primene *T. spiralis* neophodna je izolacija aktivnih komponenti njenih antigena. Na osnovu rezultata naše studije, pretpostavljamo da bi to mogao biti upravo ES L1 antigen. Naši i rezultati nekih drugih autora se mogu objasniti jedino prisustvom ES antigena ovog parazita u cirkulaciji domaćina. Naime, u hroničnoj infekciji su već formirani kompleksi domaćin – parazit, oformljene su ćelije negovateljice i kao i kapsula koja omogućava prohodnost ES L1 antigena u pravcu domaćina. Takođe moguće je i da ovaj parazit utiče na imunski sistem. Poznato je da infekcije različitim bakterijama i parazitima mogu da nespecifično pojačaju imuni sistem i odbrambenu sposobnost domaćina i tako ga zaštite od različitih agenasa.

Dosadašnje malobrojne studije o antitumorskom mehanizmu *T. spiralis* uglavnom nisu bile fokusirane na efektorne mehanizme imunskog sistema, a sam antitumorski efekat se ispitivao u *in vivo* sistemu. Tako najnovija studija Gong i sar., 2011, ukazuje da infekcija sa *T. spiralis* aktivira imunološki kompetentne ćelije da produkuju citokine koji inhibiraju rast tumora, moguća je uloga c-Ski onkoproteina i TGF  $\beta$ .

Značaj koji bi mogli da imaju helminti u mogućoj terapiji tumora pokazuje i patent broj US 7,335,354 B2 od 26 februara 2008 pod naslovom „Metodi za redukciju malignih tumora pomoću terapije eozinofilima/helmintima“ Georga Frenoy-a. To je metod redukovanja veličine malignih tumora sisara korišćenjem ekskretornih i sekretornih antigena helminata, jaja helminata i ekstrakata helminata u cilju aktivacije eozinofila koji infiltriraju tumore i dovode do imunološkog odgovora (Frenoy, 2008).

Na osnovu trenutno raspoloživih saznanja bilo bi smelo špekulisati o mehanizmima delovanja *T. spiralis* na tumore. Međutim, nadamo se da će buduća ispitivanja uneti više svetla i u ovaj domen interakcije parazita i domaćina.

### **6.2.1. Efekat mebendazola na rast tumora *in vivo***

Ispitivanja uticaja peroralne aplikacije mebendazola, pokazala su da terapija ovim lekom dovodi do statistički značajne supresije rasta melanoma. Rast melanoma se usporava posle primene ovog leka u odnosu na kontrolne životinje, tako da je kod tretiranih životinja zapremina i težina tumora statistički značajno manja nego kod kontrolnih životinja.



Koncentracije koje smo primenili *in vitro* mogu se lako postići *in vivo* u cilju ostvarivanja inhibicije rasta tumora, što smo eksperimentalno i pokazali. Pored toga, važno je napomenuti da ove koncentracije ne dovode do pojave poznatih štetnih efekata.

Mukhopadhyay i saradnici (2002) su pokazali da mebendazol, aplikovan peroralno miševima, snažno inhibira rast presađenog humanog tumora, kao i broj i veličinu tumora u eksperimentalnom modelu plućnih metastaza. Slične nalaze su objavili Sasaki i saradnici krajem iste godine. Obe grupe su pokazale da mebendazol ne utiče na normalne ćelije *in vitro* poput W138 ćelija endotela humane umbilikalne vene, odnosno normalne fibroblaste. U literaturi se navodi da mebendazol antikancerski efekat ispoljava time što prevenira polimerizaciju tubulina (Sasaki i sar., 2002) ali i inhibicijom vaskularizacije tumora (Doudican 2008 Sasaki i sar., 2008). Ovaj lek takođe inaktivira Bcl-2 (Doudican i sar., 2008; Bai i sar., 2011), i ima sposobnost da indukuje spoljašnji put apoptoze i posledično efektorske kaspaze (Doudican i sar., 2008; naši podaci) i na taj način indukuje apoptozu.

Za terapiju kancera ispituju se mnogi lekovi koji deluju na tubulin. Međutim, mnogi pri tome ispoljavaju značajnu toksičnost, na primer kolhicin. Mebendazol i drugi benzimidazoli deluju na tubulin na sličnom mestu kao i kolhicin, ali na razlicitom mestu od vinka alkaloida (vinblastin, vinkristin) koji su odobreni za terapiju nekih tumora, ali imaju toksične efekte (supresija kostne srži i toksičnost na nervni sistem) (Bai i sar., 2011). Poznato je da benzimidazoli deluju u nižim koncentracijama na ćelije parazita nego na normalne ćelije organizma. Izgleda da ovi lekovi imaju sličan efekat i kad su kancerske ćelije u pitanju. Ovo ukazuje na povoljan terapijski indeks za *in vivo* primenu (Bai i sar., 2011).

Tumorske ćelije se smatraju antigenima ali ne i imunogenima bilo zbog prezentacije slabo prepoznatljivih antigena ili zbog nesposobnosti imunskog sistema da ih prepozna. (Ferrucci i sar., 2012). Za uspešno odbacivanje tumora delovanjem imunskog sistema potrebna je adekvatna aktivacija CD4+ i CD8+ T limfocita i NK ćelija i kostimulacija, odnosno prezentacija antigena preko antigen prezentujućih ćelija. Zatim se u efektorskoj fazi putem indukovanja apoptoze ćelija tumora, citolitičkog delovanja (perforin i granzim B), kao i delovanjem TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$  uništavaju ćelije tumora (Kline i sar., 2008; Pietra i sar., 2009). Najbolji efekat u uništavanju kancerskih ćelija imaju citotoksični T limfociti koji prepoznaju tumorske antigene na kancerskim ćelijama (Tanaka i sar., 2012).

