



Univerzitet u Nišu
Medicinski fakultet



Ivana D. Damnjanovi

**Uloga i značaj alfa-lipoinske kiseline i nesteroidnih
antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze
elija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija**

doktorska disertacija

Niš, 2014.



University of Niš
Faculty of Medicine



Ivana D. Damnjanovi

The role and significance of alpha-lipoic acid and non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention and induction of apoptosis in colon and cervix cancer cell lines - *in vitro* study

doctoral thesis

Niš, 2014.

I Autor

Ime i prezime: Ivana Damnjanovi

Datum i mesto ro enja: 03.07.1983. godine, Leskovac, Srbija

II Doktorska disertacija

Naslov: Uloga i zna aj alfa-lipoiniske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija

*Broj stranica:*141

Broj slika: 8

Broj grafikona: 42

*Broja tabela:*5

*Broj bibliografskih podataka:*343

III Ocena i odbrana

Datum odobrenja teme za izradu doktorske disertacije: 06.05.2014. godine

Broj odluke:04-FT-3/08

Komisija za ocenu i odbranu diktorske disertacije:

Prof. dr Sr an Peši , mentor i lan, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Stevo Najman, predsednik, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Gordana Koci , lan, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof. dr Dušica Stojanovi , lan, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Prof.dr. Dragan Milovanovi , lan, Fakulteta medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Datum prihvatanja izveštaja o ura enoj doktorskoj disertaciji: 04.07.2014. godine

Datum odbrane:

IV Nau ni doprinos doktorske disertacije:2 rada

1. **Damnjanovic I,** Kocic G, Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Conic I, Langerholc T, Pesic S. Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. Bratisl Med J; in press. (M23)
2. **Damnjanovic I,** Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Kocic H, Langerholc T, Damnjanovic Z, Pesic S. Crosstalk between possible cytostatic and antiinflammatory potential of ketoprofen in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. Bratisl Med J; in press. (M23)

Za izradu ove doktorske disertacije iskrenu zahvalnost dugujem:

Prof. dr Sr anu Peši u, mentoru ove doktorske disertacije, za uloženi trud, korisne sugestije i bezrezervnu podršku u svakom trenutku realizacije ovog istraživanja,

Prof. dr Gordani Koci, na nesebičnoj podršci, dragocenoj pomoći u svim fazama izrade doktorske disertacije i iskrenom prijateljstvu od samog početka mog istraživanja,

Prof. dr Stevi Najmanu, na velikoj stručnoj pomoći, uvek temeljnim, kritičkim analizama bitnim za postavku, izradu i konačan oblik ovog istraživanja,

Prof. dr Dušici Stojanovi, na korisnim sugestijama, ukazanoj pažnji i podršci u toku izrade doktorske disertacije,

Prof. dr Draganu Milovanoviću, na izvanrednoj saradnji, ličnom angažovanju i ekspeditivnosti.

Na velikoj pomoći u toku realizacije ovog istraživanja posebnu zahvalnost dugujem *mag. farm. Sanji Stojanović*, *ass.dr Andreju Velkoviću*, *ass.dr Dijani Stojanović* i *hemiarki Svetlani Stojanović*.

Istraživanje je podržano od strane *Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije*, u okviru projekata *TR 31060* i *III41017*.

I iznad svega, od srca se zahvaljujem svojoj porodici, na razumevanju, strpljenju i pruženoj podršci koja je bila presudna za završetak ovog rada

Autor



Ljubav ljude ini vrednijim...
Mojim najve im ljubavima, Zoranu i Savi

SAŽETAK

Uloga i značaj alfa-lipoiinske kiseline i nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa – *in vitro* studija

Terapija karcinoma kolona i cerviksa se obično zasniva na delovanju jednog ili više citostatika, koji na različite načine zaustavljaju elijski ciklus ispoljavaju i visok stepen neželjenih efekata i razvoja rezistencije. Zato je pronalaženje novih ili unapređene ve postoje ih agenasa, sa potencijalnim antitumorskim delovanjem, imperativ u savremenoj farmakoterapiji karcinoma. Povećanje efikasnosti citostatika može biti postignuto kombinovanom terapijom sa hemopreventivnim agensima čime se potencira efikasnost samog citostatika, a smanjuju neželjeni efekti.

Cilj ovog istraživanja je da se ispita efekat alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama elija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi na proliferaciju elija i kvantitativnu ekspresiju NF- κ B, Bcl-2 i Bax proteina u cilju procenjivanja hemopreventivnog potencijala ispitivanih supstanci.

MTT test u eseju elijske proliferacije se koristio za ispitivanje efekta ispitivanih supstanci na proliferaciju elija karcinoma kolona i cerviksa, dok je kvantitativna ekspresija NF- κ B, Bcl-2 i Bax proteina određena odgovarajućim imunofluorescentnom metodom. Uloga mononuklearnih elija periferne krvi u sprovedenom istraživanju bazirana je na proceni selektivnosti ispitivanih supstanci analizom ekspresije mitohondrijalnih markera apoptoze.

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da alfa-lipoiinska kiselina, ketoprofen i meloksikam mogu zauzeti značajno mesto u hemoprevenciji karcinoma kolona i cerviksa delujući na ekspresiju NF- κ B, Bcl-2 i Bax, kao važnih markera apoptotičke mreže u elija karcinoma kolona i cerviksa. Primećeno je doznosno zavistan efekat ispitivanih supstanci, pogotovo u kombinaciji sa citostaticima. Kada je komparacija nesteroidnih antiinflamatornih lekova u pitanju, prednost bi mogla biti data meloksikamu, najverovatnije zbog selektivnijeg profila delovanja prema inhibiciji COX-2. Dobijeni rezultati mogli bi biti izuzetno dobri preparati za dalja *in vivo* preklinička ispitivanja u cilju potenciranja efekata, uz poseban osvrt na razvoj rezistencije i smanjenja neželjenih efekata standardnih citostatskih tretmana karcinoma kolona i cerviksa.

Ključne reči: Karcinom kolona, karcinom cerviksa, apoptoza, hemoprevencija, alfa-lipoiinska kiselina, ketoprofen, meloksikam

Naučna oblast: Klinička farmakologija

UDK broj: 615.03

SUMMARY

The role and significance of the alpha-lipoic acid and non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention and induction of apoptosis in the colon and cervix cancer cell lines - *in vitro* study

The colon and cervix cancer treatment is usually based on the activity of one or more chemotherapeutic agents, which stop the cell cycle in numerous ways, by showing a high level of adverse effects and the development of resistance. Therefore, finding new or improving the existing agents with potential antitumor activity is imperative in the contemporary pharmacotherapy of cancer. Increasing the efficiency of chemotherapeutic agents can be achieved by combining the treatment with chemopreventive agents, which would enhance the effectiveness of the cytostatics and reduce the side effects.

The aim of this study is to investigate the effect of the alpha-lipoic acid, ketoprofen, meloxicam and the combinations of these test substances with cisplatin and 5-fluorouracil, in the cell cultures of colon and cervical cancer and the primary cultures of the mononuclear cells of peripheral blood, on cell proliferation and the quantitative expression of NF- κ B, Bcl-2 and Bax protein in order to assess the test substances' chemopreventive potential.

The MTT test in the cell proliferation assay was used to examine the effect of test substances on the proliferation of colon and cervix cancer cells, while the quantitative expression of the NF- κ B, Bcl-2 and Bax protein was determined in correspondence to the immunofluorescence method. The role of the mononuclear cells of peripheral blood in the conducted research, is based on monitoring the selectivity of the tested substances by analysing the expression of mitochondrial apoptosis markers.

The research results show that the alpha-lipoic acid, ketoprofen and meloxicam have an important role in the chemoprevention of colon and cervix cancer, by having an influence on the expression of NF- κ B, Bcl-2 and Bax, as important markers of the apoptotic cell power of the colon and cervix cancer cells. The test substances showed a dose-dependent effect, especially in combination with the cytostatics. When it comes to the comparison of the anti-inflammatory nonsteroidal drugs, the priority could be given to meloxicam, probably due to the more selective profile of the COX-2 inhibition. The results could be very good candidates for the further *in vivo* preclinical studies in order to potentiate the effects, in a particular reference to the development of resistance and the reduction of the side effects that occur in the standard cytostatic treatment of colon and cervix cancer.

Key word: colon cancer, cervix cancer, apoptosis, chemoprevention, alpha-lipoic acid, ketoprofen, meloxicam

Scientific field: Clinical pharmacology

UDC: 615.03

LISTA SKRA ENICA

KK - Karcinom kolona
FAP - Adenomatozna polipoza
AJCC/TNM - American Joint Committee on Cancer
KC - Karcinom cerviksa
HPV - Humani papilloma virus
CIN - Cervikalnim intraepitelnim neoplazijama
SIL - Skvamoznih intraepitelnih lezija
WHO - World Health Organization
TNF - Faktor tumorske nekroze
Cyt c - Citohrom c
APAF-1 - Apoptosis protease activating factor-1
RHD - Rel homologi domen
DSB - DNA double-strand breaks
AIF - Apoptosis-Inducing Factor
IAP - Inhibitorni proteini apoptoze
COX - Ciklooksigenazna
VEGF - Vascular endothelial growth factor
LOX - Lipooksigenaza
FACL4 - Fatty acid CoA ligase 4
FU - 5-fluorouracil
CP – Cisplatin
ALA - Alfa-lipoinjska kiselina
NSAIL - Nesteroidni antiinflamatorni lekovi
KT - Ketoprofen
MK - Meloksikam
PG – Prostaglandini
PKB/Akt - protein kinaza B
NAG-1 - NSAIL-aktiviranog gena
c-Src - Protionkogeni produkt tirozin kinaze
PBMC - Peripheral blood mononuclear cells

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. KARCINOM KOLONA.....	2
1.1.1. <i>Epidemiologija karcinoma kolona</i>	2
1.1.2. <i>Molekularni mehanizmi nastanka karcinoma kolona</i>	2
1.1.3. <i>Faktori rizika za nastanak karcinoma kolona</i>	3
1.1.4. <i>Klasifikacija karcinoma kolona</i>	5
1.2. KARCINOM CERVIKSA	6
1.2.1. <i>Epidemiologija karcinoma cerviksa</i>	6
1.2.2. <i>Molekularni mehanizmi nastanka karcinoma cerviksa</i>	7
1.2.3. <i>Faktori rizika za nastanak karcinoma cerviksa</i>	8
1.2.4 <i>Klasifikacija karcinoma cerviksa</i>	10
1.3. ZNAČAJ APOPTOZE U NASTANKU I TERAPIJI KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA	11
1.3.1. <i>Apoptoza kao mehanizam elijske smrti</i>	12
1.3.2. <i>Defekti u procesu apoptoze i njihova uloga u nastanku i terapiji karcinoma kolona i cerviksa</i>	15
1.3.3. <i>Uloga NF-κB u apoptozi elija karcinoma kolona i cerviksa</i>	17
1.3.4. <i>Bcl-2 familija proteina u apoptozi karcinoma kolona i cerviksa</i>	22
1.3.5. <i>Uloga ciklooksigenaza u regulaciji procesa apoptoze</i>	26
1.4. HEMOPREVENTIVNI ASPEKTI TERAPIJE KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA	28
1.4.1. <i>Terapija karcinoma kolona i cerviksa</i>	28
1.4.2. <i>Definicija i opšte karakteristike hemoprevencije karcinoma</i>	29
1.4.3. <i>Alfa-lipoininska kiselina, ketoprofen i meloksikam kao potencijalni hemopreventivni agensi</i>	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	37

3.1.	KORIŠ ENE SUPSTANCE	37
3.1.1.	<i>Priprema rastvora za in vitro istraživanje</i>	37
3.2.	ELIJSKE LINIJE	38
3.2.1.	<i>HeLa elijska linija</i>	38
3.2.2.	<i>Caco-2 elijska linija</i>	38
3.2.3.	<i>Primarna kultura</i>	39
3.3.	ESEJ PROLIFERACIJE.....	39
3.3.1.	<i>MTT test</i>	39
3.4.	MERENJE NIVOVA TRANSKRIPCIONOG FAKTORA NF- κ B, BCL-2 I BAX	40
3.5.	STATISTI KA OBRADA PODATAKA	40
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	41
4.1.	PROLIFERACIJA ELIJA KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA U PRISUSTVU ISPITIVANIH SUPSTANCI MERENA MTT TESTOM	41
4.1.1.	<i>Proliferacija elija karcinoma cerviksa u prisustvu alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama</i>	41
4.1.2.	<i>Proliferacija elija karcinoma kolona u prisustvu alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama</i>	45
4.2.	KVANTITATIVNA EKSPRESIJA NF- κ B U KULTURI KARCINOMA KOLONA, CERVIKSA I PRIMARNE KULTURE MONONUKLEARNIH ELIJA PERIFERNE KRVI NAKON INKUBACIJE ISPITIVANIH SUPSTANCI	48
4.2.1.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa alfa-lipoiinskom kiselinom u kulturi elija karcinoma cerviksa</i>	49
4.2.2.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa alfa-lipoiinskom kiselinom u kulturi elija karcinoma kolona</i>	50
4.2.3.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa alfa-lipoiinskom kiselinom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi</i>	52
4.2.4.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa ketoprofenom u kulturi elija karcinoma cerviksa</i>	54
4.2.5.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa ketoprofenom u kulturi elija karcinoma kolona</i>	55
4.2.6.	<i>Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa ketoprofenom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi</i>	55

4.2.7. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u kulturi elija karcinoma cerviksa	56
4.2.8. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u kulturi elija karcinoma kolona.....	57
4.2.9. Kvantitativna ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi.....	58
4.3. KVANTITATIVNA EKSPRESIJA BCL-2, BAX PROTEINA I ODNOSA BCL-2/BAX NAKON INKUBACIJE ISPITIVANIH SUPSTANCI U KULTURI KARCINOMA KOLONA, CERVIKSA I PRIMARNE KULTURE MONONUKLEARNIH ELIJA PERIFERNE KRVI.....	59
4.3.1. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom.....	60
4.3.2. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom.....	65
4.3.3. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom.....	70
4.3.4. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa ketoprofenom	71
4.3.5. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa ketoprofena.....	72
4.3.6. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa ketoprofenom.....	74
4.3.7. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa meloksikamom	76
4.3.8. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa meloksikamom.....	78
4.3.9. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, i Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa meloksikamom.....	79
5. DISKUSIJA	82
5.1. ZNAČAJ APOPTOZE U RAZVOJU KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA	82
5.1.1. Uloga alfa-lipoinске kiseline u proliferaciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa	83

5.1.2. Uloga ketoprofena i meloksikama u proliferaciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa	85
5.2. ZNAČAJ TRANSKRIPCIONOG FAKTORA NF- κ B U RAZVOJU I TERAPIJI KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA.....	89
5.2.1. Promene nivoa transkripcionog faktora NF- κ B u elijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim alfa-lipoinskom kiselinom.....	90
5.2.2. Promene nivoa transkripcionog faktora NF- κ B u elijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim ketoprofenom i meloksikamom	92
5.3. ZNAČAJ EKSPRESIJE BCL-2 I BAX U RAZVOJU I TERAPIJI KARCINOMA KOLONA I CERVIKSA.....	95
5.3.1. Promene nivoa ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u elijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim alfa-lipoinskom kiselinom.....	97
5.3.2. Promene nivoa ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u elijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim ketoprofenom i meloksikamom	100
5.4. EFEKAT ALFA-LIPOINSKE KISELINE, KETOPROFENA I MELOKSIKAMA NA PRIMARNU KULTURU MONONUKLEARNIH ELIJA PERIFERNE KRVI.....	105
5.5. HEMOPREVENTIVNI POTENCIJAL ALFA-LIPOINSKE KISELINE, KETOPROFENA I MELOKSIKAMA	108
7. ZAKLJUČCI.....	112
8. LITERATURA.....	114

1. UVOD

Promene u strukturi vode ih uzroka smrti, poslednjih decenija, kretale su se u pravcu smanjivanja udela akutnih zaraznih bolesti i pove anja hroni nih nezaraznih oboljenja. Sli an trend je bio u svim razvijenim zemljama sveta kada su kardiovaskularne i maligne bolesti postali dominantni uzroci smrti, a infektivne i zarazne bolesti statisti ki zanemarljive (1). Pove anje stope oboljevanja od karcinoma se pripisuje životnoj dobi, životnom stilu i genetici. Karcinom kolona predstavlja visoko zastupljeni oblik maligniteta (2). Smatra se tre im naj eš im oblikom dijagnostikovanog maligniteta u Evropi i kao takav predstavlja veliki zdravstveni i socioekonomski problem (3). Karcinom cerviksa, koji je svojom incidencom za nijansu zastupljeniji od kolon karcinoma, nalazi se na drugom mestu i beleži porast obolelih u nerazvijenim zemljama (4).

Terapija karcinoma kolona i cerviksa se obi no zasniva na delovanju jednog ili više citostatika, koji na razli ite na ine zastavljaju elijski ciklus ispoljavaju i visok stepen neželjenih efekata i razvoja rezistencije. Zato je pronalaženje novih ili unapre enje ve postoje ih agenasa, sa potencijalnim antitumorskim delovanjem, imperativ u savremenoj farmakoterapiji karcinoma. Pove anje efikasnosti citostatika može biti postignuto kombinovanom terapijom sa hemopreventivnim agenasima ime se potencira efikasnost samog citostatika, a smanjuju neželjeni efekti.

1.1. Karcinom kolona

Maligne bolesti predstavljaju veliki socioekonomski problem u svetu zbog velike smrtnosti, izmenjenog kvaliteta života i ogromnih troškova za lečenje. Među malignitetima gastrointestinalnog sistema karcinom kolona (KK) predstavlja ozbiljan svetski zdravstveni problem. Po svojoj učestalosti i smrtnosti nalazi se u samom vrhu svih karcinoma kako kod muškaraca, tako i kod žena (5).

1.1.1. Epidemiologija karcinoma kolona

Karcinom kolona je jedan od najčešćih oblika karcinoma, koji podjednako zahvata oba pola. Po učestalosti, KK se nalazi na trećem mestu u svetu u muškaraca i na drugom u žena. Kod muškaraca je najčešći i po učestalosti iza karcinoma pluća i želuca, a kod žena iza karcinoma dojke i cerviksa. Karakteriše se visokom stopom mortaliteta. U učestalost karcinoma kolona je u poslednjih dvadesetak godina u stalnom i značajnom porastu. Godišnje u svetu od KK oboli oko 1,2 miliona, a umire oko 600 hiljada ljudi. Skoro 60% svih slučajeva obolelih se javlja u razvijenim zemljama. Incidenca karcinoma kolona varira u raznim geografskim područjima. Najveća incidenca je procenjena u Australiji sa Novim Zelandom i zapadnoj Evropi, a najniža u Africi i južnoj i centralnoj Aziji (6).

KK predstavlja drugi najčešći i uzrok smrti usled karcinoma u Srbiji, odmah posle karcinoma pluća kod muškaraca i karcinoma dojke kod žena. Poslednjih godina došlo je do značajnog porasta njegove incidence i sada ona iznosi 19,9/100 000 muškaraca i 11,2/100 000 žena. Najčešće se javlja kod muškaraca starosti između 70 i 74 godine, a kod žena iznad 75 godine života (7).

Stopa mortaliteta u Srbiji iznosi 9,4/100 000 i 5,9/100 000 respektivno. Na osnovu podataka Republičkog zavoda za statistiku u periodu od 1997-2010. godine, zapažen je porast mortaliteta usled malignih tumora kolona za 16,0% (8).

1.1.2. Molekularni mehanizmi nastanka karcinoma kolona

Karcinogeneza karcinoma kolona je veoma dugotrajan proces. Postoje brojni faktori koji na kraju dovode do pojave mutacija, koje u jednom trenutku dovode do transformacije tkiva u malignu neoplazmu. Genetske, eksperimentalne i epidemiološke studije upućuju na

injenicu da je za nastanak KK odgovorna složena interakcija između u nasledne sklonosti i faktora spoljašnje sredine (9).

Osim spoljašnjih faktora i karcinogena koji deluju na epitelnu eliju, ona mora biti zahva ena i naslednim patološkim procesom koji e izazvati alteraciju sposobnu za indukciju elijske proliferacije i nekontrolisanog rasta. Važno je naglasiti da je elija u stanju poja ane abnormalne proliferacije mnogo osetljivija na dejstvo karcinogena i dalje genetske promene (10). Za potpunu elijsku promenu potrebno je više genetskih defekata tipa mutacije ili poreme aja ekspresije koji daju i modifikuju klini ku sliku i krajnji ishod bolesti. Karcinogeneza je kontinuirani, dugotrajni proces koji može trajati više godina ili decenija (11).

Neoplasti na transformacija kolona je višestepen proces koji naj eš e traje godinama i pra ena je nizom karakteristi nih genetskih promena. U tom procesu dolazi do patološke transformacije normalnog epitela kolona prvo u adenomatozni polip, a zatim u maligni karcinom koji kasnije dobija invazivni potencijal. Karcinogeneza kolona se karakteriše sukcesivnom akumulacijom mutacija u genima koji kontrolišu rast i diferencijaciju epitelnih elija, što za posledicu ima genomsku nestabilnost (12).

Danas je poznato da je KK vrlo heterogen na molekularnom nivou i da to u mnogome doprinosi razli itoj prognozi i ishodu le enja pacijenata. U poslednjih deset godina terapija pacijenata sa KK je zna ajno poboljšana zahvaljuju i boljem razumevanju molekularne osnove bolesti, optimizaciji hemioterapije i uvo enju ciljane terapije (13).

1.1.3. Faktori rizika za nastanak karcinoma kolona

Etiologija nastanka, kako maligne neoplazije, tako i KK, još uvek nije dovoljno razjašnjena, zato se naj eš e govori o faktorima rizika za pojavu karcinoma kolona. Postoji veliki broj faktora koji su odgovorni za nastanak mutacija, koje u jednom trenutku mogu dovesti do transformacije tkiva i nastanka maligne neoplazme. U najve em broju slu ajeva neophodan je multifaktorski uticaj za nastank maligne neoplazme kolona. Epidemiološke studije su utvrdile više faktora koji doprinose nastanku KK koji mogu biti promenljivog ili nepromenljivog karaktera. U Tabeli 1. prikazani su faktori koji imaju zna ajnu ulogu u nastanku i napredovanju karcinoma kolona (14).

Tabela 1. Faktori koji imaju značajnu ulogu u nastanku i napredovanju karcinoma kolona

Promenljivi faktori	Nepromenljivi faktori	
	Stetsni faktori	Nasledni faktori
Ishrana	Životna dob	Porodi na anamneza za karcinom kolona
Prekomerna telesna težina	Li na anamneza na polipozu	
Fizička aktivnost	Li na anamneza na karcinom kolona	Porodi na adenomatozna
Alkohol i pušenje	Li na anamneza na inflamatorna bolesti creva	polipoza
Medikamenti i hormoni		Nasledni nepolipozni
Infektivni agensi		kolorektalni karcinom
		Juvenilna polipoza

Promenljivi faktori i karcinom kolona. Smatra se da faktori sredine, koji obuhvataju kulturološke i sociološke faktori, mogu imati snažan uticaj na nastanak i dalji razvoj KK. Literaturni podacaci ukazuju da je 70-80% svih KK uzrokovano nekim od faktora spoljašnje sredine. Etničke i rasne razlike, kao i studije o migracijama sugeriraju da faktori spoljašnje sredine mogu igrati važnu ulogu u etiologiji ove bolesti (15).

Ishrana je vrlo važan faktor u nastanku i napredovanju KK. Vrlo je teško izdvojiti poseban sastojak ili namernicu koja može biti odgovorna za nastanak, ali se globalno može reći da hrana bogata mastima i kalorijama pogoduje nastanku maligniteta kolona. Konzumiranje povrća i povrća dovodi do smanjenja rizika od nastanka karcinoma kolona zahvaljujući prisustvu biljnih vlakana, vitamina B6, folata, kalcijuma, antioksidanasa, selena i magnezijuma. Sa druge strane ishrana bogata crvenim mesom povećava rizik od nastanka KK zbog nastalih heterocikličkih amina u toku termičke obrade mesa (16).

Prekomerna telesna masa predstavlja značajan faktor rizika za nastanak kardovaskularnih bolesti i različitih malignih neoplazija. Epidemiološki podaci potvrđuju da povećanje telesne mase dovodi do porasta rizika od nastanka KK za 30-70% i to prvenstveno u populaciji muškaraca. Uočljiv je trend značajnijeg uticaja visceralne gojaznosti na nastanak kolon karcinoma u odnosu na subkutanu gojaznost (17).

Fizička aktivnost. Veliki broj dosadašnjih istraživanja upućuje na ulogu i značaj fizičke aktivnosti u prevenciji i razvoju malignih oboljenja. U svim istraživanjima zabeležen je pozitivan uticaj umerene fizičke aktivnosti na smanjenje incidence KK (18).

Pušenje i alkohol. Za razliku od karcinoma cerviksa gde je jasno definisana uloga nikotina i produkata iz duvanskog dima kod KK postoje nedovoljno jasni podaci, ali se globalno može reći i da postoji povećani rizik za razvoj karcinoma kolona kod osoba koje su pušači. Svakako da se moraju uzeti u obzir, godine pušačkog staža i početak pušenja u ranijoj životnoj dobi. Dosadašnja istraživanja upućuju na značaj upotrebe iste konzumacije alkohola i nastanka malignih neoplazija kolona (19).

Nepromenljivi faktori i karcinom kolona. Godine predstavljaju najvažniji faktor rizika za obolevanje od KK. Vrlo su retki slučajevi obolevanja od ovog tipa maligniteta kod osoba mlađih od 40 godina. Istraživanja pokazuju da se u četvrtoj i petoj deceniji života incidenca obolevanja značajno povećava, dok se nakon ovog perioda rizik eksponencijalno povećava za svaku sledeću dekadu života, sa naznakom da se 90% KK otkrije u osoba starijih od 50 godina (20).

Osobe sa pozitivnom porodičnom istorijom KK imaju veću verovatnoću da obole od ove vrste maligniteta dok članovi porodica sa specifičnim, retkim naslednim sindromima imaju značajno veći rizik za obolevanje.. Ovi sindromi uključuju: familijarnu adenomatoznu polipozu (FAP), Gardner-ov sindrom, nasledni nepolipozni kolorektalni kancer, juvenilni polipozni sindrom, Muir-Torre sindrom, MYH vezane polipoze, Peutz-Jeghers sindrom i Turcot sindrom. Smatra se da samo 5-10% KK ima naslednu osnovu, dok ostali nastaju sporadično (21).

Osobe obolele od inflamatornih bolesti creva, kao što su ulcerozni kolitis ili Kronova bolest, mogu razviti hroničnu inflamaciju debelog creva čime se povećava rizik za nastanak KK. Prisustvo crevnih polipa povećava rizik od pojave novih polipa ili KK. Pozitivna istorija KK, karcinomom ovarijuma ili uterusa može uticati na lakši razvoj KK (5).

1.1.4. Klasifikacija karcinoma kolona

Maligna transformacija epitelnih ćelija kolona odgovorna je za nastanak i razvoj karcinoma kolona. Kod većine ljudi KK se razvija sporo tokom perioda od 5 do 15 godina (22). Najpre nastaju benigni polipi, od kojih neki mogu preći kasnije u maligne karcinome. Verovatnoća prelaska polipa u karcinom zavisi od njegovog tipa, a u osnovi postoje tri tipa: adenomatozni polip, hiperplastični - inflamatorni polip i displazija (23).

Nakon stadijuma polipa, elije karcinoma po inju da se šire u slojeve zida kolona formiraju i maligni tumor. Daljim širenjem preko krvnih i limfnih sudova do udaljenih organa formiraju se metastaze. Postoji nekoliko tipova karcinoma koji mogu da nastanu i to:

1. adenokarcinomi – više od 95% KK su ovog tipa; formiraju se neoplasti nom transformacijom žlezdanih elija koje lu e mukus u lumen debelog creva,
2. karcinoidni tumori – nastaju od specijalizovanih elija creva koje lu e hormone,
3. gastrointestinalni stromalni tumori – nastaju u *Cajal*-ovim elijama kolona i mogu se na i bilo gde u digestivnom traktu,
4. limfomi – kanceri elija imunog sistema koji atipi no mogu da nastanu i u debelom crevu, kao i u drugim organima,
5. sarkomi – retki tumori koji nastaju u krvnim sudovima, miši nom i vezivnom tkivu debelog creva (23).

Prilikom dijagnostike karcinoma kolona vrši se podela na histološke tipove, graduse. Gradusi ozna avaju stepen dediferenciranosti karcinoma, ukazuju i na sli nost sa normalnim tkivom kolona gledano pod mikroskopom. Skala koja se koristi ide od G1 (dobro diferentovan, karcinom li i na normalno tkivo) do G4 (slabo diferentovan, karcinom ima abnormalan izgled). Odre ivanje stadijuma tumora se bazira na tome koliko duboko je maligna transformisano tkivo uraslo u zid creva, da li je zahvatio okolne strukture i da li se proširio na okolne limfne vorove i udaljene organe upotrebom AJCC/TNM klasifikacije (eng. *American Joint Committee on Cancer - AJCC*) (24).

1.2. Karcinom cerviksa

Karcinom cerviksa (KC) ima poseban zna aj u ginekološkoj onkologiji jer se naj eš e javlja u generativnom periodu kod žena, ine i ovaj tip maligniteta važnim zdravstveni problemom današnjice.

1.2.1. Epidemiologija karcinoma cerviksa

Karcinom cerviksa je tre i po u estalosti maligni tumor u svetu i ini 8.8% svih slu ajeva karcinoma u žena (25). Svake godine dijagnostifikuje se 400.000 novih slu ajeva obolelih žena od karcinoma cerviksa. Ve ina slu ajeva KC otkriva se u manje razvijenim regionima sveta (26), gde je prose na standardizovana stopa incidence 17.7 na 100,000 žena, što je skoro dvostruko više nego u razvijenijim regionima gde ona iznosi 9.1 na 100 000

žena. Sli no oboljevanju, najve i broj smrtnih slu ajeva od KC dešava se u manje razvijenim regionima, u kojima su uzrasno-standardizovane stope mortaliteta 2.8 puta više nego u razvijenim delovima sveta (25).

Srbija je 2002. godine imala najve u incidenciju KC u Evropi (27). Prema poslednjim podacima Globocan-a, Srbija je sada na petom mestu po incidenciji posle Rumunije, Makedonije, Bugarske i Litvanije (28). U Srbiji je KC, posle karcinoma dojke, na drugom mestu i ini u Vojvodini 7,2%, a u centralnoj Srbiji 8.7% svih novo-otkrivenih slu ajeva karcinoma u žena. Poslednjih godina vrh u oboljevanju od KC pomera se prema mla im starosnim grupama. Postoje velike razlike u oboljevanju i smrtnosti od KC i me u pojedinim regionima Srbije (8).

Opadanje u estalosti i smrtnosti je gotovo ograni ena na razvijene zemlje sveta, a zasluge se pripisuju redovnom skriningu i prevenciji ove bolesti (29). Sa druge strane neophodno je sagledati i promene u izloženosti polno prenosivih bolesti.

1.2.2. Molekularni mehanizmi nastanka karcinoma cerviksa

Infekcija humanim papiloma virusima (HPV) sa srednjim i visokim onkogenim potencijalom je najvažniji pojedina ni etiološki faktor u patogenezi KC i njegovih prekursora (30). KC nastaje naj eš e u zoni transformacije u kojoj se kontinuirano odvija proces metaplazije. Najve i rizik od HPV infekcije poklapa se sa najve im nivoom metaplasti ne aktivnosti tj. periodom 18-30 godina starosti, a zatim postepeno opada. Oko 24% inficiranih visokorizi nim HPV tipovima je me u ženama izme u 20 i 24 godine i opada sa godinama starosti na 6% kod žena iznad 35 godina (31). Prevalenca inficiranih u populaciji razvijenih zemalja kre e se od 20% do 39.2% (32).

HPV su epitelotropni virusi i njihov životni ciklus je tesno povezan s diferencijacijom plo astih elija epitela cerviksa (33). U toku sazrevanja inficirane elije kre u se prema površini epitela produkuju i specifi ne faktore koji stimulišu stvaranje kapsidnih proteina, što rezultuje pojavom velike koli ine viriona. U toku ovog tipa infekcije u površnom sloju plo astog epitela može se zapaziti citopatski efekat virusa (34).

Dug period latencije, visoka prevalencija HPV i injenica da se proces maligne transformacije dogodi samo u jednoj od nekoliko hiljada inficiranih celija, ukazuje da je HPV infekcija potreban, ali ne i dovoljan uslov za mailgnu transformaciju elije. U toku brojnih ispitvanja prisustvo virusne DNK kod KC na eno je u više od 90% slu ajeva. Inkorporacija

virusne DNK u genom elija doma ina dovodi do fuzije virusne DNK i elijskih gena koji posledi no bivaju strukturno i funkcionalno izmenjeni. Sam put onkogeneze nije u potpunosti rasvetljen poznato je da najvažniju ulogu u ovom procesu imaju E6 i E7 proteini virusa koji se vezuju za tumor supresorne gene doma ina (35). Ovi geni odgovorni su za kodiranje proteina koji u estvuju u regulaciji rasta elije, spre avaju i malignu transformaciju. E6 protein se vezuje za p53 protein koji je važan regulator elijskog sazrevanja i diferencijacije. Nakon vezivanja za E6 protein p53 protein se razgra uje što omogu ava akumulaciju hromozomskih abnormalnosti, dok se sa druge strane, E7 protein vezuje za ciklin A, koji u estvuje u regulaciji prelaska elije iz G1 u S fazu elijskog ciklusa omogu avaju i na taj na in poreme aj eliskog rasta i gubitka kontrole rasta (36).

1.2.3. Faktori rizika za nastanak karcinoma cerviksa

Sproveden je veliki broj epidemioloških studija u cilju determinacije faktora koji uti u na etiologiju KC. Rezultati ve ine studija nisu pokazali bitne razlike izme u faktora rizika i histopatoloških tipova karcinoma cerviksa, dok je geografska komparacija 60 svetskih registara karcinoma pokazuje visok stepen korelacije izme u godina starosti pacijentkinja i stope incidence za pojavu skvamocelularnog i adenokarcinomi cerviksa (29). Ovakvi rezultati upu uju na postojanje sli nih faktora rizika za obe patološke vrste karcinoma cerviksa što je i potvr eno u istraživanju Brintona i saradnika (37). Primarni etiološki faktori u nastanku i razvoju KC baziraju se na epidemiološkim i molekularnim studijama u ijim osnovama se zapravo nalazi infekcija Humanim papiloma virusima.

Infekcija Humanim papilloma virusom. Infekcija Humanim papilloma virusom je najvažniji faktor rizika i neophodan uslov za nastanak raka grli a materice. HPV infekcija je klju na u etiologiji skvamoznog i adenokarcinoma cerviksa (38). Vreme odlaganja od infekcije HPV virusom do invazije KC može da iznosi i do 15 godina. Od ukupno 70 tipova HPV virusa, tipovi 16, 18,45 i 56 se karakterišu visokim onkogenim potencijalom i udruženi su sa 75% karcinoma cerviksa (39).

Delovi ovog virusa, koji pripada familiji *Papovavirida*, na eni su u 99.7% slu ajeva KC. Do danas je identifikovano više od 120 tipova Humanih papiloma virusa. Period inkubacije kre e se od nekoliko nedelja do više meseci. Smatra se da virus primarno inficira ili bazalne elije ili primitivne elije nezrelog plo asto-slojevitog epitela, koje li e na bazalne elije, ulaze i u sluzokožu ili kožu kroz mikroabrazije nastale u toku polnog odnosa (38).

Poznato je da infekcija različitim tipovima HPV ne nosi isti rizik za nastanak maligne transformacije. Zbog toga su anogenitalni tipovi HPV, na osnovu svoje specifične udruženosti sa pojedinim tipovima lezija, podeljeni na grupu virusa niskog onkogenog rizika (HPV tipovi 6, 11, 42, 43, 44) i grupu virusa visokog onkogenog rizika (HPV tipovi 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) (40).

Dug latentni period izme u inicijalne izloženosti HPV i razvoja KC, kao i činjenica da samo mali broj žena izloženih HPV infekciji zaista i dobije isti, ukazuje da, iako neophodna, HPV infekcija nije dovoljna za nastanak KC. Da bi HPV infekcija dovela do nastanka KC, ona mora perzistirati, za šta su neophodni i drugi faktori od kojih su najvažniji: sociodemografski faktori, pušenje i stil života, dugotrajna primena oralnih kontraceptiva, imunosupresiju i/ili genetski faktori (41).

Sociodemografski faktori. Incidenca KC se povećava sa godinama starosti u žena. Uvećanje zemalja incidenca ovog tipa maligniteta počinje da raste kod žena starosti između 30 i 35 godina, a svoj maksimum dostiže između 50 i 60 godina starosti. Oba histološka tipa karcinoma pokazuju isti obrazac zavisnosti pojave karcinoma i starosti žena (29). KC je zastupljeniji kod žena niskog socio-ekonomskog statusa i niskog stepena obrazovanja što se može objasniti povećanom stopom HPV infekcije (42).

Reproduktivnost i značaj polnih odnosa kao faktora rizika. Veliki broj spoljašnjih uticaja zajedno sa stilom života mogu imati značajnu ulogu kofaktora kada je u pitanju HPV infekcija i njena progresija. Životni stil i navike mogu doprineti povećanoj stopi seksualno prenosivih bolesti čime se značajno povećava rizik od HPV infekcije, a time i nastanak i razvoj karcinoma cerviksa. Žene koje u toku života imale dva ili više partnera imaju tri puta veći rizik za razvoj karcinoma od žena koje su imale samo jednog partnera. (43). Zabeležen je trend povećanog rizika KC kod žena koje su redovno koristile oralne kontraceptive. Rezultati istraživanja pokazuju povezanost između dugogodišnje upotrebe oralnih kontraceptiva (duže od 5 godina) i nastanka prevažno adenokarcinoma karcinoma cerviksa (42).

Pušenje kao faktor rizika. Pušenje duvana je faktor rizika za nastanak KC (44). Smatra se da su žene pušačice i izložene dva puta većem riziku za nastanak KC u odnosu na žene nepušačice, a metaboliti duvana, nikotin i kotinin, pronađeni su u tkivu cerviksa kod žena pušačica. Postoji više mehanizama delovanja pomoću kojih pušenje duvana ostvaruje važnu ulogu u nastanku i razvoju karcinoma cerviksa. Poznato je da pušenje smanjuje imuni odgovor prema HPV infekcijama na nivou Langerhansovih ćelija epitela cerviksa, dok sa

druge strane, nikotin i kotinin mogu dovesti do oštećenja DNA elija cerviksa i na taj na in dopriniti nastanku i razvoju maligniteta (45). Zabeležena je i povezanost pušenja sa visokim stepenom cervikalne intraepitelne displazije, kao i činjenica da se kod žena puša a eš e javljaju skvamocelularni karcinomi u odnosu na adenokarcinome (46).

Dijeta i gojaznost kao faktor rizika. Postoji vrlo malo dokaza o ulozi nutritivnih faktora u prevenciji ili nastanku KC. Dosadašnja istraživanja pokazuju suprotne rezultate koji se odnose na ulogu nutritivnih faktora u razvoju oba histolška tipa karcinoma cerviksa. Rezultati istraživanja koje su sprovedeli Lui i sar. upu uju da upotreba mikronutritijenata kao što su folna kiselina, vitamin A, C, E mogu imati protektivnu ulogu kada je karcinom cerviksa u pitanju (47), dok su druga istraživanja došla do suprotnih rezultata (48). Neophodno je napomenuti značajnu ulogu gojaznosti u nastanku cervikalnih maligniteta. Za razliku od skvamocelularnog karcinoma, adenokarcinomi cerviksa su udruženi sa poveanom gojaznoš u žena pogotovo u starijoj životnoj dobi i nakon dugog vremenskog intervala upotrebe oralnih kontraceptiva (49).

Genetski faktori rizika. Iako postoji mali broj istraživanja, dosadašnji rezultati upu uju na povezanost cervikalnih maligniteta i genetskih faktora. Ta na uloga genetskih faktora još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Nekoliko istraživanja upu uju na značaj HLA alela ili halotipova i invazivnosti cervikalnih karcinoma. Do sada najveće interesovanje je fokusirano na genotip HLA-D lokusa (50). Genetska predispozicija može biti udružena sa poveanim rizikom od KC. Polimorfizam tumor supresornih gena je povezan sa HPV perzistencom i progresijom do invazivnog karcinoma (40).

1.2.4 Klasifikacija karcinoma cerviksa

KC se razvija kroz niz promena epitela koje se nazivaju cervikalnim intraepitelnim neoplazijama (CIN). Za ove promene u prošlosti je korišćena terminologija displazija/karcinom in situ. Posle uvođenja Bethesda citološke klasifikacije, CIN se svrstavaju u jednu od grupa skvamoznih intraepitelnih lezija (SIL) (51).

Stadijum pre pojave lezija poznat je kao cervikalna intraepitelna neoplazija i može se javiti u vidu različitog stepena izmene elijske maturacije u epitelu cerviksa. Definitivna dijagnoza cervikalne intraepitelne displazije jedino može biti doneta biopsijom suspektne lezije i histopatološkom analizom. Prva je cervikalne citologije prvi put je započeto od

strane George Papanicolaou 1940. godine koji se bavio identifikacijom inicijalnih abnormalnosti epitelnih elija cerviksa. Postoji nekoliko sistema koji se koriste za klasifikaciju cervikalne citologije, a u osnovi su modifikacija originalnog sistema Papanicolaou-a (52).

Originalna klasifikacija obuhvata pet klasa koje su rangirane od normalnog do invazivnog karcinoma. Reagen sistem, predstavlja modifikaciju originalnog sistema koja je adaptirana od strane WHO (World Health Organization), gde su cervikalne promene podeljene na blage displazije, displazija srednjeg stepena, displazija teškog stepena i karcinom *in situ*. Richart klasifikacija se bazira na histopatološkim promenama i različitim stepenima cervikalne intraepitelne neoplazije (CIN I, CIN II i CIN III) (53). Bethesda sistem klasifikuje lezije na skvamozne intraepitelne lezije niskog (Low-grade SIL) i visokog stepena (High-grade SIL) (54).

Cervikalne intraepitelne neoplazije srednjeg i teškog stepena (CIN 2 i CIN 3) prethode većini invazivnih formi planocelularnog karcinoma. Adenokarcinomu grlišta materice prethodi adenokarcinom *in situ* koji se smatra prekursorom invazivne bolesti (55). Ta činjenica u slučaju adenokarcinoma *in situ* nije poznata, ali se zna da je znatno manja nego što je u slučaju CIN. To ukazuje da ova dva tipa lezija mogu imati sličnu ili istu etiologiju. Potvrda ove pretpostavke je nalaz HPV DNA, posebno tipa 18, u 63%-89% slučajeva adenokarcinoma *in situ*, kao i 80% slučajeva invazivnog adenokarcinoma (56).

1.3. Značaj apoptoze u nastanku i terapiji karcinoma kolona i cerviksa

Poremećaji u regulaciji ćelijske smrti su značajna komponenta za nastanak i razvoj malignih bolesti. Karakteristika nekih maligniteta je nedovoljna apoptoza, dok druge karakteriše preterana apoptoza. Nastanak karcinoma se može posmatrati kroz niz genetskih promena tokom kojih se normalna ćelija pretvara u malignu, dok je izbegavanje ćelijske smrti jedna bitna promena normalne ćelije koja je uzrokovana malignom transformacijom (57). Kerr i sar. su došli do značajne povezanosti između apoptoze i eliminacije malignih ćelija, hiperplazije i progresije tumora (58). Poznato je da smanjena apoptoza ili rezistencija ćelija ima vitalnu ulogu u karcinogenezi. Mehanizmi kojima ćelija potencijalno može da izbegne apoptozu uključuje: poremećaj ravnoteže proapoptotičkih i antiapoptotičkih proteina, smanjenu kaspaznu aktivnost i izmenjenu signalizaciju receptora smrti (59).

Danas se smatra da su poremećaji na nivou apoptoze značajni u patogenezi mnogih bolesti, od neurodegenerativnih poremećaja do malignih tumora. Jedna od najvažnijih karakteristika malignih ćelija jeste preživljavanje ćelije s oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih mutacija. Zdrave ćelije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravljavanja oštećenih mesta na DNK, a aktivacijom apoptoze sprečavaju deobu ćelije i umnožavanje mutiranih ćelija. Nakupljanje mutiranih ćelija može biti posledica aktivacije onkogeno, inaktivacije tumor-supresor gena, mutacije gena koji regulišu apoptozu ili poremećaja u procesu popravljavanja DNK (60).

1.3.1. Apoptoza kao mehanizam ćelijske smrti

Apoptoza, programirana ćelijska smrt, je dirigovana velikim brojem proteina neophodnih za funkcionisanje signalnih puteva ćelija karcinoma i vrlo je bitan proces u zaustavljanju nekontrolisane proliferacije ćelija (61). Sklonost pojedinih ćelija da uđu u apoptozu je pozitivno ili negativno regulisana različitim genima, koji su potencijalno deregulisani u malignim ćelijama. Na sam proces apoptoze jak uticaj može imati lokalno mikrookruženje karcinoma, koje se odlikuje velikom heterogenošću u oksigenaciji i ponudi hranljivih materija. Ćelijska osetljivost na apoptozu može značajno varirati između različitih karcinoma, pa čak i unutar istog (62).

Apoptoza se javlja u toku razvoja i starenja i kao homeostatski mehanizam odgovorna je za održavanje populacije ćelija u tkivima. Iako postoji širok spektar stimulusa i uslova, fizioloških i patoloških, koji mogu izazvati apoptozu, ne sve ćelije reaguju na isti način u toku odgovoru na stimulus. Zračenje ili lekovi koji se koriste u hemioterapiji rezultiraju oštećenjem DNK u nekim ćelijama, što može dovesti do apoptotičke smrti preko p53-zavisnog puta. Neki hormoni, kao što su kortikosteroidi, mogu dovesti do apoptotičke smrti ćelije, iako su druge ćelije nepromenjene, pa čak mogu biti i stimulisane (63).

Mehanizmi apoptoze su veoma složeni i uključuju energetski zavisnu kaskadu molekularnih događaja. Dosadašnja istraživanja pokazuju da postoje dva glavna apoptotička puta: spoljašnji, put receptora smrti i unutrašnji, mitohondrijalni put. Ova dva puta su međusobno povezana i učesnici jednog puta mogu uticati na drugi (64).