Da bi se ovakav scenario i ostvario potrebno je ukloniti negativnu regulaciju antitumorskog imunskog odgovora. Kod pacijenata obolelih od tumora povećan je broj i aktivnost imunosupresorskih ćelija, uključujući regulatorne T ćelije i/ili supresorske ćelije mijeloidnog porekla (myeloid-derived suppressor cells - MDSCs) (Kline i sar., 2008; Tanaka i sar., 2012). Istraživanja Kline i saradnika (2008) su pokazala da deplecija T regulatornih ćelija dovodi do odbacivanja B16 tumora kod miševa. T regulatorne ćelije imaju važnu ulogu u održanju tolerancije na sopstvene antigen i homeostazu imunskog sistema tako što suprimiraju mnoge fiziološke i patološke imunske odgovore. Kod ljudi i glodara ove ćelije se infiltriraju u tumor i slabe antitumorski imunski odgovor. Akumulacija T regulatornih ćelija kod obolelih od melanoma je glavni uzrok izbegavanja imunskog odgovora od strane tumora. U mišjem modelu melanoma deplecija T reg indukuje antitumorski imunitet i poboljšava čišćenje tumora i preživljavanje obolelih životinja (Jacobs i sar., 2012). Da su sve ćelije imunskog sistema važne u odbrani od tumora pokazali su DiLillo i saradnici (2010) nalazom da deplecija B limfocita dovodi do pojačanog rasta eksperimentalno izazvanog melanoma kod miševa u poređenju sa kontrolom. Ovo nastaje zbog toga što su B limfociti potrebni za optimalnu aktivaciju T limfocita.

Efikasna terapija melanoma može se bazirati na imunoterapiji zajedno sa ciljanom terapijom da bi se stimulisala aktivnost efektorskih ćelija imunskog sistema i isključio supresorski efekat T regulatornih ćelija. Iz tog razloga korisne su sve strategije koje mogu da obezbede mehanizam kojim bi se antitumorski imuni odgovor ponovo uspostavio (Jacobs i sar., 2012).

Danas, moderna terapija tumora pa i melanoma, uključuje sistemsku hemioterapiju lekovima (sintetski i prirodnog porekla) (Pan i sar., 2010) kao što su dakarbazin (DTIC), cisplatina (Mandic i sar., 2001) i inhibitori kinaza (Vemurafenib) (Yap i Workman, 2012). Pored toga terapija uključuje adjuvantnu terapiju visokim dozama interferona alfa (IFN $\alpha$ ). Međutim, uprkos tome trenutno ne postoji efikasna terapija zbog rezistencije metastatskog melanoma na hemioterapiju (Ascierto i sar., 2006; Marković i sar., 2007b). Imunoterapija sa intrleukinom-2 (IL-2) ili interferonom se koristi samostalno ili u kombinaciji sa hemioterapijom ali uspeh ove terapije je ograničen oko 10-15% (Ascierto i Kirkwood, 2008).

Iz navedenih razloga proističe potreba proširivanja izbora danas dostupnih tretmana melanoma uvođenjem novih terapijskih supstanci. Jedan od mogućih načina da se ubrza uvođenje novih lekova u klinička ispitivanja terapije melanoma je ispitivanje poznatih i već registrovanih lekova sa puno dostupnih podataka o dobrom bezbednosnom profilu kod ljudi i životinja bez obzira na namenu za koju su registrovani.

\*  
\*      \*

Ovim ispitivanjima pokazali smo da ES L1 antigen *T. spiralis* i mebendazol smanjuju preživljavanje i indukuju apoptozu melanomskih ćelija *in vitro*. Apoptoza je posledica aktiviranja kaspaze -8 i efektorske kaspaze -3. Ovi podaci pokazuju da bi tretman svakom od ovih supstanci mogao predstavljati efikasni način indukovanja apoptoze kod pacijenata obolelih od melanoma. Naša, *in vivo* ispitivanja ukazuju da infekcija C57Bl/6 miševa *Trichinella*-om, odnosno tretman C57Bl/6 miševa mebendazolom dovode do usporenog rasta tumora koji imaju statistički značajno ( $p < 0,001$ ) manju zapreminu i masu u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe.

Dosadašnja ispitivanja drugih autora, ali i naša, ukazuju da bi *T. spiralis* i/ili njeni produkti, kao i mebendazol mogli biti primenjeni u predkliničkim i kliničkim ispitivanjima terapije melanoma i drugih oblika tumora. S obzirom da postoji velika potreba za novim terapijama melanoma ali i drugih kancera, u budućnosti se sa sigurnošću mogu očekivati njihova dalja ispitivanja.

## **7. ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata sprovedenih ispitivanja zaključili smo sledeće:

1. Ispitivanje uticaja ES L1 antigena *Trichinella spiralis* na preživljavanje melanomskih ćelija *in vitro* pokazalo je da ovaj antigen dovodi do blagog ali statistički značajnog smanjenja preživljavanja humanih (Fem-X) i mišjih (B16) melanomskih ćelija. Nešto je jači efekat postignut na ćelije humanog nego na ćelije mišjeg melanoma, ali ova razlika nije statistički značajna.
2. Ispitivanje uticaja mebendazola na preživljavanje melanomskih ćelija *in vitro* pokazalo je da ova supstanca dovodi do statistički značajnog smanjenja preživljavanja humanih (Fem-X) i mišjih (B16) melanomskih ćelija. Nešto je jači efekat postignut na ćelije humanog nego na ćelije mišjeg melanoma, ali ova razlika nije statistički značajna.
3. Ispitivanje uticaja ES L1 antigena *Trichinella spiralis* na apoptozu melanomskih ćelija *in vitro* pokazalo je da ovaj antigen dovodi do blage, ali statistički značajne indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija. Ovaj efekat je vremenski zavisian.
4. Ispitivanje uticaja mebendazola na apoptozu melanomskih ćelija *in vitro* pokazalo je da ova supstanca dovodi do statistički značajne indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija. Ovaj efekat je vremenski zavisian.
5. Ispitivanje uticaja inhibicije kaspaza -3, -8, -9 na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu ES L1 antigenom *in vitro* pokazalo je da: inhibicija kaspaza -3 i -8 dovodi do statistički značajne inhibicije indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija ovim antigenom.
6. Ispitivanje uticaja inhibicije kaspaza -3, -8, -9 na apoptozu melanomskih ćelija indukovanu mebendazolom *in vitro* pokazalo je da: inhibicija kaspaza -3 i -8 dovodi do statistički značajne inhibicije indukcije apoptoze mišjih (B16) melanomskih ćelija ovom supstancom.

7. Ispitivanja uticaja hronične infekcije sa *Trichinella spiralis*, pokazalo je da infekcija ovim parazitom dovodi do statistički značajne supresije rasta melanoma, *in vivo* kod C57Bl/6 miševa, kada se B16 ćelije aplikuju 40-og dana od infekcije ovom nematodom. Rast melanoma je sporiji u odnosu na kontrolne životinje, tako da je kod inficiranih životinja zapremina i težina tumora statistički značajno manja nego kod kontrolnih.
  
8. Ispitivanja uticaja peroralne aplikacije mebendazola, *in vivo* kod C57Bl/6 miševa, pokazala su da terapija ovim lekom dovodi do statistički značajne supresije rasta melanoma. Rast melanoma se usporava posle primene ovog leka u odnosu na kontrolne životinje, tako da je kod tretiranih životinja zapremina i težina tumora statistički značajno manja nego kod kontrolnih životinja.

\*  
\*      \*

Na kraju, na osnovu svega navedenog može se zaključiti da obe ispitivane supstance (ES L1 antigen *T. spiralis* i mebendazol) poseduju antitumorski potencijal kako u uslovima *in vitro* tako i u uslovima *in vivo*.

## **8. SPISAK LITERATURE**

Adams HR.: Veterinary Pharmacology and Therapeutics., Iowa State University Press/Ames, 2008.

Akgul, C., D. A. Moulding, and S. W. Edwards. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 2001. 487:318-322

Appleton J.A., Bell G.R., Homan W. and van Knapen F. Concensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today* 1991, 7: 190-192.

Appleton JA, Romaris F. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet Parasitol.* 2001 Nov 22;101(3-4):249-60

Appleton JA, Romaris F. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet Parasitol.* 2001 Nov 22;101(3-4):249-60.

Arriaga C, Yépez-Mulia L, Viveros N, Adame LA, Zarlenga DS, Lichtenfels JR, Benitez E, Ortega-Pierres MG. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *J Parasitol.* 1995 Oct;81(5):781-3.

Ascierto PA, Kirkwood JM. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med.* 2008 Oct 27;6:62.

Ascierto PA, Scala S, Ottaiano A, Simeone E, de Michele I, Palmieri G, Castello G. Adjuvant treatment of malignant melanoma: where are we? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006 Jan;57(1):45-52.. Review.

Babić T, Grabarević Ž, Vuković S, Kos J, Matičić D: Congenital melanoma in a 3-month old bull calf. *Vet. arhiv* 79 (4), 315-320, 2009

Bai RY, Staedtke V, Aprhys C, Gallia GL, Riggins GJ. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro oncology.* 13 (9): 974-982, 2011

Bar-Eli M. Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res.* 2001 Apr;14(2):78-85.

Barnhill RL, Mihm MC Jr. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol.* 1993 Feb;10(1):47-75.

Bell RG, Liu WM. *Trichinella spiralis*: quantitative relationships between intestinal worm burden, worm rejection, and the measurement of intestinal immunity in inbred mice. *Exp Parasitol.* 1988 Jun;66(1):44-56.



Bell RG, McGregor DD. Requirement for two discrete stimuli for induction of the intestinal rapid expulsion response against *Trichinella spiralis* in rats. *Infect Immun.* 1980a Jul;29(1):186-93.

Bell RG, McGregor DD. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis*: coinduction by using antigenic extracts of larvae and intestinal stimulation with an unrelated parasite. *Infect Immun.* 1980 Jul;29(1):194-9.

Bell RG. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Adv Parasitol.* 1998;41:149-217.

Bevers EM, Williamson PL. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.* 2010 Jul 2;584(13):2724-30. Epub 2010 Mar 17.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* 2003 Dec;139(12):1620-4

Blagosklonny M.V., et al.: Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res.* 57: 130-135, 1997

Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol.* 1998 Jul 15;161(2):897-908.

Bolás-Fernandez F, Corral Bezara LD. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci.* 2006 Dec;81(3):297-303.

Bolon B; Calderwood MB; Hall BJ. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol* 1990; 27: 96-102

Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 2004 Mar;128(3):323-32.

Britov VA, Bоеv SN. Таксономический ранг трихинелл различных штаммов и характер их циркуляции [Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation.] *Vestnik. Akademiia Nauk. SSSR* 1972, 28, 27-32.

Britov VA, Ermolin GA, Tarakanov VI, Nikitina TL. Genetic isolation of 2 varieties of *Trichinella*]. *Med Parazitol (Mosk).* 1971 Sep-Oct;40(5):515-21.

Britov VA, Nivin EA. „Трихинеллы против иммунодефицита и рака“ 2002. Vladivostok-Ussurijsk

Britov VA. "Трихинеллы и их использование в медицине" 2006. Vladivostok

Brunelle JK., Zhang B. Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug products. *Drug Resistance Updates* 13 (2010) 172–179

Bruschi F, Murrell KD. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J.* 2002 Jan;78(915):15-22.

Bruschi F. The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002 Oct;2(3):269-80.

Bruschi F., Carulli G., Azzarà A., Homan W., Minnucci S., Rizzuti-Gullaci A., Sbrana S., and Angiolini C. Inhibitory Effects of Human Neutrophil Functions by the 45-kD Glycoprotein Derived from the Parasitic Nematode *Trichinella spiralis*. *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 2000, 122: 58–65.

Bystryn, J.-C., R. S. Bart, P. Livingston, and A. W. Kopf. 1974. Growth and Immunogenicity of Murine B16 Melanoma. *J Invest Dermatol* 63:369-373.

Capó V, Despommier DD. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev.* 1996 Jan;9(1):47-54.

Caspi, R. R. 2008. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nature Reviews Immunology* 8:970-976.

Chambers, A. F., A. C. Groom, and I. C. MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2:563-572.

Chen L, He Z, Qin L, Li Q, Shi X, et al. (2011) Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. *PLoS ONE* 6(9): e24407. doi:10.1371/journal.pone.0024407

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17, 393-403.