Apoptoza predstavlja aktivan i visokoučestan proces u kojem ćelija prolazi kroz niz morfoloških promena. Tipični događaji u procesu apoptoze su promene na nivou ćelijske

membrane, premeštanje molekula fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu elijske membrane, unakrsno povezivanje proteina i smanjenje zapremine elija, kondenzacija hromatina, cepanje jedarne DNK i formiranje velikih citoplazmatičnih vezikula koja se otkidaju sa elijske površine (65). Fagociti uklanjaju nastala apoptotička tela pri čemu nema pojave inflamatorne reakcije u okolnom tkivu. Poremećaj regulacije ovog složenog procesa vodi ka pojavi različitih oboljenja kao što su maligne, autoimune i degenerativne bolesti (63).

Apoptoza je koordinisan, energetski zavisian proces, koji podrazumeva aktiviranje grupe cistein proteaza (kaspaza) i kaskadu događaja koji povezuju pokretne signale i smrt. Kaspaze su glavni igrači kada je elijska smrt u pitanju. One primaju signal koji je neophodan za pokretanje apoptoze. U toku procesa apoptoze odvija se niz promena na nivou elije (66). Sve kaspaze imaju sličnu hemijsku strukturu, tri karakteristična domena: NH₂-terminalni peptid, veliku subjedinicu (20 kD) i malu subjedinicu (10 kD). Kaspaze su eksprimirane u vidu prokaspaza, a cepanje subjedinic je znak aktivnog procesa apoptoze u elijama (67).

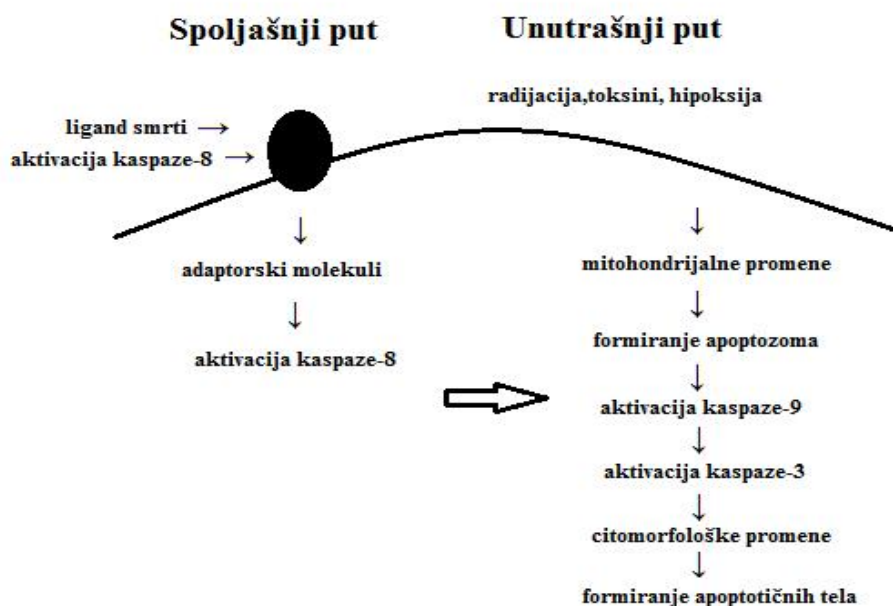
Tačan mehanizam delovanja kaspaza još uvek nije u potpunosti razjašnjen. U toku procesa apoptoze kaspaze mogu ostvarivati direktnu i indirektnu aktivnost. Direktna aktivnost kaspaza se ogleda u sposobnosti da deluju na integritet elijske strukture (68), dok je inhibicija proteina koji promovišu elijski rast i preživljavanje posledica indirektno kaspazne aktivnosti. U okoviru ovih proteina spada i familija Bcl-2 proteina sa direktnim apoptotičkim delovanjem (69).

Kaspaze se nalaze u obliku proenzima u elijskoj citoplazmi, a mogu se aktivirati autokatalitički ili drugom kaspazom. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cepanja. Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu. Centralnu ulogu u ovom procesu ima kaspaza 3. Tokom apoptoze kaspaza 3 je odgovorna za postepenu razgradnju velikog broja elijskih proteina, fragmentaciju DNK i kondenzaciju hromatina (70). Aktivacijom kaspaze dolazi do izvršenja procesa apoptoze. Postoje dva osnovna puta aktivacije kaspaza, spoljašnji i unutrašnji. Proces apoptoze može biti iniciran putem specifičnih receptora, članova familije faktora tumorske nekroze (TNF). Sa druge strane apoptotički put se dešava i na nivou mitohondrija. Pod uticajem različitih faktora, ove elijske organele mogu da otpuste citohrom c u citoplazmu elije. Ovako oslobođeni citohrom C je potencijalni aktivator efektornih kaspaza (71).

Unutrašnji put aktivacije kaspaza uključuje signale koji potiču iz unutrašnjosti elije, a koji nastaju usled različitih oštećenja u pojedinim organelama elije. Centralno mesto u

ovom putu imaju mitohondrije kod kojih dolazi do tranzitorne promene potencijala membrane pratećeg povećanja propustljivosti za male molekule. Jedan od molekula koji napušta mitohondrije je i citohrom c (*Cyt c*), koji se vezuje za citoplazmatski protein APAF-1 (engl. *apoptosis protease activating factor-1*) dovodeći do njegove konformacione promene, omogućavajući i na taj način aktivaciju kaspaze 9. Kaskada ovih događaja ima za posledicu dalje aktiviranje efektorne kaspaze 3, što konačno vodi ćeliju u smrt (72).

U ranoj fazi apoptoze spoljašnja membrana mitohondrija postaje propustljiva za proteine, što dovodi do otpuštanja rastvorljivih intermembranskih mitohondrijskih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala što može poslužiti kao pokazatelj ranih apoptotičkih promena u *in vivo* uslovima. Važnu ulogu u modulaciji apoptotičkog procesa imaju i inhibitorni proteini apoptoze, koji sprečavaju apoptozu direktnim blokiranjem kaspaza (73). Spoljašnji i unutrašnji put konvergiraju ka istom putu egzekucije (Slika 1.).



Slika 1. Šematski prikaz spoljašnjeg i unutrašnjeg puta apoptoze, preuzeto i adaptirano iz Newsheena S i sar. *Exp Oncol* 2012.

Shvatanje da se smrt ćelije isto pojavljuje kao deo aktivnog, programiranog procesa značajno je promenilo razumevanje kako razvoja, tako i tretmana malignih bolesti. Smrt ćelije se danas isto posmatra i kao modalitet od strane ćelije koja je nepovratno oštećena ili je postala potencijalno opasna zbog aktiviranja onkogena koji podstiče rast.

Apoptoza predstavlja moćan i važan elijski odbrambeni mehanizam protiv razvoja karcinoma. Zato se gubitak apoptotičke osetljivosti smatra jednim od obeležja karcinoma. (74).

1.3.2. Defekti u procesu apoptoze i njihova uloga u nastanku i terapiji karcinoma kolona i cerviksa

Nastanak i razvoj karcinoma su primer gde su normalni mehanizmi regulacije elijskog ciklusa izmenjeni, bilo zbog preterane proliferacije elija i/ili smanjenog uklanjanja elija karcinoma (72). Smatra se da suzbijanje apoptoze tokom karcinogeneze igra centralnu ulogu u razvoju nekih vrsta karcinoma (75). Postoji niz molekularnih mehanizama koj elije karcinoma koriste za suzbijanje apoptoze. Poremećen nivo apoptoze i promene u proliferaciji imaju značajnu ulogu u patogenezi karcinoma. Jedna od najvažnijih karakteristika malignih elija jeste preživljavanje elije s oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih mutacija. Zdrave elije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravljavanja oštećenih mesta na DNK, a aktivacijom procesa apoptoze sprečavaju deobu elije i umnožavanje mutiranih erki elija (60).

Ugrožena elija može aktivirati različite puteve apoptotičke smrti kako bi osigurala samouništenje. Kaspaza-nezavisna smrt elije odvija se znatno sporije od kaspaza-zavisne apoptoze. Kaspaza-zavisna apoptoza je najefikasnija i najbrža, ali ukoliko je zbog mutacija, genetskih manipulacija i inhibicija poremećena, elija može pokrenuti apoptotsku smrt nezavisnu od kaspaza (76).

NF- κ B, Bcl-2 i Bax vrlo su značajni markeri apoptotičke aktivnosti elije. NF- κ B igra mnogobrojne uloge u postavljanju granice između inflamacije i razvoja karcinoma jer je aktivacija ovog transkripcionog faktora jedan od glavnih regulatornih koraka u anti-apoptotičkoj aktivnosti elija karcinoma (77). Supresija NF- κ B u elijama karcinoma dovodi do inhibicije proliferacije, prekida elijskog ciklusa što rezultuje apoptozom čime se potvrđuje ključna uloga ovog transkripcionog faktora u elijskoj proliferaciji i adekvatnom odgovoru na citostatski tretman i zračenje terapiju (78).

Permeabilnost mitohondrijalne membrane regulisana je nivoom proapoptotičkih i antiapoptotičkih članova Bcl-2 familije. Ukupan učinak inak se oslobađanjem proapoptotičkih faktora iz mitohondrija i potencijalno dovodi do gubitka mitohondrijalne

funkcije. Smatra se da je glavna biološka uloga Bcl 2 proteina u inhibiciji procesa apoptoze rezultat njegove sposobnosti da se vezuje za Bax protein i heterodimerizacija neutralizacija njegovog proapoptotičnog delovanja (79).

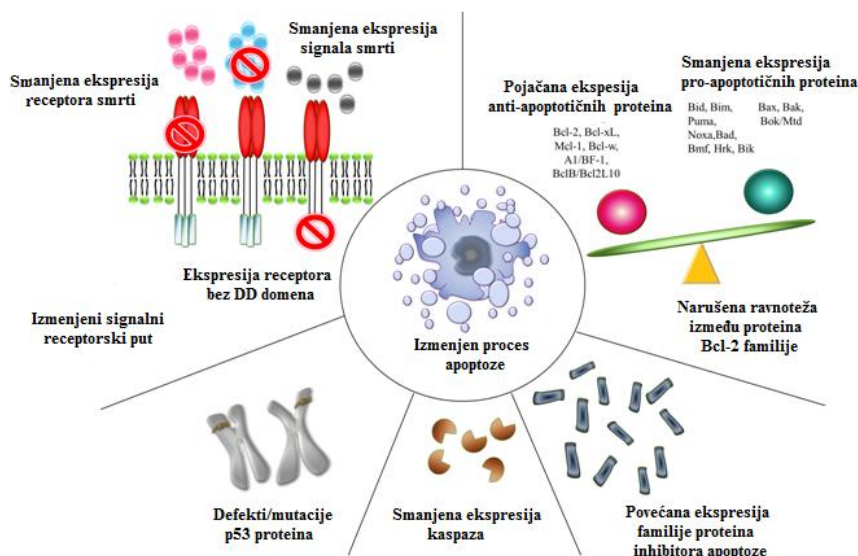
Odnos proapoptotičkih i antiapoptotičkih homodimera i heterodimera vrlo je bitan i utiče na tok ćelijske reakcije prilikom dejstva različitih apoptotičkih stimulusa (80). Povećana ekspresija Bcl-2 može usporiti ćelijski rast, izrazito povećana ekspresija dovodi do promocije ćelijske smrti dok smanjena Bcl-2 ekspresija dovodi do inhibicije apoptoze u ćelijama humanih karcinoma (81).

Ometanje unutrašnjeg puta je karakteristično za maligno transformisane ćelije jer su proapoptotički Bcl-2 proteini inaktivisani u većini karcinoma. Mutacije ili promenjena ekspresija Bcl-2 proteina drastično može promeniti senzitivnost ćelija karcinoma prema primenjenoj terapiji (82).

Drugi metod koji maligne ćelije koriste za suzbijanje apoptoze podrazumeva izbegavanje imunog nadzora (83). Određene ćelije imunog sistema (T-ćelije i ćelije prirodne ubice) normalno uništavaju ćelije tumora putem perforin/granzim B puta ili preko puta receptora smrti. Da bi izbegle imunsku destrukciju, neke ćelije karcinoma pokušavaju smanjiti odgovor puta receptora smrti na FasL koji proizvode T-ćelije. Ovo je pokazano da se dešava na različite načine, uključujući i smanjenu ekspresiju Fas receptora na ćelijama karcinoma. Drugi mehanizmi uključuju ekspresiju nefunkcionalnog Fas receptora, ali i visokog nivoa rastvorljivog oblika Fas receptora koji može blokirati Fas ligand ili ekspresija Fas liganda na površini tumorskih ćelija (84).

Promene na nivou različitih ćelijskih signalnih puteva mogu dovesti do deregulacije apoptoze i rezultirati razvojem i/ili napredovanjem maligne bolesti. Najčešće mutirani gen u humanoj tumorogenezi je p53 tumor supresor gen. Ključna uloga p53 je evidentna iz činjenice da je mutiran u preko 50 % od svih humanih malignih bolesti. p53 može da aktivira proteine DNK repara, kada je DNK pretrpela štetu, može zadržati ciklus ćelija u G₁/S regulatornoj fazi i može pokrenuti apoptozu ako se pokaže da je oštećenje DNK nepopravljivo. U slučaju poremećaja ovog sistema može doći do tumorogeneze (85).

Uloga različitih signalnih puteva u deregulaciji apoptoze prikazana je na Slici 2. Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptičkih i antiapoptičkih mitohondrijalnih proteina Bcl-2 porodice ili da indukuje gene koji povećavaju produkciju reaktivnih kiseoniknih vrsta, koji su snažni aktivatori apoptoze (86).



Slika 2. Uloga različitih signalnih puteva u deregulaciji apoptoze, preuzeto i adaptirano iz Wong RS, J Exp Clin Cancer Res 2011.

Defekti u procesu apoptoze utiču na tumorigenezu i rezistenciju na lekove što može rezultirati neuspesnom terapijom karcinoma. Razumevanje i molekularne događaje koji dovode do lekom izazvane apoptoze i mehanizama izbegavanja apoptoze od strane ćelija karcinoma potencira ulogu i značaj genetike samog karcinoma u odgovarajućem farmakoterapijskom pristupu (87).

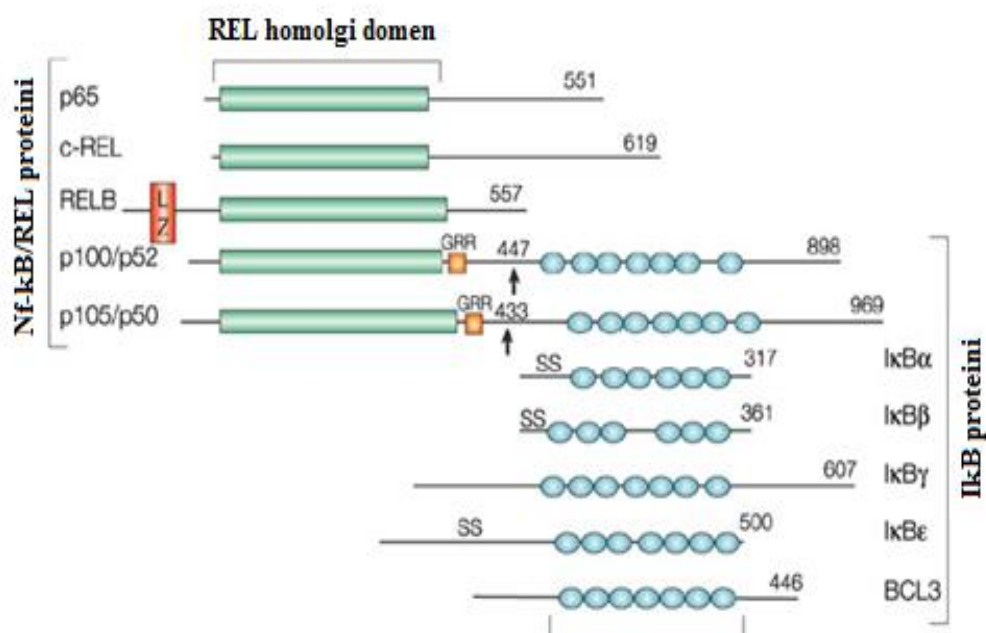
Saznanje da potenciranje apoptoze doprinosi antitumorskoj aktivnosti hemoterapeutika upućuje nas na potencijalni put razvika urođene rezistencije na lek. Ćelije karcinoma ćelije su primorane da izdrže veliki broj strukturnih i metaboličkih promena. Takođe, da bi dalje napredovala one moraju biti spremne da izbegnu ili zaobiđu imuni odgovor domaćina. Zato izmenjena ekspresija proteina koji učestvuju u procesu programirane ćelijske smrti može omogućiti ćelijama karcinoma da prežive ili da razviju rezistenciju na primenjeni hemoterapeutik (88).

1.3.3. Uloga NF- κ B u apoptozi ćelija karcinoma kolona i cerviksa

NF- κ B je zajednički naziv za familiju transkripcionih faktora uključenih u regulaciju brojnih fizioloških procesa. Ova familija sadrži pet gena: NF-B1 (p50/105), NF-B2 (p52/100), RelA (p65), c-Rel i RelB (89). Ovih pet gena odgovorni su za sedam proteina koji dele Rel homologni domen (RHD) u svojoj sekvenci. RHD posreduje u njihovoj dimerizaciji i

interakciji sa specifičnim inhibitorima i/ili DNK mestima za vezivanje. U većini slučajeva NF- κ B dimeri su lokalizovani predominantno u citoplazmi i transkripcijski su neaktivni zbog postojanja interaktivne veze sa inhibitorima. Rel A, Rel B i c-Rel se sintetišu u zreom obliku i sadrže transkripciono aktivni domen. Različiti okidači i stres faktori poput citokina ili faktora rasta mogu biti odgovorni za aktivaciju NF- κ B. Pojačana ekspresija različitih receptora rasta takođe mogu biti odgovorni za aktivaciju ovog transkripcionog faktora (90).

NF- κ B proteini uključuju one koji ne zahtevaju proteolitičko procesuiranje i one koji zahtevaju proteolitičko procesuiranje (Slika 3.). Prvu grupu čine: Rel A (p65), c-Rel i RelB dok se u drugoj grupi ubrajaju: NF- κ B1 (p105) i NF- κ B2 (p100). Ove dve grupe proteina dimerizuju i najčešće su detektovani NF- κ B p50-relA (91).



Slika 3. Šematski prikaz strukturalnih karakteristika NF- κ B proteina i inhibitornih I κ B, preuzeto i adaptirano iz Oeckinghaus A i sar, Cold Spring Harb Perspect Biol 2009.

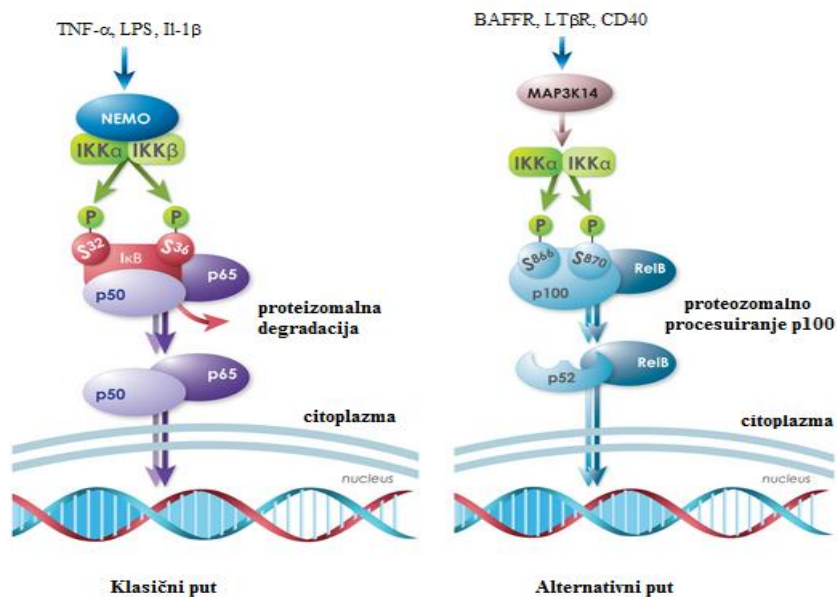
Transkripcioni faktor NF- κ B je otkriven 1986. godine u okviru istraživanja Blijaja. Istraživanja su pokazala da proteini koji omogućavaju ovo specifično delovanje i vezivanje za DNK su izraženi u mnogim ćelijama regulišu i stvaraju niz ciljnih gena. Kompleksnost sistema transkripcije uvećava činjenicom da različiti NF- κ B dimeri imaju različite afinitete za odgovarajuća mesta na DNK sekvenci za vezivanje. Pored toga NF- κ B subjedinice sadrže i mesta za fosforilaciju i druge post-translacione modifikacije koje su važne za aktiviranje drugih signalnih puteva (92).

Funkcija Rel/ NF- κ B familije proteina strogo je povezana sa ciljnim genima koji sadrže odgovarajuće elemente za protein. Aktivacija NF- κ B uključuje translokaciju NF- κ B proteina iz jedra. Dvostruka uloga NF- κ B u aktivaciji ili inhibiciji apoptoze i ćelijske smrti privukla je pažnju u pogledu svoje uloge u toku procesa karcinogeneze. Uloga NF- κ B u ćelijskom preživljavanju udružena je sa njihovom sposobnošću u ushodne regulacije ekspresije myc-a. Myc je protein koji posreduje u transkripcionalnoj aktivaciji ciklina A i ciklina D3 koji su važni regulatori ćelijskog ciklusa. Smanjenje koncentracije myc proteina povezano je sa apoptozom (93).

U većini ćelija, NF- κ B dimeri se predominantno nalaze u citoplazmi vezani sa inhibitornim jedinicama i tada su transkripcioni neaktivni. Inhibitori NF- κ B (I κ B β , I κ B α , I κ B γ i Bcl-3) obuhvataju familiju proteina koji sadrže anikrin ponavljanja, neophodna za interakciju sa RDH domenima NF- κ B proteina. I κ B β , I κ B α , I κ B γ interaguju sa dimerima ovog transkripcionog faktora i odgovorni su za njihovo zadržavanje u citoplazmi ćelije. Bcl-3 je jedinstveni tip inhibitora jer sadrži transkripcioni domen i može interagovati sa p50 i p52 homodimerima, osstvaruju i na taj način ulogu transkripcionog koaktivatora (94).

Poznata su dva puta aktivacije NF- κ B, klasični i alternativni (Slika 4.). Klasični put aktivacije obično je rezultat odgovora na mikroorganizme ili delovanja proinflammatory hemokina koji aktiviraju kompleks, a kao rezultat delovanja dolazi do razgradnje inhibitorne jedinice kompleksa. U klasičnom putu ekscitatorni signali su posredovani Toll-like receptorima, Interleukin-1 receptorima, receptorima faktora nekroze tumora. Ovaj put se pokreće od strane virusne, bakterijske infekcije ili proinflammatory citokina. Aktivacija klasičnog puta vodi do inducibilne I κ B degradacije i translokacije NF- κ B kompleksa do jedra, predominantno p50/RelA dimera (95).

Alternativni put aktivacije dovodi do selektivne aktivacije p50: RelB dimera indukcijom p100 prekursora proteina, dok je alternativni put aktivacije bitan za razvitak limfoidnih organa i stečenog imunog odgovora. Aktivacija alternativnog puta NF- κ B potiče od različite klase receptora uključujući i faktor aktivacije B ćelija, limfotoksin β -receptore i/ili CD40. Posledica niza ovih reakcija dovodi do aktivacije NF- κ B putem indukcije kinaza što dovodi do fosforilacije i predominantne IKK α (96).



Slika 4. Šematski prikaz klasičnog i alternativnog puta aktivacije NF- κ B, preuzeto i modificirano iz Fu J i sar, Blood 2011.

Klasični i alternativni put aktivacije NF- κ B se fundamentalno razlikuju na određenim nivoima elijske signalizacije. Pojedini stimulusi koji aktiviraju alternativni put mogu dovesti do aktivacije i klasičnog puta, dok je obrnuti tok dokačaja vrlo redak. Novija istraživanja upućuju na činjenicu da aktivacija alternativnog puta za NF- κ B aktivaciju zapravo dovodi do olakšavanja aktivacije klasičnog puta (97).

U normalnim, maligno netransformisanim ćelijama, NF- κ B dimeri se obično nalaze kao latentni kompleksi u citoplazmi vezani za I κ B proteine. Abnormalna i konstitutivna aktivacija NF- κ B uočena je u brojnim solidnim i hematološkim karcinomima ljudi. Uloga ovog transkripciona faktora ogleda se u okviru regulacije procesa apoptoze, angiogeneze, invazivnosti karcinoma, regulaciji elijskog ciklusa maligno transformisanih ćelija, indukciji hemorezistencije i zračne terapije. Brojne studije pokazale su antiapoptotiku ulogu NF- κ B u normalnim i malignim ćelijama. Poznato je da NF- κ B inhibira apoptozu indukcijom antiapoptotičkih proteina i supresijom proapoptotičkih gena (98). Uočena konstitutivna aktivacija NF- κ B u ćelijama karcinoma štiti tumorsku ćeliju od delovanja apoptotičkih stimulusa uključujući i citostatski tretman (99).

Molekularni mehanizmi aktivacije NF- κ B u toku patogeneze karcinoma još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. Oba puta, klasični i alternativni, vrlo su regulisana od strane pozitivnih i negativnih signalnih faktora. Bilo kakvo narušavanje ravnoteže između u ovih

pozitivnih i negativnih signalnih faktora rezultova e smanjenom ili pove anom aktivnoš u ovog transkripcionog faktora. U elijama pojedinih karcinoma jasno je definisan uzrok konstitutivne aktivnosti NF- κ B kao posledice alteracije lanova NF- κ B i njihovih inhibitornih proteina. U ve ini slu ajeva, neregulisana NF- κ B aktivnost pripisuje se ushodnoj regulaciji pozitivnih regulatora i/ili inaktivaciji negativnih regulatora IKK/ NF- κ B signalizacije (99).

Neregularnost na nivou klasi nog i/ili alternativnog puta NF- κ B signalizacije su važni koraci u razvoju karcinoma. Kao transkripcioni faktor, NF- κ B je uklju en u okviru svih faza tumorogeneze, od inicijacije do metastaziranja, regulacijom ekspresije odre enih gena. Uloga NF- κ B u toku procesa tumorogeneze je vrlo kompleksna i dinami na. U toku inicijacije tumora, NF- κ B je aktiviran u premalignim elijama i elijama iz njihovog okruženja u cilju ekspresije citokina i pokretanja niza imunih reakcija (100).

Aktivirane elije imunog sistema, proizvode velike koli ine proinflamatornih citokina, hemokina, faktora rasta kao posledica aktivacije ovog transkripcionog faktora. Ovako sekretovani citokini, faktori rasta i drugi biološki aktivni molekuli deluju na maligne i inflamatorne elije sa ciljem pokretanja njihove autokrine i/ili parakrine funkcije, stvaraju i inflamatorne komplekse i pro-tumorigeno mikrookruženje (99).

Inflamacija posredovana NF- κ B aktivacijom ogovorna je za DNK ošte enja i indukciju onkogenih mutacija u pre-malignim elijama i ostavljuje se aktivacijom klasi nog i/ili alternativnog NF- κ B signalnog puta. Aktivacija NF- κ B signalnog puta od strane citokina, faktora rasta, inflamatornih faktora i slobodnih radikala dolazi do regulacije transkripcije gena uklju enih u procese elijskog preživljavanja, proliferacije, angiogeneze, invazije i metastaze, promocije i progresije karcinoma (101).

Inflamacija je proces u toku koga prirodni imunitet odgovara na fizi ki, fiziološki i oksidativni stres i udružena je sa aktivacijom klasi nog NF- κ B signalnog puta. Aktivacija NF- κ B je deo odbrane imunog sistema u cilju eliminacije transformisanih elija. NF- κ B je konstitutivno aktiviran u velikom broju elija karcinoma uklju uju i karcinom kolona i cerviksa. Zato je vrlo važna aktivnost ovog transkripcionog faktora u preživljavanju elija karcinoma (102).

Literaturni podaci upu uju da postoji povezanost hroni nih inflamatornih procesa i povišenih nivoa NF- κ B aktivnosti (103). injenica da konstitutivna aktivacija NF- κ B rezultuje pro-karcinogenim efektom opravdava postojanje ve eg rizika za obolevanje od

karcinoma imunosuprimiranih pacijenata. NF- κ B aktivacija obično dovodi do ušodne regulacije apoptotičkih gena i obezbeđuje preživljavanje ćelije u toku delovanja fiziološkog stresa izazvane inflamacijom. Pored svoje uloge u prirodnom imunitetu NF- κ B signalizacija je kontrolisana velikim brojem ćelularnih procesa uključujući i proliferaciju i apoptozu. Uopšteno govoreći inflamacija i NF- κ B aktivacija usko su povezani i inicijaciji i progresiji karcinoma (102).

NF- κ B je vrlo važan ćelijski signalni put transdukcije. Veliki broj literaturnih podataka pokazuje da aktivacija ovog transkripcionog faktora ima vrlo odgovornu ulogu u razvoju rezistencije karcinoma na jonizujuće zračenje i primenjen citostatski tretman (104). Ovo se potencijalno može objasniti činjenicom da monoklone hemoterapeutske agense i jonizujuće zračenje aktiviraju NF- κ B putem puteva aktivacije, indukcijom DSB-a (DNA double-strand breaks) (105).

Aktivacija inhibitornih subjedinica ovog transkripcionog faktora odgovorno je za razvoj rezistencije na primenjenu terapiju velikog broja različitih ćelija karcinoma posredno indukcijom antiapoptotičkih proteina (106). Zato je inhibicija NF- κ B postalo vrlo interesantno područje istraživanja u cilju poboljšanja odgovora ćelija karcinoma na ekspoziciju hemioterapeutskih agenasa i zračenja terapije.

1.3.4. Bcl-2 familija proteina u apoptozi karcinoma kolona i cerviksa

Otkriće Bcl-2 gena, 1984. godine, Bcl-2 familija proteina postaje posebno istraživana oblast zbog izuzetnog značaja molekularno-bioloških mehanizama koji su povezani i uključeni u procesu apoptoze ćelija. Prvootkriveni član Bcl-2 familije gena bio je antiapoptotički protoonkogen Bcl-2 (107).

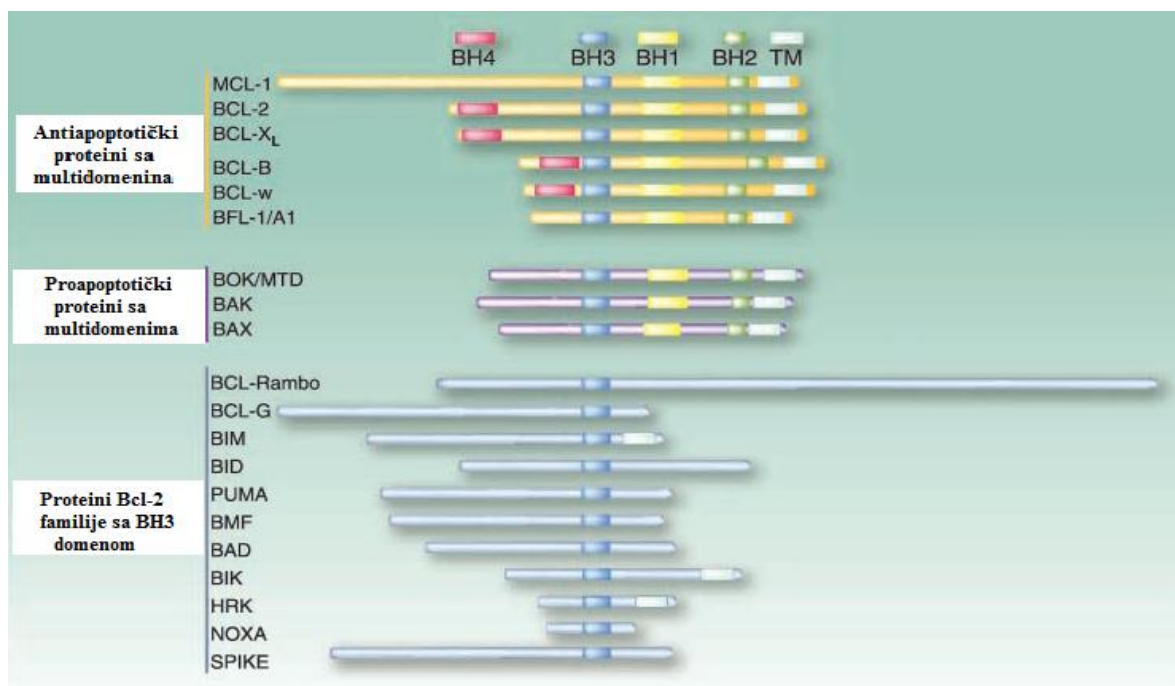
Bcl-2 familija proteina igra centralnu ulogu u regulaciji ćelijske smrti jer su članovi ove porodice sposobni da regulišu različite mehanizme ćelijske smrti u okviru procesa apoptoze, nekroze i autofagije. Promene u ekspresiji i funkciji proteina Bcl-2 familije značajno doprinose patogenezi i progresiji humanih karcinoma, i otvaraju novi vidici za otkrivanje ciljane terapije karcinoma. Postoji veliki broj istraživanja koji ukazuju na značaj regulacije gena koji učestvuju u kodiranju antiapoptotičkih i proapoptotičkih proteina Bcl-2 familije u toku nastanka, razvoja i progresije karcinoma (108).

Defekti u ekspresiji proapoptičkih članova Bcl-2 porodice jedna su od karakteristika elija karcinoma. Posledica izmenjene ekspresije proapoptičkih proteina rezultira gubitkom funkcije p53. Povećana ekspresija Bcl-2 proteina i antiapoptičkih članova ove porodice odgovorni su za inhibiciju elijske smrti indukovane od strane faktora rasta, hipoksije ili oksidativnog stresa. Sposobnost antiapoptičkih proteina da suzbiju elijsku smrt u toku delovanja različitih citotoksičnih agenasa karakteriše ovu grupu proteina kao potencijalno važna mesta sa otkrićem novih pristupa u farmakoterapiji karcinoma (109). Bcl-2 proteini su vrlo važni u potenciranju procesa elijske smrti prilikom delovanja različitih citostatika gledano sa aspekta hemorezistencije na primenjeni tretman. Ovakva zapažanja objašnjavaju zašto se veliki broj članova Bcl-2 porodice smatra važnim prognostičkim parametrom u velikom broju humanih karcinoma (110).

Proteini Bcl-2 porodice dele se na proapoptičke (Bad, Bax, Bak i Bok) i antiapoptičke proteine (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1) (86). Proapoptički proteini prisutni su u citosolu kao senzori elijskog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptički proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Svi članovi Bcl-2 porodice sadrže najmanje jedan od četiri homologična domena. Antiapoptički članovi Bcl-2 porodice sadrže BH1, BH2, BH3 i BH4 domene, dok proapoptički proteini sadrže BH1, BH2, BH3 (111). Poznato je da antiapoptički i proapoptički proteini Bcl-2 porodice dele istu trodimenzionalnu proteinsku osnovu (112).

BH domeni se karakterišu odgovarajućim α -heliksnim segmentima koji su odgovorni su za strukturu i funkciju Bcl-2 porodice proteina. Sposobnost Bcl-2 proteina da međusobno interaguju je važan segment u ostvarivanju funkcije ovih proteina. BH1, BH2 i BH3 domeni antiapoptičkih proteina formiraju hidrofobne strukture koje se vezuju za hidrofobne krajeve amfipatičnog α -heliksa BH3 domena proapoptičkog partnera za vezivanje (113).

Mutacione studije pokazuju da je prisustvo BH4 domena neophodno za ostvarivanje antiapoptičke funkcije Bcl-2 proteina. Uloga BH4 domena u regulaciji aktivnosti NF- κ B je takođe zabeležena (114). Klasifikacija članova Bcl-2 porodice na osnovu prisustva homologičnih domena prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Klasifikacija lanova Bcl-2 familije na osnovu prisustava homologih domena, preuzeto i adaptirano iz Danial NN. Clin Cancer Res 2007.

Homologi domeni odgovorni su za procese homodimerizacije i heterodimerizacije lanova Bcl-2 familije proteina (115). Zahvalju i ovim domenima, heterodimere mogu formirati i proteini sa suprotnim dejstvom na proces apoptoze (116). Antiapoptotiki delovanje Bcl-2 proteina zasniva se na mogu nosti da veže Bax protein u vidu heterodimera i tako onemogu i formiranje Bax/Bax homodimera. Tokom indukcije procesa apoptoze, homodimeri Bax proteina formiraju kanale na membranama mitohondrija. Putem ovih kanala, molekuli citohroma c napuštaju mitohondrije (117).

Proapoptotiki proteini prisutni su u citosolu kao senzori elijskog ošte enja ili stresa, dok se antiapoptotiki proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Odnos proapoptotikih i antiapoptotikih faktora odre uje osetljivost elija na apoptozu. Važno je naglasiti da taj odnos bitno odre uje odgovor tumorskih elija na zra enje i hemoterapiju.

Lanovi Bcl-2 familije regulišu broj i tip jonskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri emu Bad i Bax dovode do stvaranja ve ih jonskih kanala kroz koje izlaze citohrom C i drugi proapoptotiki molekuli. Otpušteni Cyt c veže se uz medijatorski molekul Apaf-1 koji aktivira kaspazu 9 (118). Cyt c, Apaf-1, kaspaza 9 i ATP zajedno u estvuju u

indukciji apoptoze. Osim Cyt c, mitohondrije sadrže i druge apoptotske faktore kao što su AIF (*engl. Apoptosis-Inducing Factor*) i endonukleaza G (117).

U ranoj fazi apoptoze spoljašnja membrana mitohondrija postaje propustljiva za proteine, što dovodi do otpuštanja rastvorljivih intermembranskih mitohondrijalnih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala što može poslužiti kao pokazatelj ranih apoptotičkih promena u *in vivo* uslovima. Tako e ulogu u modulaciji apoptotičkog procesa imaju i inhibitorni proteini apoptoze (IAP), koji spreavaju apoptozu direktnim blokiranjem kaspaza (119).

Bcl-2 protoonkogen je smešten na unutrašnjoj strani mitohondrijalne membrane. To je protein od 24 kD koji se sastoji se od 239 aminokiselina i lokalizovan je na dugom kraku 18-tog hromozoma. Ekspresija Bcl-2 gena je veća u tkivu fetusa nego kod odraslih, smatra se da je to u vezi sa morfoogenetskim promenama (120).

Bcl-2 gen reguliše elijski ciklus u fiziološkim uslovima, hiperplastičnom i neoplastičnom tkivu. Mutacija Bcl-2 gena registruje se u različitim neoplazmama, uključujući i limfome, karcinome i sarkome. U epitelu kolona normalno se Bcl-2 gen eksprimira u kompleksu elija lokalizovanom u bazi kripte. Njegovi antiapoptotički proteinski produkti štite matične elije od eliminacije i utiču na program diferencijacije. Terminalno diferencijovani enterociti gube ekspresiju Bcl-2 i pod uticajem proapoptotičkih pripadnika familije ulaze i u program samouništenja (121). Ovaj protoonkogen je pojačano eksprimira u pojedinim elijama karcinoma uključujući i karcinom kolona i cerviksa (122, 123).

Oltvai i sar. su identifikovali Bax, 21 kD protein, 1993. godine. Ovaj protein deli veliki stepen homologije sa Bcl-2 proteinom i u stanju je da se heterodimerizacijom sa Bcl-2 suprostavi njegovoj antiapoptotičkoj aktivnosti (124). Bcl-2 je značajno povećan u intraepitelnim lezijama, dok je povećana ekspresija Bax proteina zabeležena u skvamokarcinoma što potvrđuje značajnost ovih markera apoptoze u cervikalnim neoplazijama (125).

Bax gen je član Bcl-2 familije proteina sa proapoptotičkim karakteristikama pa je jasno da povećana ekspresija Bax proteina vodi eliju u apoptozu. Progresija karcinoma povezana sa ravnotežom između elijske smrti i proliferacije, uključujući medijatori ovih procesa su članovi Bcl-2 familije proteina. Bcl-2 i Bax su uključeni u proces kontrole apoptoze elija karcinoma cerviksa i međusobno kompetiraju formiranjem homodimera i/ili heterodimera (126).

Nakon prijema različitih signala proapoptotički članovi Bcl-2 familije se premeštaju iz citoplazme u mitohondrijalnu membranu. Formiranje dimera rezultuje otpuštanjem

citohroma c u citoplazmu, stvaranjem apoptozoma i aktivacije izvršnih kaspaza. Ovom putu mogu se suprostaviti antiapoptotički članovi Bcl-2 familije, najverovatnije heterodimerizacijom sa proapoptotičkim članovima. Komunikacija spoljašnjeg i unutrašnjeg puta ostvarena je putem cepanja Bid proteina. Tako nastali molekul Bida može stvarati homodimere ili se formirati heterodimere sa Bax ili Bak proteinima unutar mitohondrijalne membrane (127).

Apoptoza je genetski visoko regulisana vrsta ćelijskog umiranja. Glavne modulatore ćelijske smrti po tipu apoptoze predstavljaju proteini Bcl-2 familije. Predominantno prisustvo Bcl-2/Bcl-2 homodimera i/ili Bcl-2/Bax heterodimera u ćeliji uzrokuje inhibiciju procesa apoptoze. Suprotno tome, prisustvo Bax/Bax homodimera u višku indukuje proces apoptoze (128).

Sa funkcionalne tačke gledišta, Bax protein igra centralnu ulogu regulaciji programirane ćelijske smrti. Mehanizam delovanja ovog proapoptotičkog proteina zasniva se na direktnom uticaju i interakciji sa Bcl-2 proteinima čime se potencira proces apoptoze (129). Povećana ekspresija Bax proteina dovodi do izmenjene propustljivosti mitohondrijalne membrane i posledičnog oslobađanja citohroma c. Poznato je da Bax protein može dovesti do oslobađanja citohroma c i bez izmena na nivou mitohondrijalne membrane što potvrđuje da se proces apoptoze može aktivirati različitim putevima. Smatra se da su karcinomi sa smanjenom ekspresijom Bax proteina povezani sa oslabljenim apoptotičkim putevima što rezultira bržom progresijom karcinoma (130).

1.3.5. Uloga ciklooksigenaza u regulaciji procesa apoptoze

Hronična inflamacija je faktor rizika za nastanak karcinoma, ali tačan razlog još uvek nije poznat (131). Aberantno povećana ekspresija ciklooksigenaznih izoformi (COX-1 i COX-2) povezuje se sa malignom transformacijom zdravog tkiva, proliferacijom i povećanim invazivnim potencijalom malignog tkiva i nepovoljnim kliničkim ishodom. COX enzim je nepravilno regulisan u ćelijama karcinoma, a dosadašnja istraživanja upućuju na visok stepen značajnog ometanja metaboličkog puta u kome su uključene izoforme COX u karcinogenezi i progresiji tumora (132).

COX-1 je povećano ekspresirana u ćelijama karcinoma cerviksa i ovarijuma (133), dok se COX-2 u zdravom tkivu obično ne detektuju za razliku od značajno povišenih nivoa kod karcinoma kolona, pluća (134), prostate (135) i cerviksa (136), dojke (137). Povećana

COX-2 aktivacija udružena je sa povećanim malignim potencijalom u osnovi je rezultat NF- κ B aktivacije (138), jer je NF- κ B centralni medijator imunog odgovora ćelija karcinoma koji indukuje ekspresiju faktora rasta i angiogenetskih faktora udruženih sa indukcijom i progresijom karcinoma (139).

Prostaglandin E₂ i COX-2 stimulišu proces angiogeneze pojačavaju enzim VEGF (*eng. vascular endothelial growth factor*), koji posledično zbog pojačane sinteze potencira i razvoj metastaza. Tromboksan A₂ je proizvod eikosanoda koji takođe deluje kao aktivator angiogeneze, a njenu produkciju mogu da inhibiraju COX-2 antagonisti. Smatra se da je invazivnost karcinoma usko povezana sa povećanom produkcijom matriks metaloproteinaza i smanjenom ekspresijom tkivnog inhibitora metaloproteinaza. Dodatna uloga COX-2 u karcinogenezi ogleda se u njenoj ulozi u razgradnji arahidonske kiseline. Slobodnu arahidonsku kiselinu koju proizvodi fosfolipaza A₂, COX-2 prevodi u prostaglandine, lipooksigenaza (LOX) u leukotrijene, a enzim FACL4 (*engl. fatty acid CoA ligase 4*) je konjuguje pomoću koenzima A (140).

COX-2 može imati ulogu u različitim stadijumima progresije karcinoma, povećavanjem proliferacije izmenjenih ćelija i favorizovanjem promocije, utičući na programiranu ćelijsku smrt i efikasnost terapijskih protokola, zato nesteroidni antiinflamatorni lekovi mogu biti od velikog značaja u terapiji i hemoprevenciji karcinoma (141).

Saznanje da potenciranje apoptoze doprinosi antikancerskoj aktivnosti hemoterapeutika upućuje nas na potencijalni put razvitka urođene rezistencije na lek. Ćelije karcinoma primorane su da izdrži veliki broj strukturnih i metaboličkih promena. Da bi dalje napredovala ona mora biti spremna da izbegne ili zaobiđe imuni odgovor domaćina. Zato izmenjena ekspresija proteina koji učestvuju u procesu programirane ćelijske smrti može omogućiti ćelijama karcinoma da prežive ili da razviju rezistenciju na primenjeni hemoterapeutik (142).

1.4 Hemopreventivni aspekti terapije karcinoma kolona i cerviksa

1.4.1. Terapija karcinoma kolona i cerviksa

Citostatici su hemijska jedinjenja koja interferiraju sa elijskim metabolizmom, spreavaju i rast elije inhibicijom enzimskog delovanja, ošte enjem elijskog jezgra i/ili ko enjem elijske deobe. Prema osnovnoj nameni njihovo delovanje usmereno je na elije karcinoma i narušavanjem njihovog elijskog ciklusa spreavaju rast ili izazvaju smrt tih elija u fazi aktivnog rasta. U le enju karcinoma kolona i cerviksa naj eš e se primjenjuje pristup koje uklju uje hirurško le enje, terapiju citostaticima, radioterapiju i imunoterapiju, jer se potpuni terapijski efekat vrlo može posti i primjenom samo jedne metode. Ve ina ovih lekova nije dovoljno specifi na samo za elije karcinoma što rezultuje ošte enjem i zdrave elije u toku citostatskog tretmana. Zato je u izboru najadekvatnijeg citostatskog tretmana vrlo važno sagledati farmakokineti ke osobine samog citostatika u cilju postizanja optimalnog farmakoterapijskog efekta sa najmanjim stepenom interakcija i neželjenih reakcija (143).