Cherniack EP. Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks. Centipedes and spiders. *Altern med rev.* 2011 16 (1): 50-58

Chin L, Garraway LA, Fisher DF. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes and development*. 2006. 20:2149–2182

Cooper EL, Ru B, Weng N. Earthworms: sources of antimicrobial and anticancer molecules. *Adv exp med biol*. 2004; 546: 359-389;

Coyner K and Loeffler D. Topical imiquimod in the treatment of two cutaneous melanocytomas in a dog. *Veterinary dermatology*. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.01000.x

Curik I, Seltenhammer m, Sölkner j, Zechner p; Bodo i; Habe f; Marti e.; Brem g; Inbreeding and Melanoma in Lipizzan Horses. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 65, No. 4, 2000 (181-186)

Cvetkovic J., Teodorovic V., Marucci G., Vasilev D., Vasilev S., Cirovic D., Sofronic-Milosavljevic Lj. First report of *Trichinella britovi* in Serbia. *Acta Parasitologica*. 2011; 56 (2):

Čuperlovic K. i Đorđević M. (2003). *Trichinella* and Trichinellosis. Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade.

Ćupić V, Muminović M, Kobal S, Velez R. *Farmakologija za studente veterinarske medicine*. Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje, 2007

Ćupić V. Najčešća trovanja u veterinarskoj medicini. *IŠ Stručna knjiga*, Beograd, 1999.

Dame JB, Murrell KD, Worley DE, Schad GA. *Trichinella spiralis*: genetic evidence for synanthropic subspecies in sylvatic hosts. *Parasitol*. 1987 Oct;64(2):195-203.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.

Davis MA: *Apoptosis methods in pharmacology and toxicology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2002

Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*. 2003. 86: 141-159

de Boni U, Lenczner MM, Scott JW. Autopsy of an Egyptian mummy. 6. *Trichinella spiralis* cyst. *Can Med Assoc J*. 1977 Sep 3;117(5):472.

Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. *Trichinella* antigens: a review. *Vet Res*. 1999 Nov-Dec;30(6):559-71.

Despommier DD, Gold AM, Buck SW, Capo V, Silberstein D. *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Exp Parasitol*. 1990 Jul;71(1):27-38.

Despommier DD. How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? *Parasitol Today*. 1998 Aug;14(8):318-23.

Di Lillo DJ, Yanaba K, Tedder TF, B cell are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: Therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J immunol*. 2010. 184: 4006-4016

Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M. Genealogy, expresion and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol and Therapeutic* 101, 1-15, 2004

doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.04.008

Doudican et al., Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res.*, Vol. 6 (8), 1-8, 2008

Dupouy-Camet J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas-Fernandez F, Pozio E. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Aug;3(8):1117-30.

Dupouy-Camet, J., and F. Bruschi. Management and diagnosis of human trichinellosis, p. 37-68. In J. Dupouy-Camet and K. D. Murrell (ed.), *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. 2007. World Organisation for Animal Health Press, Paris, France

Dutton-Regester K i Hayward NK. Reviewing the somatic genetics of melanoma: from current to future analytical approaches. *Pigment cell and melanoma research*. 2012. Doi: 10.1111/j.1755-148X.2012.00975.x

European Commission, health and consumer protection directorate – general directorate c - scientific opinions. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on trichinellosis, epidemiology, methods of detection and *Trichinella* – free pig production. Adopted on 21-22 November, 2001.

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000 May 4;405(6782):85-90.

Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a Molecular Classification of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2007. 25: 1606-1620

Ferrucci PF, Tosti G, di Pietro A, Passoni C, Pari C, Tedeschi I, Cataldo F, Martinoli C, Testori A. Newly identified tumor antigens as promising cancer vaccine targets for malignant melanoma treatment. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(1):11-31.

Fidler, I. J. 1973. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature: New Biology* 242:148-149.

Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present and future. *BMC Medicine*. 2012. 10: 23-33

Formigli L., Papucci L., Tani A., Schiavone N., Tempestini A., Orlandini G. E., Capaccioli S., Orlandini S. Z. Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol*. 182, 41-49. 2000

Frenoy. Patent No.: US 7,335,354 B2 „Methods for the reduction of malignant tumors by an eosinophil/helminth therapy“ 26 february 2008

Friedman RJ, Heilman ER. The pathology of malignant melanoma. *Dermatol Clin*. 2002 Oct;20(4):659-76.

Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Oct;13(5):555-62.

Fröscher W, Gullotta F, Saathoff M, Tackmann W. Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur Neurol*. 1988;28(4):221-226.

Gajadhar A.A., Pozio E, Gamble H.R., Nockler K., Maddox-Hyttel C., Forbes L.B., Vallee I., Rossi P., Marinculic A., Boireau P. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Veterinary Parasitology*. 2007; 159: 197–205.

Gamble HR, Graham CE. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am J Vet Res*. 1984a Jan;45(1):67-74.

Gamble HR, Graham CE. Comparison of monoclonal antibody-based competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of swine trichinosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1984b Jul;6(3-4):379-89.

Gamble HR, Murrell KD, Marti HP. Inoculation of pigs against *Trichinella spiralis*, using larval excretory-secretory antigens. *Am J Vet Res.* 1986 Nov;47(11):2396-9.

Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol.* 1994 May;102(5):695-9.

Ghavami S, Hashemi M, Ande S R, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko A J, Los M. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009;46:497–510. doi:10.1136/jmg.2009.066944

Gil-ad I, Shtauf B, Levkovitz Y, Nordenberg J, Taler M, Korov I, Weizman. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncology reports.* 2006. 15: 107-112

Gold A.M. and Despommier D.D. Buck SW Partial characterization of two antigens secreted by L1 larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol* 1990, 41: 187–19.

Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Arch Dermatol.* 2001 Nov;137(11):1493-6. Review. No abstract available

Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Cherchi S, Pezzotti P, Pozio E. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Nov;15(11):1723-9.

Gong P., Zhang J., Cao L., Nan Z., Li J., Yang J., Fang H. Jiao H., Jiang T., Zhang X. Identification and characterization of myeloma-associated antigens in *Trichinella spiralis*. *Experimental Parasitology.* 127: 784-788. 2011

Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):127-45,

Goyal PK, Wheatcroft J, Wakelin D. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Int.* 2002 Mar;51(1):91-8.

Gray-Schopfer V, et al.: Melanoma biology and new targeted therapy. Nature, 445: 851-857, 2007

Green DR, Evan GI. Matter of life and death. Cancer Cell. 2002 Feb;1(1):19-30.

Grossman D., and Altieri D.C. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. Cancer and metastasis review, 20: 3 – 11, 2001

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, Vasilev S, Radovic I, Sofronic-Milosavljevic Lj. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2011; 34: 429-439

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M, Sofronic-Milosavljevic Lj. Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite Immunology*. 2010.32 (6):450-459,

Guiliano DB, Oksov Y, Lustigman S, Gounaris K, Selkirk ME. Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. Int J Parasitol. 2009 Apr;39(5):515-24. Epub 2008 Oct 21.

Guimaraes CA, and Linden R: Programmed cell death, Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem. 271: 1638-1650, 2004

Haanen C., Vermes I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 64, 129-133. 1996

Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. Nature. 2002 May 9;417(6885):182-7.

Hao, Z., Duncan, G.S., Chang, C.C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., *et al.* Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. Cell. 2005. 121: 579-591.

Harris N. Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design? Trends in Parasitology. 2011. 27 (7): 288-293

Hashimoto H, Messerli SM, Sudo T, Maruta H. Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov Ther.* 2009; 3(6):243-246.

Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407:770-776, 2000.

Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol.* 2009. 167(1-9): 1–11.

Hoelder, S., Clarke PA, Workman P., Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities, *Molecular Oncology.* 2012. 6: 155-176. doi:10.1016/j.molonc.2012.02.004

Holcombe RF, McLaren CE, Milovanovic T. Immunomodulation with low dose levamisole in patients with colonic polyps. *Cancer Detect Prev.* 2006;30(1):94-8. Epub 2006 Feb 3.

<http://www.britov.net/>

Inaba T, Sato H, Kamiya H. Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *J Vet Med Sci.* 2003b Nov;65(11):1227-31.

Inaba T, Sato H, Kamiya H. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology.* 2003a Jun;126(Pt 6):591-8.

Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Perucho M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):10872-7.

Ishibashi M, Ohtsuki T. Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis. *Inc. Med Res Rev*, 28, No. 5, 688–714, 2008

Ivanoska D, Čuperlović K, Gamble HR, Murrell KD. Comparative efficacy of antigen and antibody detection tests for human trichinellosis. *J Parasitol.* 1989. 75(1): 38-41

Jacobs JFM, Nierkens S, Figdor CG, de Vries JM, Aderna GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol.* 2012. 13:32-42



Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007 Jan-Feb;57(1):43-66.

Jordan MA and Wilson L., Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10: 123-130, 1998.

Kamm PCA and Ferch NI: Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia*, 55: 1081-1093, 2000

Katz M. Adverse Metabolic Effects of Antiparasitic Drugs. *Reviews of infectious diseases.* 1982. 4: 768-770

Kaufmann, T., Tai, L., Ekert, P.G., Huang, D.C., Norris, F., Lindemann, R.K., Johnstone, R.W., Dixit, V.M., and Strasser, A. (2007). The BH3-only protein bid is dispensable for DNA damage- and replicative stress-induced apoptosis or cell-cycle arrest. *Cell* 129, 423-433. 93

Kerr JFR, Wyllie i Currie .: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J cancer*, 26: 239-257, 1972

Khan W. I. i Collins S. M. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol.* 2004, 26:319-326.

Kiyono K, Suzuki HI, Matsuyama H, Morishita Y, Komuro A, Kano MR, Sugimoto K, Miyazono K. Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009 Dec 1;69(23):8844-52.

Kline J, Brown IE, Zha YY, et al. Homeostatic proliferation plus regulatory T-cell depletion promotes potent rejection of B16 melanoma. *Clin Cancer Res.* 2008. 14: 3156-3167

Kluck, R.M., Bossy-Wetzler, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Ko R.C. and Fan L. Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Parasitology.* 1996, 112: 89-95.

Krathen M. Malignant Melanoma: Advances in Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Semin Cutan Med Surg.* 2012. doi:10.1016/j.sder.2011.11.00631:45-49

Kuijk LM and van Die I. Worms to the Rescue: Can Worm Glycans Protect from Autoimmune Diseases? *Life*, 62(4): 303–312, April 2010

La Rosa G, Marucci G, Pozio E. Biochemical analysis of encapsulated species of *Trichinella* (Nematoda, Trichinellidae) from cold- and warm-blooded animals reveals a high genetic divergence in the genus. *Parasitol Res* 2003, 91, 462-466.

La Rosa G, Pozio E, Rossi P, Murrell KD. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol.* 1992 Aug;78(4):641-6.

Lemaire C., Andreau K., Souvannavong V., Adam A. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Letters* 425, 266-270.1998

Lemasters J.J., Nieminen A.-L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P., Nishimura Y., Crowe R.A., Cascio W.E., Bradham C.A., Brenner D.A., Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 177-196. 1998

Li CK, Ko RC. The detection and occurrence of circulating antigens of *Trichinella spiralis* during worm development. *Parasitol Res.* 2001 Feb;87(2):155-62.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Lopez NC, Valck C, Ramirez G, Rodriguez M, Ribeiro C, et al. Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010. 4(7): e730. doi:10.1371/journal.pntd.0000730

Lu D, Choi MY, Yu J, Castro JE, Kipps TJ, Carson DA. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 August 9; 108(32): 13253–13257. doi: 10.1073/pnas.1110431108

Lundy J, Lovett EJ 3rd, Conran P, Goldblatt PJ. Thiabendazole: a potential adjuvant in cancer therapy. *Surgery.* 1976 Nov;80(5):636-40.

MacGillivray KC, Sweeney RW, Del Piero F. Metastatic Melanoma in Horses. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 452-456

Maianski N.A. et al.: Apoptosis of Neutrophils. *Acta Haematol*, 11:56-66, 2004

Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M. and Allen J.E. Helminth parasites: Masters of regulation. *Immunol. Rev.* 2004, 201: 89-116.

Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, and Wynn TA Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *The Journal of Experimental Medicine.* 2009.