Terapija KK uslovljena je stadijumom i kategorizacijom same bolesti. Pored hirurške intervencije, koja se smatra metodom izbora, pacijenti se podvrgavaju hemioterapiji u cilju eliminacije preostalih, rasutih elija karcinoma i spreavanja progresije tumora (144). Postoji relativno mali broj odobrenih hemioterapeutika koji se koriste u farmakoterapiji KK, a njihova efikasnost dodatno je uslovljena stepenom progresije karcinoma (145).

Standardni izbor u terapiji uznapredovalog KK je 5-fluorouracil (5-FU) (146). U osnovi delovanja 5-FU jeste zaustavljanje progresije elijskog ciklusa i posledi na indukcija apoptoze. 5-FU je antimetabolit, fluoropirimidinski analog, koji se u organizmu konvertuje u brojne aktivne metabolite poput 5-fluoroksiuridin monofosfata, koji se umesto uracila ugra uje u iRNK i inhibira njeno procesovanje (147). elije KK pokazuju uro enu rezistenciju prema cisplatinu (CP) koji se smatra konvencionalnim hemioterapeutikom, zato se u terapiji karcinoma kolona koristi oksaliplatin, platinski kompleks slede e generacije (148).

Pored platinskih derivata u terapiji KK se može koristiti irinotekan hlorid. Radi se o hemijskom agensu koji svoj efekat ostvaruje u toku S faze, putem aktivnog metabolite, 7-etil-

10-hidroksil-kamptotecin (149). Monoklonska antitela, Cetuksimab i Bevacizumab, našli su svoje mesto u terapiji KK. Ovaj vid biološke terapije direktno ili posredno može uticati na progresiju KK (144). Terapija KK navedenim lekovima u vidu monoterapija retko daju o ekivanu efikasnost zato se farmakoterapijski pristup okre e ka kombinovanoj terapiji u cilju poboljšanja terapijskog odgovora na primenjene hemioterapeuike i smanjenje teških neželjenih reakcija primenjenih lekova (150).

Karcinom cerviksa je naj eš i malignitet genitalnog trakta kod žena. Le enje KC zavisi od stadijuma bolesti i podrazumeva hiruški tretman, terapiju zra enjem, hemoterapiju i/ili kombinovani pristup le enja ovog maligniteta. Terapija citostaticima je novi pristup u le enju KC. Veliki broj randomiziranih, multicentri nih studija pokušavaju da potpuno objasne ulogu, zna aj i korisnost terapije citostaticima daju i prednost derivatima platine. Ve ina referentnih centara kao osnovu farmakoterapijskih protokola u terapiji KC koristi cisplatin, jer je naj eš e evaluiran hemioterapijski agens u le enju KC (143).

Osnovni mehanizam delovanja derivata platine zasniva se na direktnoj indukciji apoptoze elija KC. Step en efikasnosti primenjene terapije karcinoma zavisi od stepena odgovora elija karcinoma na primenjen lek ili kombinaciju lekova. U okviru kombinovanih protokola cisplatin se može primenjivati zajedno sa bleomicinom ili vinkristinom. Kombinovani modaliteti onkološkog le enja esto su pra eni ve im komplikacijama pa iziskuju multidisciplinarni pristup u le enju (151).

elije KC teže da prežive razvijaju i rezistenciju na primenjeni citostatski tretman. Razvijanje rezistencije vodi do daljeg razvitka i progresije karcinoma. Pored direktne indukcije apoptoze, lekovi u terapiji KC svoj efekat potencijalno mogu ostvarivati i nekim alternativnim mehanizmima u cilju poboljšanja prvobitne terapije (152).

1.4.2. Definicija i opšte karakteristike hemoprevencije karcinoma

Razvoj karcinoma je dinami ki i dugotrajan proces koji uklju uje veliki broj kompleksnih faktora koji su neophodni u višestepenom procesu progresije, ultimativnog razvoja metastaza i nekontrolisanim rastom elija karcinoma (153). Hemoprevencija je relativno nova i obe avaju a strategija za prevenciju karcinoma koja se bazira na upotrebi prirodnih, dijeteskih suplemenata ili sintetskih supstanci koji blokiraju, inhibiraju, poništavaju ili usporavaju proces karcinogeneze (154).

Hemoprevencija je usko povezana sa molekularnim mehanizmima karcinogeneze u cilju razvijanja najefikasnijeg hemopreventivnog agensa. Veliki broj istraživanja je sproveden kako bi se potencijalno razjasnio mehanizam delovanja hemopreventivnih agenasa. Jasno je da ovi agensi, prirodnog ili sintetskog porekla, svoj hemopreventivni potencijal mogu ispoljavati na nekom od molekularnih procesa koji su ključni za malignu transformaciju ćelije. Termin hemoprevencija prvi put se pominje 1976. godine od strane Sporn i sar. (155) i definiše se kao korišćenje specifičnih agenasa u cilju zaustavljanja i/ili suzbijanja karcinogeneze. Sumiranjem dosadašnjih istraživanja iz oblasti hemije, biologije, patologije, farmakologije i epidemiologije dobijeni su rezultati koji potencijalno mogu objasniti mehanizam delovanja hemopreventivnih agenasa.

Danas su u fokusu molekularne osnove hemopreventivnih potencijala i njihovog uloga u ćelijskim signalnim putevima karcinoma. Evaluacija dobijenih *in vitro* rezultata o ulozi hemoprevencije bila bi od velike koristi u terapiji karcinoma uzevši u obzir veliki stepen razvoja rezistencije i individualnosti u odgovoru ćelija karcinoma na primenjeni citostatski režim (156).

Idealni hemopreventivni agens trebao bi da bude selektivan prema oštećenoj ili transformisanoj ćeliji pokazujući i visok stepen biorasploživosti na ciljnom mestu primene, dok bi svoju aktivnost trebao da ostvaruje putem nekoliko različitih mehanizama delovanja. Farmakepidemiološke studije upućuju na značaj dijetetskih suplemenata u cilju hemoprevencije karcinoma. Dijetetski suplementi su posebno atraktivni zbog svog dugogodišnjeg prisustva na tržištu, bezbedonosnog profila i relativno malim stepenom ispoljenih neželjenih efekata (157).

Jasno je da se hemoprevencija karcinoma postiže nizom različitih procesa na nivou ćelije. U Tabeli 2. prikazani su osnovni mehanizmi delovanja hemopreventivnih agenasa (158).

Tabela 2. Potencijalni mehanizmi delovanja hemopreventivnih agenasa, preuzeto i adaptirano iz Kuno T et al. J Biophys Chem 2012.

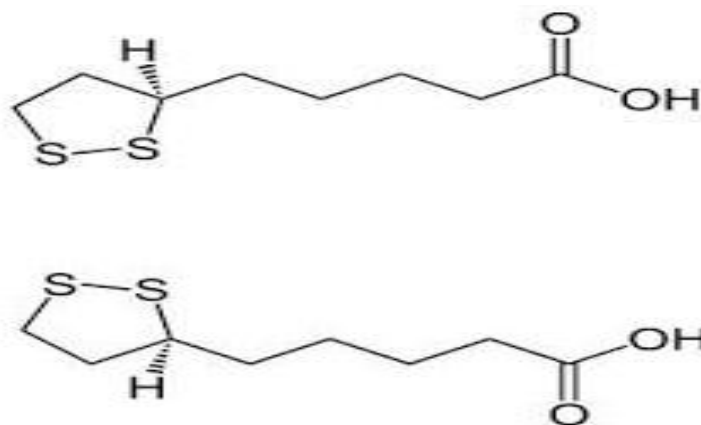
<i>Mehanizam delovanja</i>	<i>Jedinjenje</i>
Blokada karcinogene aktivnosti	
inhibicija preuzimanja karcinogena	kalcijum
inhibicija formiranja ili aktivacije karcinogena	izotiocijanati, DHEA, NSAIL, polifenoli
deaktivacija karcinogena	oltipraz
preveniranje vezivanja karcinogena za DNK	oltipraz, plofenoli
povećanje stepena DNK reparacije	NAC, inhibitori proteaza
Antioksidativna aktivnost	
veza i reaktivnih elektrofila	GSH- sli na jedinjenja
veza i kiseoni nih radikala	polifenoli, Vit E
inhibitori metabolizma arahidonske kiseline	NAC, NSAIL, polifenoli, tamoksifen
Antiproliferativna aktivnost	
modulatori signalne transdukcije	NSAIL, polifenoli, retinoidi, tamoksifen
modulatori aktivnosti hormona/faktora rasta	NSAIL, retinoidi, tamoksifen
inhibitori onkogene aktivnosti	genistein, NSAIL, monoterpeni
inhibitori metabolizma poliamina	DFMO, retinoidi, tamoksifen
induktori terminalne diferencijacije	kalcijum, retinoidi, Vit D
blokatori imunog odgovora	NSAIL, selen, Vit E
induktori apoptoze	butirna kiselina, genistein, retinoidi,
korektori procesa DNK metilacije	folna kiselina
inhibitori angiogeneze	genistein, retinoidi, tamoksifen

1.4.3. Alfa-lipoinska kiselina, ketoprofen i meloksikam kao potencijalni hemopreventivni agensi

Hemoprevencija može biti jedna od bitnijih komponenti prevencije karcinoma oslanjaju i se na delovanju hemijskih agenasa iz prirode koja nas okružuje kao i sintetskih analoga, koji mogu da blokiraju inicijaciju tumora i promociju događaja koji su važne etape u razvitku tumora (159).

Alfa-lipoinska kiselina (*eng. alpha-lipoic acid, ALA*), još poznata i kao tioktinska kiselina, otkrivena je 1951. godine kao molekul koji u estvuje u transferu acil grupe u

Krebsovom ciklusu. Radi se o organo-sumpornom jedinjenju, derivatu oktanske kiseline (6,8-ditiooktanoinska kiselina). U svojoj strukturalnoj konformaciji ALA sadži jedan asimetrični C atom koji uslovljava postojanje dva optička izomera, R (+) i S (-). U prirodnim uslovima ALA se nalazi u obliku R (+) izomera, vezana za odgovarajuće proteina ostvaruju i uloge esencijalnog kofaktora za nekoliko važnih mitohondrijalnih enzimskih kompleksa (160) (Slika 6.) .



Slika 6. Strukturni prikaz optičkih izomera alfa-lipoične kiseline

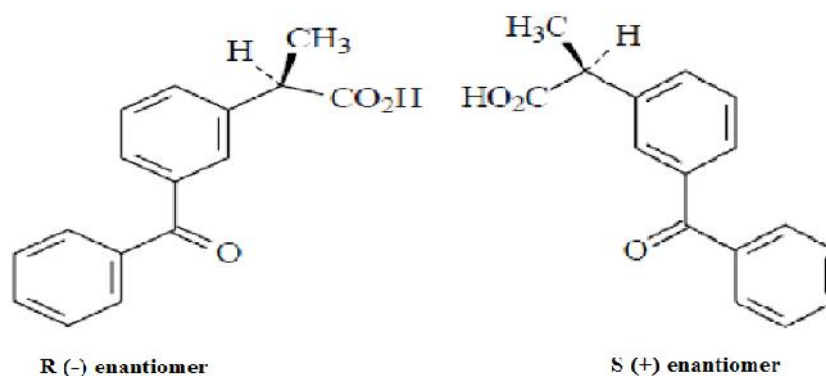
Osamdesetih godina prošlog veka alfa-lipoična kiselina je od strane naučne zajednice prepoznata kao moćan antioksidans. Danas se ALA smatra jednim od najefikasnijih do sada poznatih endogenih antioksidanasa, pa poslednjih godina zauzima posebno mesto u terapiji karcinoma (161).

Mehanizam delovanja ALA se zasniva na neutralizaciji slobodnih radikala, u hidrofilnim i hidrofobnim regionima ćelije. Karakteriše se funkcionalnom aktivnošću u redukovanoj i oksidovanoj formi. ALA poseduje antikancerogeni potencijal zato što samostalno eliminiše slobodne radikale, uključujući i hidroksil radikal, koji je uključen u svim fazama razvoja karcinoma i koji se smatra odgovornim za povećanje broja metastaza. ALA povećava efikasnost drugih antioksidanasa (vit C i E, koenzima Q₁₀), značajno povećava nivo glutationa za 30-70% naročito u ćelijama jetre, pluća i bubrega laboratorijskih životinja kada se ubrizgava kao antioksidans (162).

Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL) predstavljaju agense koji mogu obećavati u hemoprevenciji karcinoma kolona i cerviksa. Njihov mehanizam delovanja je višestruk: obuhvataju i blokadu karcinogene aktivnosti, antioksidativni potencijal i antiproliferativno delovanje (157).

Ketoprofen (KT) je nesteroidni antiinflamatorni lek, koji po svojoj hemijskoj strukturi pripada grupi derivata propionske kiseline. Originalno je sintetisan od strane Rhone-Poulenc Research laboratorija u Prizu, 1967 godine. Nekoliko godina kasnije ketoprofen se odobrava za kliničku primenu i do danas se koristi u terapiji različitih inflamatornih bolesti, reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, spondiloze (163). Danas se posebni terapijski benefiti KT otkuju u prevenciji različitih tipova maligniteta, tretmana Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (164).

Ketoprofen je 2-(3-benzoil fenil) propionska kiselina. U svom molekulu KT sadrži jedan asimetrični C atom u hiralnim centru koji omogućava postojanje 2 enantiomera, R (-) i S (+) (Slika 7.). Stereohemijske karakteristike KT prikazane su na slici X. S (+) enantiomer je odgovoran za farmakološke karakteristike i farmakodinamički odgovor KT (165). R (-) nije terapijski aktivan i nije u mogućnosti da inhibira COX aktivnost ali je zato odgovoran za neželjene efekte KT.

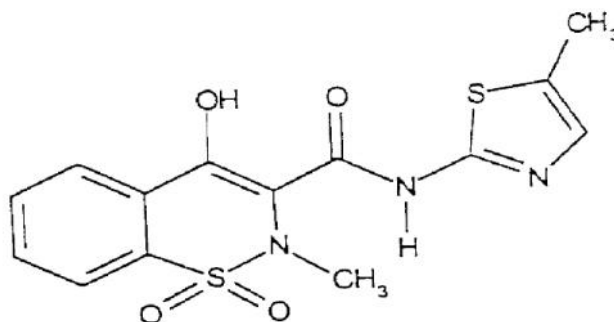


Slika 7. Stereohemijske karakteristike ketoprofena

Ketoprofen je NSAID sa analgetičkim i antipiretičkim karakteristikama. Fiziološka osnova farmakodinamičke aktivnosti KT bazira se na inhibiciji COX enzima. Neželjeni efekti KT rezultat su inhibicije COX-1 izoforme dok je COX-2 inhibicija odgovorna za ostvarivanje terapijskog efekta (166).

Meloksikam (MK) je nesteroidni antiinflamatorni lek sa karakteristikama selektivne inhibicije COX-2 izoforme, ostvaruju i analgetičko, antipiretičko i antiinflamatorno delovanje. MK je derivat enolne kiseline, 4-hidroksi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazin-3-karboksamid-1,1-dioksid. U strukturi svog molekula MK nema hiralnog centra

pa u normalnim uslovima ne formira enatiomere (167). Strukturna formula MK prikazana je na slici 8.



Slika 8. Strukturna formula meloksikama, 4-hidroksi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazin-3-karboksamid-1,1-dioksid

Ketoprofen i meloksikam svoj terapijski efekat ostvaruju neselektivnom i/ili selektivnom inhibicijom COX-1 i COX-2 izoenzima. Literaturni podaci potvrđuju uzročnu vezu između upale i inflamacije i karcinogeneze zbog pojačane ekspresije COX-2. COX-2 aktivira mnoge procese koji su uključeni u karcinogenezu, a njegova je na taj način atraktivnim terapijskim ciljem. Ova ciklooksigenazna forma učestvuje u metabolizmu ksenobiotika, angiogenezi, apoptozi, inflamaciji, procesima imunosupresije. Obzirom da su apoptoza i neoangiogeneza blisko povezani sa rezistencijom na hemoterapiju i radioterapiju smatra se da povećana ekspresija COX-2 može biti prediktivni marker hemorezistencije karcinoma (169).

Novi pristup hemoprevencije karcinoma bazira se na koadministraciji dve ili više supstanci, različitog načina delovanja, sa ciljem potenciranja efektivnosti i time bi se neželjena dejstva svela na minimum (170). Smatra se da je hemoprevencija jedna od glavnih komponenti kontrole karcinoma, a mnogobojna istraživanja ukazuju na potencijalnu ulogu antioksidanasa i NSAID u hemoprevenciji karcinoma kolona i cerviksa

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Razvoj karcinoma je višestepeni proces u toku koga kumulativno dolazi do niza promena u elijskoj strukturi i funkciji. Iako su mnogi od procesa povezanih sa kancerogenezom pojedina no intenzivno izu avani, molekularni mehanizmi koji ih povezuju i koji leže u osnovi kompleksne biologije humanih karcinoma još uvek su nedovoljno poznati. Nastanak karcinoma može se posmatrati kroz niz genetskih promena koji transformišu normalnu eliju u malignu, dok je izbegavanje elijske smrti jedna od osnovnih promena koja vodi do maligne transformacije elije. Apoptoza je homeopatski proces koji omogu ava da stare, mutirane ili ošte ene elije umru. U elijama karcinoma taj mehanizam je esto ošte en, maligne elije ne umiru, ve nastavljaju proliferaciju. Proces kontrolisane elijske smrti predstavlja genetski regulisan proces jer je u kontroli elijske sudbine uklju en veliki broj elijskih signala i ekspresija specifi nih gena.

Polaze i od pretpostavke da postoji povezanost izme u kvantitativne ekspresije markera apoze, NF- κ B, Bcl-2, Bax i hroni ne inflamacije u kontroli procesa elijske smrti kao i odgovora na primenjeni citostatski tretman, cilj ovog istraživanja je:

1. Ispitivanje efekata alfa-lipoinske kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacija ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama elija karcinoma kolona i cerviksa na proliferaciju elija, MTT testom u eseju elijske proliferacije,
2. Ispitivanje kvantitativne ekspresije NF- κ B u kulturama elija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi, nakon inkubacije sa raz li itim koncentracijama alfa-lipoinske kisevine, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom,

3. Ispitivanje stepena apoptoze praćenjem kvantitativne ekspresije Bcl-2 i Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom,
4. Procjenjivanje hemopreventivnog potencijala alfa lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama na osnovu kvantitativne ekspresije NF- κ B, transkripcionog faktora uključenog u regulaciji gena koji utiču na nivo apoptoze, Bcl-2 i Bax u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Koriš ene supstance

U eksperimentu su koriš ene slede e supstance: alfa-lipoiniska kiselina (Berlition 300 ED, Berlin - Chemie, Nema ka 300mg/12ml), ketoprofen (Ketonal, Sandoz Pharmaceuticals, Switzerland 100 mg/ 2 ml), meloksikam (Movalis, Boehringer Ingelheim, 15mg/1.5ml), cisplatin (Cisplatin Ebewe, Ebewe Pharma Austrija, 10mg/20ml) i 5-fluorouracil (Fluorouracil Teva, Pharmachemie B.V. - Holandija, 50mg/ml). DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (Fetal Bovine Serum), antibiosko-antimikoti ni rastvor, L-Glutamine i Trypsin - EDTA rastvor su naru eni od PAA Laboratories, Austria, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) je naru en od Carl Roth, Germany dok je Trypan Blue Stain naru en od Invitrogen-a. Primarna i sekundarna anti-NF- κ B, anti-Bcl-2 i anti-Bax antitelima su proizvo a a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Citostatici 5-fluorouracil i cisplatin se po protokolu koriste za le enje karcinoma kolona i cerviksa (171).

3.1.1. Priprema rastvora za in vitro istraživanje

Alfa-lipoiniska kiselina (ALA), ketoprofena (KT), meloksikama (MK), cisplatin (CP) i 5-fluorouracil (FU) su razblaživani u medijumu DMEM i ispitivane su po tri koncentracije svake od navedenih supstanci (Grupa 1 - najmanja koncentracija, Grupa 2 - srednja kocentracija i Grupa 3 - najve a koncentracija). Finalne koncentracije ispitivanih supstanci iznose: alfa-lipoiniska kiselina ALA1-10 μ M, ALA2-100 μ M i ALA3-1000 μ M); ketoprofen (KT1-2, KT2-20 i KT3-200 μ M), meloksikam (MK1-10 μ M, MK2-50 μ M, MK3-500 μ M), cisplatin (CP1-1.66 μ M, CP2-3.32 μ M i CP3-6.64 μ M) i 5-fluorouracil (FU1-10 μ M, FU2-100 μ M i FU3-1000 μ M). Ispitivane supstance su kombinovane se sa 5-fluorouracilom i cisplatinom. Kombinovanje ispitivanih supstanci sa standardnim citostaticima je ura eno tako da su me usobno kombinovane najmanje koncentracija (ALA1-CP1, KT1-CP1, MK1-CP1, ALA1-FU1, KT1-FU1, MK1-FU1), zatim srednje (ALA2-CP2, KT2-CP2, MK2-CP2, ALA2-FU2, KT2-FU2, MK2-FU2) i na kraju najve e koncentracija (ALA3-CP3, KT3-CP3, MK3-CP3, ALA3-FU3, KT3-FU3, MK3-FU3). Pripremljene su kombinacije ispitivanih supstanci, alfa lipoiniske kiseline, ketoprofena i meloksikama sa

cisplatinom i 5-fluorouracilom. Kombinacija ispitivanih supstanci u odnosu 1:1 je izvršena tako da su finalne koncentracije bile 2 puta manje od početnih.

3.2. elijske linije

Ispitivanje je vršeno na dve elijske linije, HeLa S3 (elije humanog karcinoma cerviksa) naručene od Leibniz Institute DSMZ i Caco-2 (elije humanog karcinoma kolona) naručene od ATCC. Elije su kultivisane u medijumu DMEM sa dodatkom 10% FBS, antibiotik/antimikotik rastvora i 2 mM L-glutamina, na 37C u atmosferi sa 5% CO₂ i zasićenju vlažnošću. Zamena medijuma je vršena na svaka 2-3 dana.

3.2.1.HeLa elijska linija

HeLa elije predstavljaju kancerski tip elijske linije koje mogu da se u elijskoj kulturi, pod povoljnim uslovima dele neograničen broj puta (172). Postoje mnogi subklonovi HeLa elija i one i dalje evoluiraju u toku presađivanja. Za razliku od mnogih drugih elijskih linija, HeLa elije su veoma izdržljive i imaju veliku sposobnost deobe (173). Ime su dobile u korist pacijentkinje obolele od karcinoma cerviksa, Henriete Laks (Henrietta Lacks, 1920 – 1951), iz koje su karcinoma grlišta materice elije prvi put izolovane 8. februara 1951. godine (174).

3.2.2.Caco-2 elijska linija

Elije humanog karcinoma kolona inicijalno su otkrivene od strane Fogha i saradnika 1977. godine (175). U kulturi Caco-2 elije prolaze kroz procese spontane diferencijacije pokazuju i osobine vrlo slične elijama kolona. Prva istraživanja sprovedena sa Caco-2 elijama pokazala su da pored jasne diferencijacije ove elije karakteriše i ekspresija nekoliko važnih morfoloških i biohemijskih karakteristika humanih enterocita. Ove elije rastu u vidu mono-sloja, pokazuju cilindrično polarizovanu morfologiju, sa mikrovilima na apikalnoj strani. Danas, elije humanog karcinoma kolona predstavljaju odličan *in vitro* model za proučavanje intestinalne elijske diferencijacije i regulacije (176).

3.2.3. Primarna kultura

Mononuklearne elije periferne krvi su izolovane u sterilnim uslovima, centrifugiranjem sa rastvorom Ficoll Histopaque® 1077 (Lymphoprep™, Nycomed Pharma, Zurich, Switzerland). elijska vijabilnost iznosila je 90% i ispitana je pomoću rastvora Trypan blue. Nakon ispiranja u fiziološkom rastvoru, izolovane mononuklearne elije periferne krvi su resuspendovane u DMEM-u sa dodatkom 10% FBS, L-glutamina i penicilin-streptomicin rastvora, nakon čega su mononuklearne elije periferne krvi su zasade u sterilne ploče sa 96 bunara i, inkubirane 24h i tretirane ispitivanim supstancama (177).

3.3. Esej proliferacije

Kada su elije obe elijske linije postigle 80% konfluentnosti odlepljene su rastvorom Trypsin/EDTA, isprane u rastvoru pufera i ukupan broj elija, kao i gustina elija potrebna za esej proliferacije određeni su korišćenjem boje tripan plavo (Trypan blue dye exclusion test). elije su posade u sterilnim pločama sa 96 bunara i u gustini 2×10^4 elija po bunaru i u kultivisane 24 h u standardnim uslovima. Nakon toga, elijama su dodavane ispitivane supstance (alfa lipoinjska kiselina, ketoprofen, meloksikam, cisplatin, 5-fluorouracil) kao i odgovarajuće kombinacije ovih supstanci u ispitivanim koncentracijama. Kontrolu elije inkubirane samo sa medijumom, bez dodavanja supstanci. Efekat ispitivanih supstanci na proliferaciju elija određen je nakon 48 h inkubacije sa ispitivanim supstancama primenom MTT testa.

3.3.1. MTT test

MTT test se bazira na redukciji žute supstance MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) do ljubiastih kristala formazana koji su nerastvorni u vodi. Medijum u kome su inkubirane elije, sa ili bez dodatih supstanci, izvučen je po završetku inkubacije. elije su isprane rastvorom pufera nakon čega je u svaki bunar dodato 20 μ L MTT rastvora koncentracije 1 mg/ml. Nakon 3h inkubacije sa rastvorom MTT-a na 37°C, nastali kristali formazana su rastvoreni dodatkom 100 μ l 2-propanola. Spektrofotometrijsko merenje redukcije MTT-a, odnosno intenziteta ljubiaste boje, je vršeno na talasnoj dužini od

540 nm na ELISA ita u (Elisa plate reader, ThermoLab Systems). Intenzitet ljubi aste boje je u direktnoj korelaciji sa brojem vijabilnih elija. Rezultati su prikazani kao stepen proliferacije elija (izražen u procentima) u odnosu na kontrolnu kulturu za koju je uzeta vrednost od 100%.

3.4. Merenje nivoa transkripcionog faktora NF- κ B, Bcl-2 i Bax

elije obe elijske linije, kao i primarna kultura mononuklearnih elija periferne krvi zasa ene su u sterilne plo e sa 96 bunar i a sa gustinom od 3×10^4 elija po bunar i u, i kultivisane u standardnim uslovima 24 h. Nakon tog perioda dodavane su supstance u ispitivanim koncentracijama i predvi enim kombinacijama, nakon ega su elije inkubirane 48h po protokolu istraživanja Koci G. i sar. (178). elije se pažljivo isprane rastvorom fosfatnog pufera (PBS), fiksirane pomo u 70% metanola i permeabilizovane pomo u 0,1% Triton X-100 u PBS-u. elije su inkubirane sa primarnim anti-NF- κ B, anti-Bcl-2 i anti-Bax antitelima, isprane 3 puta, a zatim inkubirane sa FITC sekundarnim antitelima. Srednji intenzitet fluorescence odre ivan je i analiziran na Victor™ multiplate reader (Perkin Elmer-Wallace, Wellesley, MA). Rezultati e biti prikazani kao procentualna promena u odnosu na kontrolu.

3.5. Statisti ka obrada podataka

Dobijeni podaci su analizirani, statisti ki obra eni primenom metoda deskriptivne statistike i koriš enjem odgovaraju ih testova statisti ke zna ajnosti (χ^2 -test nezavisnosti, uz korekciju neprekidnosti prema Jejtisu). Baza podataka je kreirana u statisti kom programu Excel, a za statisti ku obradu je koriš en SPSS program, verzija 19.0 (Statistical Package for Social Sciences). Svi statisti ki testovi prihva eni su ako je verovatno a nulte hipoteze jednaka ili manja od 5% ($p < 0.05$).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

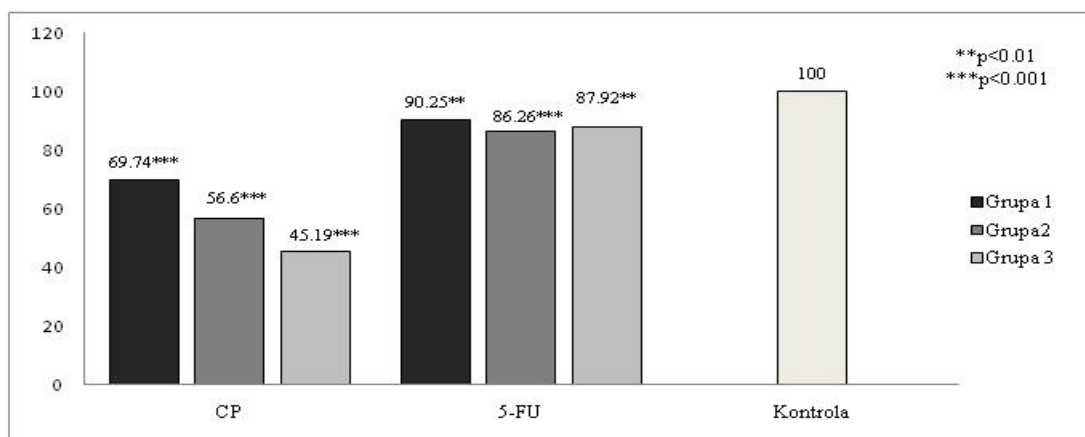
Rezultati MTT testa i ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B, Bcl-2 i Bax proteina nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoijske kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama elija karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi prikazani su grafički, dok je odnos Bcl-2/Bax prikazan tabelarno. Svi rezultati prikazani su kao procenat u odnosu na kontrolnu grupu.

4.1. Proliferacija elija karcinoma kolona i cerviksa u prisustvu ispitivanih supstanci merena MTT testom

U sledećim poglavljima sa ciljem ispitivanja efekata alfa-lipoijske kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacija ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama elija karcinoma kolona i cerviksa na proliferaciju elija prikazani su rezultati MTT testa u eseju elijske proliferacije.

4.1.1. Proliferacija elija karcinoma cerviksa u prisustvu alfa-lipoijske kiseline, ketoprofena i meloksikama

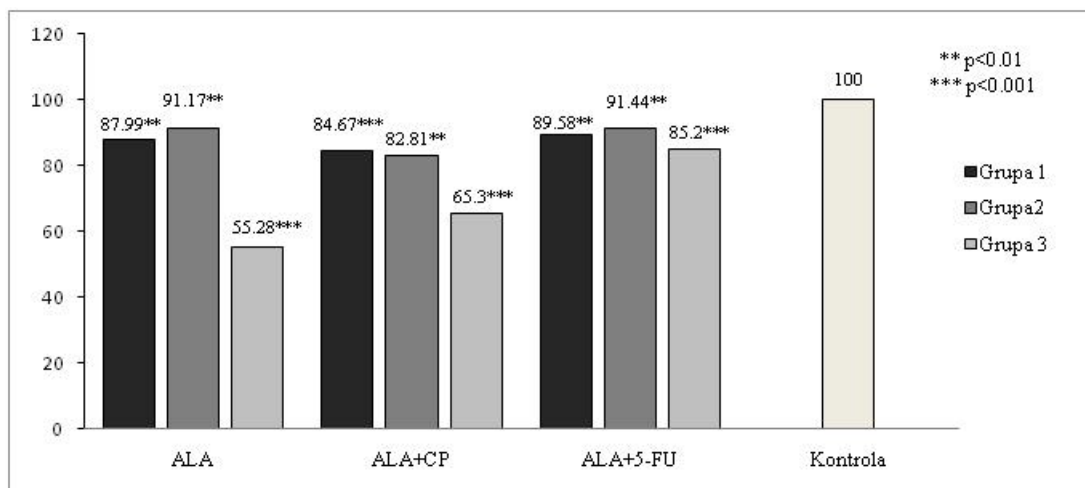
T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati efekta cisplatina i 5-fluorouracila u tri različite koncentracije na proliferaciju elija u kulturi Hela elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 1.)



Grafikon 1. Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

Sve tri grupe tretirane cisplatinom pokazuju statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije elija u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.001$, $p_{CP1} < 0.001$, $p_{CP2} < 0.001$ i $p_{CP3} < 0.001$. Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom statisti ka zna ajnost je prona ena izme u kontrolne grupe i grupe 2 na nivou $p < 0.001$, $p_{FU2} < 0.001$, dok je kod grupa 1 i 3 statisti ka zna ajnost utvr ena na nivou $p < 0.01$, $p_{FU1} = 0.003$ i $p_{FU3} = 0.001$.

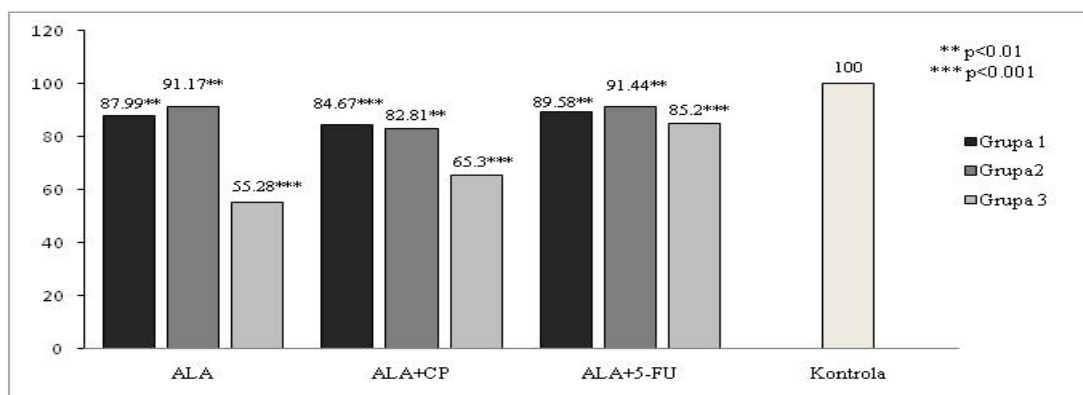
Na Grafikonu 2. prikazan je MTT test u kulturi Hela elija inkubiranih razli itim koncentracijama alfa-liponske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu.



Grafikon 2. Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa alfa-liponskom kiselinom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

Utvr eno je statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije elija u kulturi u grupama 1 i 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{ALA1} = 0.001$ i $p_{ALA2} = 0.004$, a u grupi 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{ALA3} < 0.001$.

Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom prikazane su na Grafikonu 3.

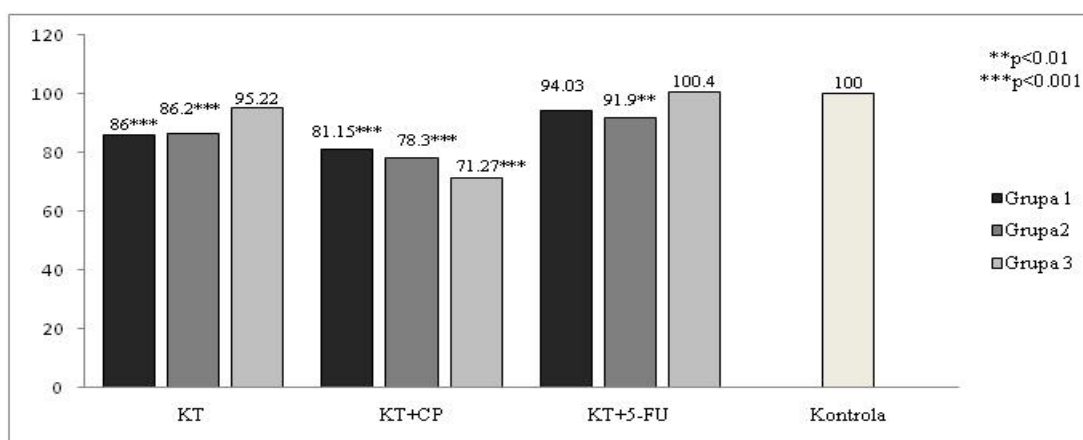


Grafikon 3. Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

U kombinaciji alfa-lipoinška kiselina i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajno smanjenje u grupama 1 i 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{ALA-CP1} < 0.001$ i $p_{ALA-CP3} < 0.001$, a u grupi 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{ALA-CP2} = 0.001$.

Kombinacija alfa-lipoinške kiseline i 5-fluorouracila je u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajno smanjenje proliferacije elija u sve tri grupe i to na nivou $p < 0.001$ u grupi 3, $p_{ALA-FU3} < 0.001$, a na nivou $p < 0.01$ u grupama 1 i 2, $p_{ALA-FU1} = 0.003$ i $p_{ALA-FU2} = 0.005$.

Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom prikazani su na Grafikonu 4.

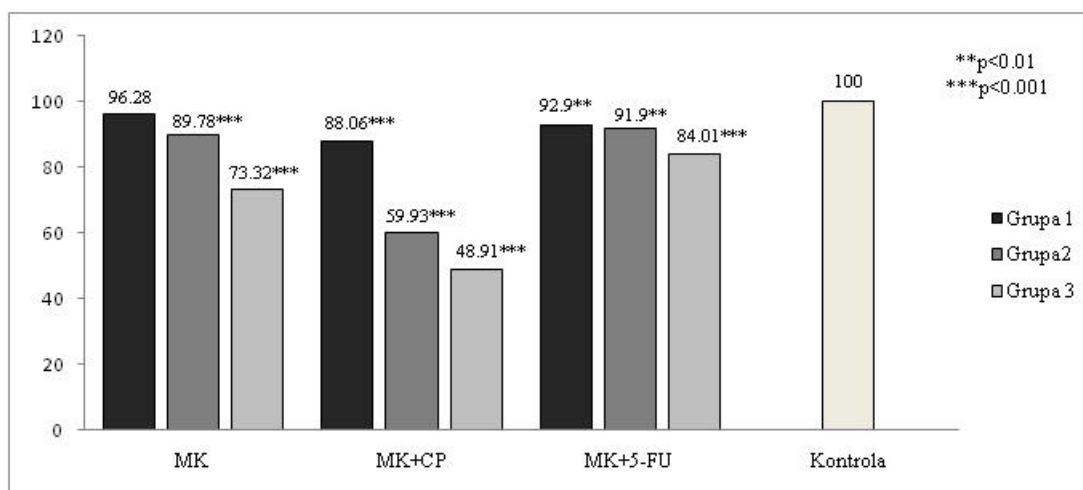


Grafikon 4. Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

Analizom rezultata nakon tretiranja Hela elija ketoprofenom utvrđeno je statistički značajno smanjenje proliferacije elija u grupama 1 i 2 na nivou $p < 0.001$, $p_{KT1} < 0.001$ i $p_{KT2} < 0.001$.

U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajno smanjenje proliferacije u sve tri grupe na nivou $p < 0.001$, $p_{KT-CP1} < 0.001$, $p_{KT-CP2} < 0.001$ i $p_{KT-CP3} < 0.001$. Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statistički značajno smanjenje samo u grupi 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{KT-FU2} = 0.007$, dok u grupama 1 i 3 statistički značajna razlika nije pronađena, $p_{KT-FU1} = 0.066$ i $p_{KT-FU3} = 0.877$.

Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom prikazani su na Grafikonu 5.



Grafikon 5. Proliferacija Hela elija u kulturi inkubiranih sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

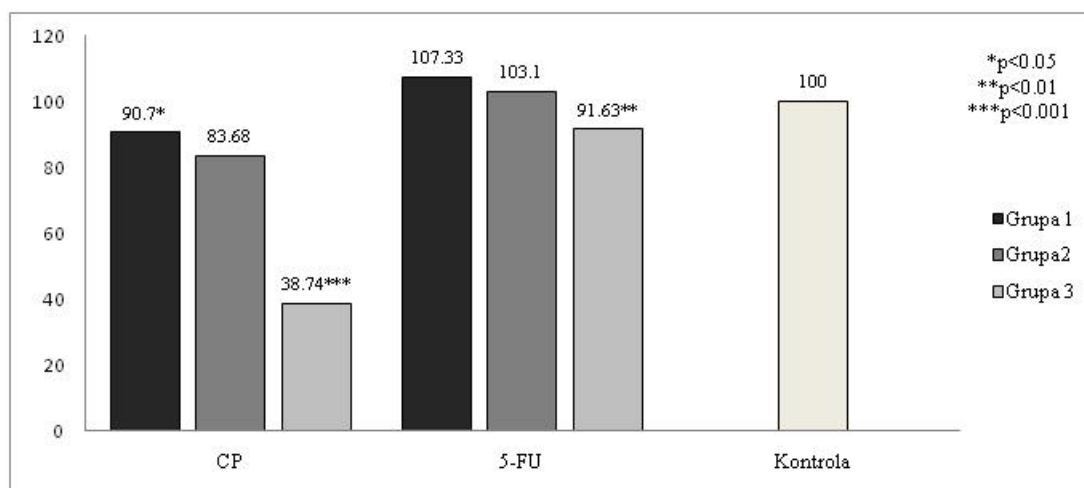
Kod grupa tretiranih meloksikamom u tri različite koncentracije nije pronađena statistički značajna razlika između grupe 1 i kontrolne grupe, $p_{MK1} = 0.409$, dok se grupe 2 i 3 statistički razlikuju u odnosu na kontrolu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK2} < 0.001$ i $p_{MK3} < 0.001$.

Sve tri grupe tretirane kombinacijom meloksikama i cisplatina pokazuju statistički značajno smanjenje proliferacije elija u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-CP1} < 0.001$, $p_{MK-CP2} < 0.001$ i $p_{MK-CP3} < 0.001$.

Meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom pokazao je statistički značajno smanjenje izme u grupa 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-FU1} = 0.001$ i $p_{MK-FU2} = 0.007$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-FU3} < 0.001$.

4.1.2. Proliferacija elija karcinoma kolona u prisustvu alfa-lipoične kiseline, ketoprofena i meloksikama

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja cisplatina i 5-fluorouracila u tri različite koncentracije na proliferaciju elija u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 6.).

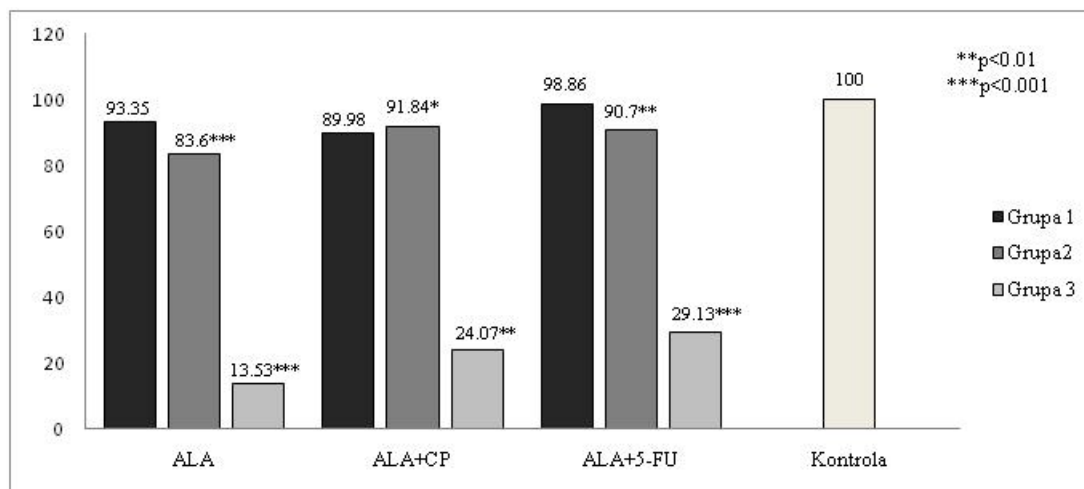


Grafikon 6. Proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolnu grupu merane MTT testom

U grupama tretiranim cisplatinom utvrđena je statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu izme u grupe 1 na nivou $p < 0.05$, $p_{CP1} = 0.010$ i grupe 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{CP3} < 0.001$, dok grupa 2 nije pokazala statistički značajno smanjenje, $p_{CP2} = 0.071$.

Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom utvrđena je statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu izme u grupa 3 i kontrolne grupe na nivou $p < 0.01$, $p_{FU3} = 0.007$, dok izme u grupa 1 i 2 statistički značajna razlika nije pronađena $p_{FU1} = 0.282$ i $p_{FU2} = 0.284$.

Na Grafikonu 7. prikazana je proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatiom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom.



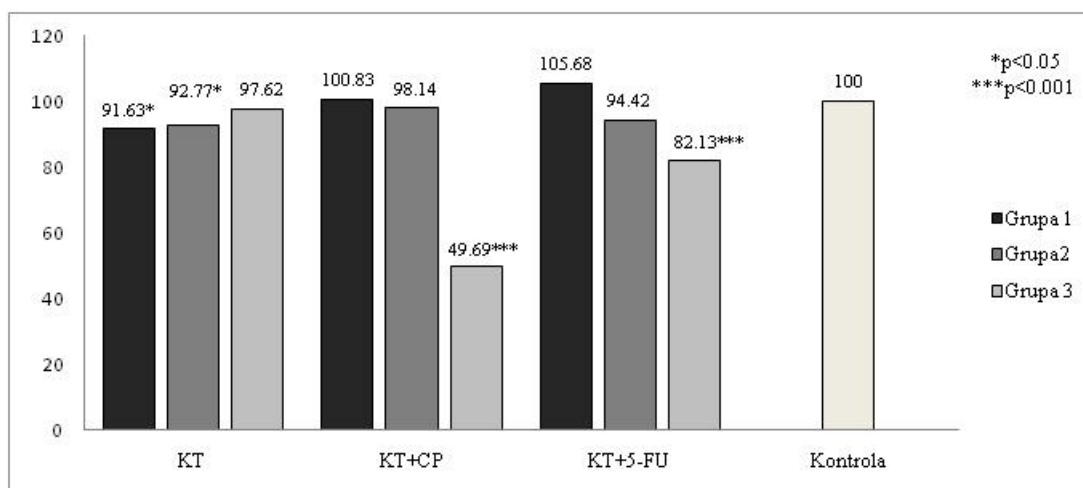
Grafikon 7. Proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatiom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

Utvr eno je statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije elija u kulturi izme u grupa 2 i 3 na nivou $p<0.001$, $p_{ALA2}<0.001$ i $p_{ALA3}<0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu.

U kombinaciji alfa-lipoiniske kiselina i cisplatina u odnosu na kontrolnu grupu pokazali su statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije izme u grupa 3 na nivou $p<0.001$, $p_{ALA-CP3}<0.001$ i grupi 2 na nivou $p<0.05$, $p_{ALA-CP2}=0.013$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena, $p_{ALA-CP1}=0.088$.

Alfa-lipoiniska kiselina u kombinaciji sa 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolnu grupu je pokazala statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije elija izme u grupa 3 na nivou $p<0.001$ i grupe 2 na nivou $p<0.01$ u odnosu na kontrolnu grupu, dok u grupi 1 statisti ki zna ajno smanjenje nije prona eno, $p_{ALA-FU1}=0.711$.

Proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom prikazani su na Grafikonu 8.



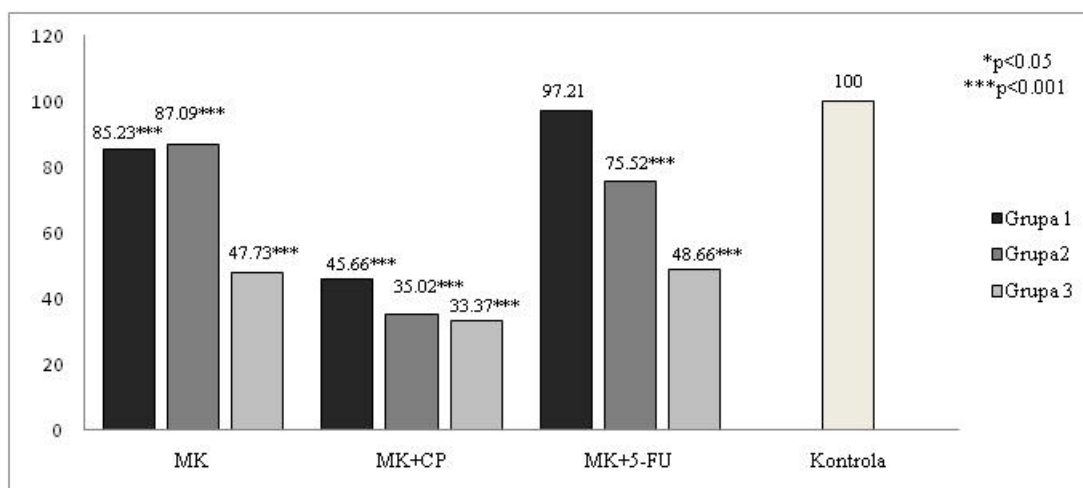
Grafikon 8. Proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

U grupama tretiranim ketoprofenom utvrđeno je statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu između kontrolne grupe i grupa 1 i 2, na nivou $p < 0.05$, $p_{KT1} = 0.017$ i $p_{KT2} = 0.021$, dok grupa 3 nije pokazala statistički značajnu razliku, $p_{KT3} = 0.456$.

U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajno smanjenje samo između grupe 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{KT-CP3} < 0.001$ u odnosu na kontrolnu grupu, dok u grupama 1 i 2 statistički značajno smanjenje nije pronađeno, $p_{KT-CP1} = 0.831$ i $p_{KT-CP2} = 0.679$.

Kombinacija ketoprofen i 5-fluorouracil je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statistički značajno smanjenje samo između kontrole i grupe 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{KT-FU3} < 0.001$, dok u grupama 1 i 2 statistički značajno smanjenje nije pronađeno, $p_{KT-FU1} = 0.592$ i $p_{KT-FU2} = 0.104$.

Na Grafikonu 9. prikazane je proliferacija Caco elija u kulturi inkubiranih sa meloksikamom i kombinacijom sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom



Grafikon 9. Proliferacija Caco-2 ćelija u kulturi inkubiranih sa meloksikamom i kombinacijom sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolu merane MTT testom

Kod grupa tretiranih meloksikamom sve tri grupe su pokazale statistički značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK1} < 0.001$, $p_{MK2} < 0.001$ i $p_{MK3} < 0.001$.

Kombinacija meloksikama i cisplatina pokazala je statistički značajno smanjenje izme u svih grupa u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-CP1} < 0.001$, $p_{MK-CP2} < 0.001$ i $p_{MK-CP3} < 0.001$.

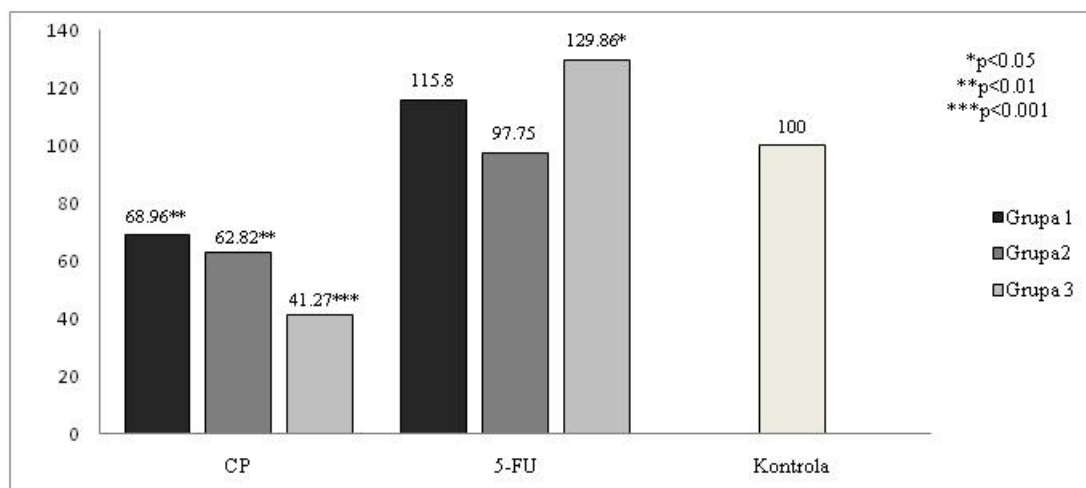
Meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom dao je statistički značajno smanjenje izme u grupa 2 i 3 u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-FU2} < 0.001$ i $p_{MK-FU3} < 0.001$.

4.2. Kvantitativna ekspresija NF- κ B u kulturi karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon inkubacije ispitivanih supstanci

U sledećim poglavljima prikazani rezultati kvantitativne ekspresije NF- κ B u cilju ispitivanja efekata alfa-lipoične kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacija ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama ćelija karcinoma kolona, cerviksa.

4.2.1. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom u kulturi elija karcinoma cerviksa

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama cisplatina i 5-fluorouracila na Caco-2 elije u kulturi u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 10).



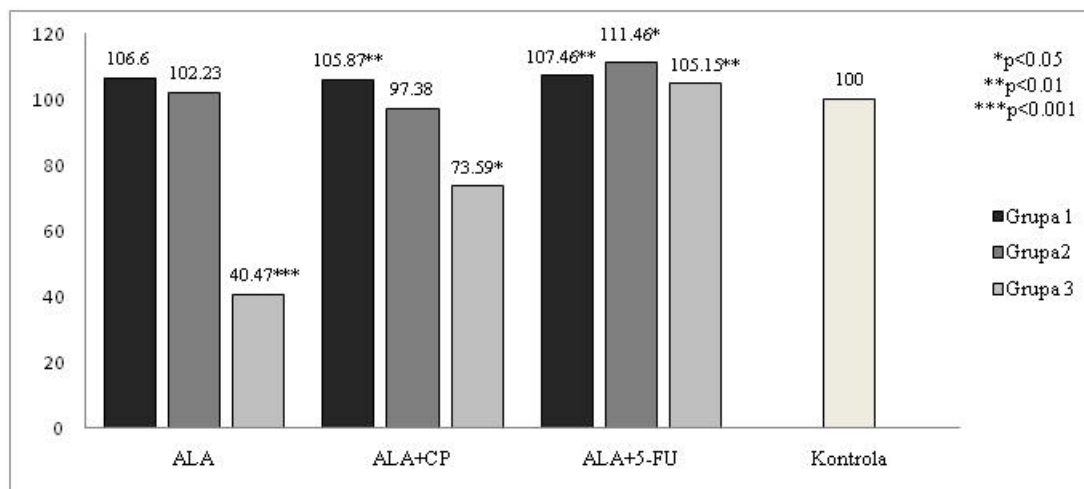
Grafikon 10. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Hela elija

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja dejstva cisplatina u tri različite koncentracije na Hela elije u odnosu na kontrolnu grupu. U grupama koje su tretirane cisplatinom utvrđena je statistički značajna razlika između svih grupa u odnosu na kontrolnu grupu, kod grupa 1 i 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{CP1} = 0.004$ i $p_{CP2} = 0.002$, a kod grupe 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{CP3} < 0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statistička značajnost između grupa CP1, CP2 i CP3. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p < 0.05$, $p_{CP} = 0.025$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe CP1 razlikuje od grupe CP3 ($p_{CP1-3} = 0.026$), dok srednja vrednost grupe CP2 ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na ostale dve grupe.

Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom nije pronađena statistički značajna razlika između grupa 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{FU1} = 0.158$ i $p_{FU2} = 0.802$, dok je u grupi 3 došlo i do statistički značajnog povećanja na nivou $p < 0.05$, $p_{FU3} = 0.012$.

Između samih grupa tretiranih 5-fluorouracilom ne postoji statistički značajna razlika, $p_{FU} = 0.283$.

Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoiinske kisline i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Hela elija prikazana je na Grafikonu 11.

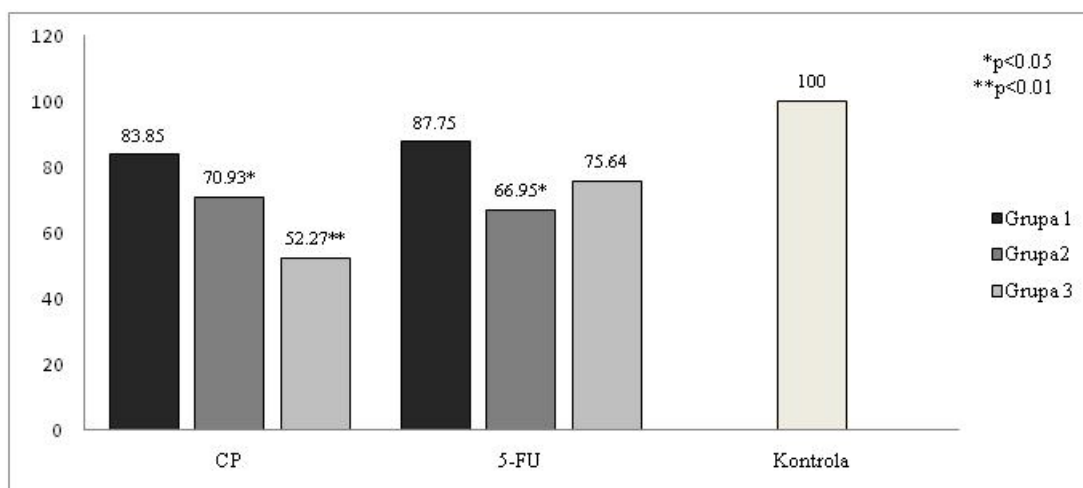


Grafikon 11. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa alfa-lipoiinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Hela elija

U grupi 1 nije pronađena statistički značajna razlika $p_{ALA1}=0.477$, kao ni u grupi 2, $p_{ALA2}=0.8$, dok je u grupi 3 pronađena statistički značajnost na nivou $p_{ALA3}<0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statistički značajnost između grupa ALA1, ALA2 i ALA3. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p<0.001$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALA3 razlikuje od grupa ALA1 i ALA2 ($p_{ALA1-3}<0.001$ i $p_{ALA2-3}<0.001$), dok srednje vrednosti grupa ALA1 i ALA2 ne pokazuju statistički značajne razlike.

4.2.2. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa alfa-lipoiinskom kiselinom u kulturi elija karcinoma kolona

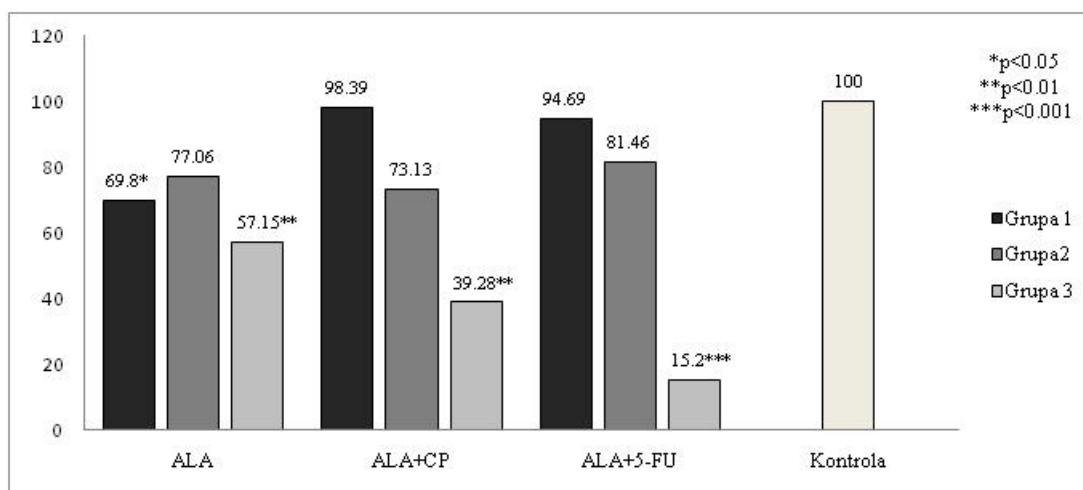
T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama cisplatina i 5-fluorouracila na Caco-2 elije u kulturi u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 12).



Grafikon 12. Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija

U grupama koje su inkubirane cisplatinom nije utvrđena statistički značajna razlika između u grupe 1 i kontrolne grupe, kod grupe 2 u odnosu na kontrolu značajnost je na nivou $p < 0.05$, $p_{CP2} = 0.040$, a kod grupe 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{CP3} = 0.002$. Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom statistički značajnost je pronađena samo između u kontrolne grupe i grupe 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{FU2} = 0.024$, dok kod grupa 1 i 3 statistički značajnost nije utvrđena.

Na Grafikonu 13. pokazane su vrednosti kvantitativne ekspresije NF-κB nakon inkubacije Caco-2 elija sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u različitim koncentracijama.



Grafikon 13. Kvantitativna ekspresija NF-κB nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija

U grupi 1 je prona ena statisti ki zna ajna razlika na nivou $p_{ALA1}<0.05$, $p_{ALA1}=0.025$, grupa 2 nije pokazala zna ajnu razliku, $p_{ALA2}=0.097$, dok je u grupi 3 prona ena statisti ka zna ajnost na nivou $p<0.01$, $p_{ALA3}<0.008$.

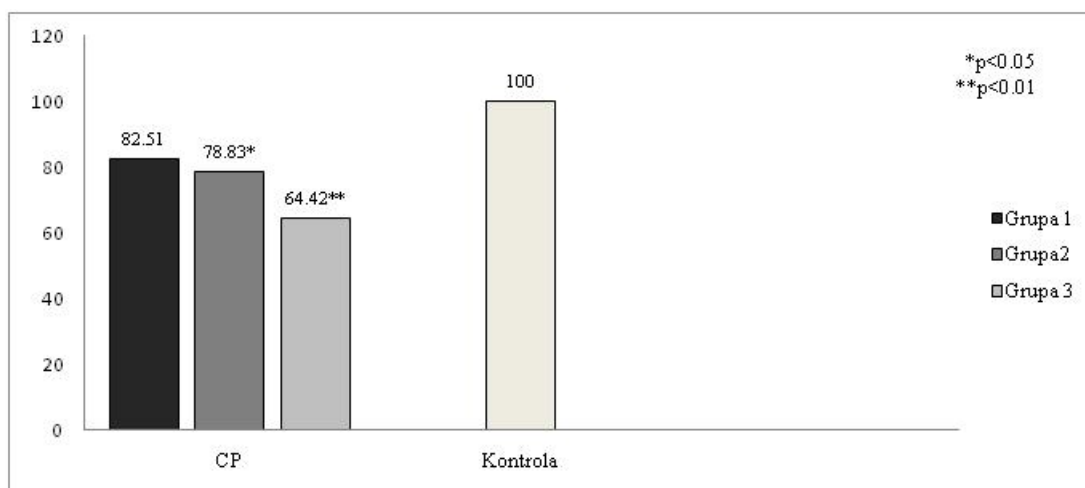
Kombinacija alfa-lipoinse kiseline i cisplatina je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statisti ku zna ajnost samo u grupi 3 na nivou $p<0.01$, $p_{ALA-CP3}=0.001$, dok u grupama 1 i 2 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALACP1, ALACP2 i ALACP3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.01$, $p_{ALA-CP}=0.009$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALACP1 razlikuje od grupe ALACP3 ($p_{ALA-CP1-3}=0.007$), dok srednja vrednost grupe ALACP2 ne pokazuje statisti ki zna ajne razlike u odnosu na ostale dve grupe.

Kombinacija alfa-lipoinse kiseline i 5-fluorouracila je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statisti ku zna ajnost samo u grupi 3 na nivou $p<0.001$, $p_{ALA-FU3}<0.001$, dok kod grupa 1 i 2 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALAFU1, ALAFU2 i ALAFU3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.01$ $p_{ALA-FU}=0.003$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALA-FU3 razlikuje od grupa ALAFU1 ($p_{ALA-FU1-3}=0.003$), i ALAFU2 ($p_{ALA-FU2-3}=0.008$), dok srednje vrednosti grupa ALAFU1 i ALAFU2 ne pokazuju me usobno statisti ki zna ajnu razliku.

4.2.3. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa raz li itim koncentracijama alfa-lipoinse kiseline u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu. Ni jedna od grupa nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kotrolnu grupu.

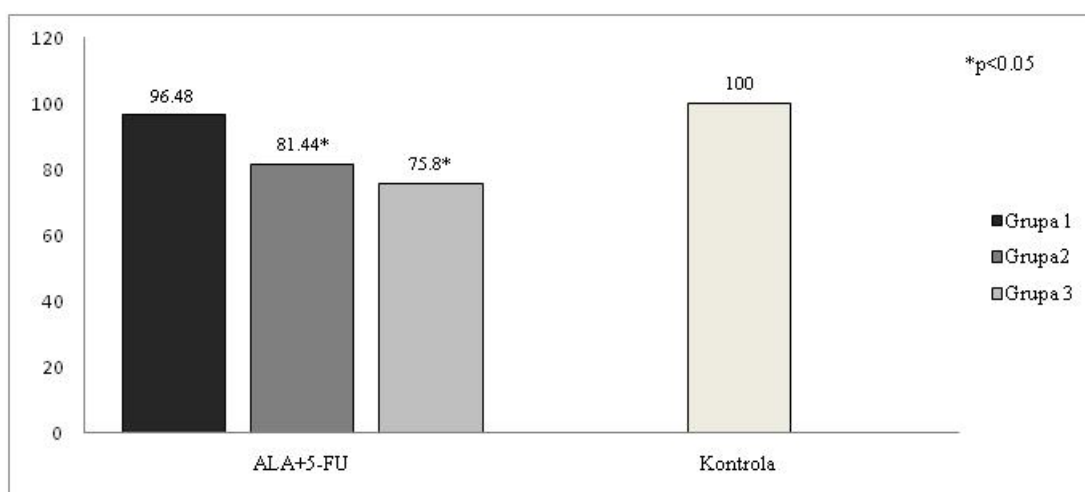
Na Grafikonu 14. prikazane su vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih elija periferne krvi sa razli itim koncentracijama cisplatina.



Grafikon 14. Kvantitativna ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih elija periferne krvi sa cisplatinom

U grupama koje su tretirane cisplatinom utvrđena je statistički značajna razlika između u grupu 2 u odnosu na kontrolnu grupu na nivou $p < 0.05$, $p_{CP2} = 0.036$, a kod grupe 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{CP3} = 0.002$, dok grupa 1 nije pokazala statistički značajnu razliku. Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom u tri različite koncentracije nijedna od grupa nije pokazala statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{FU1} = 0.224$, $p_{FU2} = 0.233$ i $p_{FU3} = 0.096$. Vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih elija periferne krvi sa različitim koncentracijama alfa-liponske kiseline i cisplatina nije pokazala statističku značajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{ALA-CP1} = 0.659$, $p_{ALA-CP2} = 0.151$ i $p_{ALA-CP3} = 0.059$.

Na Grafikonu 15. prikazane su vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih elija periferne krvi sa različitim koncentracijama alfa-liponske kiseline i 5-fluorouracila.

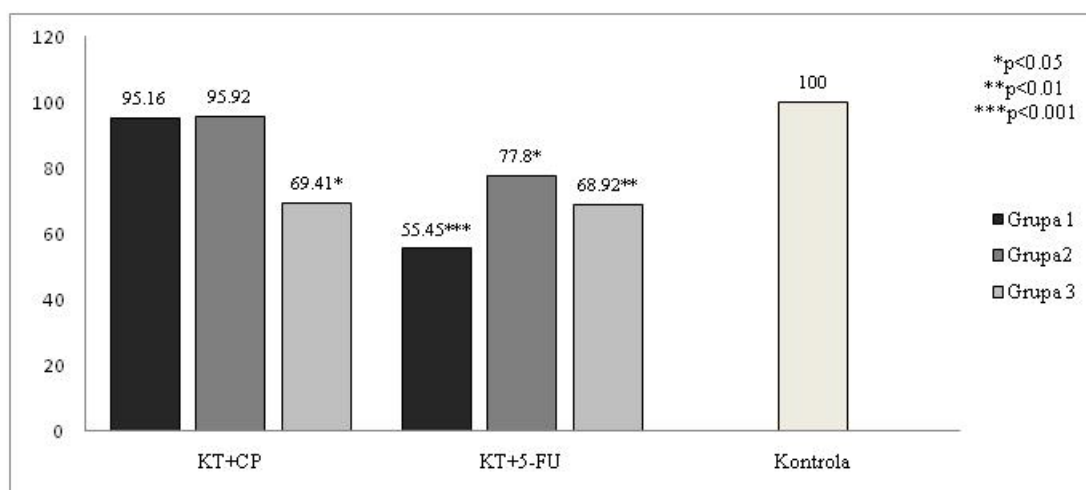


Grafikon 15. Kvantitativna ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih elija periferne krvi sa alfa-lipoinskom kiselinom i 5-fluorouracilom

Kombinacija alfa-lipoinске kiseline i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost u grupi 1 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{ALA-FU1}=0.792$, dok se grupe 2 i 3 statistički razlikuju u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{ALA-FU2}=0.029$ i $p_{ALA-FU3}=0.010$.

4.2.4. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa ketoprofenom u kulturi elija karcinoma cerviksa

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa tri različite koncentracije ketoprofena i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Hela elija u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su prikazani u procentima (%) u odnosu na kontrolu (Grafikon 16.).



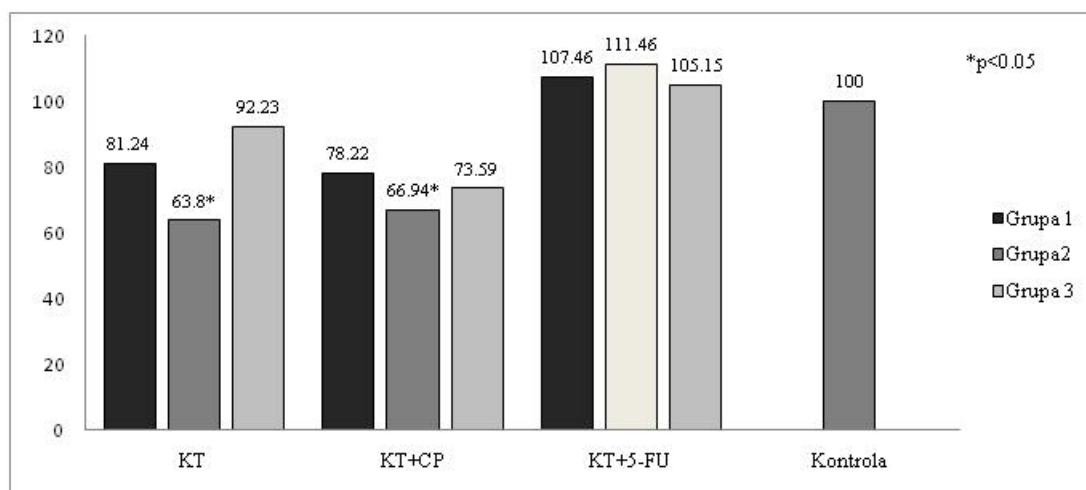
Grafikon 16. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije Hela elija sa ketoprofenom i kombinacijom sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B u kulturi Hela elije tretiranih ketoprofenom nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu $p_{KT1}=0.241$.

U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statističku značajnost samo u grupi 3 na nivou $p<0.05$, $p_{KT-CP3}=0.032$, dok u grupama 1 i 2 statistički značajna razlika nije pronađena, $p_{KT-CP1}=0.641$ i $p_{KT-CP2}=0.656$.

4.2.5. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa ketoprofenom u kulturi elija karcinoma kolona

T-testom nezavisnih uzoraka uporeni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena i kombinacije cisplatina i 5-fluorouracila u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 17.). Rezultati su prikazani u procentima (%) u odnosu na kontrolu



Grafikon 17. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija

Vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena u kulturi Caco-2 elija nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu samo u grupi 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{KT2} = 0.014$, dok grupe 1 i 3 ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.

U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statističku značajnost samo u grupi 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{KT-CP2} = 0.046$, dok u grupama 1 i 3 statistički značajna razlika nije pronađena, $p_{KT-CP1} = 0.173$ i $p_{KT-CP3} = 0.225$.

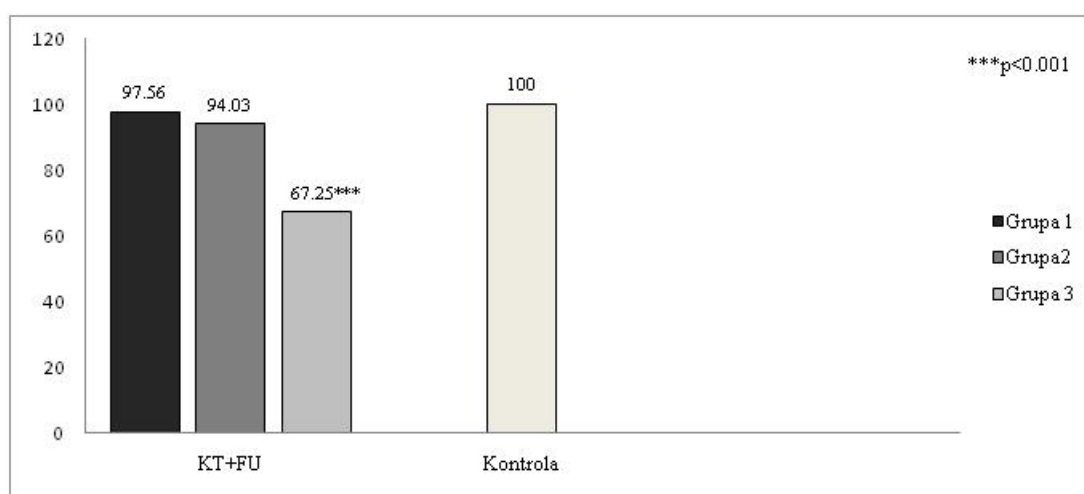
Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu ni u jednoj od grupa, $p_{KT-FU1} = 0.904$, $p_{KT-FU2} = 0.205$ i $p_{KT-FU3} = 0.434$.

4.2.6. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa ketoprofenom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa tretiranih ketoprofenom u tri različite koncentracije nijedna od grupa nije pokazala statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{KT1}=0.784$, $p_{KT2}=0.296$ i $p_{KT3}=0.119$ kao ni prilikom inkubacije mononuklearnih ćelija periferne krvi sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina, $p_{KT-CP1}=0.606$, $p_{KT-CP2}=0.249$ i $p_{KT-CP3}=0.103$.

Vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih ćelija periferne krvi sa kombinacijom ketoprofena i 5-fluorouracila prikazane su na Grafikonu 18.

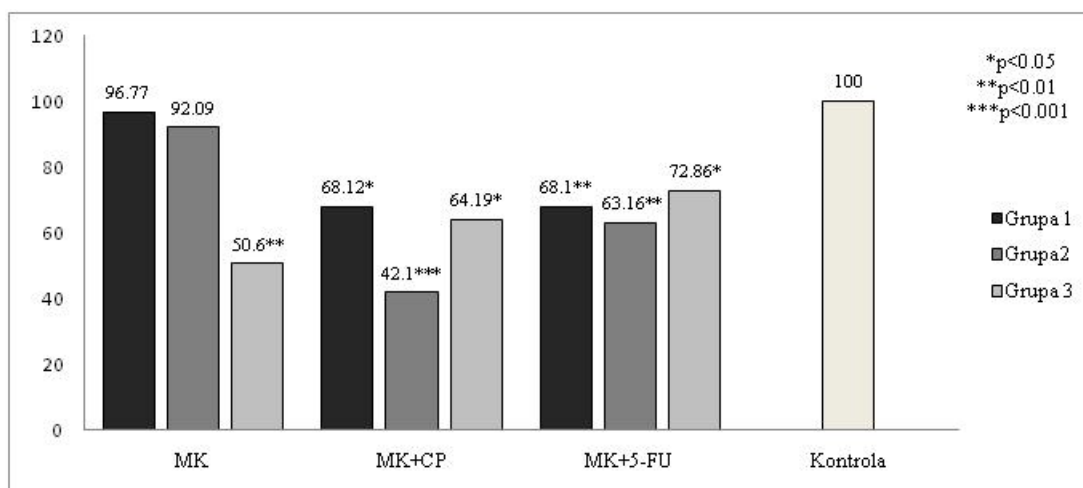


Grafikon 18. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije mononuklearnih ćelija periferne krvi sa ketoprofenom i 5-fluorouracilom

Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{KT-FU1}=0.727$ i $p_{KT-FU2}=0.686$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.001$, $p_{KT-FU3}<0.001$.

4.2.7. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u kulturi ćelija karcinoma cerviksa

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa tri različite koncentracije meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Hela ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su prikazani u procentima (%) u odnosu na kontrolu (Grafikon 19).



Grafikon 19. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije Hela elija sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

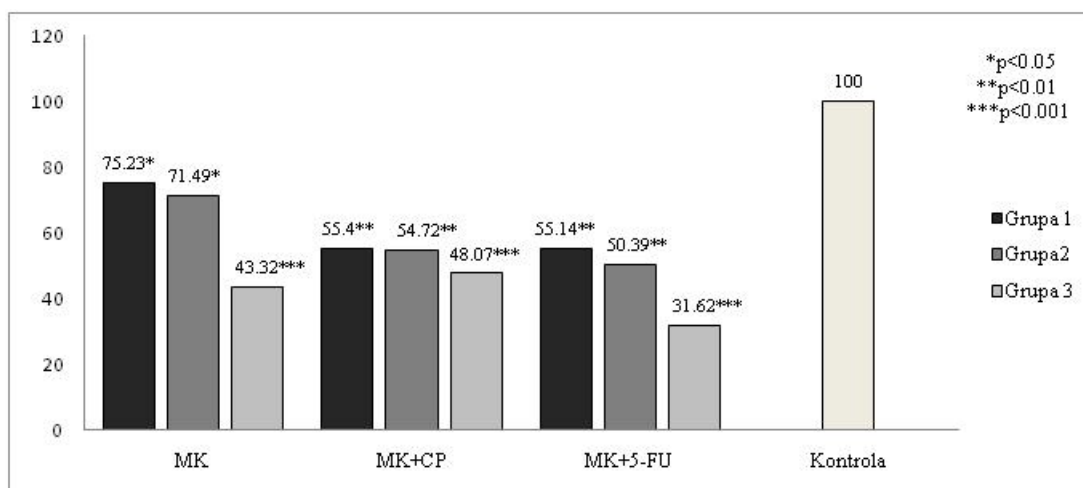
Vrednosti kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije Hela elija sa razli itim koncentracijama meloksikama u grupama 1 i 2 nisu pokazale statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu $p_{MK1}=0.723$, $p_{MK2}=0.454$, dok se grupa 3 razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.01$, $p_{MK3}=0.002$.

U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost u svim grupama i to na nivou $p<0.05$ grupe 1 i 3, $p_{MK-CP1}=0.037$, $p_{MK-CP3}=0.016$, a grupa 2 na nivou $p<0.001$, $p_{MK-CP2}<0.001$.

Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod svih grupa i to kod grupa 1 i 2 na nivou $p<0.01$, $p_{MK FU1}=0.007$, $p_{MK FU2}=0.005$, a kod grupa 3 na nivou $p<0.05$, $p_{MK FU3}=0.011$.

4.2.8. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u kulturi elija karcinoma kolona

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati ispitivanja kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 20.).



Grafikon 20. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija

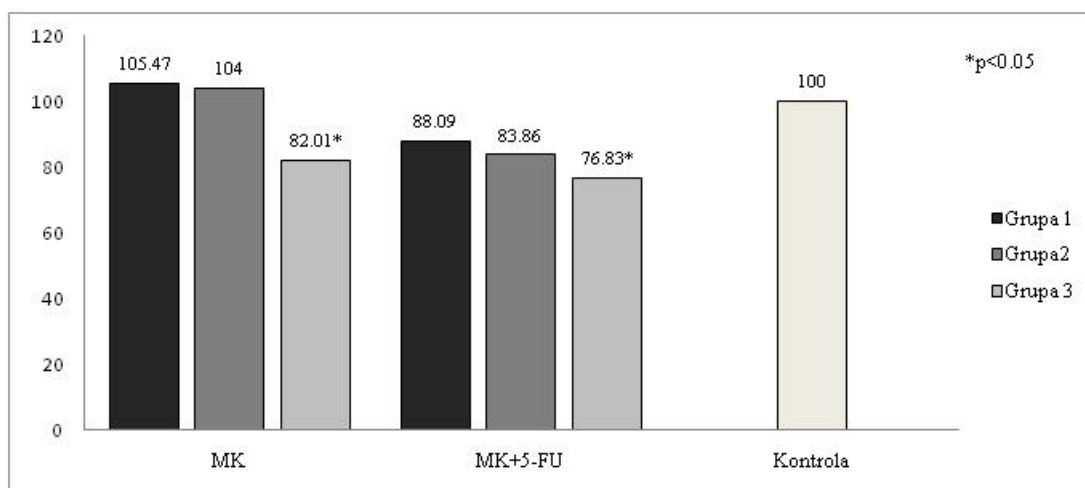
Vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B u kulturi Caco-2 elija tretiranih meloksikamom pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u svim grupama i to u grupama 1 i 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{MK1} = 0.038$, $p_{MK2} = 0.022$, a u grupi 3 na nivou $p_{MK3} < 0.001$.

U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statističku značajnost u svim grupama i to na nivou $p < 0.01$ grupe 1 i 2, $p_{MK-CP1} = 0.001$, $p_{MK-CP2} = 0.001$, a grupa 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-CP3} < 0.001$.

Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod svih grupa i to kod grupa 1 i 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-FU1} = 0.002$, $p_{MK-FU2} = 0.001$, a kod grupe 3 na nivou, $p_{MK-FU3} < 0.001$.

4.2.9. Kvantitativna ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 21).



Grafikon 21. Kvantitativna ekspresija NF- κ B nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi

Kod grupa tretiranih meloksikamom u tri različite koncentracije nije pronađena statistički značajnost u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{MK1}=0.494$ i $p_{MK2}=0.790$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{MK3}=0.040$.

Kombinacija meloksikama i cisplatina nije pokazala statističku značajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{MK-CP1}=0.978$, $p_{MK-CP2}=0.642$ i $p_{MK-CP3}=0.821$.

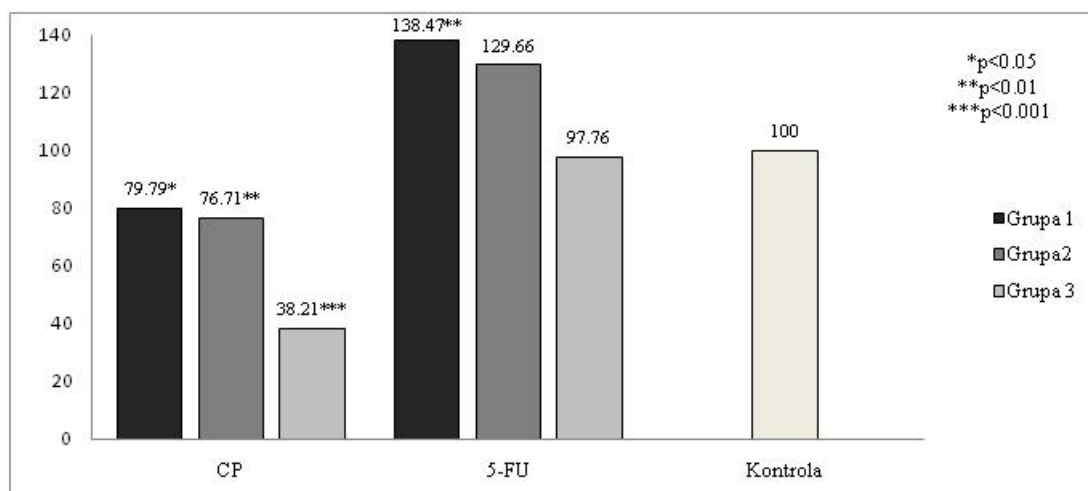
Meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom nije dao statistički značajnu razliku u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{MK-FU1}=0.398$ i $p_{MK-FU2}=0.075$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{MK-FU3}=0.021$.

4.3. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax nakon inkubacije ispitivanih supstanci u kulturi karcinoma kolona, cerviksa i primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi

U cilju ispitivanja efekata alfa-liponske kiseline, ketoprofena, meloksikama i kombinacija ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturama elija karcinoma kolona, cerviksa u sledećim poglavljima prikazani rezultati kvantitativne ekspresije kvantitativna ekspresija Bcl-2 i Bax proteina.

4.3.1. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom

T-testom nezavisnih uzoraka uporeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa različitim koncentracijama cisplatina i 5-fluorouracila u kulturi Hela elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 22).

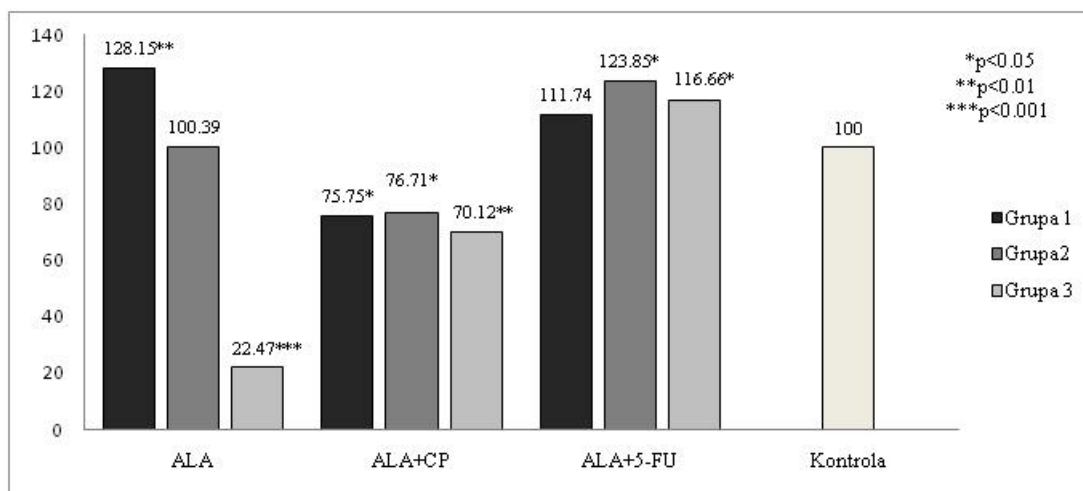


Grafikon 22. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Vrednosti Bcl-2 ekspresije u kulturi Hela elija koje su tretirane cisplatinom u tri različite koncentracije pokazale su statistički značajno smanjenje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu, i to, kod grupe 1 na nivou $p < 0.05$, $p_{CP1} = 0.013$, u grupi 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{CP2} = 0.005$, a kod grupe 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{CP3} < 0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse uz modifikaciju po Welch u istražena je statistička značajnost između grupa CP1, CP2 i CP3. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p < 0.01$, $p_{CP} = 0.001$. Naknadna poređenje pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe CP3 razlikuje od grupa CP1 ($p_{CP1-3} = 0.001$) i CP2 ($p_{CP2-3} = 0.004$), dok srednje vrednosti grupa 1 i 2 ne pokazuju statistički značajne razlike međusobno.

Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom u grupi 1 je pronađena statistički značajna povećanje na nivou $p < 0.01$, $p_{FU1} = 0.002$, u grupama 2 i 3 nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{FU2} = 0.2$, i $p_{FU3} = 0.802$. Između samih grupa tretiranih 5-fluorouracilom ne postoji statistički značajna razlika.

Rezultati ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije Hela elija sa alfa-lipoinском kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom prikazani su na Grafikonu 23.



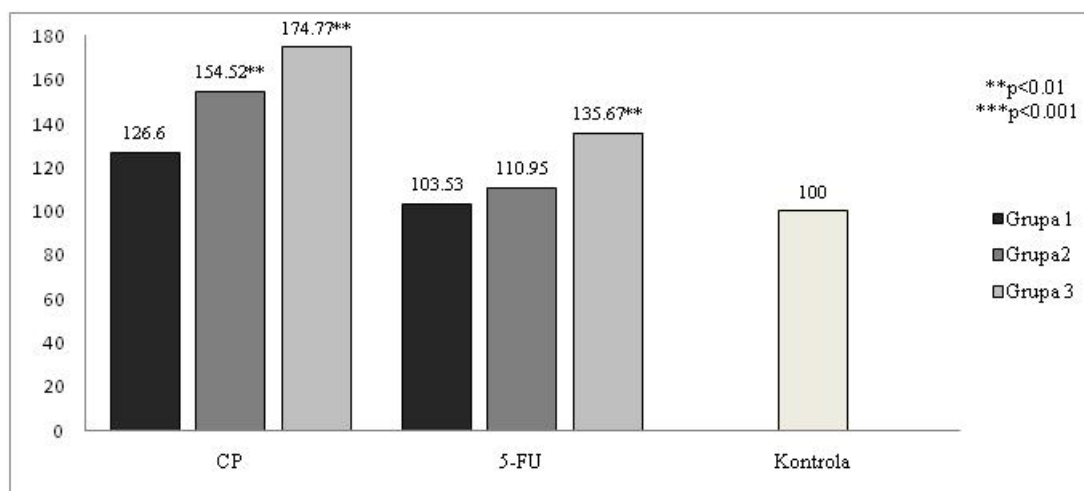
Grafikon 23. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa alfa-lipoinском kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

U Grupi 1 je prona ena statisti ki zna ajno pove anje na nivou $p<0.01$, $p_{ALA1}=0.009$, u grupi 2 nije bilo statisti ki zna ajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{ALA2}=0.962$, dok je u grupi 3 došlo do zna ajnog smanjenja $p_{ALA3}<0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALA1, ALA2 i ALA3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.001$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALA3 razlikuje od grupa ALA1 i ALA2 ($p_{ALA1-3}<0.001$ i $p_{ALA2-3}<0.001$), dok srednje vrednosti grupa ALA1 i ALA2 ne pokazuju statisti ki zna ajne razlike.

Vrednosti ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije Hela elija sa kombinacijom alfa-lipoinске kiseline i cisplatina pokazale su statisti ki zna ajno smanjenje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu, i to, kod grupa 1 i 2 na nivou $p<0.05$, $p_{CP1}=0.011$ i $p_{CP2}=0.014$, a kod grupe 3 na nivou $p<0.01$, $p_{CP3}=0.003$. Izme u samih grupa tretiranih kombinacijom alfa-lipoinске kiseline i cisplatina ne postoji statisti ki zna ajna razlika.

Statisti ka analiza je pokazala da je u kulturi Hela elija inkubiranih sa kombinacijom alfa-lipoinске kiseline i 5-fluorouracila nije došlo do smanjenja u grupi 1, $p_{FU1}=0.157$, ak je u grupi 2 i 3 došlo do statisti ki zna ajnog pove anja na nivou $p<0.05$, $p_{FU2}=0.019$ i $p_{FU3}=0.043$. Izme u samih grupa tretiranih kombinacijom alfa-lipoinске kiseline i 5-fluorouracilom ne postoji statisti ki zna ajna razlika, $p_{ALA-FU}=0.522$.

T-testom nezavisnih uzoraka uporebene su vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Hela elija inkubiranih sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u tri različite koncentracije u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 24.).



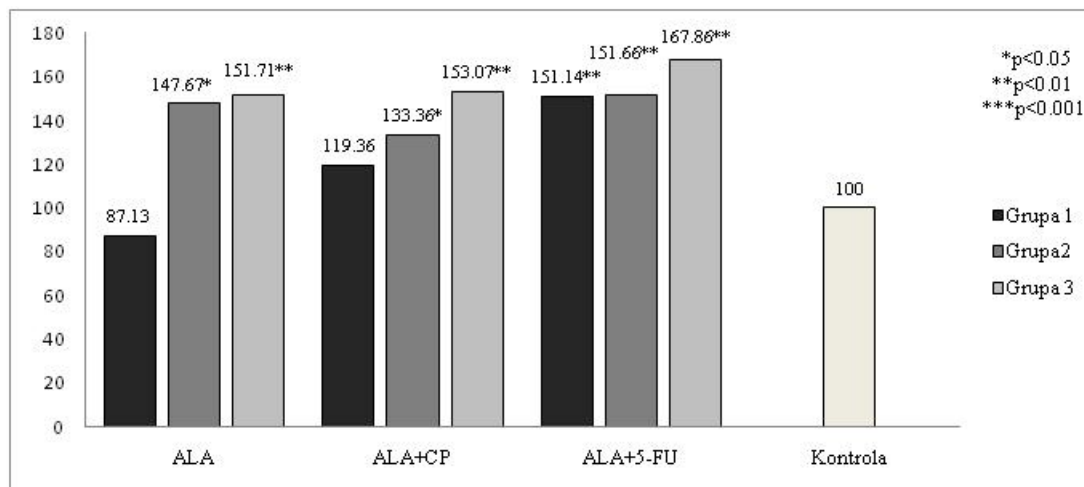
Grafikon 24. Vrednost ekspresije Bax proteina nakon inkubacije Hela elija sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Hela elija inkubiranih sa različitim koncentracijama cisplatina pokazale su povećanje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu, ali kod grupe 1 to povećanje nije statistički značajno, $p_{CP1}=0.139$, u grupi 2 je povećanje statistički značajno na nivou $p<0.01$, $p_{CP2}=0.008$, a kod grupe 3 na nivou $p<0.001$, $p_{CP3}<0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statistička značajnost između grupa CP1, CP2 i CP3. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p<0.05$, $p_{CP}=0.040$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe CP1 razlikuje od grupe CP3 ($p_{CP1-3}=0.033$), dok srednja vrednost grupe CP2 ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na ostale grupe ($p_{CP1-2}=0.234$, $p_{CP2-3}=0.439$).

Hela elije koje su tretirane 5-fluorouracilom u tri različite koncentracije pokazale su povećanje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu, ali kod grupa 1 i 2 to povećanje nije statistički značajno, $p_{FU1}=0.729$ i $p_{FU2}=0.522$, a kod grupe 3 pokazuje značajnost na nivou $p<0.01$, $p_{FU3}=0.009$.

Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statistička značajnost između grupa FU1, FU2 i FU3. Utvrđena je statistički značajna razlika na nivou $p<0.05$, $p_{FU}=0.032$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe FU1 razlikuje od grupe FU3 ($p_{FU1-3}=0.032$), dok srednja vrednost grupe FU2 ne pokazuje statistički značajne razlike u odnosu na ostale grupe.

Nivo ekspresije Bax proteina u grupi Hela elija tretiranih sa alfa-lipoinском kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom prikazan je na Grafikonu 25.



Grafikon 25. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteinu u kulturi Hela elija inkubiranih sa alfa-lipoinском kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

U grupi 1 tretiranih alfa-lipoinском kiselinom nije prona ena statisti ki zna ajna razlika, $p_{ALA1}=0.285$, dok u grupama 2 i 3 je došlo do statisti ki zna ajnog pove anja u odnosu na kontrolnu grupu i to kod grupe 2 na nivou $p<0.05$, $p_{ALA2}=0.014$, a kod grupe 3 na nivou $p<0.01$, $p_{ALA3}=0.007$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALA1, ALA2 i ALA3.

Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.01$ ($p=0.002$). Naknadna pore enja pomo u Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALA1 razlikuje od grupa ALA2 i ALA3 na nivou $p<0.01$ ($p_{ALA1-2}=0.005$ i $p_{ALA1-3}=0.003$), dok srednje vrednosti grupa ALA2 i ALA3 ne pokazuju statisti ki zna ajne razlike.

Hela elije koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoinске kiseline i cisplatina u tri razli ite koncentracije pokazale su pove anje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu. Sli no kao i kod tretmana samim cisplatinom kod grupe 1 to pove anje nije statisti ki zna ajno, $p_{ALA-CP1}=0.098$, u grupi 2 je pove anje statisti ki zna ajno na nivou $p<0.05$, $p_{ALA-CP2}=0.020$, a kod grupe 3 na nivou $p<0.01$, $p_{ALA-CP3}=0.001$.

Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALACP1, ALACP2 i ALACP3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.01$, $p_{CP}=0.003$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALACP3 razlikuje od grupa ALACP1 ($p_{ALA-CP1-3}=0.002$) i ALACP2

($p_{ALA-CP2-3}=0.043$), dok srednje vrednosti grupa ALACP1 i ALACP2 ne pokazuju statistički značajnu razliku međusobno.

Hela ćelije kojima je dodata kombinacija alfa-lipoične kiseline i 5-fluorouracila u tri različite koncentracije pokazale su statistički značajno povećanje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.01$, $p_{ALA-FU1}=0.008$, $p_{ALA-FU2}=0.002$, $p_{ALA-FU3}=0.001$. Između samih grupa tretiranih kombinacijom alfa-lipoične kiseline i 5-fluorouracilom ne postoji statistički značajna razlika, $p_{ALA-FU}=0.416$.

U Tabeli 4. prikazan je odnos Bcl-2/Bax u kulturi Hela ćelija nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoične kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom

Tabela 4. Bcl-2/Bax odnos u kulturi Hela ćelija

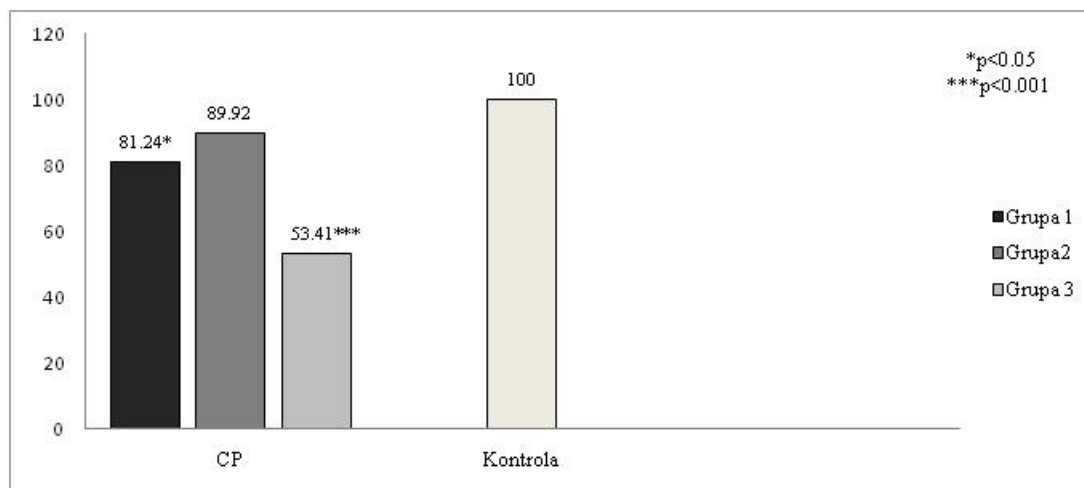
	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3
Bcl2/Bax ALA	1.47	0.68	0.15
Bcl2/Bax CP	0.63	0.46	0.22
Bcl2/Bax FU	1.34	1.17	0.72
Bcl2/Bax ALA-CP	0.63	0.58	0.46
Bcl2/Bax ALA-FU	0.74	0.82	0.69
Bcl2/Bax KT	1.11	0.73	0.58
Bcl2/Bax KT-CP	1.05	0.75	0.71
Bcl2/Bax KT-FU	1.11	0.87	0.79
Bcl2/Bax MK	0.73	0.51	0.20
Bcl2/Bax MK-CP	0.39	0.29	0.29
Bcl2/Bax MK-FU	0.52	0.52	0.46

Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje ovog odnosa pri inkubaciji Hela ćelija najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim citostaticima. Analizirani odnos bio je najniži u grupi Hela ćelija tretiranih samom alfa-lipoičnom kiselinom sa trendom dozno zavisnog opadanja odnosa Bcl2/Bax. Sličan trend zabeležen je i prilikom analize odnosa Bcl2/Bax u grupi ćelija inkubiranih najvećom koncentracijom meloksikama, samog ili u kombinaciji sa 5-

fluorouracilom. U grupi Caco-2 elija inkubiranih meloksikamom, najveći pad Bcl2/Bax odnosa zabeležen je u grupi tretiranoj najmanjom koncentracijom meloksikama i 5-fluorouracila, dok analiza rezultata upućuje na porast Bcl/Bax odnosa u grupi Hela elija inkubiranih sa ketoprofenom i njegovim kombinacijama.

4.3.2. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom kiselinom

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa različitim koncentracijama cisplatina i 5-fluorouracila u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 26.). Rezultati su prikazivani kao procenat (%) u odnosu na kontrolu.



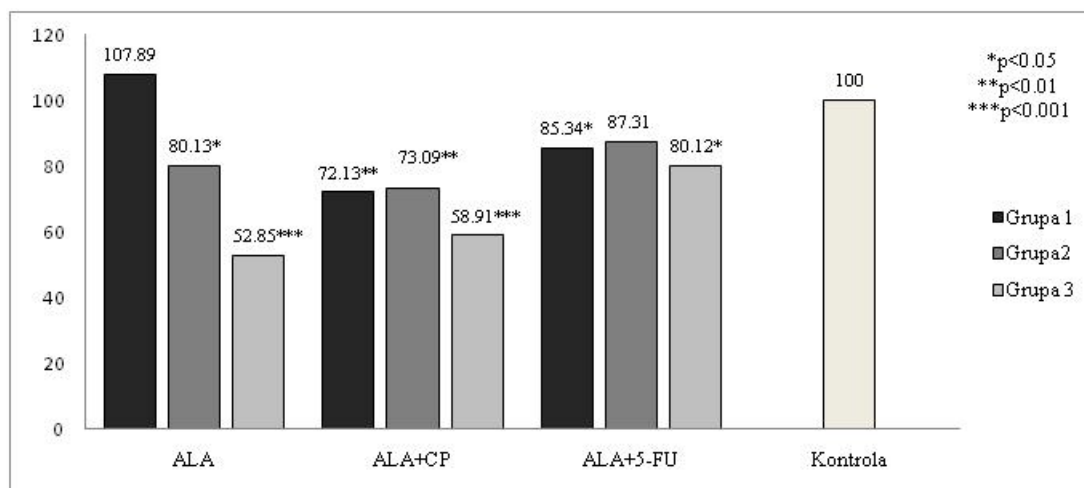
Grafikon 26. Vrednosti ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Tretman cisplatinom pokazalo je statistički značajno smanjenje u grupi 1 u odnosu na kontrolu na nivou $p < 0.05$, $p_{CP1} = 0.042$, u grupi 2 nije zabeležena statistički značajna razlika, $p_{CP2} = 0.164$, a kod grupe 3 je razlika u odnosu na kontrolu na nivou $p < 0.001$, $p_{CP3} < 0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse uz modifikaciju po Welchu istražena je statistička značajnost između grupa CP1, CP2 i CP3.

Utvrđeno je statistički značajna razlika na nivou $p < 0.01$, $p_{CP} = 0.002$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe CP3 razlikuje od grupa CP1 ($p_{CP1-3} = 0.011$) i CP2 ($p_{CP2-3} = 0.002$), dok srednje vrednosti grupa 1 i 2 ne pokazuju statistički značajne razlike međusobno.

Kod grupa tretiranih 5-fluorouracilom u sve tri grupe nije prona ena statisti ki zna ajna razlika, $p_{FU1}=0.802$, $p_{FU2}=0.366$, i $p_{FU3}=0.81$. Izme u samih grupa tretiranih 5-fluorouracilom ne postoji statisti ki zna ajna razlika, $p_{FU}=0.688$.

Rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama alfa-lipoiniske kiseline i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu prikazani su na Grafikonu 27.



Grafikon 27. Vrednosti ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa alfa-lipoiniskom kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

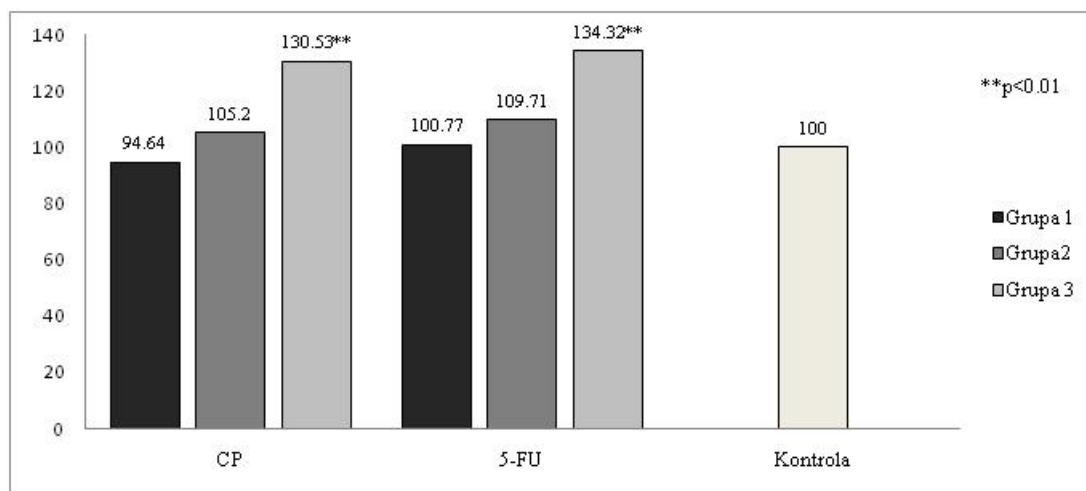
U grupi 1 nije prona ena statisti ki zna ajna razlika u odnosu na kontrolu, $p_{ALA1}=0.386$, u grupi 2 je statisti ka zna ajna razlika u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{ALA2}=0.031$, dok je u grupi 3 ta razlika na nivou $p_{ALA3}<0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa ALA1, ALA2 i ALA3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.01$, $p_{ALA}=0.001$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALA1 razlikuje od grupe ALA3 ($p_{ALA1-3}=0.001$), dok srednja vrednost grupe ALA2 ne pokazuju statisti ki zna ajne razlike u odnosu na druge grupe.

Rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i cisplatinom pokazali su statisti ki zna ajno smanjenje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu, i to, kod grupa 1 i 2 na nivou $p<0.01$, $p_{CP1}=0.003$ i $p_{CP2}=0.002$, a kod grupe 3 na nivou $p_{CP3}<0.001$. Izme u samih grupa tretiranih kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i cisplatinom ne postoji statisti ki zna ajna razlika, $p_{ALA-CP}=0.082$.

Upore ivanjem vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i 5-fluorouracila nije došlo do statisti ki

zna ajnog smanjenja u grupi 2, $p_{FU2}=0.068$, dok je u grupama 1 i 3 došlo do statisti ki zna ajnog smanjenja na nivou $p<0.05$, $p_{FU1}=0.042$ i $p_{FU3}=0.011$. Izme u samih grupa tretiranih kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i 5-fluorouracilom ne postoji statisti ki zna ajna razlika.

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa cisplatinom i 5-fluorouracilom prikazane su na Grafikonu 28.



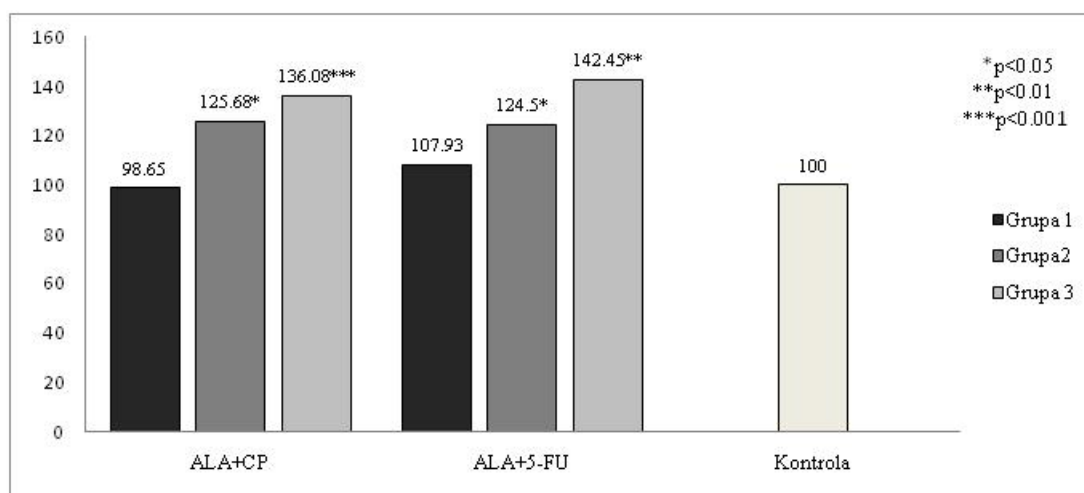
Grafikon 28. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Upore ivanjem vrednosti kvantitativne ekspresije Bax u kulturi Caco-2 elija elije koje su tretirane cisplatinom u tri razli ite koncentracije nisu pokazale u odnosu na kontrolu statisti ki zna ajnu razliku u grupama 1 i 2, $p_{CP1}=0.632$ i $p_{CP2}=0.579$, a kod grupe 3 je zna ajnost na nivou $p<0.01$, $p_{CP3}=0.009$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa CP1, CP2 i CP3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.05$, $p_{CP}=0.032$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe CP1 razlikuje od grupe CP3 ($p_{CP1-3}=0.030$), dok srednja vrednost grupe CP2 ne pokazuje statisti ki zna ajne razlike u odnosu na ostale grupe.

U grupi 1 i 2 Caco-2 elija tretiranim sa 5-fluorouracilom nije zabeležena statisti ki zna ajne razlike u odnosu na kontrolu, $p_{FU1}=0.935$ i $p_{FU2}=0.306$, a kod grupe 3 pokazuju zna ajnost na nivou $p<0.01$, $p_{FU3}=0.003$. Jednofaktorskom analizom varijanse istražena je statisti ka zna ajnost izme u grupa FU1, FU2 i FU3. Utvr ena je statisti ki zna ajna razlika na nivou $p<0.05$, $p_{FU}=0.032$. Naknadna pore enja pomo u Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe FU1 razlikuje od grupe FU3, $p_{FU1-3}=0.031$, dok srednja vrednost grupe FU2 ne pokazuje statisti ki zna ajne razlike u odnosu na ostale grupe.

T-testom nezavisnih uzoraka uporebene su vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa alfa-lipoinom u tri različite koncentracije u odnosu na kontrolnu grupu. Nije pronađena statistički značajna razlika ni u jednoj od grupa, $p_{ALA1}=0.882$, $p_{ALA2}=0.409$ i $p_{ALA3}=0.065$. Između samih grupa tretiranih alfa-lipoinom ne postoji statistički značajna razlika.

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija tretiranih alfa-lipoinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom prikazane su na Grafikonu 29.



Grafikon 29. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija tretiranih alfa-lipoinom i kombinacijom sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Caco-2 elije koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoinne kiseline i cisplatinom kod grupe 1 nisu pokazale statistički značajnu razliku, $p_{ALA-CP1}=0.913$, u grupi 2 je povećanje statistički značajno na nivou $p<0.05$, $p_{ALA-CP2}=0.030$, a kod grupe 3 na nivou $p_{ALA-CP3}<0.001$. Jednofaktorskom analizom varijanse uz modifikaciju po Welchu istražena je statistička značajnost između grupa ALACP1, ALACP2 i ALACP3. Utvrđeno je statistički značajna razlika na nivou $p<0.05$, $p_{CP}=0.021$. Naknadna poređenja pomoću Tukeyjevog HSD testa pokazuju da se srednja vrednost grupe ALACP1 razlikuje od grupa ALACP2 ($p_{ALA-CP1-2}=0.015$) i ALACP3 ($p_{ALA-CP1-3}=0.003$), dok srednje vrednosti grupa ALACP2 i ALACP3 ne pokazuju statistički značajnu razliku međusobno.

Caco-2 elije tretirane kombinacijom alfa-lipoinne kiseline i 5-fluorouracila kod grupe 1 nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, $p_{ALA-FU1}=0.528$ ($t=-0.65$), kod grupe 2 značajnost je na nivou $p<0.05$, $p_{ALA-FU2}=0.037$, a kod grupe 3 na nivou $p<0.01$, $p_{ALA-FU3}=0.004$, kada su vrednosti Bax proteina u pitanju. Između samih grupa

tretiranih kombinacijom alfa-lipoinske kiseline i 5-fluorouracilom ne postoji statistički značajna razlika, $p_{ALA-FU}=0.195$.

U Tabeli 3. prikazan je odnos Bcl-2/Bax u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoinske kiseline, ketoprofena i meloksikama i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom.

Tabela 3. Bcl-2/Bax odnos u kulturi Caco-2 elija

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3
Bcl2/Bax ALA	0.52	0.36	0.22
Bcl2/Bax CP	0.42	0.42	0.20
Bcl2/Bax FU	0.48	0.40	0.30
Bcl2/Bax ALA-CP	0.36	0.29	0.21
Bcl2/Bax ALA-FU	0.39	0.34	0.28
Bcl2/Bax KT	0.38	0.29	0.24
Bcl2/Bax KT-CP	0.42	0.30	0.27
Bcl2/Bax KT-FU	0.41	0.23	0.21
Bcl2/Bax MK	0.46	0.36	0.22
Bcl2/Bax MK-CP	0.35	0.34	0.24
Bcl2/Bax MK-FU	0.30	0.22	0.22

Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje ovog odnosa pri inkubaciji Caco-2 elija najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim citostaticima. Analizirani odnos bio je niži u grupi Caco-2 elija tretiranih kombinacijom alfa-lipoinske kiseline i 5-fluorouracila u odnosu na sam citostatik. Sličan trend zabeležen je i prilikom analize odnosa Bcl2/Bax u grupi elija inkubiranih najvećom koncentracijom ketoprofena, samog ili u kombinaciji sa 5-fluorouracilom. U grupi Caco-2 elija inkubiranih meloksikamom, najveći pad Bcl2/Bax odnosa zabeležen je u grupi tretiranoj najmanjom koncentracijom meloksikama i 5-fluorouracila.

4.3.3. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa alfa-lipoinskom

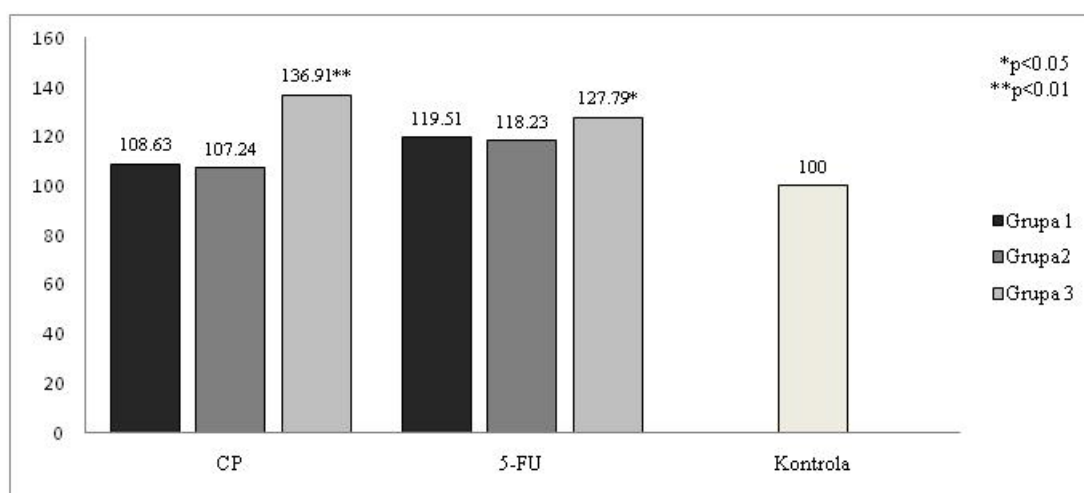
T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama alfa-lipoinske kiseline u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu. Ni jedna od grupa nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{ALA1}=0.498$, $p_{ALA2}=0.836$ i $p_{ALA3}=0.804$.

U grupama koje su tretirane cisplatinom i fluorouracilom nijedna od grupa nije pokazala statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu.

Kombinacija alfa-lipoinske kiseline sa citostaticima u kulturi monocita nije pokazala statisti ku zna ajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu.

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih sa razli itim koncentracijama alfa-lipoinske. Ni jedna od grupa nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

Na Grafikonu 30. prikazane su vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u grupi mononuklearnih elija inkubiranih cisplatinom i 5-fluorouracilom.



Grafikon 30. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u grupi mononuklearnih elija inkubiranih cisplatinom i 5-fluorouracilom

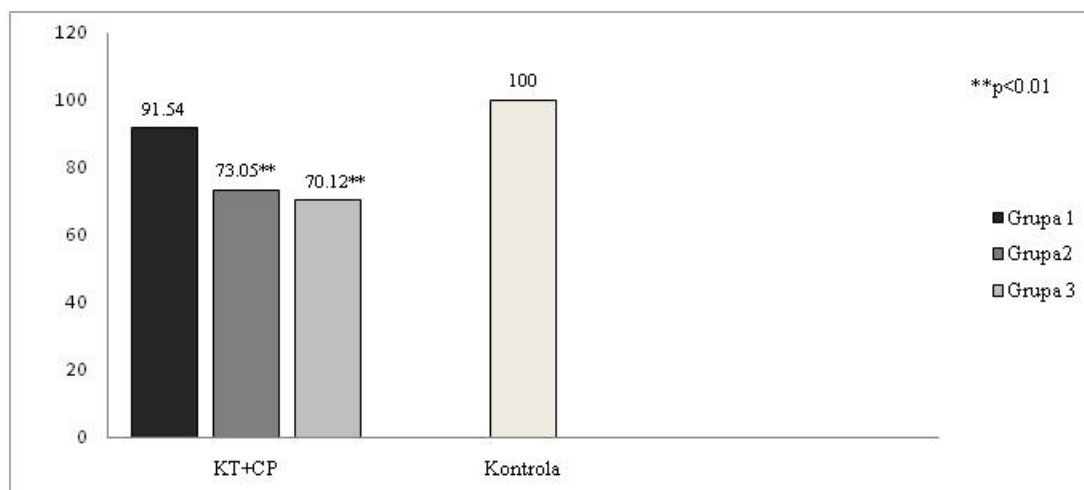
U grupama koje su tretirane cisplatinom grupe 1 i 2 nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, $p_{CP1}=0.433$, $p_{CP2}=0.639$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.01$, $p_{CP3}=0.008$.

U grupama koje su tretirane 5-fluorouracilom grupe 1 i 2 nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, $p_{FU1}=0.102$ i $p_{FU2}=0.128$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{FU3}=0.033$, dok kombinacija alfa-lipoične kiseline sa citostaticima u kulturi monocita nije pokazala statistički značajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu.

4.3.4. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa ketoprofenom

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena u kulturi Hela elija u odnosu na kontrolnu grupu pri čemu nije zabeležena značajna razlika u odnosu na kontrolu $p_{KT1}=0.131$, $p_{KT2}=0.572$ i $p_{KT3}=0.137$.

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina prikazane su na Grafikonu 31.



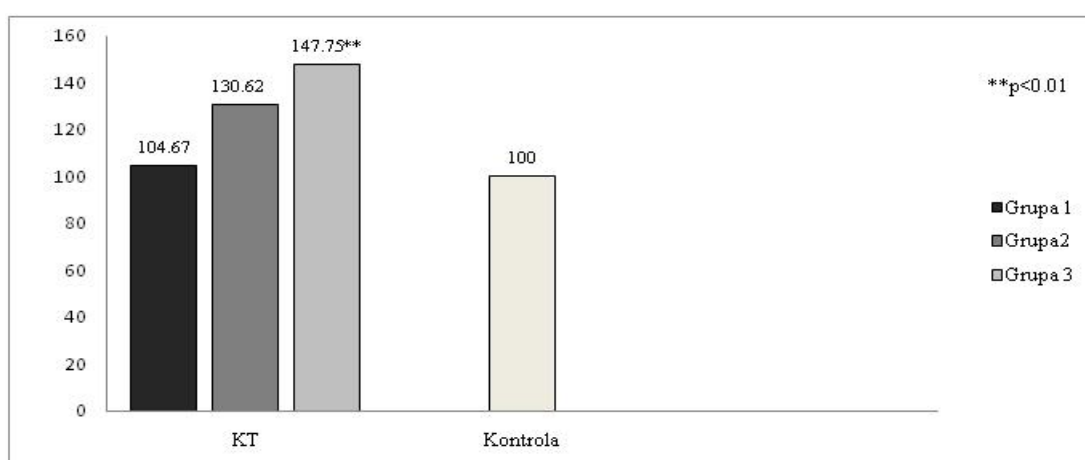
Grafikon 31. Vrednost kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina

Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statistički značajnu razliku.

značajnost u grupama 2 i 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{KT-CP2} = 0.005$, $p_{KT-CP3} = 0.003$, dok u grupi 1 statistički značajna razlika nije pronađena, $p_{KT-CP1} = 0.296$.

U kulturi Hela elija statistička analiza vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statistički značajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod svih grupa u odnosu na kontrolu.

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati ispitivanja efekta ketoprofena u tri različite koncentracije u kulturi Hela elija u odnosu na kontrolnu grupu na ekspresiju Bax proteina (Grafikon 32).



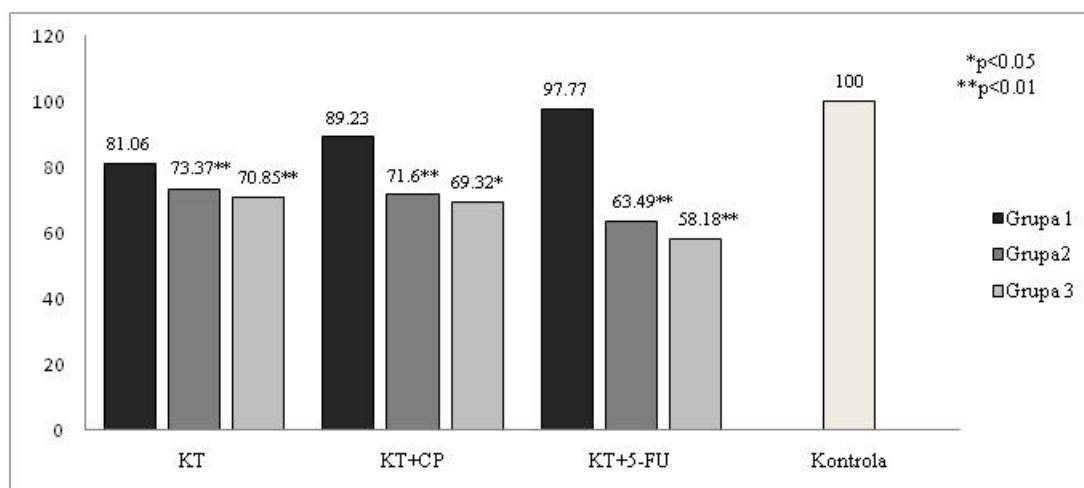
Grafikon 32. Vrednosti ekspresije Bax proteina u kulturi Hela inkubiranim ketoprofenom

Hela elije tretirane ketoprofenom su pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu samo u grupi 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{KT3} = 0.002$, dok kod grupa 1 i 2 statistički značajnost nije pronađena.

U ispitivanoj kombinaciji efekata ketoprofena i cisplatina, kao i ketoprofena i 5-fluorouracila, nije zabeležena statistički značajnost u odnosu na kontrolnu grupu u svim ispitivanim grupama.

4.3.5. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa ketoprofenom

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 elija u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 33.). Rezultati su prikazivani kao procenat (%) u odnosu na kontrolu.



Grafikon 33. Vrednost kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

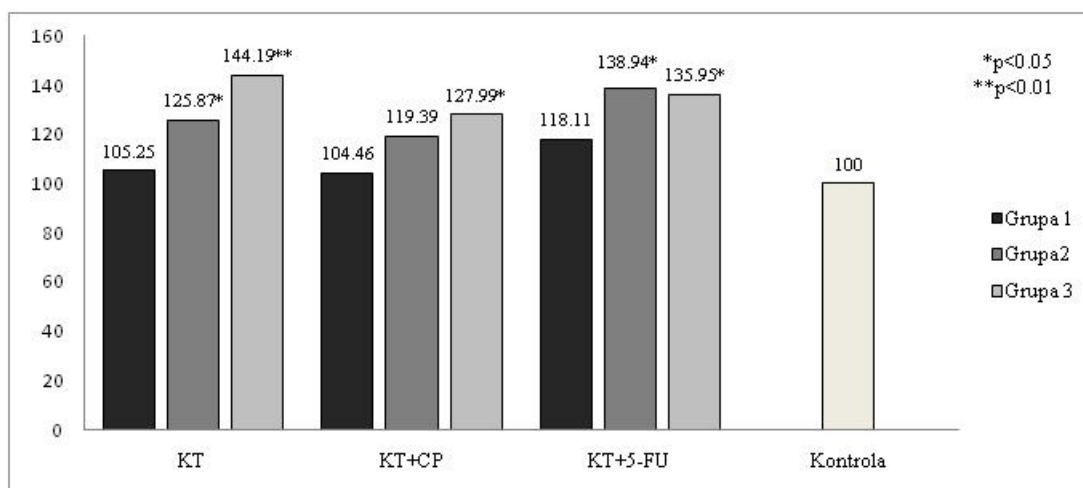
Vrednost ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija tretiranih ketoprofenom su pokazale statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupama 2 i 3, $p_{KT2}=0.004$ i $p_{KT3}=0.004$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena $p_{KT3}=0.190$.

Vrednosti Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost u grupi 2 na nivou $p<0.01$, $p_{KT-CP2}=0.007$, u grupi 3 na nivou $p<0.05$, $p_{KT-CP3}=0.019$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena, $p_{KT-CP1}=0.186$.

Vrednosti Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa kombinacijom ketoprofena i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazale su statisti ku zna ajnost u grupi 2 na nivou $p<0.01$, $p_{KT-CP2}=0.007$, u grupi 3 na nivou $p<0.05$, $p_{KT-CP3}=0.019$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena.

Statisti ka analiza kvantitativne ekspresije Bcl-2 Caco-2 elija tretiranih kombinacijom ketoprofena i 5-fluorouracila pokazala je zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod grupa 2 i 3 na nivou $p<0.01$, $p_{KT-FU2}=0.006$ i $p_{KT-FU3}=0.001$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena, $p_{KT-FU1}=0.807$.

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa ketoprofenom u tri razli ite koncentracije i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom (Grafikon 34).



Grafikon 34. Vrednost kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Caco-2 elije tretirane ketoprofenom su pokazale statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupi 2 na nivou $p<0.05$, $p_{KT2}=0.019$, u grupi 3 na nivou $p<0.01$, $p_{KT3}=0.001$, dok kod grupe 1 statisti ka zna ajnost nije prona ena, $p_{KT1}=0.673$.

U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost samo u grupi 3 na nivou $p<0.05$, $p_{KT-CP3}=0.026$, dok grupe 1 i 2 ne pokazuju statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu.

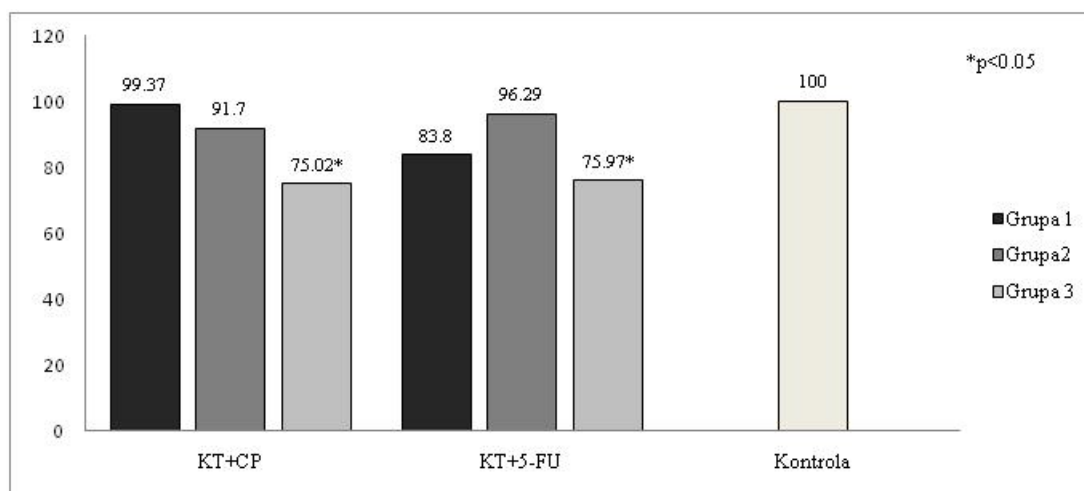
Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila pokazala je statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod grupa 2 i 3 na nivou $p<0.05$, $p_{KT-FU2}=0.018$ i $p_{KT-FU3}=0.014$, dok kod grupe 1 statisti ka zna ajnost nije prona ena, $p_{KT-FU1}=0.136$.

4.3.6. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononukleranih elija periferne krvi nakon inkubacije sa ketoprofenom

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama ketoprofena u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su prikazivani kao procenat (%) u odnosu na kontrolu.

Kod grupa tretiranih ketoprofenom u tri razli ite koncentracije nijedna od grupa nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

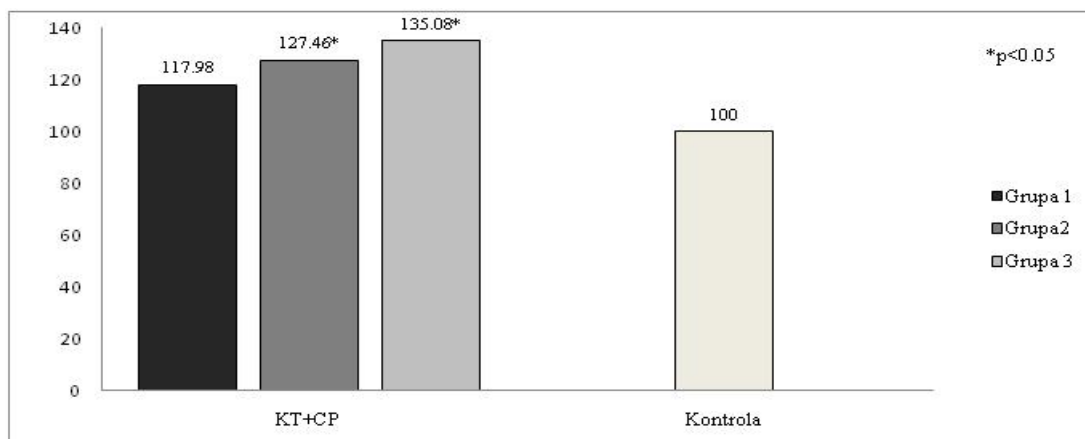
Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih kombinacijom ketoprofena sa cisplatinom i 5-fluorouracilom prikazane su na Grafikonu 35.



Grafikon 35. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih sa ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih sa kombinacijom ketoprofena i cisplatinu nije pokazala statističku značajnost u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{KT-CP1}=0.947$ i $p_{KT-CP2}=0.405$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{KT-CP3}=0.016$. Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{KT-FU3}=0.025$. T-testom nezavisnih uzoraka upoređene su vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih sa ketoprofenom u tri različite koncentracije u odnosu na kontrolnu grupu pri čemu statistička analiza nije pokazala značajnost u nijednoj od grupa nije pokazala statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti ekspresije Bax proteina u mononuklearnim elijama periferne krvi inkubiranih kombinacijom ketoprofena i cisplatinu prikazana je na Grafikonu 36.

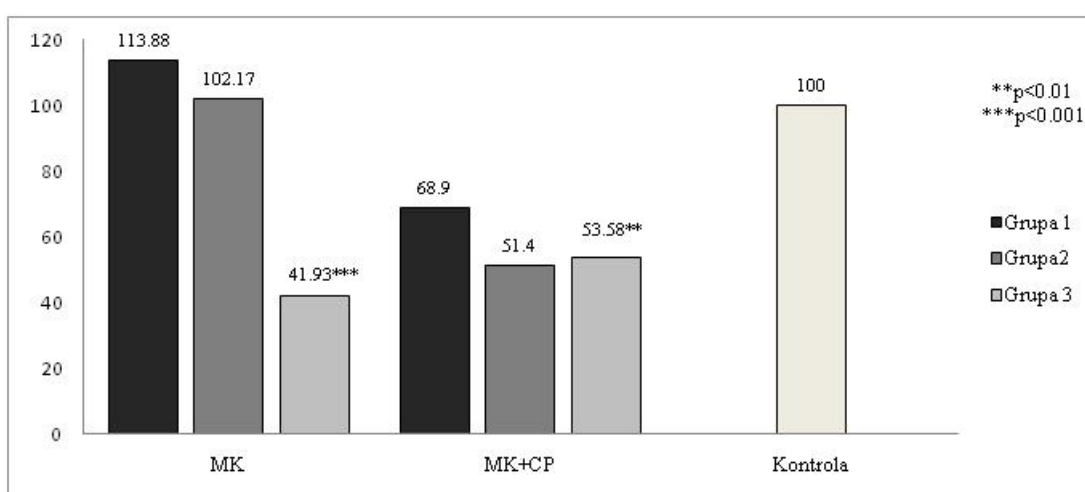


Grafikon 36. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih ketoprofenom i cisplatinom

Vrednosti ekspresije Bax proteina u mononuklearnim elijama periferne krvi inkubiranim kombinacijom ketoprofena i cisplatina nije pokazala statističku značajnost u grupi 1 u odnosu na kontrolnu grupu, dok se grupe 2 i 3 statistički razlikuju u odnosu na kontrolu na nivou $p < 0.05$, $p_{KT-CP2} = 0.040$ i $p_{KT-CP3} = 0.020$. Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost ni u jednoj ispitivanoj grupi mononuklearnih elija periferne u odnosu na kontrolnu grupu.

4.3.7. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma cerviksa nakon inkubacije sa meloksikamom

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 37).



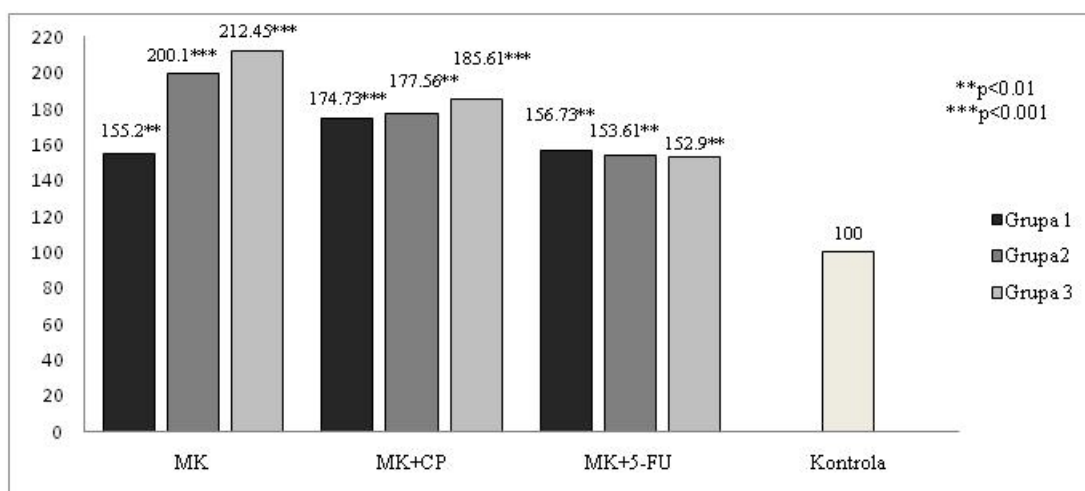
Grafikon 37. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacijom sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama meloksikama nisu pokazale statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu, dok se grupa 3 zna ajno razlikuje od kontrole na nivou $p < 0.001$, $p_{MK3} < 0.001$.

U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost u grupama 2 i 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-CP2} = 0.001$, $p_{MK-CP3} = 0.002$, dok u grupi 1 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena, $p_{MK-CP1} = 0.091$.

Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod svih analiziranih grupa.

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 38).



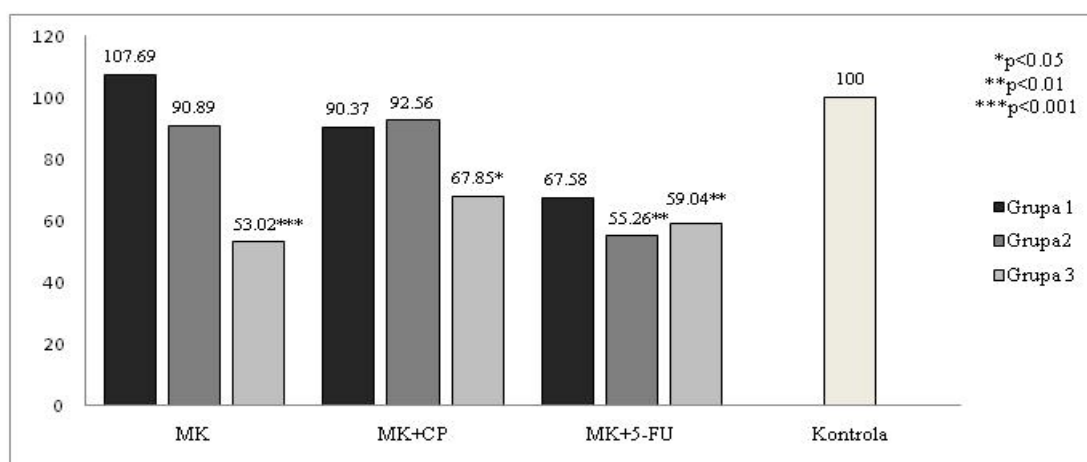
Grafikon 38. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bax u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Hela elije tretirane meloksikamom pokazale su statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu u sve tri grupe i to u grupi 1 na nivou $p < 0.01$, $p_{MK1} = 0.001$, dok kod grupa 2 i 3 je to na nivou $p < 0.001$, $p_{MK2} < 0.001$, $p_{MK3} < 0.001$.

U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost u grupi 1 i 3 na nivou $p < 0.001$, $p_{MK-CP1} < 0.001$ i $p_{MK-CP3} < 0.001$, dok je u grupi 2 statisti ki zna ajna razlika zabeležena na nivou $p < 0.01$ i $p_{MK-CP2} = 0.001$. Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila je pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod svih grupa na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-FU1} = 0.007$, $p_{MK-FU2} = 0.007$, $p_{MK-FU3} = 0.001$.

4.3.8. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi elija karcinoma kolona nakon inkubacije sa meloksikamom

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elije nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom (Grafikon 39.).



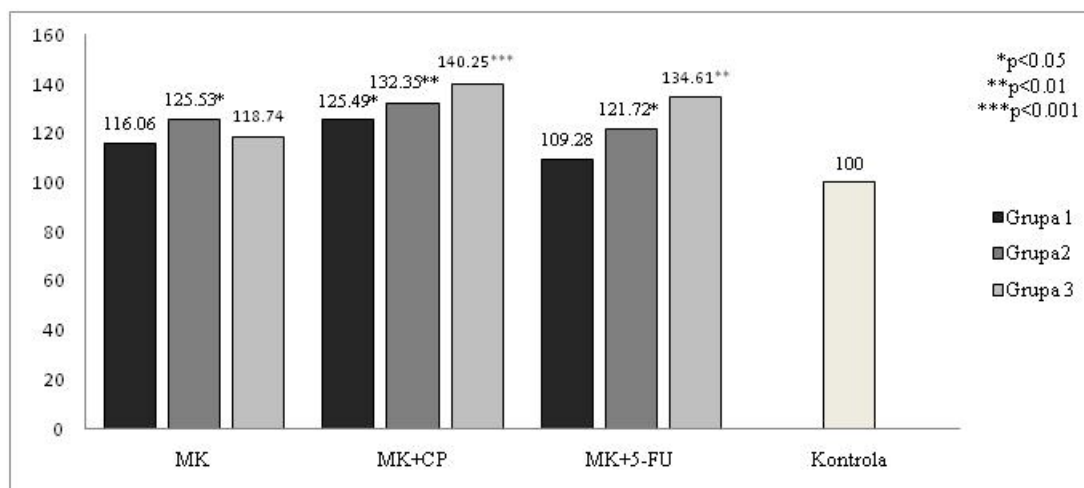
Grafikon 39. Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Statističkom analizom kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elije nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama u grupama 1 i 2 nije pronađena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, dok se grupa 3 značajno razlikuje od kontrole na nivou $p_{MK3} < 0.001$.