Mandic A, Viktorsson K, Molin M, Akusjärvi G, Eguchi H, Hayashi SI, Toi M, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces the proapoptotic conformation of Bak in a deltaMEKK1-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2001 Jun;21(11):3684-91.

Manley CA; Leibman NF; Wolchok JD; Rivere IC; Bartido S; Craft DM; Bergman PJ. Xenogenic Murine tyrosinase DNA vaccine for malignant melanoma of the digit of dogs. *J Vet Intern Med.* 2011; 25: 94-99

Marković S. i sar. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007; 82 (3): 364-380

Marković S. i sar. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part2: Epidemiology, Staging, Prognosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2007b; 82 (4): 490-513

Marti H. P. i Murrell K. D. *Trichinella spiralis*: Antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitol.* 1986, 62:370-375.

McGuire C, Chan WC, Wakelin D. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):7149-52.

Merlo DF, Rossi L, Pellegrino C, Ceppi M, Cardellino U, Capurro C, Ratto A, Sambucco PL, Sestito V, Tanara G, Bocchini V. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J vet Intern Med.* 2008; 22: 976-984

Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 2009. 417, 651–666

Mizuno K i Toyoda Y. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch Toxicol.* 2011. 85: 199-207

Modiana JF; Ritt MG; Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: Pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* 1999; 13: 163-174

Molinari J.A., and Ebersole J.L., Antineoplastic effects of long term *Trichinella spiralis* infection on B16 melanoma. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 55: 444-448, 1977

Morelle V., Haslam S.M., Olivier V., Appleton J.A., Morris H.R. and Dell A. Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000, 109: 171-177.

Morrison B. Wallace. Inflammation and Cancer: A Comparative View. *J Vet Intern Med.* 2012; 26: 18-31

Mukhopadhyay T., et al.: Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, vol 8, 2963-2968. 2002

Muller J, Sidler D, Nachbur U, Wastling J, Brunner T, Hemphill A. Thiazolides inhibit growth and induce glutathione-S-transferase Pi (GSTP1)-dependent cell death in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer:* 2008. 123, 1797–1806

Muppidi J, Porter M, Siegel RM. Measurement of apoptosis and other forms of cell death. *Curr Protoc Immunol.* 2004 May;Chapter 3:Unit 3.17. Review.

Murrell KD, Stringfellow F, Dame JB, Leiby DA, Duffy C, Schad GA. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. II. Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis spiralis* from domestic swine to wildlife. *J Parasitol.* 1987 Feb;73(1):103-9.

Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Functional genes and proteins of *Trichinella* spp. *Parasitol Res.* 2009 Jan;104(2):197-207.

Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. Species-specific antibody responses to the recombinant 53-kilodalton excretory and secretory proteins in mice infected with *Trichinella* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Mar;15(3):468-73. Epub 2008 Jan 9.

Nakada T., Nagano I., Wu Z. and Takahashi Y. Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 2005, 96: 354-60.

Nava-Castro K, Hernandez-Bello R, Hernández SM, Escobedo G, Montor JM. NewMethod to Disaggregate and Analyze Single Isolated Helminthes Cells Using Flow Cytometry: Proof of Concept. 2012. *Front Immunol.* 2012; 3: 8. doi: 10.3389/fimmu.2012.00008

Negrao-Correa D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: Looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2001, 43:291-299.

Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res.* 1978 Nov;38(11 Pt 2):4105-11. Review.

O'Day SJ, Boasberg PD, Piro L, Kristedja TS, Wang HJ, Martin M, Deck R, Ames P, Shinn K, Kim H, Fournier P, Gammon G. Maintenance biotherapy for metastatic melanoma with interleukin-2 and granulocyte macrophage-colony stimulating factor improves survival for patients responding to induction concurrent biochemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2002 Sep;8(9):2775-81.

Olsen BS, Villella JB, Gould SE. Distribution of *Trichinella spiralis* in muscles of experimentally infected swine. *J Parasitol* 1964, 50, 489-495.

Oppenheim R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501.1991

Ortega-Pierres M.G., Yopez-Mulia L., Homan W., Gamble R.H., Lim P.L., Takahashi Y., Wassom D.I. and Appleton J.A. Workshop on detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Par. Immunol.* 1996, 18: 273-284.

Osada Y. Kanazawa T. Parasitic helminthes: new weapons against immunological disorders. *Journal of biomedicine and biotechnology.* 2012; article ID 743758, 9 pages, doi: 1155/2010/743758

Pan L, Chai H, Kinghorn AD. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Letters* 3 (2010) 1–8

Peters P. J., Gagliardo L. F., Sabin E. A., Betchen A. B., Ghosh K. & Oblak J. B. Dominance of immunoglobulin G2c in the antiphosphorylcholine response of rats infected with *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 1999, 67:4661-4667.

Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L, Mingari, MC. Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *International immunology.* 2008. 21: 793-801

Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., and Salvesen, G.S. (2006). The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 22, 269-275.

Postow, MA. Harding, J. Wolchok JD. Targeting Immune Checkpoints: Releasing the Restraints on Anti-Tumor Immunity for Patients With Melanoma. *The Cancer Journal.* 2012. 18(2): 153-159

Pozio E, Bruschi F. The importance of correct terminology in describing the muscular stage of *Trichinella* infection. *Trends Parasitol* 2001, 17, 362.

Pozio E, La Rosa G, Murrell KD, Lichtenfels JR. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J Parasitol* 1992b, 78, 654-659.

Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol* 1992a, 78, 647-653.

Pozio E, Zarlenga DS, La Rosa G. The detection of encapsulated and non-encapsulated species of *Trichinella* suggests the existence of two evolutive lines in the genus. *Parasite* 2001, 8, S27-S29.

Pozio E. and Murrell D.K. Systemics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv. Parasitol.* 2006, 63: 367-439.

Pozio E. Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. In: (Eds. J. Dupouy-Camet and K.D. Murell) FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France. 2007; 1-35.

Pozio E. World distribution of *Trichinella spp.* Infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology.* 2007a; 149: 3-21.

Pozio E., La Rosa G. PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animals and human samples. *Methods in Molecular Biology*. 2003; 216: 299-309.

Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G., Zarlenga, D.S. Molecular Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect. Gen. Evol.* 2009; 9: 606-616.

Reed, J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17, 2941-2953.

Richmond, A., J. Yang, and Y. Su. 2009. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research* 22:175-186.

Rieder S., Stricker C., Joerg H., Dummer R. and Stranzinger G., (2000). A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma. *J Anim Breed Genet* 117: 73-82

Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):405-13. Epub 2007 Mar 21. Review.

Riet E., Hartgers F. and Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* 2007, 212: 475-490.

Robinson M.W., Greig R., Beattie K.A., Lamont D.J. and Connolly B. Comparative analysis of the excretory–secretory proteome of the muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 2007, 37: 139–148.

Romaris F., Dea-Ayuela M.A., Bolas F., Martinez-Fernandez R., Sanmartin M.L. and Ubeira F.M. Heterogeneity and immunogenicity of *Trichinella* gp53. *Parasite Immunology* 2003, 25: 297-305.

Russo A.E., et al.: Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. *International journal of oncology*, 34: 1481-1489, 2009

Sajid MS, Iqbal Z, Muhammad G, Iqbal MU. Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology*. 2006 Mar;132(Pt 3):301-13.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997. 91(4):443-6.

Sasaki Ji-ichiro et al., The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002. Vol 1, 1201-1209,

Sauerwald TM, Oyler GA, Betenbaugh MJ. Study of Caspase Inhibitors for Limiting Death in Mammalian Cell Culture. *Biotechnol Bioeng*. 2003.81: 329–340,

Silberstein D. S. i Despommier D. D. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. Immunol*. 1984, 132:898-904.

Simon Hans-Uwe: Neutrophil apoptosis pathway and their modifications in inflammation. *Immunological Review*, 2003. Vol193:101-110,

Soengs M.S., and Lowe S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 2003. 22: 3138-3151,

Sofronic-Milosavljevic i sar., *Veterinary parasitology*. 2012. in press

Sredni B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Seminars in cancer biology*. 2012. 22: 60 – 69.

Steer HJ, Lake RA, Nowak AK, Robinson BWS. Harnessing the immune response to treat cancer. *Oncogene*. 2010. 29: 6301-6313

Sulaimon SS i Kitchell BE. The basic biology of malignant melanoma: molecular mechanisms of disease progression and comparative aspects. *J Vet Intern Med*. 2001; 17: 760-772

Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 621-632.

Takahashi A. and Earnshaw W. C. ICE-related proteases in apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 1996. 6, 50-55.

Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Today* 1997, 13: 104-

Takahashi Y., Homan W., Lim P.L. Ultrastructural localization of the fosforilcholine-associated antigen in *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol*. 1993, 79: 604-

Takahashi Y., Uno T., Mizuno N., Suzuki H., Wada T. & Araki T. Immunocytochemical evaluation of *Trichinella spiralis* larval antigen. *J. Electron. Microsc.* 1990, 39:155-159.

Tanaka K, Ishikawa S, Matsui Y, Kawanishi T, Tamesada M, Harashima N, Harada M. Combining a peptide vaccine with oral ingestion of *Lentinula edodes*



mycelia extract enhances anti-tumor activity in B16 melanoma-bearing mice. Published online 16 may 2012. *Cancer Immunol Immunother*. DOI 10.1007/s00262-012-1275-8

Teodorović V. *Trichinella – Trichinellosis*. Naučna KMD doo, Beograd, 2007

Thatte U, Dahanukar S: apoptosis – clinical relevance and pharmacological manipulation. *drugs*, 72: 511-32, 1997

Tolstoj VA, Lytvynets A, Langrova L. Pro-oxidant effects of mebendazole in albino rats experimentally infected with *Trichinella Spiralis*. *Parasitol Res*. 2007. 100: 1277-1280

Vasilev S., Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Sofronic-Milosavljevic Lj.. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between Dark Agouti, and Albino Oxford Rats. *Veterinary Parasitology*. 2009; 159: 229–231.

Villa P.G., Henzel W. J., Sensenbrenner M., Henderson C.E., Pettmann B. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J. Cell Sci*. 111, 713-722. 1998

Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431. 99

Vutova K, Mechkov G, Vachkov P, Petkov R, Georgiev P, Handjiev S, Ivanov A, Todorov T. Effect of mebendazole on human cystic echinococcosis: the role of dosage and treatment duration. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999 Jun;93(4):357-65.

Wakelin D, Goyal PK. *Trichinella* isolates: parasite variability and host responses. *Int J Parasitol* 1996, 26, 471-481.

Wang XL, Fu BQ, Yang SJ, Wu XP, Cui GZ, Liu MF, Zhao Y, Yu YL, Liu XY, Deng HK, Chen QJ, Liu MY. *Trichinella spiralis*--a potential anti-tumor agent. *Vet Parasitol*. 2009 Feb 23;159(3-4):249-52.

Wang Z. Q., Cui J., Wei H.Y., Han, H. M., Zhang H. W. & Li Y.L. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine*. 2005,

Watanabe N., Bruschi F. & Korenaga M. IgE: A question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends Parasitol*. 2005, 21:175-178.

Wei, M. Q., A. Mengesha, D. Good, and J. Anne. 2008. Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. *Cancer Letters* 259. 224

Welch, D. R. 1997. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clinical and Experimental Metastasis* 15:272-306.

White E. Life, death and pursuit of apoptosis. *Gen. Develop.* 10, 1-15. 1996

Wu X.P., Fu B.Q., Wang X.L., Yu L., Yu S.Y., Deng H.K., Liu X.Y., Boireau P., Wang F., Liu M.Y. Identification of antigenic genes in *Trichinella spiralis* by immunoscreening of cDNA libraries. *Vet. Parasitol.* 2009, 159: 272-275.

Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. 2005b. *Parasitology* 130:561-573

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. A panel of antigens of muscle larvae of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* as revealed by two-dimensional western blot and immunoelectron microscopy. *Parasitology*. 1999 Jun;118 (Pt 6):615-22.

Wu Z, Sofronic-Milosavljevic Lj, Nagano I, Takahashi Y. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasite Vectors* 2008;19:27-40.

Wu Z. Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in trichinella spiralis-infected muscle cells. 2005a. *Parasitology* 131: 379-381

Wu Z., Matsuo A., Nakada T., Nagano I. and Takahashi Y. Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology* 2001, 123: 85-94.

Wu Z., Nagano I., Nakada T. and Takahashi Y. Expression of excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. *Parasitol. Int.* 2002, 51: 155-161.

Wyllie A. H. The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 97-104. 1995

Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306. 1980

Xue L., Fletcher G. C., Tolkovsky A.M. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 180-198. 1999

Yadav P, Singh R. A review on anthelmintic drugs and their future scope. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 3, Issue 3, 2011, 1721-1726

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.

Yazdanbakhsh M., Kremsner P.G. and van Ree R. Allergy, parasites and hygiene hypothesis. *Science* 2002, 296: 490-494.

Yepez-Mulia L., Hernandez-Bello R., Arizmendi-Puga N., Fonseca-Linan R. I. and Ortega-Pierres G. Contribution to the study of *Trichinella spiralis* TL-1 antigens in host immunity. *Par. Immunol.* 2007, 29: 661-670.

Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J. Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, 10, 793-796.

Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-891.

Young Kim D; Mauldin GE; Hosgood G; Cho DY. Perianal Malignant Melanoma in a Dog. *J Vet Intern Med.* 2005; 19: 610-612

Zaidi, M. R., C.-P. Day, and G. Merlino. 2008. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *Journal of Investigative Dermatology* 128:2381-2391.

Zamzami N., Kroemer G. Condensed matter in cell death. *Nature* 401, 127-128. 1999

Zarlenga D.S., Chute M.B., Martin A., Kapel C.M. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology.* 1999; 29: 1859-1867.

Zarlenga D.S., Rosenthal B.M., La Rosa G., Pozio E. and Hoberg E.P. Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *PNAS USA.* 2006, 9: 7354–7359.

Zarlenga DS, La Rosa G. Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within the genus *Trichinella*. *Vet Parasitol* 2000, 93, 279-292.

Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC Jr, Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 2008 Oct;3(5):569-585.

Zhivotovsky B. Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle*. 3, 1, 2004

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Živojinović i sar., *Veterinary parasitology*. 2012. In press

## BIOGRAFIJA

### mr sci. med. vet. SAŠA VASILEV, vet. specijalista

Vasilev Saša je rođen 23.12.1971. godine u Pančevu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu je upisao 1992., a diplomirao 1997. godine. Magistrirao je 2005. godine na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, smer patologija i terapija životinja, sa temom: »Efekat aspirina i njegovih nitro-derivata na apoptozu neutrofilnih granulocita pacova *in vitro*«. Specijalizaciju iz veterinarske kliničke farmakologije završio je 2007. godine na istom fakultetu.

Vasilev Saša je od 1998 do 2001. godine bio zaposlen kao stručni saradnik na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Od 2001 do 2006 godine radio je na Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Od 2006 do danas je zaposlen na mestu istraživača – saradnika u Institutu za primenu nuklearne energije – INEP, Univerziteta u Beogradu, na Odeljenju za Imunologiju i imunoparazitologiju. Deo je stručnog kadra Nacionalne referentne laboratorije za trihinelozu.

Posедуje licencu Veterinarske komora Srbije. Član je Veterinarske komore Srbije, Srpskog farmakološkog društva, Društva imunologa Srbije, Društva parazitologa Srbije, i Srpskog veterinarskog društva

### Najznačajnije publikacije u časopisima:

#### Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

Vasilijić S, Savić D, Vasilev S, Vučević D, Gašić S, Majstorović I, Janković S, Čolić M. Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation. *Cell Immunol.* 2005; 233: 148-157.

Vasilev S., Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Sofronic-Milosavljevic Lj.. Strain difference in susceptibility to *Trichinella spiralis* infection between Dark Agouti, and Albino Oxford Rats. *Veterinary Parasitology.* 2009; 159: 229–231.

Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, Vasilev S, Radovic I, Sofronic-Milosavljevic Lj. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2011; 34: 429-439.

#### Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

Ilic N, Colic M, Gruden-movsesijan A, Majstorovic I, Vasilev S, Sofronic-Milosavljevic Lj. Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by *Trichinella spiralis* antigens. *Parasite Immunol.* 2008; 30(9): 491-5.

#### Rad u međunarodnom časopisu (M23)

Vasilev S, Majstorović Ivana, Gašić Sonja, Vučević Dragana, Vasilijić S, Čupić V, Čolić M. The effects of aspirin on apoptosis of neutrophil granulocytes. *Acta Veterinaria*, 2006; 56 (5-6): 413-421.

Vasilev S, Vučević Dragana, Gašić Sonja, Majstorović Ivana, Vasilijić S, Čolić M, Čupić V. The effect of a nitro-aspirin on apoptosis of neutrophil granulocytes. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 2007; Vol. 57, No. 5-6: 403-412.

Vasilev S., Vučević Dragana, Gasić Sonja, Majstorovic Ivana, Vasilijić S., Cupic V. And Colic M. The effect of a new nitro-aspirin on apoptosis of neutrophil granulocytes. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 2008; Vol. 58, No. 5-6: 449-457.

Cvetkovic J., Teodorovic V., Marucci G., Vasilev D., Vasilev S., Cirovic D., Sofronic-Milosavljevic Lj. First report of *Trichinella britovi* in Serbia. *Acta Parasitologica.* 2011; 56 (2): 232-235.

Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Потписани-а SASA VASILEV

број индекса \_\_\_\_\_

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Efekat ekskretorno-sekretornog antigena mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i antihelminatika mebendazola na ćelije melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo*

- 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, 24.10.2012.

Sasa Vasilev

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Saša Vasilev

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Efekat ekskretorno-sekretornog antigena mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i anthelmintika mebendazola na ćelije melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo*

Ментор prof. dr Vitomir Ćupić

Потписани/а Saša Vasilev

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 24. 10. 2012.

Saša Vasilev

Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

Efekat ekskretorno-sekretornog antigena mišićnih larvi *Trichinella spiralis* i antihelmintika mebendazola na ćelije melanoma u uslovima *in vitro* i *in vivo*

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, 24.10.2012.

Саша Воисев



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

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

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

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

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

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