Analiza vrednosti ekspresije Bcl-2 u grupi tretiranoj meloksikamom i cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu pokazana je statistički značajnost u grupi 3 na nivou $p < 0.05$, $p_{MK-CP3} = 0.040$, dok u grupama 1 i 2 statistički značajna razlika nije pronađena, $p_{MK-CP1} = 0.269$ i $p_{MK-CP2} = 0.568$.

Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statistički značajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod grupa 2 i 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{KT-FU2} = 0.002$, $p_{KT-FU3} = 0.003$, dok u grupi 1 statistički značajna razlika nije pronađena.

T-testom nezavisnih uzoraka upoređeni su vrednosti ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija inkubiranim sa meloksikamom u tri različite koncentracije i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom (Grafikon 40.).



Grafikon 40. Kvantitativna ekspresija Bax proteina u kulturi Caco-2 elija nakon inkubacije sa meloksikamom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom

Caco-2 elije tretirane meloksikamom pokazale su statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupi 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{MK2} = 0.025$, dok kod grupa 1 i 3 statisti ki zna ajna razlika nije prona ena.

U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statisti ku zna ajnost kod svih grupa i to u grupi 1 na nivou $p < 0.05$, $p_{MK-CP1} < 0.040$, kod grupe 2 na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-CP3} = 0.005$, dok je u grupi 3 $p_{MK-CP3} < 0.001$.

Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statisti ku zna ajnost u odnosu na kontrolnu grupu kod grupe 2 na nivou $p < 0.05$, $p_{MK-FU2} = 0.030$, kod grupe 3 na nivou $p < 0.01$, $p_{MK-FU3} = 0.003$, dok u grupi 1 statisti ka zna ajnost nije prona ena, $p_{MK-FU1} = 0.361$.

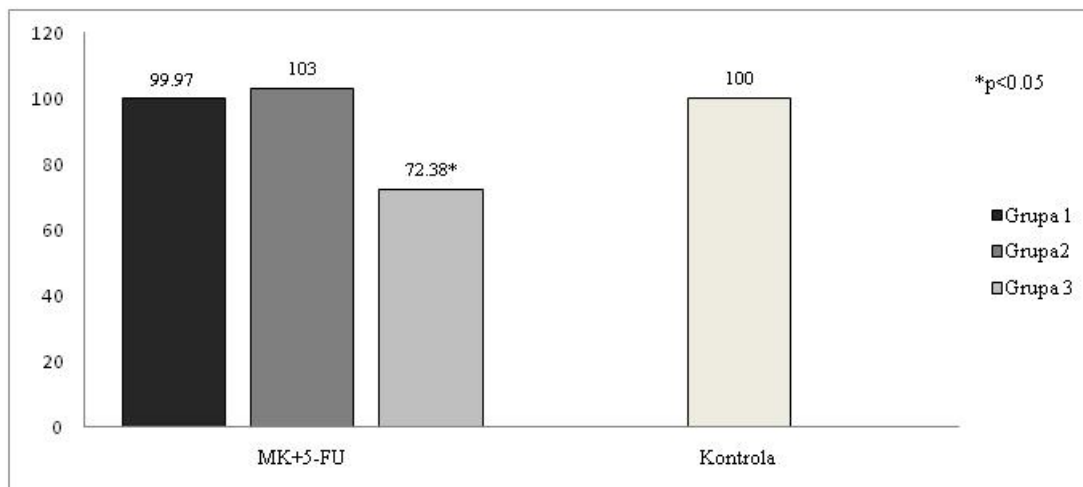
4.3.9. Kvantitativna ekspresija Bcl-2, i Bax proteina i odnosa Bcl-2/Bax u kulturi mononukleranih elija periferne krvi nakon inkubacije sa meloksikamom

T-testom nezavisnih uzoraka upore eni su rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama meloksikama u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod grupa tretiranih meloksikamom u tri razli ite koncentracije nije prona ena zna ajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{MK1} = 0.775$, $p_{MK2} = 0.896$ i $p_{MK3} = 0.373$.

Kombinacija meloksikama i cisplatin nije pokazala statisti ku zna ajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu.

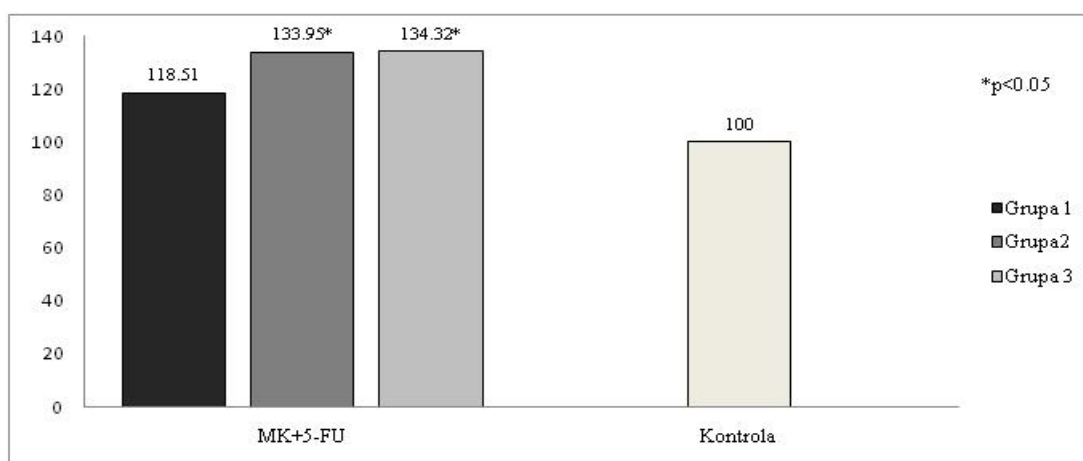
Na Grafikonu 41. prikazane su vrednosti ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa meloksikamom i 5-fluorouracilom.



Grafikon 41. Vrednosti ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi nakon inkubacije sa meloksikamom i 5-fluorouracilom

Meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom nije dao statistički značajnu razliku u grupama 1 i 2 u odnosu na kontrolnu grupu, $p_{MK-FU1}=0.999$ i $p_{MK-FU2}=0.876$, dok se grupa 3 statistički razlikuje u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{MK-FU3}=0.015$. Kod grupa tretiranih meloksikamom, kao i kombinacijom meloksikama i cisplatina u tri različite koncentracije nije pronađena značajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu.

Na Grafikonu 42. prikazane su vrednosti ekspresije Bax proteina u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih kombinacijom meloksikama i 5-fluorouracila.



Grafikon 42. Vrednosti ekspresije Bax proteina u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih kombinacijom meloksikama i 5-fluorouracila

Meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom nije dao statistički značajnu razliku u grupi 1 u odnosu na kontrolu, $p_{MK-FU1}=0.529$, dok se grupe 2 i 3 statistički razlikuju u odnosu na kontrolu na nivou $p<0.05$, $p_{MK-FU2}=0.047$ i $p_{MK-FU3}=0.046$.

U Tabeli 5. prikazan je odnos Bcl-2/Bax u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi nakon inkubacije sa različitim koncentracijama alfa-lipoične kiseline, ketoprofena i meloksikam i kombinacije ispitivanih supstanci sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom.

Tabela 5. Bcl-2/Bax odnos u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi

	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3
Bcl2/Bax ALA	1.09	0.86	0.88
Bcl2/Bax CP	0.83	0.79	0.68
Bcl2/Bax FU	0.73	0.74	0.68
Bcl2/Bax ALA-CP	0.91	0.95	0.69
Bcl2/Bax ALA-FU	0.89	0.73	0.71
Bcl2/Bax KT	1.02	0.93	0.72
Bcl2/Bax KT-CP	0.84	0.72	0.56
Bcl2/Bax KT-FU	0.83	0.95	0.63
Bcl2/Bax MK	1.23	0.85	0.71
Bcl2/Bax MK-CP	0.90	0.80	0.85
Bcl2/Bax MK-FU	0.84	0.77	0.54

Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje ovog odnosa pri inkubaciji mononuklearnih ćelija periferne krvi najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim cistostaticima. Analizirani odnos bio je najniži u grupi mononuklearnih ćelija periferne krvi tretiranih kombinacijom ketoprofena i cisplatina u najvišim koncentracijama.

5. DISKUSIJA

5.1. Značaj apoptoze u razvoju karcinoma kolona i cerviksa

Otkriće programirane ćelijske smrti je jedan od ključnih događaja koji su doprineli boljem razumevanju biologije ćelije i značajno je uticao na istraživanja u oblasti biomedicinskih nauka, posebno u domenu eksperimentalne onkologije. Razumevanje mehanizama i signalnih puteva koji su uključeni u fenomen programirane ćelijske smrti je od velikog značaja za savremenu terapiju maligniteta. Mnogi geni su uključeni u procese aktivacije i/ili inhibicije apoptoze. Efekat aktivacije ovih gena rezultuje supresiji ili progresiji karcinoma (179).

Apoptoza je jedan od glavnih mehanizama ćelijske smrti kao odgovor na terapiju karcinoma. Izmene osetljivosti na apoptozu doprinose razvoju novih terapijskih agenasa u cilju poboljšanja otpornosti na konvencionalni citostatski tretman. Defekti u procesu apoptoze karakteristika su ćelija karcinoma. Izmenjeni apoptotički odgovor ćelija karcinoma povezani su sa rezistencijom na primenjenu citostatsku terapiju (115).

Veliki broj stimulusa i stanja u organizmu, bilo fizioloških ili patoloških, mogu dovesti do apoptoze. Apoptozu može uzrokovati i nedostatak mehanizama u ćelijskim signalima. Većini ćelija potrebna je stalna stimulacija ili kontakt s površinom na kojoj rastu, a naročito je važna uloga citokina, faktora rasta i pojedinih hormona (180).

Danas se smatra da su poremećaji u apoptotičkim putevima značajni u patogenezi karcinoma kolona i cerviksa. Jedna od značajnih karakteristika malignih ćelija je preživljavanje ćelije sa oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih mutacija. Zdrave ćelije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravka oštećenja mesta DNK, a aktivacijom apoptoze sprečavaju deobu ćelije. Nakupljanje ćelija karcinoma može biti posledica aktivacije onkogenih gena, inaktivacije tumor supresor gena, mutacije gena koji reguliraju apoptozu ili poremećaja u popravljanju DNK (60).

5.1.1. Uloga alfa-lipoiinske kiseline u proliferaciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa

Alfa-lipoiinska kiselina je prirodni, ditiolni antioksidans sintetisan iz oktanske kiseline. ALA je važan kofaktor za mitohondrijalnu α -keto dehidrogenazu, ostvaruju i na taj na in važnu ulogu u mitohondrijalnom energetskom metabolizmu. Pored proseca sinteze u organizmu ALA se može u organizam uneti putem hrane ili dijetetskih suplemenata. U humanom organizmi ALA se sintetiše *de novo* iz masnih kiselina i cisteina ali u vrlo malim koli inima pa je neophodno da se unosi iz spoljašnjih izvora (181). Izvori ALA su namernice životinjskog porekla (crveno meso, jetra, bubrezi) dok je u manjem procentu zastupljena u zelenom vo u i povr u (182).

U literaturi je ALA predstavljena kao potentan biološki antioksidans i detoksikacioni agens. Farmakoterapijski aspekti ALA baziraju se na u eš u ovog antioksidansa u razli itim antiinflamatornim signalnim putevima, zato ALA pronalazi svoja indikaciona podru ja u terapiji kardiovaskularnih, kognitivnih i neuromuskularnih defekata. Potencijalna biohemijska i terapijska uloga ALA unete oralnim putem uslovljena je stepenom bioraspoloživosti, akumulacije u tkivima i metaboli kim procesima kojima podleže (183,184).

Alfa-lipoiinska kiselina se karakteriše jedinstvenim antioksidativnim sposobnostima jer i endogno sintetisana i egzogeni oblik aktivno u estvuju u hvatanju slobodnih radikala u oksidovanoj i/ili redukovanoj formi. ALA je rastvorljiva i u vodi i u mastima pa zato može obavljati antioksidativnu ulogu na nivou citozola, plazma membrane, serumskih i lipoproteina (185). Poznato je da ALA štiti mitohondrije od oksidativnog stresa i da pove avaju životni vek, funkcionalne genomske karakteristike kao i strukturni integritet mitohondrija (186).

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da postoji statisti ki zna ajno smanjenje proliferacije elija u kulturi Hela elija inkubiranih alfa-lipoiinskom kiselinom u svim ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Najizraženiji efekat zabeležen je u grupi elija inkubiranih najve om koncentracijom alfa-lipoiinske kiseline. U kombinaciji alfa-lipoiinske kisleine i cisplatina, prime en je dozno zavisian efekat ($p < 0.01$, $p < 0.001$), dok je efekat kombinacije alfa-lipoiinske kiseline i 5-fluorouracila najizraženiji u grupi koja je inkubirana najve om koncentracijom cisplatina ($p < 0.001$) (Grafikon 3.).

U sprovedenom istraživanju zabeležen je izrazit efekat alfa-lipoiinske kiseline na proliferaciju Caco-2 elija. Prona ena je statisti ki zna ajno smanjenje u grupama inkubiranim sa srednjom i najve om koncentracijom ovog antioksidansa, uz primetan trend izrazite dozne zavisnosti ($p < 0.001$).

Efekata alfa-lipoiinske kiseline u kombinaciji sa cisplatinom je dovodi do statisti ki zna ajanog smnjenja proliferacije elija izme u grupa 2 i 3, uz primetno potenciranje delovanja cisplatina u svim ispitivanim koncentracijama ($p < 0.001$, $p < 0.05$). Kada je u pitanju kombinacija sa 5-fluorouracilom, rezultati pokazuju statisti ki zna ajno smanjenje izme u grupa 1 i 2 ($p < 0.01$, $p < 0.001$) i kontrolne grupe, uz potenciranje efekta 5-fluorouracila, koji je prva terpijska linija u le enju karcinoma kolona (Grafikon 7.).

Literaturni podaci pokazuju da alfa-lipoiinska kiselina deluje kao antiapoptoti ki agens u razli itim elijskim kulturama, prevenirajući oksidantima indukovanu elijsku smrt, dok indukuje apoptozu u elijama karcinoma (187).

ALA pokazuje antiproliferativni efekat i inhibira rast kolon karcinom elija u *in vitro* uslovima što je u skladu sa rezultatima sprovedenog istraživanja (188,189), dok nema literaturnih podataka o efektu alfa-lipoiinske kiseline na elije karcinoma cerviksa kao ni o potenciraju em efektu ALA sa konvencionalnim citostaticima koji su pokazani u sprovedenom istraživanju. Tako e dostupni su podaci koji govore o signifikantnoj inhibiciji proliferacije elija karcinoma dojke (190).

Pack i sar. pokazali su da tretman Jurkat i CCRF-CEM humanih T limfoma elija sa 0.001-4 mmol/L ALA dovode do dozno zavisne inhibicije DNK replikacije i elijske proliferacije (191) dok su Parker i sar. pokazalili da 10-30 $\mu\text{mol/L}$ ALA inhibira rast elija melanoma (192).

Antiproliferativni efekat ALA zabeležen je u B16F10 elijama melanoma i elijama karcinoma ovarijuma (193), dok antiproliferativan efekat nije zabeležen u humanim netransformisanim elijama (191,194). Istraživanja pokazuju da ALA vrši indukciju apoptoze u razli itim elijskim linijama karcinoma. ALA dovodi do indukcije apoptoze u elijama hepatoma (FaO, HepG2) potvr uju i važnu ulogu ovog antioksidansa u mogu im i važnim molekularnim doga ajima maligno transformisanih elija (187).

5.1.2. Uloga ketoprofena i meloksikama u proliferaciji i indukciji apoptoze elija karcinoma kolona i cerviksa

Višestepena priroda nastanka kolorektalne i cervikalne neoplazije upu uje na injenicu da specifi ni pristupi mogu imati važnu ulogu u razvoju i invaziji ovih karcinoma. Nekoliko važnih faktora usko su povezani sa patogenezom nastanka i razvoja karcinoma kolona i cerviksa uklju uju i: izmenjenu aktivnost NF-kB, izmenjenu ekspresiju COX-1 i COX-2 kao i promene u odnosima proapoptotih i antiapoptotih proteina. Održavanje kontinuiteta u istraživanjima na nivou klini ke onkologije i farmakologije je težnja ka otkrivanju novih agenasa, prirodnog ili sintetskog porekla, koji bi svoj potencijalni mehanizam delovanja inhibicijom nekog od pomenutih molekularnih mehanizama (195).

COX-1 i COX-2 vrše konverziju arahidonske kiseline do prostaglanidina G2 (PGG2), koji se reakcijama subsekventne peroksidacije prevode u PGH2 omogu avaju i, na taj na in, formiranje biološki zna ajnih prostanoida. Produkti ovih signalnih molekula striktno su regulisani stepenom ekspresije COX-2 kao i kataliti kim kapacitetom obe ciklooksigenazne izoforme (196). Iako obe izoforme umaju komparabilne Km vrednosti za arahidonate, COX-2 se aktivira pri mnogo manjim koncentzracijama nego COX-1 (197). Neselektivni antiinflamatorni lekovi inhibiraju obe ciklooksigenazne forme, COX-1 putem procesa ireverzibilne acetilacije i COX-2 procesom kompetitivne inhibicije. *In vitro* eseji pokazuju da postoji širok rang u selektivnosti NSAID prema ciklooksigenaznim formama kada pojedini lanovi pokazuju visok stepen selektivnosti prema COX-1 (ibuprofen, flurbiprofen), dok koksibi pokazuju visok stepen selektivnosti prema COX-2 izoformi (198). Dosadašnja istraživanja upu uju da su antiinflamatorni efekti i antitumorski potencijal NSAID zapravo posledica selektivne inhibicije COX-2 izoforme dok su neželjena dejstva ove grupe lekova povezana sa stepenom ekspresije konstitutivne COX-1 iziforme (199).

COX-1 i COX-2 katalizuju korake koji ograni avaju metaboli ku konverziju arahidonske kiseline do prostaglansina (PG) koji su uklju eni u razli ite patološke procese. Posebna pažnja poklanja se PGE2 koji je medijator proinflamatornih i tumor promovišu ih efekata COX enzima. 15-prostaglandih dehidrogenaza (15-PGDH) u estvuje u kataliti koj degradaciji PGE2 (200). NSAIL dovode do inhibicije COX enzima uti u i na metabolizam prostaglandina, što rezultuje antiinflamatornim i antitumorskim efektom ovih lekova. Istraživanja sprovedena poslednjih godina upu uju na postojanje nekoliko drugih mehanizama koji su nezavisni od COX inhibicije (201).

Tretiranje elija razli itih elijskih linija NSAIL lekovima dovodi do obustave G1 faze elijskog ciklusa zbog smanjene ekspresije ciklina A, B i D (202). Smatra se da je jedino objašnjenje blokade elijskog ciklusa u ovom slučaju posledica inhibicije protein kinaze B (PKB/Akt) i da je ovaj tip blokade i/ili odlaganja elijskog ciklusa nezavisan od COX-2 inhibicije (203). Pored inhibicije COX enzima, NSAIL dovode do stimulacije 15-PGHD kao i ekspresije NSAIL-aktiviranog gena (NAG-1). NAG-1 je član TGF- β superfamilije i njegova ekspresija je redukovana od strane PGE₂. Povećana ekspresija COX-2 u elijama karcinoma kolona praćena je smanjenom ekspresijom NAG-1. Sa druge strane NSAIL su odgovorni za inhibiciju PPAR- δ gena koji je normalno regulisan od strane APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) (204), a dovode do inhibicije NF- κ B, Jak3/Stat3 signalnih puteva i do nishodne regulacije proinflamatornih citokina do nivoa koji omogućavaju inhibiciju inflamacije i karcinogeneze (205).

Analizom rezultata sprovedenog istraživanja u kulturi Hela elija tretiranih različitim koncentracijama ketoprofena utvrđeno je statistički značajno smanjenje proliferacije elija u grupama 1 i 2 ($p < 0.001$). Prilikom inkubacije Hela elija sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina zabeležena je statistička značajnost u sve tri ispitivane grupe ($p < 0.001$), dok je u kombinaciji sa 5-fluorouracilom značajnost pronađena samo u srednjoj ispitivanoj koncentraciji ($p < 0.01$) (Grafikon 4.). U sprovedenom istraživanju, analizom rezultata MTT testa nakon inkubacije Hela elija sa meloksikamom i kombinacije sa konvencionalnim citostaticima, zabeležena je statistički značajan efekat meloksikama na proliferaciju elija u grupama inkubiranih srednjom i najvećom dozom ovog nesteroidnog antiinflamatornog leka ($p < 0.001$). U kombinaciji sa cisplatinom pronađen je dozno zavisni efekat koji je bio najizraženiji u grupi 3 ($p < 0.001$). Efekat meloksikama u kombinaciji sa 5-fluorouracilom pokazao je statistički značajno smanjenje proliferaciju Hela elija između svih ispitivanih grupa ($p < 0.01$, $p < 0.001$) u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 5.).

Rezultati sprovedenog istraživanja u kulturi Caco-2 elija inkubiranih ketoprofenom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom pokazuju da postoji značajno smanjenje proliferacije u grupama 1 i 2 ($p < 0.05$). U kombinaciji ketoprofen i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajno smanjenje samo u grupi elija tretiranih najvećom koncentracijom predviđene kombinacije ispitivanih supstanci ($p < 0.001$). Sličan trend zabeležen je i pri inkubaciji Caco-2 elija najvećom koncentracijom ketoprofena i 5-fluorouracila ($p < 0.001$) (Grafikon 8.). Analizom dobijenih rezultata MTT testa u obavljenom

istraživanju u grupi Caco-2 elija inkubiranih meloksikamom i kombinacije sa konvencionalnim citostaticima, utvrđena je statistički značajno smanjenje u sve tri ispitivane odnosu na kontrolnu ($p < 0.001$). Kombinacija meloksikama i cisplatina pokazala je izrazito statistički značajno smanjenje proliferacije u svim grupama u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.001$), dok je efekat meloksikama u kombinaciji sa 5-fluorouracilom na proliferaciju elija Caco-2 elija pokazao značajnost pri upotrebi srednje i najveće koncentracije ispitivane kombinacije ($p < 0.001$) (Grafikon 9).

Zheng i sar. zabeležili su sinergistički efekat nimesulida u toku paralelne administracije sa citotoksičnim hemoterapeuticima u toku terapije karcinoma pluća (206). Selektivni COX-2 inhibitori mogu potencijalno povećati osetljivost elije karcinoma na delovanje konvencionalnih citostatika, smanjenjem IC_{50} za skoro 70% (207). Entezari i sar. potvrdili su ulogu koksiba u indukciji apoptoze elija karcinoma kolona (208).

Pojavna ekspresija obe ciklooksigenazne forme u elijama karcinoma cerviksa svih stepena i stadijuma bolesti (209) potvrđuje ulogu ovog enzima u patogenezi cervikalne displazije. Istraživanje koje su sprovedili Sales i sar. potvrđuje antiakancersku aktivnost NSAIL koja se objašnjava redukcijom sinteze PGE u elijama sa povećanom ekspresijom COX-2, nishodno regulišu i procese preživljavanja i metastaziranja elija karcinoma cerviksa (210). COX-1 izoforma je konstitutivno eksprimirana u normalnim elijama gastrointestinalne mukoze i odgovorna je za fiziološke procese u mukozi. COX-2 je konstitutivno eksprimirana u humanom tkivu bubrega i mozga dok je ekspresija ove ciklooksigenazne forme u mnogim tkivima povećana u toku inflamacije i neoplastičnih transformacija (211).

NSAIL mogu da ostvare antikancerogeni efekat u različitim tipovima elije putem indukcije apoptoze (201). Apoptoza, može biti indukovana putem aktivacije receptora smrti u okviru unutrašnjeg apoptotičkog puta što posledično dovodi do oslobađanja citohroma c iz mitohondrija. Rezultati istraživanja potvrđuju ulogu aktivacije unutrašnjeg puta u indukciji apoptoze elija karcinoma nakon tretmana celekoksibom koji je bio praćen smanjenjem ekspresije antiapoptotičkih proteina Bcl-2, Bcl-xl i Mcl-1 i povećanjem ekspresije proapoptotičkog Bad proteina, brzim oslobađanjem citohroma c i aktivacijom Apaf-1, kaspaza 3, 8 i 9 (212).

NSAIL mogu dovesti do indukcije apoptoze različitim molekularnim mehanizmima uključujući: formiranje ceramidnih kanala i naknadno otpuštanje proapoptotičkih proteina (213), inhibicijom Ca^{2+} ATP-aze što posledično dovodi do povećanja intracelularnog kalcijuma (214), indukcija 15-lipooksigenaze i povećana produkcijom proapoptotičkih

molekula (215) i/ili promena u ekspresiji gena, NAG-1, koji je uklju en u razvoju i progresiji karcinoma (216). Na kraju, pove ana ekspresija COX-2 izoforme, može dovesti do inhibicije angiogeneze i redukcije daljeg rasta i razvoja karcinoma (217).

Postoji malo literaturnih podataka koji potvr uju ulogu NSAIL u prevenciji i terapiji karcinoma cerviksa. Jedina kohortna studija potvrdila je nepostojanje rizika od pojave cervikalnog karcinoma prilikom dugotrajne upotrebe NSAIL (218). Uloga NSAIL u hemoprevenciji karcinoma je objašnjena i potvr ena *in vitro* i *in vivo* rezultatima, ali klini ka primena ovih lekova kao hemopreventivnih agenasa je delom ograni na zbog postojanja velikog broja nedoumica vezanih za optimalni režim doziranja, dužinu trajanja terapije i nepotpuno objašnjenih mehanizama delovanja u prevenciji i kontoli napredovanja karcinoma. *In vitro* istraživanja pratila su antiproliferativni efekat neselektivnih antiinflamatornih lekova uklju uju i: acetilsalicilnu kiselinu, sulindak, sulindak sulfid, indometacin, naproksen i piroksikam (219). Rezultati ovih studija su kontraverzni. Shiff i sar. su pokazali antiproliferativnu aktivnost sulindaka i sulindak-sulfida na elije HT-29 linije (220). Dalja istraživanja koje su sproveli Goldberg i Qiao potvrdila su antiproliferativnu aktivnost acetilsalicilne kiseline, indometacina, naproksena, piroksikama kao i selektivnih COX inhibitora na elije karcinoma kolona u *in vitro* uslovima (221,222). Pored mehanizama povezanih sa inhibicijom COX-a, NSAIL mogu ostvariti antikancerogeni potencijal i COX nezavisnim mehanizmima. To je potkrepljeno istraživanjima koje su sproveli Grosh i Tegeder (202,223) u kojima je pokazano da antiproliferativnu aktivnost pokazuju i doze NSAIL koje su mnogo puta ve e od onih koje su neophodne za inhibiciju COX-2 izoforme kao i da su NSAIL efikasni lekovi u prevenciji karcinoma kod kojih COX-2 izoforma nije eksprimirana (224).

Nema dostupnih literaturnih podataka sa kojima bi se mogli uporediti dobijeni rezultati efekata ketoprofena i meloksikama na proliferaciju elija u kulturi elija karcinoma kolona i cerviksa. Pretpostavlja se da je mehanizam antiproliferativne sposobnosti ispitivanih nesteroidnih antiinflamatornih lekova, kao i sinergisti kog efekta sa cisplatinom i 5-fluorouracilom sli an ostalim lanovima ove velike farmakološke grupe lekova, omogu avaju i na taj na in ketoprofenu i meloksikamu da u u u borbu preživljavanja elija karcinom kolona i cerviksa (219-224).

5.2. Značaj transkripcionog faktora NF- κ B u razvoju i terapiji karcinoma kolona i cerviksa

Kada je aktiviran, NF- κ B dovodi do povećanja preživljavanja ćelija karcinoma utičući na proces ćelijske transformacije, metastaziranja, invazije, proliferacije, hemorezistencije, radiorezistencije i inflamacije (225). Aktivnost NF- κ B nije uslovljena samo različitim oblicima fosforilacije već i dinamičnim i kompleksnim protein-protein interakcijama koje su generisane sistemom povratne sprege. Pored veoma dobro definisanih interakcija između članova NF- κ B porodice važno je napomenuti interakcije sa inhibitornim molekulima (I κ B β , I κ B α , I κ B γ). Mreža proteina koji potencijalno mogu interagovati sa NF- κ B je veoma kompleksna i široka. Kada je prisutan akutni inflamacioni proces, negativna povratna sprega rezultira inaktivacijom NF- κ B dok hronična inflamacija šalje takve stimulse koji mogu da nadmaše inhibitornu povratnu spregu dovodeći do konstitutivno povišene aktivnosti NF- κ B (226).

Karcinomi sa konstitutivnom NF- κ B aktivnošću u pokazuju povećanu rezistenciju na hemoterapiju. Ovaj transkripcioni faktor može biti odgovoran za blokiranje efekata i smanjenje efikasnosti hemoterapije i zračenja kod ćelija karcinoma kolona i cerviksa. Neophodno je napomenuti da NF- κ B može biti odgovoran za ekspresiju P-glikoproteina. U pojedinim karcinomima, ćelije izložene zračenju ili citostatskom tretmanu pokazuju povećanu ekspresiju ovog transkripcionog faktora. Sa druge strane, inhibicija NF- κ B dovodi do poboljšanja u citostatskom tretmanu i zračenju terapiji maligniteta. Aktivacija NF- κ B je rezultat višestepenog signalnog puta i njegove aktivne komponente deluju na različite tačke ovog signalnog procesa. Pojedini antiinflamatorni lekovi mogu inhibirati NF- κ B ometanjem aktivnosti IKK jedinica (227). Nair i sar. pokazuju da povećanje jedarnog NF- κ B i p-65-p50 aktivnost udruženo je sa progresijom cervikalnog karcinoma (228).

Da li će NF- κ B ubrzati ili inhibirati apoptozu zavisi od tipa ćelije i vrste signala koji do ćelije stiže. Kod velikog broja ćelija karcinoma, NF- κ B je perzistentno aktivan što rezultuje konstitutivnom aktivacijom signalnih kinaza ili mutacijom inaktivne I κ B subjedinice. Perzistentna aktivacija NF- κ B može dovesti do razvoja rezistencije na primenjeni citostatski režim ili zračenju terapiju (223).

Generalno je prihvaćeno da je NF- κ B aktivacija odgovorna za razvoj rezistencije ćelija na apoptozu. NF- κ B promovira ćelijski rast regulacijom ekspresije nekoliko gena koji su uključeni u mehanizam ćelijskog ciklusa kao što su: ciklini (D1, D2, D3 i E), c-myc i c-myb. Ekspresija ciklina D1 posredovana ovim transkripcionim faktorom je osnovni korak u nastanku i razvoju karcinoma (229).

5.2.1. Promene nivoa transkripcionog faktora NF- κ B u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim alfa-lipoinskom kiselinom

Promene u intra ćelijskom tiol redoks statusu i strukturi proteina signalnih molekula može rezultovati alteracijom aktivnosti transkripcionih faktora. Alfa-lipoinska kiselina može učestvovati u procesu oksidacije sulfhidrilnih grupe ili da omogućuje formiranje mešovitih disulfida u molekulima proteina što rezultuje promenama u tiol redoks status signalnih molekula. NF- κ B je redoks osetljiv transkripcioni faktor. Ovaj faktor igra vrlo važnu ulogu u ekspresiji različitih gena koji su uključeni u proces inflamacije i apoptoze velikog broja ćelijskih tipova (230).

U sprovedenom istraživanju, analizom dobijenih rezultata efekta alfa-lipoinske kiseline na kvantitativnu ekspresiju transkripcionog faktora κ B, zabeležen je statistički značajan pad nivoa ekspresije NF- κ B nakon inkubacije HeLa ćelija najviše koncentracijom alfa-lipoinske kiseline ($p < 0.001$). Kombinacija alfa-lipoinske kiseline kako sa cisplatinom tako i sa 5-fluorouracilom pokazala je statističku značajnost u odnosu na kontrolnu grupu u ispitivanim grupama bez primetne koncentracijske zavisnosti ($p < 0.01$) (Grafikon 11.).

Rezultati sprovedenog istraživanja u grupama Caco-2 ćelija inkubiranih alfa-lipoinskom kiselinom pokazuju statistički značajno smanjenje nivoa ekspresije NF- κ B u grupama 1 i 3 u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Kombinacija alfa-lipoinske kiseline sa cisplatinom i 5-fluorouracilom je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statističku značajnost samo pri inkubiranju Caco-2 ćelija najviše koncentracijom ispitivanih kombinacija ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Grafikon 13).

Alfa-lipoinska kiselina dovodi do nishodne regulacije NF- κ B u monocitima kod pacijenata obolelih od dijabetesa (231) i potentan je inhibitor NF- κ B aktivnosti u T ćelijama prekursorima osteoklastnih ćelija (232,233). Zabeleženi su pozitivni efekti ALA na inhibiciju

NF- κ B kod elija karcinoma ovarijuma i epitelnim elijama aorte (234), dok inicijalni uticaji inhibicije NF- κ B pomo u ALA mogu imati prednosti u procesima koji su pra eni disregulacijom aktivnosti redoks osetljivih transkripcionih faktora (235). Vig-Varga i sar. su u svom istraživanju pokazali da tretiranje mišjih i humanih maligno transformisanih elija sa ALA dovodi do inhibicije NF- κ B aktivnosti (193). Pokazano je da ALA dovodi do signifikantne deplecije kod TNF- α indukovane kaspazne aktivacije (236), pove ava aktivaciju kaspaze-3 povezane sa DNK fragmentacijom HT-29 elija humanog karcinoma kolona (197).

Antiinflamatorne karakteristike ALA baziraju se na antioksidativnim karakteristikama ovog hemopreventivnog agensa. Oksidativni stres je u pozitivnoj korelaciji sa aktivacijom NF- κ B i posledicom ekspresijom velikog broja gena uklju enih u procese inflamacije i endotelne migracije elija (237). U skladu sa ovim injenicama ALA je prouavana zbog svojih antioksidativnih ukarakteristika u procesu inflamacije posredovane citokinima (162). U istraživanju koje su sproveli Guerriero i sar. pokazano je da ALA dovodi do smanjena proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-1 β i IL-8 i do pove anja antiinflamatornih citokina (IL-10). Smanjenje nivoa TNF- α usko je povezano na sa dozno zavisnom ulogom ALA na aktivnost NF- κ B i posledicom blokadom progresije HCC elija (238). Ovakav efekat ALA sugerira na potencijalno ulogu ovog antioksidansa u blokadi antiinflamatornih stimulusa elija karcinoma.

Ve ina hemopreventivnih agenasa ostvaruju intezivnu antiinflamatornu i antioksidativnu aktivnost ostvaruju i na taj na in važnu ulogu u epigenetskom razvoju karcinoma (239). ALA u estvuje u suprimiranju inflamatornog odgovora inhibicijom molekularnih signalnih puteva koji se aktiviraju proinflamatornim citokinima kao što je TNF- α . TNF- α je ključni aktivator NF- κ B puta, koji posreduje u inflamatornom odgovoru i reguliše ekspresiju važnih inflamatornih medijatora NF- κ B tako e aktivira gene koji u estvuju u procesu inflamacije, kao što su COX-2 i NO sintatetaza (193).

ALA inhibira aktivnost NF- κ B pomo u antioksidans-nezavisnog puta i I κ K-zavisnim mehanizmima (240), dok su Erlejman i sar. pokazali da ALA dovodi do inhibicije TNF- α ali da nema efekta na aktivnost NF- κ B u Caco-2 elijama što je suprotno sa rezultatima dobijenim u sprovedenom istraživanju (241). Rezultati drugih istraživanja pokazuju aktivnu ulogu ALA u terapiji razli itih maligniteta, ali nema literaturnih podataka sa kojima bi mogli da se uporede dobijeni rezultati efekat alfa-liponske kiseline na kvantitativnu ekspresiju

transkripcionog faktora κ B u kulturi elija karcinoma cerviksa, kao i njen potencijalni sinergisti ki efekat u kombinaciji sa cisplatinom i 5-fluorouracilom u kulturi Caco-2 i Hela elija (193,197).

5.2.2. Promene nivoa transkripcionog faktora NF- κ B u elijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim ketoprofenom i meloksikamom

Višestepena priroda nastanka kolorektalne i cervikalne neoplazije upu uje na injenicu da specifi ni pristupi mogu imati važnu ulogu u razvoju i invaziji ovih karcinoma. Nekoliko važnih faktora usko su povezani sa patogenezom nastanka i razvoja karcinoma kolona i cerviksa uklju uju i: izmenjenu aktivnost NF- κ B, izmenjenu ekspresiju COX1 i COX2 kao i promene u odnosima proapoptotih i antiapoptotih proteina. Održavanje kontinuiteta u istraživanjima na nivou kliničke onkologije i farmakologije je težnja ka otkrivanju novih agenasa, prirodnog ili sintetskog porekla, koji bi svoj potencijalni mehanizam delovanja inhibicijom nekog od pomenutih molekularnih mehanizama (242).

NSAIL dovode do inhibicije COX enzima u i na metabolizam prostaglandina što rezultuje antiinflamatornim i antitumorskim efektom ovih lekova. Pored inhibicije COX enzima, NSAIL dovode do stimulacije 15-PGHD kao i ekspresije NSAIL-aktiviranog gena (NAG-1). NAG-1 je član TGF- β superfamilije i njegova ekspresija je redukovana od strane PGE₂. Povećana ekspresija COX-2 u elijama karcinoma kolona pronađena je smanjenom ekspresijom NAG-1. Sa druge strane NSAIL su odgovorni za inhibiciju PPAR- δ gena koji je normalno regulisan od strane APC (204), a dovode do inhibicije NF- κ B, Jak3/Stat3 signalnih puteva i do nishodne regulacije proinflamatornih citokina do nivoa koji omogućavaju inhibiciju inflamacije i karcinogeneze (205).

Povećana COX-2 aktivacija udružena je sa povećanim malignim potencijalom u osnovi je rezultat NF- κ B aktivacije (138) jer je NF- κ B centralni medijator imunog odgovora tumorskih elija koji indukuje ekspresiju faktora rasta i angiogenetskih faktora udruženih sa indukcijom i progresijom karcinoma (243).

Aspirin, indometacin i sulindak dovode do degradacije I κ B α i nuklearne translokacije NF- κ B u kolorektalnim neoplazijama (244,245). Istraživanje koje su sprovedeli Hanif i sar. pokazalo je da natrijum-slicilat i aspirin dovode do inhibicije aktivacije NF- κ B prostaglandin nezavisnim putem u elijama karcinoma kolona (246), dok su Luiz i sar. potvrdili inhibitorni

potencijalno NSAID prema ovom transkripcionom faktoru kada je karcinom ovarijuma u pitanju (247). Poslednjih godina poseban akcenat se stavlja na antitumorsku aktivnost NSAID ciklooksigenaza-nezavisnim putem sa osvetrom na molekularne mete ove grupe lekova ukljuuju i inhibiciju NF- κ B (248). U istraživanju koje su sproveli Mladenova i sar. pokazali su dozno zavisnu inhibiciju NF- κ B nakon tretiranja elija karcinoma kolona sulindak sulfidom (249).

Receptori tirozin-kinaza i receptori faktora rasta imaju ključnu ulogu u prenosu informacija iz spoljašnjosti elije u citoplazmu i jedro. Signalna kaskada posreduje u inicijaciji, regulaciji i sprovođenju veoma važnih elijskih funkcija i procesa, kao što su diferencijacija, rast i preživljavanje/programirana smrt elije. Brady i saradnici su u svom istraživanju potvrdili značaj c-Src (pro-onkogeni produkt tirozin kinaze) u inhibiciji NF- κ B aspirinom i drugim NSAID (250).

Veliki broj literaturnih podataka upućuje na značaj primene NSAID u terapiji i prevenciji karcinoma. Dosadašnja istraživanja najpreciznije opravdavaju primenu pojedinih članova ove grupe lekova (acetilsalicilna kiselina, sulindak, indometacin) u terapiji karcinoma kolona (251), dok je upotreba ketoprofena na polju karcinoma kolona i cerviksa još uvek nedovoljno istražena (252). Ketoprofen je antiinflamatorni lek koji svoj terapijski efekat ostvaruje neselektivnom inhibicijom COX-1 i COX-2 izoenzima. Istraživanja upućuju na činjenicu da je kod karcinoma cerviksa prisutna pojačana ekspresija obe ciklooksigenazne izoforme (253), dok je kod karcinoma kolona povećana ekspresija samo COX-2 (21).

Rezultati sprovednog istraživanja pokazuju postojanje statistički značajno smanjenje nivoa kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa najvećom koncentracijom ketoprofena i cisplatina u kulturi elija karcinoma cerviksa ($p < 0.05$). Prilikom inkubacije Hela elija sa kombinacijom ketoprofena i 5-fluorouracila, statistički značajnost je zabeležena u svim ispitivanim grupama, ali je bila najizraženija prilikom inkubacije elija sa najmanjom ispitivanom koncentracijom ($p < 0.001$) (Grafikon 16.). Najjači inhibični efekat na aktivnost transkripcionog faktora κ B zapravo ostvaruju kombinacije najnižih doza ketoprofena i 5-fluorouracila. To jasno potvrđuje sinergistički potencijal ovih lekova i potencijalno dozno zavisno smanjenje neželjenih efekata citostatskog tretmana. Potenciranje efekta nestandardnog citostatika izlaganjem elija delovanju kombinovane terapije sa ketoprofenom može se objasniti visokim stepenom rezistencije kancerskih elija na standardne citostatske tretmane kao i neselektivnom inhibicijom obe ciklooksigenazne forme u karcinomu cerviksa (255).

U sprovedenom istraživanju, nakon analiziranja vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije sa različitim koncentracijama ketoprofena u kulturi Caco-2 elija, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu zabeležena je samo u grupi 2 ($p < 0.05$). U kombinaciji ketoprofena i cisplatina, u odnosu na kontrolnu grupu, zabeležena je statistički značajnost samo u grupi elija inkubiranih sa srednjim koncentracijama ispitivane kombinacije ($p < 0.05$) (Grafikon 17.). Caco-2 elijska linija pokazuje drugu i značajno slabiji odgovor na inhibiciju NF- κ B nakon mono-tretmana ketoprofenom ili u kombinaciji sa citostaticima. Pored rezistencije elija na primenjeni citostatik moraju se uzeti u obzir i potencijalno u sve ostalih mitohondrijalnih markera apoptoze kao i značajne ekspresije i inhibicije ciklooksigenaze u razvoju i progresiji karcinoma (256).

U sprovedenom istraživanju, nakon analize vrednosti kvantitativne ekspresije NF- κ B nakon inkubacije Hela elija sa različitim koncentracijama meloksikama, zabeležena je statistički značajna razlika pri inkubacij sa najvećom koncentracijom meloksikama ($p < 0.01$). U kombinaciji meloksikama i cisplatina u odnosu na kontrolnu grupu pokazana je statistički značajnost u svim grupama, koja je bila najizraženija u grupi Hela elija inkubiranih srednjom koncentracijom ispitivane kombinacije kombinacije ($p < 0.001$). Efekat kombinacije meloksikama i 5-fluorouracila na ekspresiju transkripcionog faktora κ B pokazao je statistički značajnu razliku u svim ispitivanim grupama Hela elija ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Grafikon 19.).

Rezultati sprovedenog istraživanja efekta meloksikama na nivo ekspresije NF- κ B u kulturi Caco-2 elija pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u svim grupama, sa najizraženijim efektom prilikom inkubacije sa najvećom ispitivanom koncentracijom meloksikama ($p < 0.001$). U kombinaciji meloksikama i cisplatina u odnosu na kontrolnu grupu pokazali su statističku značajnost u svim grupama sa primetnim dozno zavisnim trendom ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Efekat kombinacije meloksikama i 5-fluorouracila na nivo ekspresije transkripcionog faktora κ B pokazao je statističku značajnost u svim grupama ($p < 0.01$, $p < 0.001$), potenciraju i na taj način efekat 5-fluorouracila koje se ne koristi kao prva linija terapije karcinoma cerviksa (Grafikon 20).

Nema dovoljno literaturnih podataka sa kojima bi mogli da se uporede rezultati efekta ketoprofena i meloksikama na nivo ekspresije NF- κ B u kulturi elija karcinoma kolona i cerviksa. Veruje se da je mehanizam inhibicije ovog transkripcionog faktora nakon inkubacije sa različitim koncentracijama nesteroidnih antiinflamatornih lekova korišćenih u

istraživanju rezultat usko povezanih faktora neophodnih za nastanak i progresiju karcinoma: inhibicije NF- κ B i blokade ekspresije enzima ciklooksigenaze.

Literaturni podaci potvrđuju uzročno-posledičnu vezu između inflamacije i karcinogeneze zbog pojačane ekspresije COX-2. COX-2 aktivira mnoge procese koji su uključeni u karcinogenezi, čine je na taj način atraktivnim terapijskim ciljem. Ova ciklooksigenazna forma učestvuje u metabolizmu ksenobiotika, angiogenezi, apoptozi, inflamaciji, procesima imunosupresije (254). Obzirom da su apoptoza i neoangiogeneza blisko povezani sa rezistencijom na hemoterapiju i radioterapiju smatra se da povećana ekspresija COX-2 može biti prediktivni marker hemorezistencije karcinoma (169).

5.3. Značaj ekspresije Bcl-2 i Bax u razvoju i terapiji karcinoma kolona i cerviksa

Apoptoza se odvija kroz dva glavna puta, spoljašnji i unutrašnji put. Spoljašnji ili citoplazmatski put aktivira se preko Fas receptora smrti, članova faktora nekroze tumora. Unutrašnji ili mitohondrijalni put se zasniva na oslobađanju citohroma c iz mitohondrija nakon delovanja stimulusa. Oba puta konvergiraju do konanog, uobičajenog puta koji podrazumeva aktivaciju kaspaza, a kao finalni rezultat ovih puteva dešava se smrt ćelije. Spoljašnji i unutrašnji put su međusobno povezani i promene na jednom putu značajno se mogu odraziti na funkcionisanje drugog puta u toku procesa apoptoze ćelije. Prekomerna ekspresija Bcl-2 može potencirati inhibiciju apoptoze posredovanu spoljašnjim putem dok sa druge strane TNF- α može povećati ekspresiju NF- κ B i stimulisati antiapoptotičke članove Bcl-2 familije (257).

Ćelije karcinoma sa defektom u mitohondrijalnoj propustljivosti (gubitak Bax i povećana ekspresija Bcl-2) izbegavaju odgovor imunog sistema tokom progresije karcinoma i limitiraju efikasnost hemio- i radioterapije. Neosetljivost na apoptotičke signale omogućava preživljavanje tumorske ćelije nakon odvajanja od ekstracelularnog matriksa, opstanak u vaskulaturi i stvaranje metastatskog depozita. Bcl-2 gen je multifunkcionalni protein čija povećana ekspresija kod pojedinih maligniteta remeti ćelijski ciklus stvarajući i dugožive ćelije, čime raste rizik od sekundarnih alteracija (258). Danas, postoji posebno interesovanje

za sve faktore uklju ene u proces programirane elijske smrti, jer predstavljaju potencijalnu metu u hemoprevenciji i le enju karcinoma kolona i cerviksa (259).

Najvažniji regulatori unutrašnjeg puta je Bcl-2 familija proteina koja je poja ano ekspimirana u velikom broju maligniteta. Pove eana ekspresija Bcl-2 proteina dovodi do nastanka otpornosti na delovanje hemoterapeutika i radioterapije, dok se smanjena ekspresija Bcl-2 može potencirati apoptoti ki odgovor na antikancerske lekove. Smatra se da je jedan od rezultata hemorezistencije na terapiju posledica pove ane ekspresije Bcl-2 što posledi no dovodi do akumulacije elija u G₀ fazi elijskog ciklusa (260).

Uloga i zna aj ekspresije Bcl-2 proteina su kontraverzni. Prognosti ku zna aj ove familije proteina povezan je sa velikim brojem karcinoma. Pove ana ekspresija Bcl-2 proteina korelira sa slabom prognozom kod pacijenata sa karcinom beške (261) i prostate (262). Zabeležena je pozitivna korelacija ekspresije Bcl-2 proteina sa boljom stopom preživljavanja kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (263), dok nikakva povezanost nije prona ena kod pacijenata sa karcinom laringsa (264). U skladu sa ulogom Bcl- 2 i Bax proteina u progresiji karcinoma Apolinario i sar. su pronašli negativnu korelaciju ekspresije ovih proteina i preživljavanja pacijenata sa karcinom plu a (265). Suprotno prethodnom istraživanju, uloga ekspresije Bcl-2 i Bax proteina bila je usko povezana sa boljom prognozom kod pacijenata sa gastri nim malignitetima (266).

U zdravim elijama, Bax je protein koji se normalno nalazi kao monomer u citoplazmi i slabo vezan za spoljašnju stranu mitohondrija (267). Kao odgovor na apoptoti ki stimulus, Bax menja svoju konformaciju i translocira se iz citoplazme u nitohondrije gde podleže procesu oligomerizacije (268). C-terminalni α -heliks igra kriti nu ulogu u subcelularnoj lokalizaciji Bax proteina. Strukturne analize pokazuju da ovaj region formira hidrofobni džep pomo u BH1, BH2 i BH3 domena (269). Apoptoti ki stimulusi dovode do konformacionih promena na N-terminalnom kraju Bax proteina, jer antitela specifi na za jedan epitop na tom region vezuju se za Bax samo u elijama izloženim apoptoti kom stimulusu, što nije slu aj sa zdravim elijama. Proces osloba anja N-terminalnog kraja i izlaganje N-terminalnog epitopa procesu translokacije i agregacija molekula Bax proteina istovremeno ili postepeno još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da su ovi koraci kriti ni za pokretanje apoptoze, osvr u i se na injenicu da zadržavanje Bax proteina u citoplazmi predstavlja granicu protiv nenamerne aktivacije elijske smrti. Poznato je da dolazi do dimerizacije Bax-a u mitohondrijama nakon delovanja nekih stres signala, me utim vrlo esto su ovo samo po etni koraci i nisu dovoljni da ubiju eliju (270). Sa druge strane

Bcl-2 protein je sposoban da spreči dimerizaciju Bax molekula ili translokaciju, potvrđujujući na taj način značaj odnosa Bcl-2/Bax proteina u regulaciji procesa apoptoze (271).

Istraživanje koji su sprovedeli Kokawa i sar. potvrđuje pojačanu ekspresiju Bax (272). Harima i sar. su zabeležili važnost Bax i Bcl-2 ekspresije u odgovoru na zračnu terapiju karcinoma cerviksa (273). Svi članovi Bcl-2 familije locirani su na spoljašnjoj membrani mitohondrija i vrlo su važni za održavanje permeabilnosti mitohondrijalne membrane. Ravnoteža između Bcl-2 i Bax proteina je vrlo značajna za određivanje apoptotičkog potencijala u ćelijama gde je pojačana apoptotička aktivnost udružena sa niskim Bcl-2/Bax odnosom (260).

5.3.1. Promene nivoa ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim alfa-lipoinskom kiselinom

Poremećena ravnoteža nivoa antiapoptotičkih i proapoptotičkih članova Bcl-2 familije rezultuje neregulisanim apoptozom zbog pojačane ekspresije antiapoptotičkih proteina ili smanjene ekspresije proapoptotičkih proteina. Svaki defekt ili abnormalnost u toku procesa apoptoze može biti od značaja kao novi strateški cilj u terapiji karcinoma.

Povećana ekspresija Bcl-2 gena primećena je u različitim humanim karcinomima uključujući karcinom kolona i cerviksa. Primećena je povezanost povećane ekspresije Bcl-2 gena i endometrijalnih karcinoma u *in vitro* istraživanjima (274, 275). Tjalama i sar. pokazuju jaku vezu između ekspresije Bcl-2 proteina i sveukupnog preživljavanja od cervikalnog karcinoma (276), dok su Harima i sar. došli do zaključka da je bolja kontrola karcinoma u toku zračne terapije praćena povećanom ekspresijom Bax proteina (277).

U sprovedenom istraživanju rezultati smanjene ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela ćelija pokazuju statistički značajnu razliku prilikom inkubacije sa najmanjom ($p < 0.01$) i najvećom koncentracijom alfa-lipoinse kiseline ($p < 0.001$). Vrednosti ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije Hela ćelija sa kombinacijom alfa-lipoinse kiseline i cisplatina pokazale su statistički značajno smanjenje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Statistička analiza je pokazala da je u kulturi Hela ćelija inkubiranih sa kombinacijom alfa-lipoinse kiseline i 5 fluorouracila nije došlo do smanjenja u grupi 1, dok je u grupama 2 i 3 došlo do statistički značajnog povećanja ($p < 0.05$) (Grafikon 23.), što se potencijalno može

objaniti injenicom da 5-fluorouracil ne pripada grupi citostatika koji se koriste u terapiji karcinoma cerviksa (253).

Rezultati istraživanja efekta alfa-lipoiinske kiseline na vrednosti ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija pokazuju da statisti ki zna ajna razlika postoji prilikom inkubacije elija sa srednjom i najve om koncentracijom ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Rezultati kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiinske kiseline i cisplatina pokazali su statisti ki zna ajno smanjenje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Upore ivanjem vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiinske kiseline i 5-fluorouracila nije došlo do statisti ki zna ajnog smanjenja u grupi 2, dok je u grupama 1 i 3 došlo do statisti ki zna ajnog smanjenja na nivou ($p < 0.05$) (Grafikon 27.).

Tretiranje elija karcinoma dojke sa alfa-lipoiinskom kiselinom u koncentracijama od 500 $\mu\text{mol/L}$ i više dovodi do signifikantnog smanjena ekspresije Bcl-2, dok je ekspresija Bax bila signifikantno pove ana u toku tretmana sa ALA 1000 $\mu\text{mol/L}$. Odnos Bcl-2/Bax, koji je uzet kao indeks elijske apoptoze, je bio signifikantno redukovan u toku odgovora elija karcinoma dojke na delovanje ALA 500 $\mu\text{mol/L}$ i više koncentracije. Rezultati sprovedenog istraživanja su u skladu sa literaturnim podacima iako su ispitivane koncentracije alfa-lipoiinske kiseline bile mnogo manje od koncentracija koriš enih u istraživanju koje su sproveli Na MH i sar. (190), ali nema literaturnih podataka koji bi mogli da se koriste za upore enje sa dobijenim rezultatima o sinergisti kom efektu kombinacije alfa-lipoiinske kiseline sa cisplatinom ili 5-fluorouracilom u kulturi elija karcinoma kolona i cerviksa.

Za razliku od normalnih elija, elije karcinoma preživljavaju u specifi nom redoks okruženju gde pove anje slobodnih radikala doprinosi suzbijanju elijske apoptoze. Dozio i sar. su u svom istraživanju pokazali da ALA indukuje apoptozu u elijama karcinoma dojke, MCF-7. Molekularni mehanizam delovanja ALA ogleđa se u ulozi ovog antioksidansa u PI3-K/Akt signalnom putu. ALA je svoje antioksidativni efekata ostvarila sakupljanjem reaktivnih kiseonih radikala aktivno u estvuju i u G1 fazi elijskog ciklusa, specifi nom inhibicijom Akt puta i direktnim uticajem na Bcl2/Bax odnos (278). Kada se alfa-lipoiinska kiselina doda medijumu elijske kulture u *in vitro* uslovima, vrlo brzo ulazi u eliju i biva redukovana od strane mitohondrijalnih i citozolnih enzima do dihidro-lipoiinske kiseline nakon ega efluksnim mehanizmom biva izba ena iz elije u medijum (279).

Bcl-2 je klju ni regulator mitohondrijalnog puta apoptoze direktno uti u i na permeabilnost membrane mitohondrija. Istraživenje koje su sproveli Mounjaroen i sar.

pokazuje dozno i vremenski zavisnan uticaj ALA na ekspresiju Bcl-2 proteina u elijama karcinoma pluća (280). Povećana ekspresija Bcl-2 dovodi do usporavanja elijskog rada, dok izrazito povećane vrednosti Bcl-2 mogu promovisati elijsku smrt, dok niske vrednosti upućuju na inhibiciju apoptoze (281). Istraživanja ukazuju na činjenicu da stepen ekspresije Bcl-2 zavisi od agresivnosti i tumorske diferencijacije sa naznakom da ekspresija Bcl-2 proteina biva suprimirana u toku progresije tumora (282). Zato Bcl-2 može biti važan prediktor u prognozi i progresiji karcinoma (283).

Nakon analize rezultata sprovedenog istraživanja, vrednosti kvantitativne ekspresije Bax proteinu u kulturi Hela elija inkubiranih sa različitim koncentracijama alfa-lipoiinske kiseline, pokazali su da je u grupama 2 i 3 došlo do statistički značajnog povećanja ovog mitohondrijalnog markera u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Hela elije koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiinske kiseline i cisplatina u tri različite koncentracije pokazale su povećanje u sve tri grupe u odnosu na kontrolu sa приметnim trendom koncentracijske zavisnosti ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Slični rezultati dobijeni su prilikom inkubacije elija karcinoma cerviksa sa kombinacijom alfa-lipoiinske kiseline i 5-fluoruracila ($p < 0.01$) (Grafikon 25.).

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su razlike u statističkoj značajnosti u odnosu nivoa Bcl-2 i Bax proteina u kulturi Hela elija inkubiranih sa različitim koncentracijama ispitivanih supstanci. Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje odnosa Bcl-2-Bax pri inkubaciji Hela elija najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim cistostaticima. Analizirani odnos bio je najniži u grupi Hela elija tretiranih samom alfa-lipoiinskom kiselinom sa trendom dozno zavisnog opadanja odnosa Bcl2/Bax (Tabela 2.).

Oltvai i sar. svojim istraživanjem upućuju na značaj odnosa Bcl-2 i Bax proteina i elijskog opstanka nakon delovanja apoptotičkih stimulusa. Oni opisuju da je povećana ekspresija Bcl-2 proteina u pozitivnoj korelaciji sa preživljavanjem elije karcinoma dok povećana ekspresija Bax i/ili dominacija Bax homodimera elije karcinoma uvodi u proces apoptoze (124).

U sprovedenom istraživanju, upoređivanjem vrednosti kvantitativne ekspresije Bax u kulturi Caco-2 elija elije koje su tretirane kombinacijom alfa-lipoiinske kiseline i cisplatinom, statistički značajna razlika u grupama 2 i 3 ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Povećanje ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 elija zabeleženo je prilikom inkubacije sa

kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i 5-fluorouracila srednje i najveće koncentracije ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Grafikon 29.).

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazali su razlike u statistici koja značajnosti u odnosu nivoa Bcl-2 i Bax proteina u kulturi Caco-2 ćelija inkubiranih sa različitim koncentracijama ispitivanih supstanci. Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje ovog odnosa pri inkubaciji Caco-2 ćelija najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim citostaticima. Analizirani odnos bio je najniži u grupi Caco-2 ćelija tretiranih kombinacijom alfa-lipoiniske kiseline i 5-fluorouracila u odnosu na sam citostatik, ukazuju i na taj način na sinergistički potencijal alfa-lipoiniske kiseline u kombinaciji sa ispitivanim citostatikom (Tabela 3).

5.3.2. Promene nivoa ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa tretiranim ketoprofenom i meloksikamom

Uloga i funkcija proteinskih pripadnika Bcl-2 familije još uvek nije kompletno razjašnjena. Pojedini autori pretpostavljaju da pojačana apoptoza usporava tumorski rast i da je time znak dobre prognoze. Nasuprot tome, slaba apoptotička aktivnost je znak loše prognoze, jer stvara veće tumorsku masu i omogućava nastanak sekundarnih genetskih mutacija. Povećana Bcl-2 genska ekspresija je u nekim radovima u korelaciji sa nižom stopom preživljavanja kod neuroendokrinih tumora pluća (atipičnog karcinoida i krupnog ćeljskog karcinoma) (284).

Promene u ekspresiji Bax proteina mogu da se odraze na nivo antiapoptotičkog Bcl-2 proteina i na taj način mogu da utiču na stepen preživljavanja ćelija. Bax može biti važan medijator u toku indukcije ćeljske smrti odgovarajućim citostatičkim lekovima (285). NSAID dovode do Bax zavisne apoptoze u ćelijama karcinoma kolona i to nesvodnom regulacijom Bax antagonista Bcl-Xl proteina (286). U drugim modelima prikazana je pojačana ekspresija ovog proapoptotičkog proteina u kao odgovor na primnjeni lek. Ukoliko ne dolazi do promena u nivou odnosa Bcl-2/Bax može se smatrati da takav hemopreventivni agens svoju apoptotičnu osetljivost ne ostvaruje preko Bax i Bcl-2 proteina (287).

Većina ćelija kolorektalnih karcinoma pokazuje pad odnosa Bax/Bcl-2 proteina što objašnjava smanjeni odgovor na primenjene hemopreventivne efekte NSAID (286). Karcinogeneza cervikalnog epitela je multifaktorijski proces koji obuhvata niz genetskih,

hormonskih i imunoloških faktora udruženih sa HPV infekcijom (288). HPV infekcija, pogotovo tipovima 16 i 18, usko je povezana sa razvojem karcinoma cerviksa. E6 protein se produkuje delovanjem HPV 16 i 18 se vezuje za p53 proten. Kao posledica ovog procesa kompleksiranja sa virusnim proteinima dolazi do menjanja funkcije p53 gena što može uzrokovati malign transformaciju ili progresiju cervikalnog karcinoma. Tumor supresorski gen p53 je transkripcionalni regulator Bax gena. Bax nije samo centralni efektor p53 ve je vrlo važan u apoptozi indukovanoj hemoterapeuticima (289). p53 je direktni transkripcioni activator Bax gena, ali Bcl-2 ima sposobnost da blokira kako p53 zavisni tako i p53 nezavisni put. Prou avanje p53-Bax apoptoti nog puta je od velikog zna aja u toku terapije karcinoma cerviksa cisplatinom i drugim platinskim derivatima (290).

Kokowa i sar. su u svom istraživanju pokazali pove anu ekspresiju Bax, ali smanjenu ekspresiju Bcl-2 proteina (272). Havima i sar. upu uju na zna aj Bax i Bcl-2 proteina kao prognosti kog markera u toku i posle zra ne terapije (273), dok su Waggoner i sar. prou avali vezu izme u ekspresije Bcl-2 proteina i p-53 i stepena maligniteta karcinoma cerviksa. Njihovo istraživanje pokazuje da se ekspresija p53 korelira sa stepenom maligniteta dok se nivo Bcl-2 proteina smanjivao (291). Zergerolu i sar. su u svom istraživanju pokazali smanjenje ekspresije u odnosu na pove anje stepena maligniteta (292).

U sprovedenom istraživanju, nakon analiziranja vrednosti ekspresije Bcl-2 proteina, u kulturi Hela elija inkubiranih razli itim koncentracijama ketoprofena, nije zabeležena statisti ki zna ajna razlika u ispitivanim grupama. Kvantitativna ekspresija Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina je u odnosu na kontrolnu grupu pokazala statisti ku zna ajnost u grupama 2 i 3 ($p < 0.01$) (Grafikon 31). Anliza vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa kombinacijom ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statisti ku zna ajnost u odnosu na kotrolnu grupu kod svih grupa grupa u odnosu na kontrolu.

Rezultati statisti ke analize ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 elija tretiranih ketoprofenom su pokazale statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupama inkubiranim sa srednjom i najve om ispitivanom koncentracijom ketoprofena ($p < 0.01$). Sli an trend zabeležen je prilikom ispitivanja efekta kombinacije ketoprofena sa konvencionalnim citostaticima u kulturi Caco-2 elija na ekspresiju Bcl-2 proteina, gde je statisti ki zna ajna razlika prona ena u grupama 2 i 3 ($p < 0.01$) (Grafikon 33.).

Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Hela elija nakon inkubacije sa razli itim koncentracijama meloksikama pokazale su statisti ki zna ajnu razliku u odnosu na

kontrolu samo pri inkubaciji sa najveće om ispitivanom koncentracijom ($p < 0.001$). U kombinaciji meloksikama i cisplatina u odnosu na kontrolnu grupu zabeleženo je statistički značajno smanjenje ekspresije Bcl-2 u grupama 2 i 3 ($p < 0.01$) (Grafikon 37.).

Analizom kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi Caco-2 ćelije nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama zabeležena je statistički značajna razlika pri inkubaciji sa najveće om ispitivanom koncentracijom ($p < 0.001$). Vrednosti ekspresije Bcl-2 u grupi tretiranoj meloksikamom i cisplatinom u odnosu na kontrolnu grupu pokazana je statistički značajnost u grupi 3 ($p < 0.05$), dok u grupama 1 i 2 statistički značajna razlika. Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statistički značajnost u odnosu na kontrolnu u grupama tretiranim srednjim i najveće om ispitivanim koncentracijama ($p < 0.01$) (Grafikon 39.).

Osnovna biološka uloga Bcl-2 proteina je sposobnost njegovog vezivanja za Bax protein i heterodimerizacijska inaktivacija njegovog proapoptotičkog dejstva (293). Step en interakcije Bcl-2 i Bax proteina predmet je istraživanja brojnih studija na različitim tkivima i organima i u različitim patološkim stanjima. Istraživanja Wootipooma i sar. pokazala su da je nivo koekspresije Bcl-2 i Bax proteina nezavisan prognostički parametar u le enju skvamoznog karcinoma cerviksa (294). Kod karcinoma mokra ne bešike nivo odnosa u ekspresiji Bcl-2 i Bax proteina predstavlja prognostički parametar koji je u pozitivnoj korelaciji sa kliničkim odgovorom bolesnika na primenjenu antitumorsku terapiju (295). Kod bolesnika sa akutnom nelimfoblastnom leukemijom povećana ekspresija i povišen nivo odnosa Bcl-2/Bax proteina je negativan prognostički parametar kliničkog odgovora bolesnika na primenjenu terapiju i u korelaciji je sa njihovim kraćim preživljavanjem (296).

Rezultati obavljenog istraživanja pokazuju da Hela ćelije tretirane ketoprofenom ostvaruju statistički značajno povećanje nivoa ekspresije Bax proteina u odnosu na kontrolu samo u grupi inkubiranoj sa najveće om koncentracijom ketoprofena ($p < 0.01$) (Grafikon 32.).

U sprovedenom istraživanju rezultati kvantitativne ekspresije Bax proteina u kulturi Caco-2 ćelija inkubiranih sa ketoprofenom su pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupi 2 i 3 ($p < 0.05$, $p < 0.01$). U kombinaciji ketoprofena i cisplatina u odnosu na kontrolnu grupu su pokazali statistički značajnost samo u grupi ćelija inkubiranih sa najveće om koncentracijom cisplatina ($p < 0.05$), dok je kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila pokazala statistički značajnost kod grupa 2 i 3 ($p < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 34).

Hela elije tretirane meloksikamom pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na povećanje nivoa ekspresije Bax proteina u sve tri grupe ($p < 0.01$, $p < 0.001$). U kombinaciji meloksikama i cisplatina zabeležena je statistički značajnost u Grupi 1 i 3 ($p < 0.001$), dok je u Grupi 2 statistički značajna razlika zabeležena ($p < 0.01$). Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila je pokazala statistički značajno povećanje Bax proteina u odnosu na kontrolnu grupu kod svih ispitivanih grupa ($p < 0.01$) (Grafikon 38).

Caco-2 elije tretirane meloksikamom pokazale su statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu u grupi inkubiranoj srednjom koncentracijom ispitivane kombinacije ($p < 0.05$). U kombinaciji meloksikam i cisplatin su u odnosu na kontrolnu grupu pokazali statistički značajnost u svim ispitivanim grupama u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$). Kombinacija meloksikama i 5-fluorouracila pokazala je statistički značajnost u odnosu na kontrolnu grupu pri inkubaciji sa srednom ($p < 0.05$) i najvećom ispitivanom koncentracijom ($p < 0.01$) (Grafikon 40).

Cory i sar. u svojim istraživanjem pokazuju da antagonizovanje efekata antiapoptotičkih članova Bcl-2 familije dovodi do supresije tumora (297). Relativni odnos ekspresije Bcl-2 i Bax proteina odgovoran je za stimulaciju unutrašnjeg puta apoptoze. Prekomerna ekspresija Bcl-2 proteina i ostalih antiapoptotičkih proteina dovodi do inhibicije ćelijske smrti izazvane delovanjem različitih stimulusa uključujući i različite faktore rasta, hipoksiju i oksidativni stres. Sposobnost antiapoptotičkih proteina da suprimiraju ćelijski rast čini ovu grupu proteina vrlo interesantnom u cilju poboljšanja antikancerske terapije, jer je jasno da je efekat terapije bitno zavisan od odnosa Bcl-2/Bax proteina. Bcl-2 familija proteina su važan segment u procesu apoptoze jer su aktivno posreduju u nastanku i razvoju hemorezistencije na primenjenu citostatsku terapiju (298). Aktivacija unutrašnjeg puta apoptoze dovodi do promena u propustljivosti mitohondrijalne membrane, formiranja rupture na spoljašnjoj membrani mitohondrija što za posledicu ima oslobađanje proapoptotičkih faktora i povećanje odnosa Bax/Bcl-2 odnosa (299).

Rezultati analize odnosa Bcl2/Bax najniže vrednosti zabeležene su prilikom inkubacije Hela ćelija meloksikamom. U grupi Caco-2 ćelija inkubiranih meloksikamom, najveći pad Bcl2/Bax odnosa zabeležen je u grupi tretiranoj najmanjom koncentracijom meloksikama i 5-fluorouracila, dok analiza rezultata upućuje na porast Bcl/Bax odnosa u grupi inkubiranoj sa ketoprofenom i njegovim kombinacijama (Tabela 2.).

Sličan trend zabeležen je i prilikom analize odnosa Bcl2/Bax u grupi Caco-2 ćelija. Najniži Bcl2-Bax odnos zabeležen je u grupama inkubiranih ketoprofenom, kao i

kombinacije ketoprofena i 5-fluorouracila. Meloksikam je pokazao sličnu dinamiku efekata kao i ketoprofen u kulturi Caco-2 ćelija uz primetan dozno zavisian sinergizam sa 5-fluorouracilom (Tabela 3).

Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima koji su potvrđeni činjenicom da je za terapiju određene vrste karcinoma vrlo bitan izbor citostatika, pa kada je karcinom kolona u pitanju, ketoprofen i meloksikam potenciraju efekat 5-fluorouracila koji je konvencionalni citostatik za ovu vrstu maligniteta (253). Sa druge strane izrazito pozitivan učinak meloksikama na Bcl-2-Bax odnos može biti rezultat ekspresije obe ciklooksigenazne forme u ćelijama karcinoma kolona (21).

U istraživanju koje su sproveli Sturm i sar. pokazano je da je ekspresija Bax proteina važan prognostički parameter. Zabeleženo je da pacijenti kolon karcinomom i povećanom ekspresijom Bax proteina imaju bolju stopu preživljavanja (300). Postoji nekoliko istraživanja koji uključuju različite vrste maligniteta potvrđuju i prognostički značaj ovog proapoptotičkog proteina. Kod pacijenata sa karcinom dojke, smanjenje Bax ekspresije je udruženo sa smanjenim odgovorom na hemoterapiju i kraćim preživljavanjem (301). Povećana ekspresija Bax proteina pozitivno korelira sa stepenom poboljšanja i remisije pacijentkinja sa karcinom jajnika (302).

Smanjenje ekspresije Bax proteina povezano je sa smanjenim opstankom ćelije karcinoma (303). Zato je praćenje funkcionalnosti i značaja Bax proteina od velike važnosti u terapiji karcinoma kolona i cerviksa. Bax protein indukuje apoptozu ostvarivanjem svoje funkcije na nivou mitohondrija. Bax učestvuje na kompleksu pora odgovornih za propusljivost mitohondrijalne membrane. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi indukuju apoptozu u ćelijama karcinoma kolona Bax zavisnim putem, antagonizovanjem Bcl-XL (304).

PGE2 je proinflamatorni agens i predstavlja glavni proizvod prostaglandina u većini humanih karcinoma, uključujući i karcinom kolona (305). PGE2 može dovesti do inhibicije apoptoze indukcijom Bcl-2 proteina i povećanjem aktivnosti NF-κB (306) koji su ključni regulatori antiapoptotičkih puteva u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa. Zato je inhibicija aktivnosti COX jedan od ciljnih terapijskih ciljeva u cilju hemoprevencije karcinoma kolona i cerviksa.

U studiji koju su sproveli Ahmed i sar. praćen je antitumorski efekat ketoprofena u ćelijama karcinoma pankreasa. Autori ovog istraživanja su pokazali da nishodnu regulaciju Bcl-2 proteina prilikom tretiranja ćelija karcinoma pankreasa ketoprofenom u dozi od 60 μmol/L, također je pokazan je antiproliferativan i proapoptotička aktivnost novosintetisanog

derivata ketoprofena u elijama karcinoma pankreasa kod kojih je zabeležena COX-2 aktivnost uz inhibiciju NF- κ B (307).

5.4. Efekat alfa-lipoiniske kiseline, ketoprofena i meloksikama na primarnu kulturu mononuklearnih elija periferne krvi

Toksi ni efekat lekova koji se koriste u terapiji karcinoma je dobro poznat i zna ajno uti e na postavljanje farmakoterapijskog plana u le enju razli itih malignih bolesti. Ve ina antineoplasti nih lekova su neselektivni u toku svog delovanja pa svoje efekte ostvaruju na nivou elija karcinoma i zdravih elija ve ine organa i tkiva. Naj eš i neželjeni efekti citostatika ostvaruju se na nivou jetre, bubrega, srca, plu a, elija krvi i imunog sistema (308).

Leukociti ili bela krvna zrnca predstavljaju grupu uobli enih krvnih elemenata veoma bitnih za naš imunološki sistem. Nastaju u limfnim vorovima i koštanjoj srži. Deluju i zajedno obezbe uju odbranu organizma od tumora, bakterisjkih, virusnih i parazitnih infekcija. Svi imaju sposobnost ameboidnog kretanja i fagocitoze koja im je razli ita i zavisi od vrste. Fagocitiraju nekroti ne produkte, toksi ne materije, bakterije pa ak i neprepoznatljive materije iz samog organizma. Strana tela unose u svoju protoplazmu gde ih razlažu fermentima ili ih talože u limfnim organima. Karakteriše ih dijapedeza, sposobnost prelaska iz kapilara u me u elijske prostore i tkiva. U krvi oveka ima oko $4-10 \times 10^9/l$ belih krvnih zrnaca. Svi leukociti su osetljivi na mehani ke i hemijske stimuluse pa ak i na neravnine krvog suda nastale usled kalcifikacije. Prema poreklu, obliku jedra i izgledu citoplazme leukociti su podeljeni na granulocite (neutrofili, bazofili, eozinofili) i agranulocite (monociti i lifociti) (309).

Mononuklearne elije periferne krvi (eng. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) su populacija imunih elija koja obuhvata limfocite, monocite i dendriti ne elije. Zastupljenost frakcija ovih elijskih populacija varira u okviru svake humane individue. Mononuklearne elije periferne krvi su kriti ne komponente u imunom sistemu u borbi protiv infekcije i procesa inflamacije. Limfociti su najbrojnija subpopulacija unutar PBMC i igraju važnu ulogu u adaptivnom imunom odgovoru dok su monociti važne elije uro enog imunog odgovora (310).

Pored benefita primene citostatika u terapiji karcinoma ovaj vid terapije može izazvati ozbiljne hematološke neželjene efekte. Monociti i makrofagi, sami ili u saradnji sa drugim elijama predstavljaju bitnu kariku u imunološkom sistemu (311). Monociti imaju vrlo važnu ulogu u uro enom imunom odgovoru. U odgovoru na inflamtni signal monociti se brzo kre u do mesta inflamacije diferenciraju i se u makrofage koji obavljaju proces fagocitoze. Monociti u estvuju u borbi sa inficiranim elijama putem koji je posredovan antitelima. Makrofagi su odgovorni za zaštitu tkiva od delovanja stranih supstanci i smatraju se dominantnim elijama u toku procesa ateroskleroze (312).

Rezultati sprovedenog istraživanja u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi, inkubiranih alfa-lipoinskomn kiselinom i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom na nivo ekspresije transkripcionog faktora κ B, pokazali su postojanje statisti ke zna ajnosti samo u grupi elija inkubiranih kombinacijom alfa-lipoinse kiseline i 5-fluorouracila i to u grupama tretiranim srednjom i najve om koncentracijom ispitivanih kombinacija ($p < 0.05$) (Grafikon 15.). Kombinacija ketoprofena i 5-fluorouracila pokazala je statisti ku zna ajnost na smanjenje nivoa ekspresije NF- κ B samo prilikom inkubacije primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi sa najve om koncentracijom ketoprofena i 5-fluorouracila ($p < 0.001$) (Grafikon 18). U sprovedenom istraživanju rezultati efekta meloksikama i kombinacije sa cisplatinom i 5-fluorouracilom na smanjenje nivoa ekspresije NF- κ B, zabeleženi su prilikom inkubacije elija sa najve om koncentracijom meloksikama ($p < 0.05$), kao i u kombinaciji sa najve om koncentracijom 5-fluorouracila ($p < 0.05$) (Grafikon 21.).

U sprovedenom istraživanja postoji statisti ki zna ajno pove anje nivoa Bax proteina prilikom inkubacije primarne kulture mononuklearnih elija periferne krvi sa najve om koncentracijom cisplatina ($p < 0.01$) i 5-fluorouracila ($p < 0.05$) (Grafikon 30.), dok kombinacija alfa-lipoinse kiseline sa citostaticima nije dovela do promena u ekspresiji Bax proteina ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 u kulturi mononuklearnih elija periferne krvi inkubiranih sa kombinacijom ketoprofena i cisplatina ili 5-fluorouracila pokazali su statisti ku zna ajnost u grupi elija primarne kulture inkubirane sa najve im koncentracijama ispitivanih kombinacija ($p < 0.05$) (Grafikon 35.). Rezultati obavljenog istraživanja pokazuju da vrednosti ekspresije Bax proteina u mononuklearnim elijama periferne krvi inkubiranim kombinacijom ketoprofena i cisplatina nije pokazala statisti ku zna ajnost u grupi 1 u odnosu na kontrolnu grupu, dok se Grupe 2 i 3 statisti ki razlikuju u odnosu na kontrolu na nivou ($p < 0.05$). Kombinacija

ketoprofena i 5-fluorouracila nije pokazala statističku značajnost ni u jednoj ispitivanoj grupi mononuklearnih ćelija periferne u odnosu na kontrolnu grupu (Grafikon 36.).

Analizom rezultata sprovedenog istraživanja upoređene su vrednosti kvantitativne ekspresije Bcl-2 nakon inkubacije sa različitim koncentracijama meloksikama u kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi u odnosu na kontrolnu grupu. Kod grupa tretiranih meloksikamom u tri različite koncentracije nije pronađena značajnost ni u jednoj od grupa u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinacija meloksikama i cisplatina nije dovela do statistički značajnih izmena u nivou Bcl-2 ni u jednoj od grupa, dok je kombinacija meloksikam i 5-fluorouracila pokazala statistički značajnu razliku u grupi inkubiranoj sa najvećom koncentracijom ispitivane kombinacije ($p < 0.05$) (Grafikon 41.). Rezultati istraživanja pokazuju da meloksikam u kombinaciji sa 5-fluorouracilom dovodi do statistički značajnog povećanja vrednosti Bax proteina prilikom inkubacije ćelija sa srednjom i najvećom ispitivanom kombinacijom supstanci ($p < 0.05$) (Grafikon 42.).

U sprovedenom istraživanju analiziran je nivoa Bcl-2 i Bax proteina u primarnoj kulturi mononuklearnih ćelija periferne krvi inkubiranih sa različitim koncentracijama ispitivanih supstanci. Analizom odnosa Bcl2/Bax protein zabeleženo je smanjenje ovog odnosa pri inkubaciji mononuklearnih ćelija periferne krvi najvećim koncentracijama ispitivanih supstanci i njihovih kombinacija sa konvencionalnim citostaticima. Analizirani odnos bio je najniži u grupi mononuklearnih ćelija periferne krvi tretiranih kombinacijom ketoprofena i cisplatina u najvišim koncentracijama (Tabela 5).

Uloga mononuklearnih ćelija periferne krvi, u sprovedenom istraživanju bazirana je na kontroli efekata ispitivanih supstanci u cilju ispitivanja selektivnosti u toku delovanja, analizom ekspresije mitohondrijalnih markera apoptoze. Rezultati obavljenog istraživanja ukazuju da, osim očekivanih efekata ispitivanih citostatika, alfa-lipoinjska kiselina, ketoprofen i meloksikam nisu značajno uticali na ekspresiju transkripcionog faktora κ B, Bcl-2 i Bax proteina, potvrđujući i na taj način selektivnost svog delovanja, prema ćelijama karcinoma kolona i cerviksa u ispitivanim koncentracijama.

5.5. Hemopreventivni potencijal alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena i meloksikama

Dosadašnja istraživanja iz molekularne genetike i biologije karcinoma pružaju nam važne informacije o genetskim faktorima i fundamentalnim biohemijskim putevima karcinogeneze. Ovak tip saznanja omogu ava nove terapijske mete i mogu nosti u cilju otkri a efikasnijih metoda u terapiji i prevenciji karcinoma. Hemoprevencija, jedna od obe avaju ih strategija za prevenciju karcinoma, ima za cilj inhibiciju karcinogeneze upotrebom jedinjenja iz prirode ili sintetskih hemijskih agenasa (313).

Proces kontinuiranog otkrivanja novih hemopreventivnih agenasa omogu ava razvoj strategija za poboljšanje i unapre enje trenutno dostupnih metoda za le enje razli itih tipova maligniteta. Uspešan hemopreventivni agens bi trebao da pokazuje minimalnu toksi nost, a zna ajnu stopu redukcije incidence i/ili progresije karcinoma (314). Veliki broj hemijskih supstanci pokazuje obe avaju e hemopreventivne karakteristike kod razli itih tipova karcinoma. Ovi agensi svoj mehanizam delovanja ostvaruju putem detoksifikacije karcinogena, supresijom mutacija, inhibiranjem signalnih elijskih puteva i proliferacije ili indukcijom procesa apoptoze (313).

Idealani hemopreventivni agens bi trebao da uti e na kontrolu rasta preneoplasti nih ili kanceroznih elija modifikacijom izmjenjenih i aberantnih signalnih puteva ili indukcijom apoptoze. Karakteristike takvog agenasa uklju uju selektivnost prema ošte enim ili transformisanim elijama, dobru bioraspoloživost i više od jednog mehanizma delovanja na nivou signalnih elijskih puteva. Nekoliko studija pokazalo je da prirodni produkti, pogotovo sa antioksidativnim karakteristikama, pokazuju razli iti stepen terapijskih benefita bez izraženih neželjenih efekata u odnosu na ograni enja drugih hemioterapeutika (315).

Klju no pitanje sa molekularnog aspekta kako za onkologe i klini ke farmaceute, tako i za same pacijente obolele od razli itih tipova maligniteta jeste koji je to unutrašnji put najzaslužniji za nastanak rezistencije i smanjeni odgovor na primenjeni farmakoterapijski protokol (316). Uro ena rezistencija na primenjeni prvi ciklus citostatske terapije karakteristi na je za kracinome plu a, pankreasa i melanome, dok se ste eni tip rezistencije na lekove prevashodno javlja kod pacijenata obolelik od karcinoma janika, dojke, kolona i leukemija (317, 318). Postignit je veliki napredak u razumevanju u eš a elijskog odgovora na nastanak i razvoj rezistencije citostatske terapije. Smatra se da ostvorena interakcija ime u

leka i ciljnog mesta delovanja predstavlja suštinsku odrednicu nastanka rezistencije ili smanjenog odgovora na primenjeni lek (319).

Istraživanja iz oblasti terapije karcinoma pokazuju da kombinovani terapijski režim može omogućiti efikasniji i sigurniji tretman u odnosu na monoterapijski pristup (320). Kombinovani režim primene alfa-lipoiinske kiseline, ketoprofena ili meloksikama sa konvencionalnim citostaticima ostvaruje veći i potencijal inhibicije NF- κ B, smanjeni nivo ekspresije Bcl-2 uz pojačanu ekspresiju proapoptotičkog Bax proteina.

NF- κ B ostvaruje antiapoptotičke funkcije stimulacijom ekspresije inhibitornih proteina apoptoze koji su uključeni u proces inhibicije kaspazne aktivnosti kao i ekspresije Bcl-2 proteina, adaptivnih molekula i superoksid dismutaze (321), dok ćelije sa konstitutivnom aktivacijom NF- κ B pokazuju visok stepen rezistencije na različite hemoterapijske agense (322). Povezanost između ekspresije NF- κ B, nastanka karcinoma i ćelijske rezistencije na hemoterapijske agense i inhibiciju ovog transkripcionog faktora važnim terapijskim pristupom. Cusak i sar. su u svom istraživanju pokazali da je inhibicija NF- κ B blisko povezana sa pojačanim apoptotičkim odgovorom na hemoterapiju (323). Literaturni podaci pokazuju da je efikasnost terapije karcinoma kolona 5-fluorouracilom značajno povećana u toku paralelne administracije sa disulfiramom, upravo kao rezultat inhibicije NF- κ B (324). Ovakva zapažanja ukazuju na to da NF- κ B igra važnu ulogu u hemorezistenciji, omogućavajući i da inhibitori aktivnosti ovog transkripcionog faktora budu ciljna mesta adjuvantne terapije karcinoma.

Delovanje ispitivanih citostatika na ćelijsku proliferaciju može se smatrati otkivanim ukoliko uzmemo u obzir potencijal ćelija karcinoma kolona za razvoj rezistencije na delovanje 5-FU. Postoji nekoliko puteva koji mogu biti odgovorni za razvoj rezistencije na delovanje 5-FU (325). Timidilat sintetaza (TS) učestvuje u reakcijama metilacije deoksiuridin monofosfata (dUMP) pomoću 5,10-metilen tetrahidrofolata do sinteze deoksitimidin monofosfata (dTMP). Zbog ove bitne uloge timidilat sintetaza može biti ciljno mesto za delovanje hemopreventivnih agenasa kao što je 5-FU i 5-fluorouracil deoksiriboza. Oba leka se konvertuju u 5-fluorodeoksiuridin monofosfat (5FdUMP), nukleotid koji svoje citotoksično delovanje ostvaruje formiranjem stabilnog kompleksa sa timidilat sintetazom i folatnim kofaktorom (5,10 metilen-tetrahidrofolatom). Mehanizmi rezistencije uključuju povećanje intracelularnog nivoa timidilat sintetaze, postojanje mutiranih formi ovog enzima, kao i nizak afinitet ka 5-FdUMP ili folatnog kofaktora što kasnije može rezultovati

zmanjenom aktivnoš u timidilat sintetaze (326, 327). Drugi put rezistencije može se objasniti smanjenom transportom nukleozida ili nukleobaza u elije putem nukleozid/nukleobaznih transporterata (328), dok pojedini autori smatraju da p53 status i obnavljanje DNA defekata mogu biti zna ajni uzroci razvoja rezistencije (329).

Konstitutivno pove anje koncentracije i indukcija NF- κ B dokazana je u mnogim tumorima, uklju uju i i karcinom kolona i cerviksa (330, 331). Indukcija NF- κ B dovodi do razvoja rezistencije na hemioterapiju. Sa druge strane ustanovljeno je da NF- κ B može biti prediktor elijskog odgovora na dati citostatik. Podaci su opre ni, jer u nekim terapijama NF- κ B pozitivni tumori bolje odgovaraju na terapiju u stanju uznapredovalog karcinoma kolona (kod primene cetuximaba), dok drugi podaci pokazuju da NF- κ B negativni tumori ispoljavaju ve u senzitivnost na terapiju. Kao tipičan inducibilni transkripcioni faktor, NF- κ B se aktivira u stanjima pove anog oksidativnog stresa i najja i je inducer primarnog inflamatornog odgovora (332). Pokazana je konstitutivna indukcija NF- κ B u stanjima poja anog prisustva mikroflora u mukozi i prisutne hronične inflamacije. Hronična inflamacija je pogodno tle za kancerogenezu, što ukazuje da epigenetski faktori mogu indukovati kancerogenu diferencijaciju kolona, a prisustvo pove ane koncentracije NF- κ B u tumorskom tkivu pogoduje metastaziranju (333). Najverovatniji razlog kako kombinacija citostatika i alfa-liponske kiseline ispoljava inhibitorni efekat na nivo NF- κ B bi bila jaka antioksidativna svojstva alfa-liponske kiseline, koja time smanjuju inducibilni efekat. Ali činjenica da alfa-liponska kislina data izolovano nije bila u stanju da kompletno suprimira sintezu i aktivaciju NF- κ B potvrđuje da elije karcinoma konstitutivno stvaraju NF- κ B ne samo kao odgovor na epigenetske faktore (oksidativni stres), ve najverovatnije kao model svog preživljavanja (334). Efekat kombinacije citostatika i nesteroidnih antiinflamatornih lekova ispoljava inhibitorni efekat na nivo NF- κ B verovatno zbog kontrole aktivnosti ovog transkripcionog faktora izmenjenom ekspresijom COX-2 (227).

Stoga je i objašnjivo da je kombinovano delovanje alfa-liponske kiseline, ketoprofena i meloksikama sa cisplatinom i 5-fluorouracilom rezultiralo poja anim efektom primenjenog citostatika. Uezsuka i sar. pokazuju da smanjenje NF- κ B aktivnosti indukuje apoptozu i smanjuje rezistenciju na 5-FU pa je sasvim jasno da poja ana regulacija ovog inducibilnog faktora direktno i indirektno povezana sa elijskom proliferacijom i inhibicijom apoptoze (335, 336). Ustanovljeno je da aktivisan NF- κ B pozitivno deluje na elijski rast, dok inhibicija delovanja putem formiranja stabilnog kompleksa sa inhibitorom smanjuje i

usporava kretanje tumorskih elija iz G2 u S fazu elijskog ciklusa (337). Rezultati dobijeni u sprovedenoj studiji pokazuju da alfa-liponska kiselina i meloksikam deluje i u slu aju kada je prisutna rezistencija na hemioterapiju, kao što je to slu aj kod delovanja 5-FU na ispitivane elije. To samo potvr uje podatak da je i u slu aju ovog tipa karcinoma prisutna konstitutivna i epigenetska aktivacija NF- κ B.

Zna aj ekspresije Bcl-2 i Bax proteina u hemorezistenciji na citostatski tretman je zabeležena kod pojedinih tipova maligniteta uklju uju i karcinom kolona i cerviksa (338, 339). Granci i sar. su u svom istraživanju pokazali da koadministracija emulzije ribljeg ulja sa standardnim agensima, 5-fluorouracilom, oksaliplatinom i irinotekanom, može biti dobra alternative u pove anju efikasnosti hemoterapijskih protokola uz aktivno u eš e Bax zavisnog mitohondrijalnog puta (340), dok su Lo i sar. u istraživanju na Hela elijama potvrdili pozitivan efekat formononetina na citostatski efekat epirubicina. Poj ana ekspresija Bcl-2 spre ava apoptozu indukovanu ve inom hemoterapijskih agenasa, uklju uju i alkiliraju e agense i inhibitore topoizomeraze (341). Na osnovu uloge Bcl-2 proteina u regulisanju permeabilizacije mitohondrijalne membrane i njihove esto modifikovane ekspresije u mnogim karcinomima, Bcl-2 protein predstavlja legitimnu metu u procesu indukcije apoptoze, bilo sami ili u saradnji sa odre enom terapijom. Naravno, primena molekularnih markera bila bi opravdana samo onda kada postoji potvrš ena poja ana ekspresija ovih proteina u elijama karcinoma (317). Mnogobrojne strategije, na molekularnom nivou, mogu biti odgovorne za efekat alfa-liponske kiseline, ketoprofena i meloksikama na inhibiranje aktivnosti Bcl-2 antiapoptotike aktivnosti ili njegovu smanjenu ekspresiju. Proteini koji sadrže samo BH3 domene izmaju važnu ulogu u permeabilnoj mo i mitohondrijalne membrane, zato mali molekuli, takozvani BH3 mimetici, koji bi mogli da interaguju sa ciljnim mestima na površini Bcl-2 molekula mogu igrati važnu ulogu u indukciji apoptoze (342), dok se pove ena ekspresija Bax proteina potencijalno može objasniti modulacijom Bax zavisnog mitohondrijalnog puta (343).

Na osnovu analize rezultata obavljenog istraživanja može se re i da alfa-liponska kiselina, ketoprofen i meloksikam zauzimaju zna ajno mesto u hemoprevenciji karcinoma kolona i cerviksa deluju i na ekspresiju NF- κ B, Bcl-2 i Bax, kao važnih markera apoptotike mo i elije karcinoma kolona i cerviksa. Prime en je koncentracijski zavisian efekat ispitivanih supstanci, pogotovo u kombinaciji sa citostaticima. Kada je komparacija nesteroidnih antiinflamatornih lekova u pitanju, prednost bi mogla biti data meloksikamu, najverovatnije zbog selektivnijeg profila delovanja prema inhibiciji COX-2.

7. ZAKLJU CI

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja može se zaključiti sledeće:

1. Alfa lipoinjska-kiselina, ketoprofen i meloksikam, sami ili u kombinaciji sa citostaticima, ostvaruju selektivno citotoksično i/ili antiproliferativno delovanje na ćelije karcinoma kolona i cerviksa, uz primetan trend koncentracijske zavisnosti. Najjači antiproliferativni efekat ostvarila je alfa-lipoinjska kiselina u najvećoj koncentraciji, sama i u kombinaciji sa cisplatinom, dok je efekat meloksikama bio izraženiji u odnosu na ketoprofen u kulturi ćelija karcinoma kolona.
2. Alfa lipoinjska-kiselina, ketoprofen i meloksikam, sami ili u kombinaciji sa citostaticima, pokazuju inhibitorski efekat na nivo NF- κ B u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa u skladu sa biološkim karakteristikama samih ćelija. Efekat najveće koncentracije alfa-lipoinjske kiseline i kombinacije sa cisplatinom na smanjenje ekspresije NF- κ B bio je najizraženiji u kulturi Hela, dok je u kulturi Caco-2 ćelija kombinacija sa 5-FU ostvarila najintenzivniju inhibiciju NF- κ B. Efekat meloksikama bio je izraženiji u odnosu na ketoprofen, pogotovo u kulturi Caco-2 ćelija, primenjen sam ili u kombinaciji sa 5-fluorouracilom.
3. Alfa-lipoinjska kiselina, ketoprofen i meloksikam, sami ili u kombinaciji sa citostaticima, dovode do smanjenja ekspresije Bcl-2 i povećanja ekspresije Bax proteina u ćelijama karcinoma kolona i cerviksa sa trendom koncentracijske zavisnosti. Najizraženiji efekat na smanjenje ekspresije Bcl-2 proteina ostvarila je najveća koncentracija alfa-lipoinjske kiseline u kulturi Hela ćelija, dok je efekat meloksikama u odnosu na ketoprofen, bio izraženiji u kulturi Caco-2 ćelija. Zabeležen porast Bax proteina u svim ispitivanim grupama pokazuje dozno zavisni efekat i sinergiju sa cisplatinom i 5-fluorouracilom.

4. Pored o ekvanih efekata ispitivanih citostatika, alfa-lipoinna kiselina, ketoprofen i meloksikam nisu zna ajno uticali na ekspresiju NF- κ B, Bcl-2 i Bax proteina u primarnoj kulturi mononuklearnih elija periferne krvi, potvr uju i na taj na in selektivnost svog delovanja, prema elijama karcinoma kolona i cerviksa u ispitivanim koncentracijama.
5. Sprovedena studija ukazala je na izraziti hemopreventivni potencijal alfa-lipoinne kiseline, ketoprofena i meloksikama na osnovu procene kvantitativne ekspresije NF- κ B, transkripcionog faktora uklju enog u regulaciji gena koji uti u na nivo apoptoze, Bcl-2 i Bax u kulturama elija karcinoma kolona i cerviksa. Efekat isptivanih supstanci bio je izraženiji u kulturi elija karcinoma kolona.

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da bi potvr eni hemopreventivni potencijali alfa-lipoinne kiseline, ketoprofena i meloksikama bili izuzetno zna ajni preparati za dalja *in vivo* preklini ka ispitivanja u cilju potenciranja efekata, uz poseban osvrt na razvoj rezistencije i smanjenja neželjenih efekata standardnih citostatskih tretmana karcinoma kolona i cerviksa.

8. LITERATURA

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
2. Vivek V, Sankar NS. Chemopreventive effects of NSAIDs on cytokines and transcription factors during the early stages of colorectal cancer. *Pharmacol Rep* 2011; 63(5): 1210-21.
3. Zavoral M, Suchanek S, Zavada F, Dusek L, Muzik J, Seifert B, et al. Colorectal cancer screening in Europe. *World J Gastroenterol* 2009; 15(47): 5907-15.
4. Oaknin A, Diaz De Corcuera, Rodriguez- Freixinos V, Rivera F, Del Campo JM; SEOM (Spanish Society of Clinical Oncology). SEOM guidelines for cervical cancer. *Clin Transl Oncol* 2012; 14(7): 516-9.
5. Burt RW. Colon Cancer Screening. *Gastroenterol* 2000; 119(3): 837-53.
6. Jemal A, Thun M J, Ries L A, Howe HL, Weir HK, Center MM et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(23): 1672–94.
7. Sipeti Gruji i S, Krivokapi Z. Epidemiološke i etiološke karakteristike rak kolona i rektuma. : Krivokapi Z, editor. *Karcinom rektuma*. 1st ed. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012. 37–53.
8. Incidenca i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2009. Beograd: IZJZ Dr Milan Jovanovic Batut; 2011.
9. Pritchard CC, Grady WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 2011; 60(1): 116–29.
10. Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* 2005; 104(10): 2035-47.
11. Gill S, Blackstock AW, Goldberg RM. Colorectal cancer. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(1): 114-29.
12. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM et al. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* 2003; 63(7): 1608-14.
13. Martini M, Vecchione L, Siena S, Tejpar S, Bardelli A. Targeted therapies: how personal should we go? *Nat Rev Clin Oncol* 2012; 9(2): 87-97.

14. Camp NJ, Slattery ML. Classification tree analysis: a statistical tool to investigate risk factor interactions with an example for colon cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2002; 13(9): 813-23.
15. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000; 321(7264): 805-8.
16. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2011; 343: d6617.
17. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut* 2013; 62(6): 933-47.
18. Martínez ME. Primary prevention of colorectal cancer: lifestyle, nutrition, exercise. *Recent Results Cancer Res* 2005; 166: 177-211.
19. Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31(4): 925-43.
20. Kolligs FT, Crispin A, Munte A, Wagner A, Mansmann U, Göke B. Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PLoS One* 2011; 6(5): e20076.
21. Smith G, Carey F, Beattie J, Wilkie MJV, Lightfoot TJ, Coxhead J et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(14): 9433-8.
22. Kotoula V, Charalambous E, Biesmans B, Malousi A, Vrettou E, Fountzilias G et al. Targeted KRAS Mutation Assessment on Patient Tumor Histologic Material in Real Time Diagnostics. *PLoS One* 2009; 4(11): e7746.
23. Clarke TC, Soler-Vila H, Fleming LE, Christ SL, Lee DJ, Arheart KL. Trends in Adherence to Recommended Cancer Screening: The US Population and Working Cancer Survivors. *Front Oncol* 2012; 2: 190.
24. Hu H, Krasinskas A, Willis J. Perspectives on current tumor-node-metastasis (TNM) staging of cancers of the colon and rectum. *Semin Oncol* 2011; 38(4): 500-10.
25. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127(12): 2893-917.
26. World Health Organization, Department of reproductive health and research and department of chronic diseases and health promotion. *Comprehensive cervical cancer control: A guide to essential practice*, WHO publications, Geneva, Switzerland: World Health Organization 2006.

27. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base No. 5. version 2.0. Lyon (France): IARC Press 2004.
28. Arbyn M., Castellsague X, de Sanjose S, Bruni L, Saraiya M, Bray F et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol* 2011; 22(12): 2675–86.
29. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 75(4): 536-45.
30. Panjkovic M., Ivkovic-Kapicl T. Etiologija i patogeneza prekanceroznih lezlja i invazivnog karcinoma grlica materice. *Med Pregl* 2008; 61 (7-8): 364-8.
31. Eileen M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1-17.
32. Cuschieri KS, Cubic HA, Whitley MW, Seagar AL, Arends MJ, Moore C et al. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. *J Clin Pathol* 2004; 57(1): 68-72.
33. Brenna SMF, Syrjanen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *Sao Paulo Med J* 2003; 121(3): 130-5.
34. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5):342-50.
35. Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus infections: warts or cancer? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(7). pii: a012997.
36. Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wipf GC, et al. The p53 Arg72Pro polymorphism human papillomavirus and invasive squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(2): 225-7.
37. Brinton LA, Herrero R, Reeves WC, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F. Risk factors for cervical cancer by histology. *Gynecol Oncol* 1993; 51(3): 301-6.
38. Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed Pharmacother* 1997; 51(6-7): 268-75.
39. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(11): 796-802.

40. Alsbeih G, Al-Harbi N, El-Sebaie M, Al-Badawi I. HPV prevalence and genetic predisposition to cervical cancer in Saudi Arabia. *Infect Agent Cancer* 2013; 8(1): 15.
41. Zhao Y, Cao X, Zheng Y, Tang J, Cai W, Wang H, et al. Relationship between cervical disease and infection with human papilloma virus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. *J Med Virol* 2012; 84(12): 1920-7.
42. Corral F, Cueva P, Yopez J, Montes E. Limited education as a risk factor in cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ* 1996; 30(4): 322-9.
43. Azocar J, Abad SM, Acosta H, Hernández R, Gallegos M, Pifano E et al. Prevalence of cervical dysplasia and HPV infection according to sexual behavior. *Int J Cancer* 1990; 45(4): 622-5.
44. Szarewski A, Jarvis MJ, Sasieni P, Anderson M, Edwards R, Steele SJ et al. Effect of smoking cessation on cervical lesion size. *Lancet* 1996; 347(9006): 941-3.
45. Fonseca-Moutinho JA. Smoking and cervical cancer. *ISRN Obstet Gynecol* 2011; 2011: 847684.
46. Lacey JV Jr, Frisch M, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE et al. Associations between smoking and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer Causes Control* 2001; 12(2): 153-61.
47. Liu T, Soong SJ, Wilson NP, Craig CB, Cole P, Macaluso M et al. A case control study of nutritional factors and cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; 2(6): 525-30.
48. Wideroff L, Potischman N, Glass AG, e Greer CE, Manos MM, Scott DR et al. A nested case-control study of dietary factors and the risk of incident cytological abnormalities of the cervix. *Nutr Cancer* 1998; 30(2): 130-6.
49. Ursin G, Pike MC, Preston-Martin S, d'Ablaing G, Peters RK. Sexual, reproductive, and other risk factors for adenocarcinoma of the cervix: results from a population-based casecontrol study (California, United States). *Cancer Causes and Control* 1996; 7: 391-401.
50. Apple RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nat Genet* 1994; 6(2): 157-62.
51. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287(16): 2114-9.

52. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA* 1989; 261(5): 737-43.
53. He L, Long LR, Antani S, Thoma GR. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. *Comput Methods Programs Biomed.* 2012;107(3):538-56.
54. Anonymous. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. *JAMA* 1989; 262(7): 931-4.
55. Insinga RP, Dasbach EJ, Elbasha EH. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: a critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 119.
56. Walbooners JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer world wide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12-9.
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
58. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
59. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 87.
60. Shukla S, Dass J, Pujani M. p53 and bcl2 expression in malignant and premalignant lesions of uterine cervix and their correlation with human papilloma virus 16 and 18. *South Asian J Cancer.* 2014; 3(1):48-53.
61. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407(6805): 810-6.
62. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379(6560): 88-91.
63. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 367-401.
64. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 277-88.
65. Adrain C, Martin SJ. Apoptosis: calling time on apoptosome activity. *Sci Signal* 2009; 2(91): pe62.
66. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000; 407(6805): 784-8.

67. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407(6805): 796-801.
68. Evan G, Littlewood T. A Matter of Life and Cell Death. *Science* 1998; 281(5381): 1317-22.
69. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-6.
70. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signalling and Modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305-8.
71. Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998, 281(5381): 1309-12.
72. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 601-17.
73. Nowsheen S, Yang ES. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp Oncol* 2012; 34(3): 243-54.
74. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8): 592-603.
75. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-26.
76. Lockshin, RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004, 23(16), 2766-73.
77. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
78. Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012, 26:203-34.
79. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavalaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug -induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(1): 102-11.
80. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92(1): 57-70.
81. Dorjgochoo T, Xiang YB, Long J, Shi J, Deming S, Xu WH, Cai H, et al. Association of Genetic Markers in the BCL-2 Family of Apoptosis-Related Genes with Endometrial Cancer Risk in a Chinese Population. *PLOS one* 2013; 8(4): e60915.
82. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2001; 8(3): 705-11.

83. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2(4): 293-9.
84. Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Ninomiya I, et al. Human pancreatic cancer cells express non-functional Fas receptors and counterattack lymphocytes by expressing Fas ligand; a potential mechanism for immune escape. *Int J Oncol* 2001; 18(1): 33-9.
85. Najman S. Mutacije gena tp53 u karcinogenezi. *Acta Fac Med Naiss* 2002; 19(1): 19-22.
86. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30:87.
87. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 485-95.
88. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108(2): 153-64.
89. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293(5534): 1495-9.
90. Silvestris F, Cafforio P, Calvani N, Dammacco F. Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br J Haematol* 2004; 126(4): 475-86.
91. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Oct;1(4):a000034.
92. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(4): a000034.
93. Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJG, Baldwin AS Jr, Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B. *Mol and Cell Biol* 2000; 20(5): 1626-38.
94. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.
95. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13(5): 738-47.
96. Fu J, Qu Z, Yan P, Ishikawa C, Aqeilan R, Rabson AB, et al. The tumor suppressor gene *wwox* links the canonical and non-canonical NF κ B pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Blood* 2011; 117(5): 1652-61.

97. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 2001; 7(2): 401–9.
98. Watanabe M, Dewan MZ, Okamura T, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, et al. A novel NF-kB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2005; 114(1): 32-8.
99. Xiao G, Fu J. NF- B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res* 2011; 1(2): 192-221.
100. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(5): a000141.
101. Ak P, Levine AJ. p53 and NF-kappaB: different strategies for responding to stress lead to a functional antagonism. *FASEB J* 2010; 24(10): 3643-52.
102. Rial NS, Choi K, Nguyen T, Snyder B, Slepian MJ. Nuclear factor kappa B (NF- B): a novel cause for diabetes, coronary artery disease and cancer initiation and promotion? *Med Hypotheses* 2012; 78(1): 29-32.
103. Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(12): 1433-48.
104. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(4): 297-309.
105. Wu ZH, Miyamoto S. Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med (Berl)* 2007; 85(11): 1187-202.
106. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805(2): 167-80.
107. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984; 224(4656): 1403-6.
108. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27(50): 6398-406.
109. Yip KW, Reed JC. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 2008; 27(50):6398-406.
110. Belli BA, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, et al. An inhibitor of Bcl-2-family proteins induces regression of solid tumors. *Nature* 2005; 435(7042): 677–81.

111. Reed JC. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 2006; 13(8): 1378–86.
112. Schendel S, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ionchannels. *Cell Death Differ* 1998; 5(5): 372–80.
113. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(6): 3012-7.
114. de Moissac D, Zheng H, Kirshenbaum LA. Linkage of the BH4 domain of Bcl-2 and the nuclear factor κ B signaling pathway for suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274(41): 29505-9.
115. Danial NN. BCL-2 Family Proteins: Critical checkpoints of cpoptotic cell death. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7254-63.
116. Lutz RJ. Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. *Biochem Soc Trans* 2000; 28(2): 51-6.
117. Zamorano S, Rojas-Rivera D, Lisbona F, Parra V, Court FA, Villegas R, et al. A BAX/BAK and cyclophilin D-independent intrinsic apoptosis pathway. *PLoS One* 2012; 7(6): e37782.
118. Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. *Br J Cancer* 1999; 79(1): 95–100.
119. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 410(6828): 549-54.
120. Le Brun DP, Warnke RA, Clearly ML. Expression of Bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis *Am J Pathol* 1993; 169(3): 431-7.
121. Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* 2004; 53(11): 1701-9.
122. Hashimoto S, Koji T, Kahara, Kanematsu T, Nakane PK. Frequency of apoptosis relates inversely to invasiveness and metastatic activity in human colorectal cancer. *Virchows Arch* 1997; 431(4): 241-8.
123. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts GC, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervicalcancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97(2): 223-30.

124. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74(4): 609-19.
125. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000; 77(1): 129-36.
126. Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB et al. Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerisation with bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(17): 7834-8.
127. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, et al. tBID homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(14): 12237–45.
128. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 1993; 4(6): 327-32.
129. Zha H, Reed JC. Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31482-8.
130. Decaudin D, Marzo I, Brenner C, et al: Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: A prospective novel target of cancer therapy. *Int J Oncol* 1998; 12(1): 141-52.
131. Wiese FM, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX 1 and COX 2. *Carcinogenesis* 2001; 22(1): 5-10.
132. Fosslien E. Review: Molecular Pathology of Cyclooxygenase-2 in Cancer-induced Angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31(4): 325-48.
133. Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer* 2006; 119 (10): 2247–54.
134. Sung S, Park Y, Jo JR, Jung NK, Song DK, Bae J, Keum DY et al. Over expression of cyclooxygenase-2 in NCI-H292 human alveolar epithelial carcinoma cells: Roles of p38 MAPK, ERK-1/2, and PI3K/PKB signaling proteins. *J Cell Biochem* 2011; 112 (10): 3015–24.
135. Kim BH, Kim CI, Chang HS, Choe MS, Jung HR, Kim DY, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia:

- is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer? *Korean J Urol* 2011; 52 (4): 253-9.
136. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al. Cyclooxygenase-2 is Overexpressed in Human Cervical Cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(2): 429–34.
137. Nie D. Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers. *Front Biosci* 2007; 12: 1574-85.
138. Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, Nakano K, Mibu R, Tanaka M, et al. Increased Nuclear Factor-kB Activation in Human Colorectal Carcinoma and its Correlation with Tumor Progression. *Anticancer Res* 2004; 24(2B): 675-82.
139. Dooher JE, Paz-Priel I, Houg S, Baldwin AS Jr, Friedman AD. C/EBP , C/EBP Oncoproteins, or C/EBP Preferentially Bind NF- B p50 Compared with p65 Focusing Therapeutic Targeting on the C/EBP:p50. Interaction. *Mol Cancer Res* 2011; 9(10): 1395-405.
140. Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585(2-3): 72-6.
141. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999; 18(55): 7908-16.
142. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy . *Cell* 2002; 108(2): 153-64.
143. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I. Assesment of chemotherapyinduced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22(1): 13-30.
144. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010; 375(9719): 1030-47.
145. Wolpin B, Mayer R. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 2008; 134(5): 1296-310.
146. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Brouquet A, Cervantes A. Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21(5): 70-7.
147. Ghoshal K, Jacob ST. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 1994; 54(3): 632-6.

148. Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M, et al. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49(6): 445-52.
149. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 2001; 7(8): 2182-94.
150. Abraham A, Habermann EB, Rothenberger DA, Kwaan M, Weinberg AD, Parsons HM, et al. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer in the oldest old: Results beyond clinical guidelines. *Cancer* 2013; 119(2): 395-403.
151. Viswanathan AN, Thomadsen B; American Brachytherapy Society Cervical Cancer Recommendations Committee. American Brachytherapy Society consensus guidelines for locally advanced carcinoma of the cervix. Part I: general principles. American Brachytherapy Society. *Brachytherapy* 2012; 11(1): 33-46.
152. *Nutr Cancer* 2013; 65(1):12-25. Nambiar D, Singh RP. Advances in prostate cancer chemoprevention: a translational perspective.
153. Hail N Jr, Cortes M, Drake EN, Spallholz JE. Cancer chemoprevention: A radical perspective. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(2): 97-110.
154. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *J Biophys Chem* 2012, 3(2): 156–73.
155. Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res* 1976; 36(7 PT 2): 2689–702.
156. Wu X, Patterson S, Hawk E. Chemoprevention-history and general principles. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(4-5):445-59.
157. Kalimuthu S, Se-Kwon K. Cell survival and apoptosis signaling as therapeutic target for cancer: marine bioactive compounds. *Int J Mol Sci* 2013; 14(2): 2334-54.
158. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4): 287-306.
159. Langman MJ, Cheng KK, Gilman EA, Lancashire RJ. Effect of Anti-Inflammatory Drugs on Overall Risk of Common Cancer: Case–Control Study in General Practice Research Database. *BMJ* 2000; 320(7250): 1642–6.
160. Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Methods Enzymol* 1979; 62: 152-8.

161. Elangovan S, Tze-chen H. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by lipoic acid: role in cancer prevention and Therapy. *J Hematol Oncol* 2008; 1:4.
162. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19(2): 227-50.
163. Tayade, PT, Vavia, PR. Inclusion Complexes of Ketoprofen with β - Cyclodextrins: Oral Pharmacokinetics of Ketoprofen in Human. *Indian J Pharm Sci* 2006; 68(2): 164-70.
164. Rençber S, Yaprak Karavana S, ÖzyaziciM. Bioavailability File: Ketoprofen. *FABAD J Pharm Sci* 2009; 34: 203-16.
165. Jamali F, Brocks DR. Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. *Clin Pharmacokinet* 1990; 19(3): 197-217.
166. Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA, Motilva V, Herrerías JM, Martín MJ. Mucosal damage induced by preferential COX-1 and COX-2 inhibitors: Role of prostaglandins and inflammatory response. *Life Sci* 2004; 74(7): 873-84.
167. Bae JW, Choi CI, Jang CG, Lee SY. Effects of CYP2C9*1/*13 on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of meloxicam. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71(4): 550-5.
168. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 661-90.
169. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, Zannoni GF, Gessi M, Legge F, et al. Increased Cyclooxygenase-2 Expression Is Associated With Chemotherapy Resistance and Poor Survival in Cervical Cancer Patients. *J Clin Oncol* 2002; 20(4): 973-98.
170. Kelloff GJ. Perspectives on Cancer Chemoprevention Research and Drug Development. *Adv Cancer Res* 2000; 78: 199-334.
171. Haie-Meder C, Morice P, Castiglione M. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21(5): 37-40.
172. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* 2009; 46 (4): 277-84.
173. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer* 2010; 127 (1): 1–8.

174. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 1953; 97 (5): 695–710.
175. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(1): 221-6.
176. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21(1): 1-26.
177. de Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95 (2): 221-3.
178. Kocic G, Pavlovic R, Najman S, Nikolic G, Sokolovic D, Jevtovic-Stoimenov T, et al. Circulating Ribonucleic Acids and Metabolic Stress Parameters May Reflect Progression of Autoimmune or Inflammatory Conditions in Juvenile Type 1 Diabetes. *Scientific World Journal* 2011; 1: 1496–508.
179. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008; 34(8): 737-49.
180. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 2000; 243(1-2): 167-90.
181. Gorca A, Huk-KolegaH, Piechota P, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid – biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 2011, 63(4): 849-58.
182. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 2001; 17(10): 888–95.
183. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, et al. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res* 1994; 20(2): 119–33.
184. Liu J, Head E, Gharib AM, Yuan W, Ingersoll RT, Hagen TM, et al. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha -lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4): 2356–61.
185. Suzuki YJ, Aggarwal BB, Packer L. Alpha-lipoic acid is a potent inhibitor of NF-kappa B activation in human T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189 (3): 1709–15.

186. Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V, et al. (R)-alpha-lipoic acid supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J* 1999; 13(2): 411–8.
187. Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, et al. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells. *Apoptosis* 2007; 12(1): 113–23.
188. Kono Y, Inomata M, Hagiwara S, Hiratsuka T, Suzuki K, Koga H, et al. Antiproliferative effects of a new -lipoic acid derivative, DHL-HisZnNa, in HT29 human colon cancer cells in vitro. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16(1): 103-9.
189. Bernini R, Crisante F, Merendino N, Molinari R, Soldatelli MC, Velotti F. Synthesis of a novel ester of hydroxytyrosol and -lipoic acid exhibiting an antiproliferative effect on human colon cancer HT-29 cells. *Eur J Med Chem* 2011; 46(1): 439-46.
190. Na MH, Seo EY, Kim WK. Effects of alpha-lipoic acid on cell proliferation and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cells. *Nutr Res Pract* 2009; 3(4): 265-71.
191. Pack RA, Hardy K, Madigan MC, Hunt NH. Differential effects of the antioxidant alpha-lipoic acid on the proliferation of mitogenstimulated peripheral blood lymphocytes and leukemic T cell. *Mol Immunol* 2002; 38(10): 733-45.
192. Packer L. alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev* 1998; 30(2): 245-75.
193. Vig-Varga E, Benson EA, Limbil TL, Allison BM, Goebel MG, Harrington MA. Alpha-lipoic acid modulates ovarian surface epithelial cell growth. *Gynecol Oncol* 2006, 103(1), 45–52.
194. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-*⁻ generation. *Apoptosis* 2005; 10(2): 359–68.
195. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine. A Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9): 17279-303.
196. Kulmacz RJ. Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis. *FEBS Lett* 1998; 430(3): 154-7.
197. Chen W, Pawelek TR, Kulmacz RJ. Hydroperoxide dependence and cooperative cyclooxygenase kinetics in prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999; 274(29): 20301-6.

198. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(13): 7563-8.
199. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol* 1998; *Toxicol* 38: 97-120.
200. Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, Watanabe K, Kawamori T, Maruyama T, et al. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 2004; 53(8): 1151–8.
201. Grösch S, Jürgen Maier T, Schiffmann S, Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(11): 736-47.
202. Grösch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001; 15(14): 2742-4.
203. Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, et al. 3-phosphoinositidedependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(4): 1444-51.
204. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99(39): 335–45.
205. Vaish V, Sanyal SN. Chemopreventive effects of NSAIDs on cytokines and transcription factors during the early stages of colorectal cancer. *Pharmacol Rep* 2011; 63(5): 1210–21.
206. Zheng Y, Ritzenthaler JD, Roman J, Han S. Nicotine stimulates human lung cancer cell growth by inducing fibronectin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(6): 681–90.
207. Rao PN, Grover RK. Apricoxib: a COX-2 inhibitor for the potential treatment of pain and cancer. *IDrugs* 2009; 12(11): 711–22.
208. Entezari Heravi R, Hadizadeh F, Sankian M, Tavakol Afshari J, Taghdisi SM, Jafarian H, et al. Novel selective Cox-2 inhibitors induce apoptosis in Caco-2 colorectal carcinoma cell line. *Eur J Pharm Sci* 2011; 44(4): 479-86.
209. Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP, Jabbour HN. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of

- cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 2002; 62(2): 424-32.
210. Sales KJ, Katz A. Inflammatory pathways in cervical cancer - the UCT contribution. *S Afr Med J* 2012; 102(6): 493-6.
211. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107(4): 1183-8.
212. Guadagni F, Ferroni P, Palmirotta R, Del Monte G, Formica V, Roselli M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention and therapy. *Anticancer Res* 2007; 27(5A): 3147-62.
213. Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 2003; 47(5): 383-92.
214. Johnson AJ, Hsu AL, Lin HP, Song X, Chen CS. The cyclooxygenase- 2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks. *Biochem J* 2002; 366(Pt 3): 831-7.
215. Shureiqi I, Jiang W, Zuo X, Wu Y, Stimmel JB, Leesnitzer LM, et al. The 15-lipoxygenase product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid downregulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(17): 9968-73.
216. Eling TE, Joon Baek S, Shim M, Ho Lee C. NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39(6): 649-55.
217. Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grosch S. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(8): 1469-78.
218. Wilson JC, O'Rourke MA, Cooper JA, Murray LJ, Hughes CM, Gormley GJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and cervical cancer risk: a case-control study using the Clinical Practice Research Datalink. *Cancer Epidemiol* 2013; 37(6): 897-904.
219. Liu JF. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer, with an especial focus on esophageal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011; 12(12): 3159-68.
220. Shiff SJ, Rigas B. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 1997; 113(6), 1992-8.

221. Goldberg Y, Nassif II, Pittas A, Tsai LL, Dynlacht BD, Rigas B, et al. The anti-proliferative effect of sulindac and sulindac sulfide on HT-29 colon cancer cells: alterations in tumor suppressor and cell cycle-regulatory proteins. *Oncogene* 1996; 12(4): 893-901.
222. Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Sulindac sulfide inhibits the proliferation of colon cancer cells: diminished expression of the proliferation markers PCNA and Ki-67. *Cancer Lett* 1997; 115(2): 229-34.
223. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J* 2001; 15(12): 2057-72.
224. Marx J. Cancer research. Anti-inflammatories inhibit cancer growth--but how? *Science* 2001; 291(5504): 581-2.
225. Berkson BM, Rubin DM, Berkson AJ. Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases. *Integr Cancer Ther* 2009; 8(4): 416-22.
226. Tieri P, Termanini A, Bellavista E, Salvioli S, Capri M, Franceschi C. Charting the NF- κ B pathway interactome map. *PLoS one* 2012, 7(3): e32678.
227. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 1998; 396(6706): 77-80.
228. Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D. NF- κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003; 22(1): 50-8.
229. Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 2001; 411(6841): 1017-21.
230. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, Klevesath MS, Joswig M, Lee V, et al. Insufficient glycemic control increases nuclear factor κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21(8): 1310-6.
231. Baldwin AS Jr. NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-83.
232. Kim HJ, Chang EJ, Kim HM, Lee SB, Kim HD, Kim GS, et al. Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear

- factor-kappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(9): 1483–93.
233. Kim HY, Or Y, Kim M, Yokozawa T. Protective effect of lipoic acid against methylglyoxal-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008; 54:(1) 99–104.
234. Zhang WJ, Frei B. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *FASEB J* 2001; 15(13): 2423–32.
235. Lee HA, Hughes DA. Alpha-lipoic acid modulates NF-kappaB activity in human monocytic cells by direct interaction with DNA. *Exp Gerontol* 2002; 37(2-3): 401-10.
236. Novotny L, Rauko P, Cojocel C. alpha-Lipoic acid: the potential for use in cancer therapy. *Neoplasma* 2008; 55(2): 81–6.
237. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 2009; 790(10): 1149-60.
238. Guerriero E, Sorice A, Capone F, Costantini S, Palladino P, D'ischia M, et al. Effects of lipoic acid, caffeic acid and a synthesized lipoyl-caffeic conjugate on human hepatoma cell lines. *Molecules* 2011; 16(8): 6365-77.
239. Larghero P, Venè R, Minghelli S, Travaini G, Morini M, Ferrari N, et al. Biological assays and genomic analysis reveal lipoic acid modulation of endothelial cell behavior and gene expression. *Carcinogenesis* 2007; 28(5): 1008-20.
240. Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasarathy S, Rajagopalan S. Evidence that -lipoic acid inhibits NF- B activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res* 2011; 60(3): 219-25.
241. Erlejman AG, Jaggars G, Fraga CG, Oteiza PI. TNFalpha-induced NF-kappaB activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476(2): 186-95.
242. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9): 17279-303.
243. Doohar JE, Paz-Priel I, Houg S, Baldwin AS Jr, Friedman AD. C/EBP , C/EBP Oncoproteins, or C/EBP Preferentially Bind NF- B p50 Compared with p65 Focusing Therapeutic Targeting on the C/EBP: p50. Interaction. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(10): 1395-405.

244. Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, et al. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28(5): 968–76.
245. Loveridge CJ, MacDonald AD, Thoms HC, Dunlop MG, Stark LA. The proapoptotic effects of sulindac, sulindac Sulphone and indomethacin are mediated by nucleolar translocation of the RelA(p65) subunit of NF-kappaB. *Oncogene* 2008; 27(18): 2648–55.
246. Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, et al. Effects of nonsteroidal anti inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(2): 237-45.
247. Zerbini LF, Tamura RE, Correa RG, Czibere A, Cordeiro J, Bhasin M, et al. Combinatorial Effect of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs and NF-kB Inhibitors in Ovarian Cancer Therapy. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24285.
248. Liggett JL, Zhang X, Eling TE, Baek SJ. Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett* 2014; 346(2): 217-24.
249. Mladenova D, Pangon L, Currey N, Ng I, Musgrove EA, Grey ST, et al. Sulindac activates NF- B signaling in colon cancer cells. *Cell Commun Signal* 2013; 11: 73.
250. Brady RR, Loveridge CJ, Dunlop MG, Stark LA. c-Src dependency of NSAID-induced effects on NF- B-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; 32(7): 1069-77.
251. Luis A, García Rodríguez, Consuelo Huerta-Alvarez. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of Aspirin and Nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology* 2001; 12(1): 88-90.
252. Thun M, Henley J, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2003; 94(4): 252-66.
253. Urick ME, Giles JR, Johnson PA. VEGF expression and the effect of NSAIDs on ascites cell proliferation in the hen model of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 10(3): 418-24.
254. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, et al. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999; 282(13): 1254-7.

255. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011; 2011: 941876.
256. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990; 76(4): 655-63.
257. Zapata JM, Pawlowski K, Haas E, Ware CF, Godzik A, Reed JC. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 24242-52.
258. Wang JL, Lui D, Zhang ZJ, Shan S, Han X, Srinivasula SM, et al. Structure- based discovery of an organic compound that binds Bcl- 2 protein and induced apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13): 7124-9.
259. Bissonnette RP, Exheverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2. *Nature* 1992; 359(6395): 552-4.
260. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; 34 (4 Suppl 5): 9–19.
261. Lipponen PK, Aaltomaa S, Eskelinen M. Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumors. *Histopathology* 1996; 28(2): 135-40.
262. Lipponen P, Pierilainen T, Kosma VM, Aaltomaa S, Eskelinen M, Syjanen K. The apoptosis suppressing protein bcl-2 is expressed in well-differentiated breast carcinomas with a favourable prognosis. *J Pathol* 1995; 177(1): 49-55.
263. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordan P, Blochlinger A, Gasser TC, et al. Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol* 1996; 148(5): 1557-65.
264. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, Archer PG, Meyers AD, Franklin WA. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122(6): 627-32.
265. Apolinario RM, van der Valk P, de Jong JS, Deville W, van Ark-Otte J, Digemans AM, et al. Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and bax oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected nonsmall-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15(6): 2456-66.
266. Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 1997; 75(3): 367-73.

-
267. Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins – evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 8): 1567-74.
268. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 3668-72.
269. Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N.. Structure of Bax:coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103(4): 645-54.
270. Makin GW, Corfe BM, Griffiths GJ, Thistlethwaite A, Hickman JA, Dive C. Damage-induced Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J* 2001; 20(22): 6306-15.
271. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276(15): 11615-23.
272. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nakano R. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1999; 85(8): 1799-809.
273. Harima Y, Harima K, Shikata N, Oka A, Ohnishi T, Tanaka K. Bax and Bcl-2 expression predict response to radiotherapy in human cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124(9): 503–10.
274. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod* 2001; 16(10): 2211–8.
275. Mozzetti S, Ferrandina G, Marone M, D’Ingiullo F, Fruscella E, De Pasqua A, et al. Expression of bcl-2, bax-xL, and bcl-xS in endometrial and cervical tissues. *Cancer Detect Prev* 2000; 24(6): 536–41.
276. Tjalma W, De Cuyper E, Weyler J, Van Marck E, De Pooter C, Albertyn G, et al. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178 (1 Pt 1): 113–7.
277. Harima Y, Nagata K, Harima K, Oka A, Ostapenko VV, Shikata N, et al. Bax and Bcl-2 protein expression following radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. *Cancer* 2000; 88(1): 132–8.
278. Dozio E, Ruscica M, Passafaro L, Dogliotti G, Steffani L, Marthyn P, et al. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27(Kip1)-dependent cell cycle arrest

- and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2010; 641(1): 29-34.
279. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(1): 83–93.
280. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, et al. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319(3): 1062-9.
281. Vaskivuo TE, Stenback F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer* 2002; 95(7): 1463–71.
282. Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor prognosis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71(2): 305–7.
283. Dorjgochoo T, Xiang YB, Long J, Shi J, Deming S, Xu WH, et al. Association of genetic markers in the BCL-2 family of apoptosis related genes with endometrial cancer risk in a Chinese population. *PLoS One*. 2013; 8(4): e60915.
284. Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl-2, and bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 1996; 149(6): 1941-52.
285. Pöhland T, Wagner S, Mahyar-Roemer M, Roemer K. Bax and Bak are the critical complementary effectors of colorectal cancer cell apoptosis by chemopreventive resveratrol. *Anticancer Drugs* 2006; 17(4): 471-8.
286. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290(5493): 989-92.
287. Mahyar-Roemer M, Köhler H, Roemer K. Role of Bax in resveratrol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *BMC Cancer* 2002; 2: 27.
288. Jayshree RS, Sreenivas A, Tessy M, Krishna S. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res* 2009; 130(3): 286-95.
289. Cheah PL, Looi LM. Significance of Bcl-2 and Bax proteins in cervical carcinogenesis: an immunohistochemical study in squamous cell carcinoma and squamous intraepithelial lesions. *Malays J Pathol* 2006; 28(1): 1-5.

290. Sultana H, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Sato S, et al. Chemosensitivity and p53-Bax pathway-mediated apoptosis in patients with uterine cervical cancer. *Ann Oncol* 2003; 14(2): 214-9.
291. Waggoner SF, Baunoch DA, Anderson SA, Leigh F, Zagaja VG. Bcl-2 protein expression associated with resistance to apoptosis in clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix expressing wild type p53. *Am Surg Oncol* 1998; 5(6): 544-7.
292. Zergeroğlu S, Gungor T, Aksakal O, Parlakyigit E, Kmen O. Bcl-2 expression in carcinoma of the uterine cervix and its relationship with prognostic variables. *Turk J Med Sci* 2001; 31: 401-4.
293. Coultas L, Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003; 13(2): 115-23.
294. Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2004; 94(3): 636-42.
295. Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Naito K. Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemoradiation therapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34(3): 124-30.
296. Dabrowska M, Pietruczuk M, Kostecka I, Suchowierska M, Kloczko J, Nasilowska B, et al. The rate of apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in leukocytes of acute myeloblastic leukemia patients. *Neoplasma* 2003; 50(5): 339-44.
297. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(9): 647-56.
298. Debatin KM, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002; 21(57): 8786-803.
299. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644(2-3): 125-32.
300. Sturm I, Köhne CH, Wolff G, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, et al. Analysis of the p53/BAX Pathway in Colorectal Cancer: Low BAX Is a Negative Prognostic Factor in Patients With Resected Liver Metastases. *J Clin Oncol* 1999; 17(5): 1364-74.
301. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, et al. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55(19): 4471-8.

302. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(8): 2583-90.
303. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275(5302): 967-9.
304. Mahyar Roemer M, Katsen A, Mestres P, Roemer K. Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse. *Int J Cancer* 2001; 94(5): 615-22.
305. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(1): 135-8.
306. Poligone B, Baldwin AS. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38658-64.
307. Ahmed F, Adsule S, Ali AS, Banerjee S, Ali S, Kulkarni S, et al. A novel copper complex of 3-benzoyl-alpha methyl benzene acetic acid with antitumor activity mediated via cyclooxygenase pathway. *Int J Cancer* 2007; 120(4): 734-42.
308. Connor TH, McDiarmid MA. Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(6): 354-65.
309. Connor TH, McDiarmid MA. Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA Cancer J Clin* 2006;56(6):354-65.
310. Tomioka K, Kumagai S. Health risks of occupational exposure to anticancer (antineoplastic) drugs in health care workers. *Sangyo Eiseigaku Zasshi* 2005; 47(5):195-203.
311. Mantovani A, Vecchi A. Interaction of cancer chemotherapy agents with the mononuclear phagocyte system. *Prog Drug Res* 1990; 35: 487-519.
312. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol* 2008; 15: 118-46.
313. Ritland SR, Gendler SJ. Chemoprevention of intestinal adenomas in the ApcMin mouse by piroxicam: kinetics, strain effects and resistance to chemosuppression. *Carcinogenesis*.1999; 20(1):51-8.
314. Lippman SM, Spitz M, Trizna Z, Benner SE, Hong WK. Epidemiology, biology, and chemoprevention of aerodigestive cancer. *Cancer* 1994; 74(9):2719-25.

-
315. Manson MM, Farmer PB, Gescher A, Steward WP. Innovative agents in cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2005; 166:257–75.
316. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22(20):3138-51.
317. Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 2004; 23(16):2934-49.
318. Kim ST, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, et al. Clinical impact of microsatellite instability in colon cancer following adjuvant FOLFOX therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66(4):659-67.
319. Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, et al. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res* 1999; 59(23):5938-46.
320. Saini MK, Vaiphei K, Sanyal SN. Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycocyanin. *Mol Cell Biochem* 2012; 361(1-2):217-28.
321. Cho SG, Choi EJ. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35(1):24-7.
322. Arlt A, Gehrz A, Mürköster S, Vorndamm J, Kruse ML, Fölsch UR, et al. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003; 22(21):3243-51.
323. Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr . Inducible chemoresistance to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) in colorectal cancer cells and a xenograft model is overcome by inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 2000; 60(9):2323-30.
324. Wang W, McLeod HL, Cassidy J. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 104(4):504-11.
325. Carreras CW and Santi DV: The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem* 64: 721-762, 1995.

326. Jetté L, Bissoon-Haqqani S, Le François B, Maroun JA, Birnboim HC. Resistance of colorectal cancer cells to 5-FUdR and 5-FU caused by Mycoplasma infection. *Anticancer Res* 2008; 28(4B):2175-80.
327. Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E. Thymidylate synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1995; 49(10):1419-26.
328. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pharmacol Ther* 2004; 447(5):728-34.
329. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B: Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999; 104:263-9.
330. Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, Nakagawa H, Hayakawa Y, Shibata W, et al. Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clin Cancer Res* 2009; 15(7):2248-58.
331. Wu Z, Peng X, Li J, Zhang Y, Hu L. Constitutive activation of nuclear factor B contributes to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and promotes human cervical cancer progression and poor prognosis. *Int J Gynecol Cancer* 2013; 23(5):906-15.
332. Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, et al. Nuclear factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(25):3930-5.
333. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446:475-82.
334. Yu HG, Zhong X, Yang YN, et al: Increased expression of nuclear factor-kappaB/RelA is correlated with tumour angiogenesis in human colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:18-22.
335. Uetsuka H, Haisa M, Kimura M, Gunduz M, Kaneda Y, Ohkawa T, et al. Inhibition of inducible NF-kappaB activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line. *Exp Cell Res* 2003; 289(1):27-35.
336. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Apr;1805(2):167-80.

-
337. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML. Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. *Oncogene* 1999;18(21):3213-25.
338. Barrasa JI, Santiago-Gómez A, Olmo N, Lizarbe MA, Turnay J. Resistance to butyrate impairs bile acid-induced apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via up-regulation of Bcl-2 and inactivation of Bax. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1823(12):2201-9.
339. Casagrande N, De Paoli M, Celegato M, Borghese C, Mongiat M, Colombatti A, et al. Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2013;131(3):744-52.
340. Granci V, Cai F, Lecumberri E, Clerc A, Dupertuis YM, Pichard C. Colon cancer cell chemosensitisation by fish oil emulsion involves apoptotic mitochondria pathway. *Br J Nutr* 2013;109(7):1188-95.
341. Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ, Tanizawa A, Pommier Y, Cossman J. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 1993; 53(18):4251-6.
342. Tzung SP, Kim KM, Basañez G, Giedt CD, Simon J, Zimmerberg J, et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol* 2001; 3(2):183-91.
343. Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, Haye S, Kremer B, Kalthoff H, et al. Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer* 2004; 20:109(2):182-8.

Biografija autora

Ivana Damjanović (rođ. Dedović), rođena je u Leskovcu, 03.07.1983. godine od oca Dušana i majke Zorice. Udata je i majka jednog deteta.

Osnovnu i srednju medicinsku školu završila je u Leskovcu sa odličnim uspehom. Medicinski fakultet u Nišu, odsek farmacija, upisala je školske 2002/03. godine. Školovala se iz budžeta Republike Srbije. Diplomirala je u roku, jula 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,58 i odbranila je diplomski rad iz predmeta Farmakokinetika sa ocenom 10. Akademske doktorske studije, smer Molekularna medicina, upisala je januara 2008. godine, a februara 2009. godine je prešla na smer Toksikologija.

Profesionalnu karijeru je započela je 25.08.2007. godine u Zdravstvenoj ustanovi Apoteka Vetfarm, a zatim je od 20.10.2009. do 31.09.2012. radila u Zdravstvenoj ustanovi Apoteka Remedia u Nišu. Radni odnos na Medicinskom fakultetu u Nišu zasnovala je 1.10.2012. godine, gde i danas radi u zvanju saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Farmacija, na predmetima Farmakokinetika i Klinička farmacija.

U toku svog profesionalnog rada redovno se stručno usavršavala i počinjala stručne edukacije iz oblasti farmacije i medicine.

Autor je i koautor većeg broja radova objavljenih u domaćim i stranim časopisima: 6 radova u međunarodnim časopisima (2 autorska rada), 6 radova u časopisima nacionalnog značaja (3 autorska rada) i 1 rad u naučnom medicinskom časopisu.

Rezultati nau no-istraživa kog rada:

Izabrane publikacije:

1. Kocic G, Pavlovic V, Saranac Lj, Kocic R, Zivic S, Sokolovic D, Jevtovic T, Nikolic G, Stojanovic S, **Damnjanovic I**. Circulating nucleic acids in type 1 diabetes may modulate the thymocyte turnover rate. *Cell immunol* 2010; 266(1): 76-82.
2. Conic I, Miljkovic S, Tošic-Golubovic S, Stanojevic Z, Milenkovic D, Djordevic B, **Damnjanovic I**, Visnjic M, Antic S, Stefanovic V. Anxiety levels related to type of therapy for cervical cancer. *Central European Journal of Medicine* 2012; 7(4): 490-6.
3. Damnjanovic Z, Jovanovic M, Nagorni A, Radojkovic M, Sokolovic D, Damnjanovic G, Djindjic B, Smiljkovic I, Kamenov A, **Damnjanovic I**. Povezanost inflamatornih parametara i biohemijskih markera holestaze sa intenzitetom lipidne peroksidacij kod bolesnika sa holedoholitijazom. *Vojnosanitetski Pregled* 2013; 70(2): 170-6.
4. Milic A, **Damnjanovic I**. Primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji karcinoma kolona. *Racionalna terapija* 2013; 5(1): 17-20.
5. **Damnjanovic I**, Kocic G, Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Conic I, Langerholc T, Pesic S. Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl Med J*; in press.
6. **Damnjanovic I**, Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Kocic H, Langerholc T, Damnjanovic Z, Pesic S. Crosstalk between possible cytostatic and antiinflammatory potential of ketoprofen in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl Med J*; in press.



Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Улога и значај сифа-митохондрске киселине и нестероидних антиинфламаторних лекова у хемостазу и коагулацији абортуса
пацијата кардионаска корона и церебрална - IN VITRO студија

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни 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, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: Љана Јанковић

Потпис докторанда:



Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ПШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора: Улана Замкановић

Студијски програм: ДАС Токсикологија

Наслов рада: Улога и значај одваљивних кривичних и несавесних амбиентално-фармацевтичких лекова у хемопревенцији и ингаљацијама аутоимуне пелуца еритроцитног крвотка и урбана in vitro култура

Ментор: доц др Срђан Пецић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Аутор дисертације: Улана Замкановић

Потпис докторанда:



Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Улога и ефекат алфа-либолојне киселине и нестероидних антиинфламаторних лекова у хемостазе и регулацији абнормалне ћелијске карцинома колоне и цервикса - IN VITRO студија
која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити 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 подвучете само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, _____

Аутор дисертације: Ивана Јанковић

Потпис докторанда:
