



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU I
ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



Dimitar Jakimov

UTICAJ MODIFIKOVANIH STEROIDNIH
JEDINJENJA NA ĆELIJSKI CIKLUS, INDUKCIJU
APOPTOZE I NASTANAK GENETSKIH OŠTEĆENJA
U HUMANIM TUMORSKIM ĆELIJAMA

– Doktorska disertacija –

Novi Sad, 2016.

Predgovor

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru istraživanja na projektu „Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja steroidnih derivata i njihovih molekulskih agregata“ (br. projekta 172021) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Disertacija je rezultat timskog naučno-istraživačkog rada većeg broja saradnika sa Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu i Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Ovom prilikom bih želeo da izrazim svoju veliku zahvalnost za privilegiju koju sam imao radeći sa svojim profesorima, saradnicima, kolegama i prijateljima, koji su svi na različite načine doprineli ovoj doktorskoj disertaciji, a to su: prof. dr Suzana Jovanović-Šanta, spec. toks. hem. dr Vesna Kojić, spec. med. gen. Lidija Aleksić, prof. dr Gordana Bogdanović, prof. dr Marija Sakač, prof. dr Slavica Knežević-Ušaj, dipl. biolog Eva Moldvaji, prof. dr Svetlana Trivić, prof. dr Katarina Penov Gaši, prof. dr Evgenija Djuređić, prof. dr Slavko Kevrešan, prof. dr Mirjana Popsavin, prof. dr Velimir Popsavin, dr Jovana Ajduković, dr Andrea Nikolić, dr Aleksandar Oklješa, prof. dr Olivera Klisurić, Ljiljana Savić, Marija Marković, Jelena Milovanović i Filip Jakimov.

Najviše se zahvaljujem svojoj mentorki prof. dr Suzani Jovanović-Šanta na ogromnoj pomoći tokom doktorskih studija i istraživačkog rada, kao i na veoma prijateljskom odnosu.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Mariji Sakač, prof. dr Svetlani Trivić i Prof. Dr Slavici Knežević-Ušaj na angažovanju, pomoći i strpljenju tokom realizacije ove doktorske teze.

Veliku pomoć mi je pružila prof. dr Gordana Bogdanović, svojim iskustvom u eksperimentalnom radu i stručnošću u oblasti biomedicine.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj saradnici spec. med. gen. Lidiji Aleksić za pomoć u izvođenju testova na protočnom citometru i eksperimentalnom radu.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj kolegici i velikom prijatelju spec. toks. hem. dr Vesni Kojić, koja je učestvovala u svakom segmentu istraživanja, na nemerljivom uloženom trudu i strpljenju.

Veliku pomoć za završetak doktorske disertacije, moralnu i materijalnu, su mi pružili moja majka spec. soc. med. dr Julka Jakimov-Gazepov i brat dipl. ing. m. sc. Eftim Jakimov.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svom ocu spec. stom. prot. prim. dr Jakimov Slavku.

Novi Sad, 10. VIII 2016.

Dimitar Jakimov

Sadržaj:

Predgovor	2
Skraćenice i pojmovi	7
1. UVOD.....	10
2. OPŠTI DEO.....	14
2.1. Steroidna jedinjenja	14
2.1.1. Struktura steroida	14
2.1.2. Biološka funkcija steroidnih jedinjenja.....	15
2.2. Biomedicinski značaj modifikovanih steroida	17
2.2.1. Derivati steroidnih jedinjenja u terapiji malignih tumora	17
2.2.2. Antitumorski efekat heterocikličnih steroidnih jedinjenja sa azotom	19
2.2.3. Antitumorski efekat nitrilnih steroidnih derivata	21
2.2.4. Genotoksičnost steroida	26
2.2.5. Ispitivanje efekata steroida na biološke sisteme savremenim molekularnim metodama	28
2.2.5.1. Skrining endokrinih disruptora pomoću DNK mikromatrica	29
2.2.5.2. Ispitivanje fragmentacije i oštećenja DNK	31
2.2.5.3. Genotoksični efekat steroida u slučaju Dišenove mišićne distrofije.....	35
2.2.5.4. Ispitivanje anaboličkih androgenih heterocikličnih steroida.....	36
2.2.5.4.1. Steroidi sa pirazolskim prstenom	36
2.2.5.4.2. Steroidi sa izoksazolskim prstenom	37
2.2.5.4.3. Steroidi sa furazanskim prstenom	38
2.3. Metode za ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja.....	38
2.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i>	38
2.3.1.1. Čelijske linije	39
2.3.1.2. Metode za ispitivanje citotoksičnosti i metaboličke aktivnosti ćelija.....	40
2.3.1.2.1. Test sa tripan-plavim (Dye exclusion test, DET)	41
2.3.1.2.2. MTT test ćelijske proliferacije	41
2.3.1.3. Morfološki pokazatelji citotoksičnosti.....	42
2.3.2. Apoptoza – programirana ćelijska smrt.....	43

2.3.2.1.	Apoptoza tumorskih ćelija	46
2.3.3.	Ispitivanje genotoksičnosti.....	47
2.3.3.1.	Hemijski faktori genotoksičnosti	47
2.3.3.1.1.	Genotoksičnost hemioterapeutika	48
2.3.3.2.	Analiza hromozomskih aberacija.....	49
2.3.3.3.	Test mikronukleusa.....	49
2.3.3.4.	Test izmene sestrinskih hromatida (SCE test)	50
2.3.3.4.1.	Mehanizam nastanka i faktori koji utiču na SCE	51
2.3.3.5.	Dizajn genotoksikoloških ispitivanja	52
3.	NAŠI RADOVI	53
3.1.	Ispitivana jedinjenja.....	53
3.1.1.	Steroidni derivati.....	53
3.1.1.1.	Pikolinski i pikolinilidenski derivati.....	53
3.1.1.2.	Seko-dinitrilni derivati	53
3.1.2.	Referentna jedinjenja.....	55
3.1.3.	Ispitivane ćelijske linije.....	55
3.2.	Antiproliferativna aktivnost steroidnih derivata.....	57
3.2.1.	Ispitivanje citotoksičnosti in vitro	57
3.2.2.	Uticaj steroidnih jedinjenja na ćelije tumora dojke.....	60
3.2.3.	Sinergizam i antagonizam najaktivnijih steroidnih derivata	64
3.3.	Studija indukcije apoptoze ispitivanim steroidima.....	67
3.3.1.	Ispitivanje modulacije ćelijskog ciklusa	67
3.3.2.	Ispitivanje apoptoze i nekroze protočnom citometrijom.....	70
3.3.3.	Analiza ekspresije apoptotskih proteina <i>Western blot</i> metodom	72
3.3.4.	Morfološke promene ćelija kao pokazatelj apoptoze	77
3.4.	Ispitivanje genotoksičnosti steroidnih jedinjenja	79
3.4.1.	Rezultati analize hromozomskih aberacija.....	80
3.4.2.	Rezultati testa mikronukleusa	82
3.4.3.	Rezultati SCE testa.....	85
3.4.4.	Analiza oštećenja DNK pomoću testa komete	87
3.5.	Korelacioni odnosi strukture i biološke aktivnosti	91
3.6.	Diskusija rezultata	94
3.6.1.	Biološki efekti pikolinskih i pikolinilidenskih jedinjenja	94
3.6.2.	Biološki efekti steroidnih seko-dinitrila.....	96
3.6.3.	Genotoksičnost ispitivanih steroida	98

4. EKSPERIMENTALNI DEO	101
4.1. Kultivacija ćelija.....	101
4.1.1. Gajenje ćelijskih kultura.....	101
4.1.1.1. Sejanje i uzgajanje ćelija.....	101
4.1.1.2. Sakupljanje kultivisanih ćelija	102
4.1.2. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija	102
4.1.2.1. Test odbacivanja boje - DET	103
4.1.3. Tretman ćelija rastvorima ispitivanih jedinjenja	103
4.2. Ispitivanje citotoksičnosti <i>in vitro</i>	105
4.2.1. MTT test.....	105
4.2.1.1. Kontrola kvaliteta MTT testa i analiza podataka	105
4.3. Metode protočne citometrije.....	106
4.3.1. Ispitivanje ćelijskog ciklusa na protočnom citometru	106
4.3.1.1. Priprema reagenasa i ćelija za DNK analizu.....	106
4.3.1.2. Očitavanje distribucije faza ćelijskog ciklusa	107
4.3.2. Merenje apoptoze i nekroze na protočnom citometru	107
4.3.2.1. Annexin-V-FITC test.....	107
4.4. Analiza ekspresije proteina.....	108
4.4.1. <i>Western blot</i> analiza	109
4.4.1.1. Određivanje koncentracije proteina u lizatu ćelija.....	109
4.4.1.1.1. Pripremanje lizata za <i>Western blot</i> analizu	109
4.4.1.1.2. Određivanje koncentracije proteina mikro Bradford metodom.....	109
4.4.1.2. SDS-PAGE elektroforeza	110
4.4.1.3. Detekcija blotova	110
4.5. Morfološka studija apoptoze	111
4.5.1. Analiza apoptotske morfologije svetlosnom mikroskopijom.....	111
4.5.1.1. Obrada kultura i priprema preparata	112
4.5.1.2. Analiza morfologije	113
4.6. Metode ispitivanja genotoksičnosti	113
4.6.1. Analiza hromozomskih aberacija	114
4.6.2. Test mikronukleusa	115
4.6.3. Test izmene sestrinskih hromatida	116
4.6.4. Test komete	118
4.7. Analiza rezultata i obrada podataka	119
4.7.1. Statistička analiza.....	119

4.7.2. Ispitivanje odnosa struktura-aktivnost	119
5. ZAKLJUČAK.....	121
SUMMARY	126
6. PRILOG.....	132
LITERATURA.....	133
BIOGRAFIJA AUTORA	141
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	143

Skraćenice i pojmovi

Skraćenice i njihovo značenje navedeni su prema abecednom redosledu.

3 β -HSD1 i 2	– 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza/izomeraza tip 1 i 2
A	– Apsorbancija
A549	– Čelijska linija karcinoma pluća
Ac	– Acetil grupa
ADP	– Adenozin difisfat
ADT	– 1,4,6-androstatrien-17-ol-3-on acetat
AIs	– Inhibitori enzima aromataze (engl. <i>Aromatase Inhibitors</i>)
A-modifikovani-	– Steroidni molekuli kojima je modifikovan A prsten
APAF-1	– engl. <i>Apoptosis Protease-Activating Factor-1</i>
AR-	– Androgen receptor negativno
AR	– Androgen receptor
ATCC	– Američka organizacija za biološke resurse i standarde (engl. <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	– Adenozin trifosfat
B modifikovani-	– Steroidni molekuli kojima je modifikovan B prsten
BAD	– engl. <i>Bcl-2-Associated Death Promoter</i>
BAK	– engl. <i>Bcl-2 Homologous Antagonist Killer</i>
BAX	– engl. <i>Bcl-2-Associated X Protein</i>
Bcl-2	– engl. <i>B-Cell Lymphoma</i>
BD	– Becton Dickinson
BFB	– engl. Breakage-fusion-bridge
BN	– Binuklearni limfociti
BR	– Bradfordov reagens
BrdU	– Bromo-2-deoksiuridin
BSA	– Goveđi albumin iz seruma (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CBMN	– Test mikronukleusa sa blokiranjem citokineze (engl. <i>The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay</i>)
CBPI	– Proliferacioni indeks ćelija sa blokiranom citokinezom
CDKs	– Ciklin-zavisne kinaze
cDNA	– Komplementarna DNK (engl. <i>Complementary DNA</i>) sintetisana iz informacione RNK pomoću enzima reversne transkriptaze
CMA	– Hlormadinon acetat
C-modifikovani-	– Steroidni molekuli kojima je modifikovan C prsten
CoA	– Koenzim A
CPA	– Ciproteron acetat, steroidno jedinjenje koje se koristi u terapiji kancera prostate
CV	– Koeficijent varijacije
Cy3 i Cy5	– Fluorescentne boje <i>Cyanine 3</i> i <i>Cyanine 5</i>
CYP17	– Koenzim iz grupe citohrom 450; 17 α -hidroksilaza-C _{17,20} -lijaza
CYP19	– Koenzim iz grupe citohrom 450; aromataza
Cyt C	– Citohrom C
Cyt-B	– Citohalazin B
DD	– Proteinski „domeni smrti“ (engl. „ <i>Death Domain</i> “)
DED	– Proteinski „efektorni domen smrti“ (engl. <i>Death Effector Domain</i>)
DET	– Test izbacivanja boje sa tripan-plavim (engl. <i>Trypan Blue – Dye Exclusion Test</i>)
DEX	– Deksametazon
DGT	– Didrogesteron

DHEA	– Dehidroepiandrosteron
DISC	– engl. <i>Death-Inducing Signalling Complex</i>
DMEM	– Hranljivi medijum, engl. <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
D-modifikovani-	– Steroidni molekuli kojima je modifikovan D prsten
DMSO	– Dimetilsulfoksid
DNG	– Dienogest
DNK	– Deoksiribonukleinska kiselina
D-seko	– Steroidni molekul sa otvorenim D prstenom
E2	– Estrogeni hormon 17 β -estradiol
ECL	– Unapređena hemiluminescencija (engl. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDC	– Endokrini disruptori (engl. <i>Endocrine-Disrupting Compounds</i>)
EDTA	– Etilendiamintetraacetatna kiselina
EE2	– Etinilestradiol
engl.	– Engleski
ER-	– Estrogen receptor negativno
ER	– Estrogen receptor
ER+	– Estrogen receptor pozitivno
ER α	– Estrogen receptor α
FACS	– engl. „ <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> ”
FADD	– Adaptorske molekule (engl. <i>Fas-Associated Death Domain Protein</i>)
FasL	– Fas ligand ili CD95 ligand
FCS	– Fetalni teleći serum (engl. <i>Foetal Calf Serum</i>)
FISH	– Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FITC	– Fluorescein izotiocijanat
FL2	– Parametar ukupne ćelijske fluorescencije protočnog citometra
FLIP, v-FLIP, c-FLIP	– Protein inhibitor <i>FasL</i> (engl. <i>FasL Inhibitor Protein</i>)
FPG	– Tehnika bojenja hromozoma (engl. <i>Fluorescence Plus Giemsa</i>)
G0/G1	– G0/G1 faza ćelijskog ciklusa
G2/M	– G2/M faza ćelijskog ciklusa
GEST	– Gestoden
HA	– Hromozomske aberacije
HeLa	– Ćelijska linija karcinoma grlića materice
HEPG2	– Ćelijska linija humanog karcinoma jetre
HER2 ⁺	– Mala ekspresija receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (engl. <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
HL-60	– Ćelijska linija humane promijelocitne leukemije
<i>Hoechst</i> 33258	– Fluorescentna boja
HT-29	– Ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva
IAEA	– Internacionalna agencije za atomsku energiju (engl. <i>International Atomic Energy Agency</i>)
IC ₅₀	– 50% inhibitorna koncentracija
iRNK	– Informaciona RNK (engl. <i>mRNA</i>)
K562	– Ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije
LAPC4	– Ćelijska linija androgen receptor pozitivnog karcinoma prostate
LNCaP	– Ćelijska linija androgen-osetljivog adenokarcinoma prostate
LNG	– Levonorgestrel
MCF-7	– Ćelijska linija adenokarcinoma dojke koja ekspresuje estrogene receptore (ER ⁺)
MDA-MB-231	– Ćelijska linija adenokarcinoma dojke koja ne ekspresuje estrogene receptore (ER ⁻)
mdx (miševi)	– Miševi bez ekspresije distrofina
Me	– Metil grupa
MGA	– Megestrol acetat
MGC-803	– Ćelijska linija karcinoma želuca
MIFE	– Mifepriston
MN	– Mikronukleusi
MNI	– Učestanost mikronukleusa (engl. <i>Micronucleus Incidence</i>)

MPA	– Medroksi progesteron acetat
MRC-5	– Čelijska linija zdravih fibroblasta pluća
MTT	– 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid
NADPH	– Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NB	– Jedarno pupljenje (engl. <i>Nuclear Budding</i>)
NK	– engl. „ <i>Natural Killer</i> “
NET	– Noretisteron
NPB	– Nukleoplazmatski most (engl. <i>Nucleo-Plasmatic Bridge</i>)
P	– Progesteron, steroidni hormon
PARP	– Enzim poli-ADP-riboza polimeraza (engl. <i>Poly-ADP-Ribose Polymerase</i>)
PBS	– Fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC-3	– Čelijska linija adenokarcinoma prostate
PCN	Pregnenolon 16 α -karbonitril - inhibitor estrogen sulfataze
PCR	– Lančana reakcija polimeraze (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Pgp	– P-glikoprotein
PHA, PHA-M	– Fitohemaglutinin (-M)
PI	– Propidijum jodid
PRED	– Prednizolon
PS	– Fosfatidil serin
RAPD-PCR	– engl. <i>Random Amplified Polymorphic DNA - PCR</i>
RLU	Relativne svetlosne jedinice (engl. <i>Relative Light Units</i>)
RNK	– Ribonukleinska kiselina
ROS	– Rektivne kiseonične vreste molekula (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI-1640	– Hranljivi medijum (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RT-PCR	– Lančana reakcija polimeraze sa reverznom transkripcijom (engl. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
S	– S faza ćelijskog ciklusa
SAR	– Odnos struktura-aktivnost (engl. <i>Structure Activity Relationship</i>)
SCE	– Izmena sestrijskih hromatida (engl. <i>Sister Chromatide Exchange</i>)
SCGE	– Elektroforeza pojedinačnih ćelija (engl. <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>)
SD	– Standardna devijacija
SDS	– Natrijum dodecilsulfat (engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate</i>)
SDS-PAGE	– Elektroforeza proteina na poliakrilamidnom gelu (engl. <i>Sodium Dodecil Sulphate Polyacryl Amide Gel Electrophoresis</i>)
SRB	– Sulforodamin B
subG1	– subG1 faza ćelijskog ciklusa, smatra se apoptotskom populacijom ćelija
T	– Testosteron, steroidni hormon
T-47D	– Čelijska linija metastatskog ER+ karcinoma dojke
TBS	– TRIS pufer (engl. <i>TRIS Buffered Saline</i>)
TCA	– Trihlorsirćetna kiselina
TEMED	– Tetrametiletilendiamin
TNBC	– Trostruko negativni karcinom dojke (ER ⁻ , PR ⁻ i HER2 ⁻ – engl. <i>Triple Negative Breast Cancer</i>)
TNFR1	– Receptor TNF-liganda
TNF α	– Faktor tumorske nekroze α (engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TNF β	– Faktor tumorske nekroze β (engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TRADD	– engl. <i>TNFR-Associated Death Domain</i>
TRAIL	– engl. <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRIS	– Tris(hidroksimetil)aminometan
WHO	– Svetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)
wt-AR	– Neizmenjeni (engl. <i>Wild Type</i>) androgeni receptor
\bar{X}	– Srednja vrednost
XTT	– 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-karboksanilid

1. UVOD

Steroidi su važna klasa signalnih biomolekula. Steroidni hormoni i veliki broj srodnih steroidnih jedinjenja u živim organizmima obavljaju važne fiziološke funkcije. Steroidna jedinjenja su takođe potencijalni kandidati za razvoj novih lekova za tretman najtežih bolesti današnjice. Postoje brojne naučne publikacije koje govore o direktnom antiproliferativnom dejstvu molekula steroidne strukture. Danas se vrše istraživanja u pravcu hemijske modifikacije prirodnih steroida, sa ciljem razvoja novih lekova za tretman mnogih bolesti, uključujući kardiovaskularne, autoimune i maligne bolesti. Sintezom aktivnijih, specifičnijih i efikasnijih molekula mogao bi se učiniti napredak u lečenju malignih bolesti, ali i drugih patoloških stanja.

Androgeni su muški polni steroidni hormoni koji omogućavaju razvoj muških polnih karakteristika i funkcionisanje reproduktivnog sistema muškaraca, ali takođe i anabolizam proteina i druge važne metaboličke procese. Antiandrogeni su klasa lekova koji konkurišu androgenima za mesta vezivanja na androgenim receptorima u ćelijama, smanjujući na taj način delovanje androgena i inhibirajući rast androgen-zavisnih karcinoma. Pored toga što učestvuju u regulaciji metabolizma i prenošenju signala, ova grupa jedinjenja može imati veliki uticaj i na razvoj i progresiju bolesti, u prvom redu malignih bolesti i to na onim tipovima ćelija i tkiva koja imaju receptore za ova jedinjenja.

Slično je i sa estrogenim hormonima: to su signalni molekuli čija su ciljna tkiva prvenstveno ženski reproduktivni organi, u kojima su ovi hormoni zaduženi za razvoj i funkcionisanje tih tkiva, ali i veliki broj drugih tkiva, u kojima su zaduženi za regulaciju metabolizma. Sve ciljne ćelije sadrže estrogene receptore (α , β i/ili membranske receptore). Terapija estrogen-zavisnih problema i bolesti može da obuhvata terapiju antiestrogenima ili inhibitorima enzima aromataze, a često je i kombinacija ova dva terapijska pristupa.

Karcinom dojke spada u najrasprostranjenije bolesti sa fatalnim ishodom. Jasno izdvojen podtip malignog tumora dojke koga karakteriše odsustvo estrogenskih i progesteronskih receptora (ER- i PR-), kao i odsustvo ekspresije receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2-), poznat je kao „trostruko negativni“ karcinom dojke (TNBC – engl. *Triple-Negative Breast Cancer*)¹. Obuhvata do 20% invazivnih karcinoma dojke i javlja se uglavnom kod žena u premenopauzi. Ovi tumori povezani su sa starošću pacijenta, socijalnim statusom, stadijumom bolesti, porodičnom istorijom tumora dojke, visokim mitotskim indeksima, mutacijama gena za

BRCA1 protein i drugim faktorima^{1,2}. Zbog nedostatka odgovarajućih receptora u ćelijama, ova agresivna podgrupa karcinoma dojke je rezistentna na postojeće ciljane tretmane (terapija antitelima ili hormonska terapija)³. Mehanizmi proliferacije ovih tumora nisu još uvek dovoljno proučeni, tako da je veoma teško razviti agense za ciljani tretman pacijenata sa ovakvim tipom karcinoma. Posledica toga je da se TNBC leče standardnim tretmanima. Međutim, takvi tretmani su praćeni visokom stopom lokalnog i sistemskog relapsa³, tj. visokom učestalošću metastaza u plućima, jetri i mozgu, a preživljavanje žena sa TNBC je generalno loše². Traganje za novim, efektivnijim antitumorskim lekovima obuhvata širok spektar bioloških i biohemijskih testiranja. Pored toksičnosti ka ćelijama kancera, kandidat za novi lek mora imati i druge osobine, kao što su dobra selektivnost i niska sistemska toksičnost.

Apoptoza je fiziološki proces, veoma važan za pravilan razvoj organizma tokom embriogeneze i kasnije. Ovaj proces takođe štiti organizam od mnogih bolesti, uključujući karcinom, jer mnogi onkogeni stresovi (npr. nekontrolisana proliferacija ili oštećenje molekula DNK) predstavljaju okidač za apoptozu⁴. Poremećaji u signalnim putevima apoptoze su prepoznati kao krucijalni u onkogenezi i mnogim drugim patološkim procesima⁵⁻⁸. Stoga, da bi karcinom nastao i napredovao, apoptoza mora biti inhibirana u više stadijuma, počevši od transformacije zdrave ćelije u neoplastičnu, pa sve do pojave metastaza. Izbegavanje apoptoze je jedna od osnovnih karakteristika ćelija kancera. S druge strane, upravo je indukcija apoptoze kancerskih ćelija često glavni efektorni mehanizam delovanja antitumorskih lekova. Postoji nekoliko puteva apoptoze i većinom su poremećeni u tumorima. Međutim, razumevanje apoptotskog procesa omogućava razvijanje novih terapijskih pristupa⁵⁻⁸. U tretmanu različitih tipova karcinoma ciljano aktiviranje apoptotskih signalnih puteva je relativno nova terapijska strategija i neki od novih preparata koji indukuju apoptozu već su sastavni deo kombinovane terapije^{9,10}. Iako terapijski pristup vezan za apoptozu dominira, postoje i druge strategije u terapiji karcinoma¹¹⁻¹³. Na primer, ciljanje ćelijskog ciklusa, generalno, a posebno ciklin-zavisnih kinaza (CDKs), predstavlja jednu od strategija za razvoj terapije malignih bolesti¹⁴. Selektivno izazivanje nekroze je još jedan alternativni način da se premoste defektni apoptotski putevi^{15,16}.

Steroidna jedinjenja su se potvrdila kao dobri terapeutici za lečenje mnogih bolesti. Steroidni antitumorski lekovi su trenutno u žiži mnogih naučno-istraživačkih poduhvata¹⁷. Zahvaljujući jakom antiproliferativnom efektu prema tumorskim ćelijama, neka steroidna jedinjenja, prirodnog porekla ili sintetička, ulivaju nadu za efikasnije lečenje različitih vrsta karcinoma^{17,18}. Heterociklična steroidna jedinjenja koja sadrže atom azota, u prstenu kondenzovanom na steroidno jezgro ili u supstituentu na steroidnom jezgrou, privukla su posebnu pažnju u istraživanjima antitumorskih lekova, jer poseduju željenu farmakološku aktivnost¹⁹⁻²². U našim

prethodnim istraživanjima veliki broj novosintetisanih supstituisanih, seko- ili homo-steroidnih jedinjenja pokazala su dobru antiproliferativnu aktivnost²³⁻²⁷. Naše nedavne studije su takođe pokazale da je nekoliko 17(E)-pikolinilidenskih androstanskih derivata demonstriralo selektivnu antiproliferativnu aktivnost prema PC-3 ćelijama karcinoma prostate²⁸, dok su D-seko-meziloksi androstanski derivati indukovali apoptozu u „trostruko negativnim“ ćelijama karcinoma dojke²⁹. Pošto su neki 17-supstituisani androstanski derivati i steroidni 16,17-seko dinitrili snažno inhibirali rast TNBC MDA-MB-231 ćelija^{30, 31}, postavlja se pitanje koji mehanizmi leže u osnovi ovakve inhibicije. Stoga su istraživanja u okviru ove doktorske disertacije usmerena na testiranje uticaja steroidnih jedinjenja odabranih iz obe navedene grupe, kako na njihovu *in vitro* citotoksičnost prema nekoliko humanih ćelijskih linija, tako i na proveru ćelijskih mehanizama na kojima se zasnivaju uočeni biološki efekti ovih jedinjenja.

Cilj ove doktorske disertacije je da se prouče biološki efekti odabranih 17 α -pikolinskih, 17(E)-pikolinilidenskih i D-seko dinitrilnih steroidnih derivata na ćelije humanih malignih tumora ispitivanjem njihovog *in vitro* antiproliferativnog efekta na ćelijskim linijama humanih solidnih tumora, promena u distribuciji ćelijskog ciklusa, pro-apoptotičkog potencijala na ćelijama karcinoma dojke i genotoksičnih karakteristika.

Disertacija se sastoji iz više delova. U prvom delu je dat pregled podataka iz novije literature o istraživanjima iz oblasti sinteze modifikovanih steroidnih jedinjenja i ispitivanja njihove biološke aktivnosti, prvenstveno utvrđivanja citotoksičnog, genotoksičnog, antiproliferativnog i antitumorskog efekta. Obradene su takođe i eksperimentalne metode za evaluaciju ovakvih aktivnosti novosintetisanih jedinjenja.

U drugom delu su prikazani rezultati naših istraživanja. Predmet ove doktorske disertacije obuhvatao je ispitivanje bioloških i biohemijskih aspekata antitumorskog dejstva odabranih steroidnih derivata. Ispitivana je antitumorska aktivnost četrnaest jedinjenja koja su sintetisana u laboratoriji za organsku sintezu Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, kao deo naučno-istraživačkog projekta u okviru koga je ispitivana i biološka aktivnost većeg broja novosintetisanih steroidnih jedinjenja. Antiproliferativna aktivnost ovih jedinjenja ispitana je *in vitro* na šest ćelijskih linija humanih solidnih tumora, jednoj leukemijskoj i jednoj ćelijskoj liniji zdravog tkiva. Takođe su upoređeni efekti ovih steroidnih derivata sa efektima Formestana i Doksorubicina kao referentnih jedinjenja na istim tumorskim ćelijama. Pošto su ispitivani derivati značajno smanjivali populaciju ćelija hormon-nezavisnog karcinoma dojke MDA-MB-231, u sledećoj fazi istraživanja je na tim ćelijama ispitan uticaj jedinjenja na ćelijski ciklus i izazivanje apoptoze korišćenjem nekoliko različitih metoda. Nakon toga, korelirani su biološki efekti i strukture modifikovanih steroidnih derivata, sa ciljem otkrivanja odnosa između strukturnih varijacija i aktivnosti jedinjenja. Kao

dodatak pretkliničkim ispitivanjima citotoksičnosti, u okviru ove doktorske disertacije urađena je i studija genotoksičnosti ispitivanih steroidnih derivata radi evaluacije njihove ukupne toksičnosti kao potencijalnih novih lekova. Kao posebne celine izdvojeni su i detaljno prikazani eksperimentalni postupci i prilozi sa kompletnim rezultatima.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je u celini urađen u laboratoriji Zavoda za eksperimentalnu onkologiju i u Laboratoriji za imunobiologiju (danas – Služba za patološko-anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku) Instituta za onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Opisana istraživanja su sprovedena u periodu od 2010. do 2015. godine. Deo rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji je publikovan u vodećim međunarodnim naučnim časopisima³¹⁻³³.

2. OPŠTI DEO

Jedan od važnih zadataka savremene medicinske hemije predstavlja razvoj novih hemioterapeutika, analoga prirodnih ili sintetičkih biološki aktivnih molekula. Rukovodeći se ovom strategijom, sintetisan je veći broj steroidnih jedinjenja sa značajnom antitumorskom aktivnošću. Strukturne modifikacije koje bi dovele do pronalaženja potentnijeg i manje toksičnog terapeutika postale su takođe predmet istraživanja.

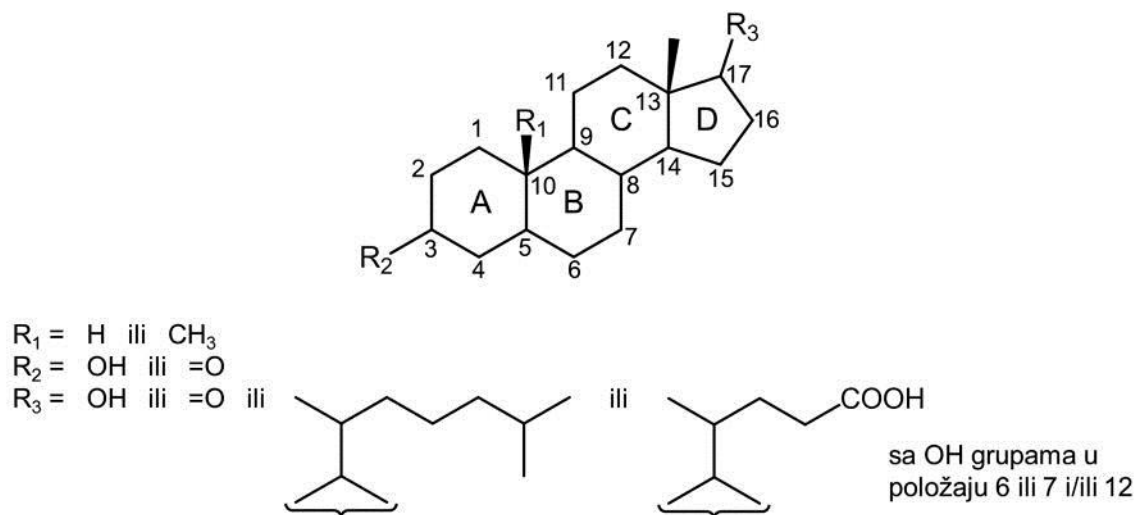
U radu su prikazani navodi iz literature o istraživanjima iz oblasti ispitivanja biološke aktivnosti steroidnih jedinjenja, sa naglaskom na modifikovane steroide koji su ispoljili antiproliferativni i antitumorski efekat. Navedeni su rezultati istraživanja citotoksičnosti i genotoksičnosti steroidnih jedinjenja, publikovanih u aktuelnoj naučnoj literaturi. Takođe je dat pregled najčešće korišćenih eksperimentalnih metoda za evaluaciju aktivnosti novosintetisanih jedinjenja.

2.1. Steroidna jedinjenja

Steroidi su organska jedinjenja koja u osnovnoj strukturi imaju kondenzovani sistem ciklopentano-perhidrofenantrena. Steroidi pripadaju klasi lipida, široko su rasprostranjeni u živom svetu, a ima ih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima³⁴.

2.1.1. Struktura steroida

Steroidi su bezbojna kristalna jedinjenja, veoma slabo rastvorljiva u vodi. Rastvaraju se u različitim organskim rastvaračima, u zavisnosti od broja i vrste funkcionalnih grupa. Biogenetski, steroidi pripadaju grupi tetracikličnih triterpena. U prirodi se javljaju u slobodnom stanju, ali i u obliku estara, konjugata, glikozida, soli i dr. Kvantitativno i kvalitativno se određuju hemijskim reakcijama koje su zasnovane na specifičnostima steroidnog jezgra i/ili različitih funkcionalnih grupa (**Slika 2.1**). Relativno su krute konformacije. Strukture steroida se mogu određivati različitim fizičkim metodama: infracrvenom spektroskopijom, nuklearnom magnetnom rezonancom, optičkom rotacionom disperzijom, masenom fragmentacionom analizom i dr³⁴.



Slika 2.1: Opšta struktura steroidnih jedinjenja. Steroidno jezgro čini četiri kondenzovana prstena (A, B, C i D), a steroidi različitih klasa imaju različite supstituente na tom jezgru. Ovde su navedene samo neke funkcionalne grupe kao mogući supstituenti na steroidnom jezgru (u strukturama polnih hormona, holesterola (sa dvostrukom vezom u položaju Δ^5) i žučnih kiselina).

Razjašnjavanje osnovne strukture steroida i razvoj hemije steroida imao je veliki uticaj na napredak organske hemije prodorima u oblasti stereochemije i uspostavljanjem koncepcije konformacione analize. Rasvetljavanje biosinteze steroida ubraja se među velika dostignuća moderne hemije. Posle određivanja strukture holesterola usledili su prvi nagoveštaji porekla steroida, jer je primećena velika sličnost steroidnih struktura i triterpena nastalih ciklizacijom skvalena³⁴.

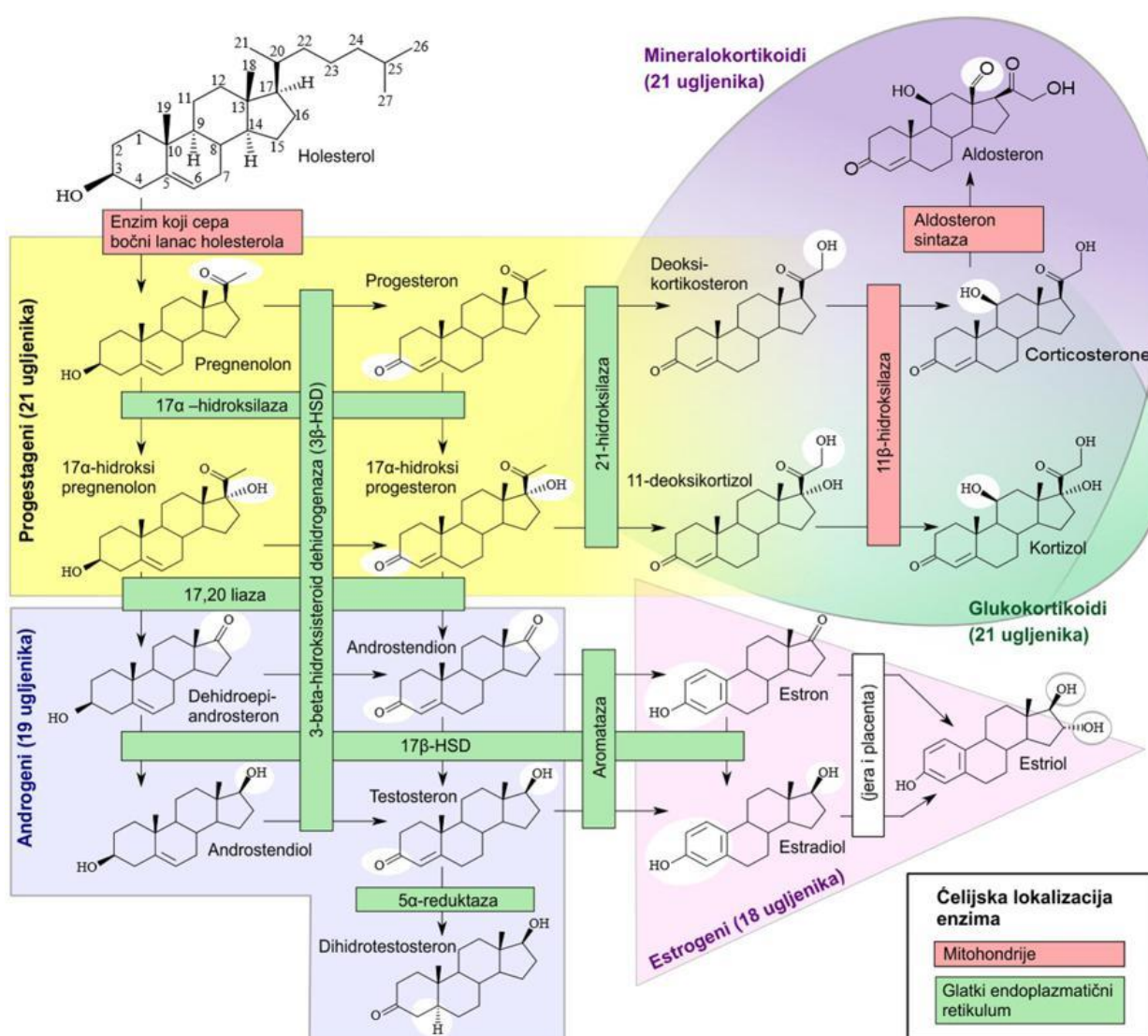
Struktura i konformacija steroidnih jedinjenja su od ključne važnosti za njihovu funkciju i aktivnost. Iz tog razloga mnoga nesteroidna jedinjenja, zbog svoje strukturne sličnosti sa određenim steroidima, mogu da deluju kompetitivno npr. na određeno mesto vezivanja steroidnih hormona za hormonske receptore ili aktivna mesta u enzimima i sl. Sa druge strane, neznatne promene u strukturi steroidnih jedinjenja mogu dovesti do gubitka osnovne funkcije ili pak do ispoljavanja novih, potpuno drugačijih aktivnosti. Stoga se veliki napor istraživača ulaže u izučavanje odnosa strukture i biološke aktivnosti steroidnih molekula (SAR – *Structure Activity Relationship*).

2.1.2. Biološka funkcija steroidnih jedinjenja

Steroidni hormoni i ostala steroidna jedinjenja u organizmu obavljaju veliki broj važnih fizioloških funkcija. Pored regulacije metabolizma i prenosa signala, ova jedinjenja mogu značajno uticati i na razvoj i progresiju bolesti, u prvom redu malignih bolesti i to na onim

tipovima tkiva i ćelija koja reaguju na signale ovih molekula, tj. koja imaju receptore za ova jedinjenja.

Na **Slici 2.2** prikazana je pojednostavljena šema biosinteze i interkonverzije steroidnih hormona, dok se biokonverzije ostalih steroida dešavaju po drugim mehanizmima i uz učešće drugih enzima, koji su uglavnom tkivno-specifični. Zbog svih važnih funkcija i velikog uticaja na organizam, steroidna jedinjenja i njihova modifikacija predstavljaju posebno interesantan segment istraživanja hemijske, biohemijske, farmakološke i medicinske nauke. Danas se vrše istraživanja u pravcu hemijske modifikacije prirodnih steroida ili sinteze novih steroidnih derivata, sa ciljem razvoja novih lekova za tretman najozbiljnijih bolesti savremenog čoveka.



Slika 2.2: Steroidogeneza u tkivima čoveka. Preuzeto uz modifikaciju od: Hagstrom i Ričfild (2014.)³⁵.

2.2. Biomedicinski značaj modifikovanih steroida

Biološki važna svojstva modifikovanih steroida zavise od strukturnih karakteristika steroidnog jezgra i prisustva bočnog lanca i/ili supstituenata na steroidnom jezgru. Modifikacija steroida pruža mogućnost izmene funkcionalnih grupa, a ovako nastala jedinjenja se mogu koristiti za razvoj novih terapeutika, kao i za proučavanje prostorne orijentacije funkcionalnih grupa važnih za vezivanje za ciljne proteine³⁶. Veliki broj steroidnih derivata sa različitim modifikacijama strukture u odnosu na prirodne steroide opisano je u literaturi kao potencijalno biološki aktivna jedinjenja. Ovde su navedeni neki primeri iz novijih literaturnih navoda.

2.2.1. Derivati steroidnih jedinjenja u terapiji malignih tumora

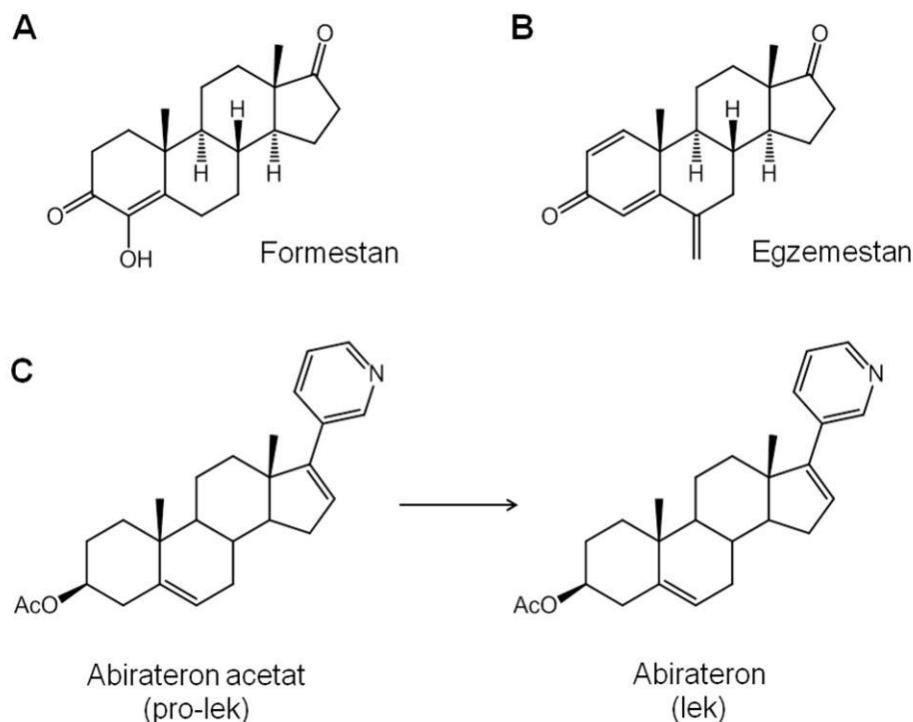
Tumor je, prema jednoj od definicija, abnormalna masa tkiva, čvor ili izraslina u organizmu. Razlikuju se dva tipa tumora: dobroćudni (benigni – koji rastu do određene veličine, zatim prestaju da rastu i trpe regresiju – tumori samoregulatori) i zloćudni (maligni – koji se karakterišu nekontrolisanim i neograničenim rastom)³⁷. Kod malignih tumora (kancera ili raka), neke ćelije u organizmu se promene i počnu nekontrolisano da rastu, što se pre ili kasnije, ako se ta progresija ne zaustavi odgovarajućom terapijom, završava smrću obolelog. Ćelije raka mogu da se odvoje od primarnog tumora i da dospeju u bilo koje tkivo, nastavljajući da rastu. Proces širenja tumora na druge lokacije u telu se naziva metastaziranje.

Razvoj i rast tumora nastalih u hormonski osetljivim tkivima može biti zavisn od hormona. Lekovi koji inhibiraju sintezu ili delovanje odgovarajućeg hormona utiču na tkiva koja zavise od tih hormona, što se koristi u lečenju tumora nastalih iz tih tkiva. Tako se u terapiji hormon-zavisnih tumora mogu koristiti antagonisti hormona (antihormoni) ili inhibitori nekog od enzima steroidogeneze.

Antihormoni obično deluju na nivou receptora (npr. sprečavanjem vezivanja estrogena za receptore). Najčešće se radi o kompeticiji između hormona i antihormona za vezujuće mesto na receptoru. Inhibitori steroidogeneze utiču na biosintezu hormona (npr. inhibiranjem enzima aromataze delovanjem specifičnih steroidnih ili nesteroidnih molekula)³⁸. Tako u cilju kontrole ili blokade patološke aktivnosti estrogena, postoje dva glavna pristupa. Prvi pristup obuhvata dizajn i sintezu antagonista estrogena, a drugi dobijanje inhibitora enzima, najčešće aromataze ili sulfataze³⁹.

Inhibitori enzima se prema mehanizmu delovanja dele na reverzibilne (koji obično kompetitivaju sa supstratom), pseudoreverzibilne i ireverzibilne (prethodno aktivirani enzimom, suicidalni ireverzibilni inhibitori, npr. steroidni inhibitori aromataze Formestan i Egzemestan)⁴⁰.

Formestan (**Slika 2.3-A**) je sintetsko steroidno jedinjenje sa antineoplastičnim delovanjem. Veže se ireverzibilno i inhibira enzim aromatazu, sprečavajući aromatizaciju androgena ⁴¹.



Slika 2.3: Strukture ireverzibilnih inhibitora aromataze: **A** – Formestan, **B** – Egzemestan i lijaze: **C** – Abirateron acetat.

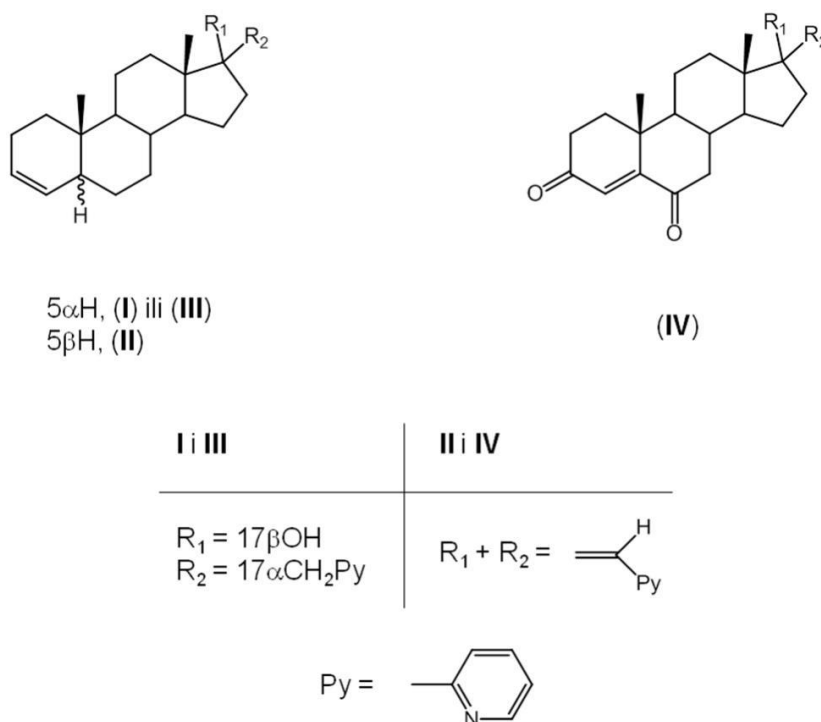
Egzemestan (**Slika 2.3-B**) je ireverzibilni steroidni inhibitor aromataze, koji se koristi u tretmanu estrogen-pozitivnog karcinoma dojke. Egzemestan je strukturno sličan prirodnom supstratu aromataze, androstendionu, pa može da se veže za njen vezivni centar i podlegne reakciji. Njegov metabolit se vezuje nepovratno za aktivni centar enzima, čime ga inaktivira i sprečava konverziju androgena u estrogene. Ovakav način delovanja je poznat kao suicidalna inhibicija ⁴².

Abirateron je potentni steroidni ireverzibilni inhibitor 17α hidroksilaze/ $C_{17,20}$ -lijaze (CYP17), koji blokira dve važne enzimske aktivnosti u sintezi testosterona. Koristi se u terapiji karcinoma prostate, u obliku Abirateron acetata, koji je njegov 3-acetatni analog. Kada se apsorbuje nakon oralne primene, Abirateron acetat se brzo konvertuje u aktivni oblik, Abirateron (**Slika 2.3-C**). Abirateron je dominantan metabolit abirateron acetata otkriven u krvi u prekliničkim i kliničkim studijama ⁴³.

2.2.2. Antitumorski efekat heterocikličnih steroidnih jedinjenja sa azotom

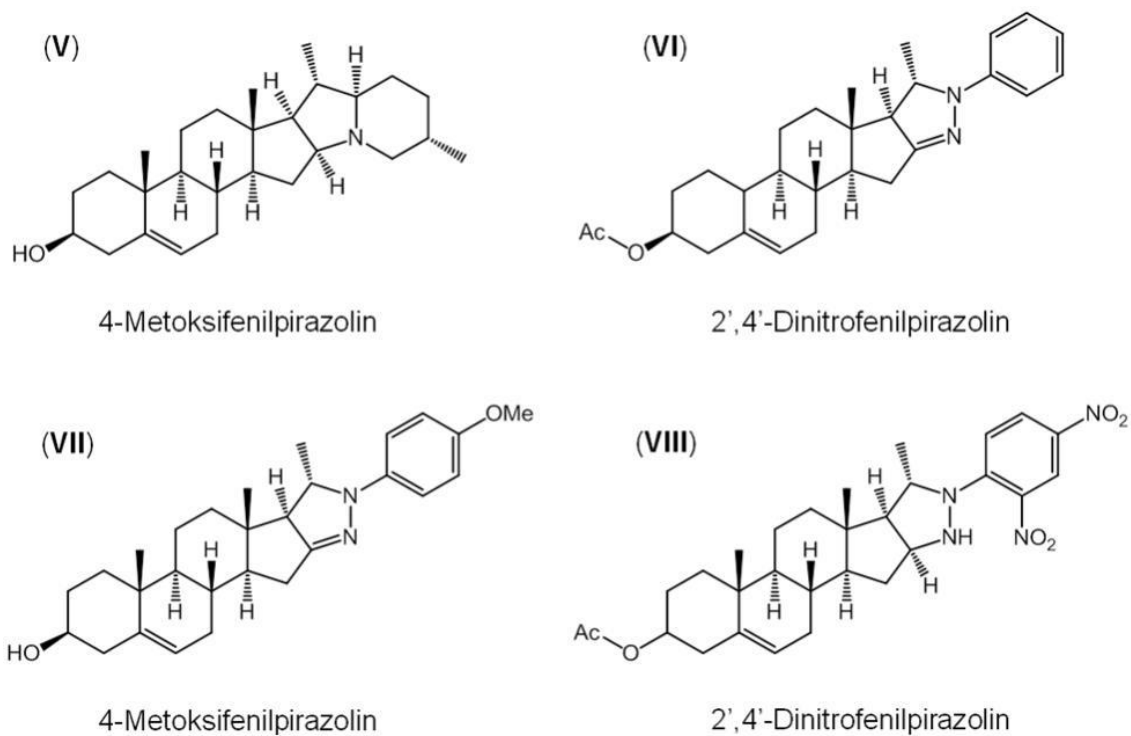
Od velikog broja modifikovanih steroida koji su ispoljili farmakološki potencijal, u radu je dat pregled nekih biološki aktivnih steroida koji sadrže azot kao heteroatom, vezan na različite načine za steroidno jezgro ili u okviru njega.

Tako su Penov Gaši i saradnici ⁴⁴, kao i Djurendić i saradnici ^{24, 30, 45} opisali sintezu serije 17 α -pikolil- i 17-pikolinilidenskih derivata androstana i njihovu antiaromataznu i antitumorsku aktivnost na ćelijskim linijama solidnih tumora. Struktura nekih od ispitivanih jedinjenja prikazana je na **Slici 2.4**.



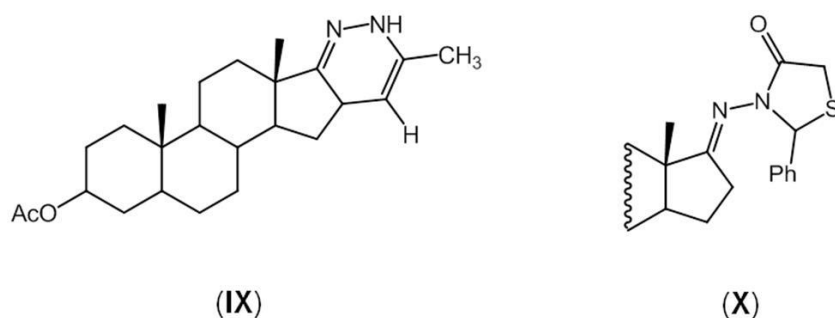
Slika 2.4: Neki od 17 α -pikolil- i 17-pikolinilidenskih derivata androstana koji su ispoljili jak antiproliferativni efekat na ćelije karcinoma dojke (I i II) i prostate (III i IV) ³⁰.

Minorics i saradnici ⁴⁶ su sintetisali analoge solanidina (**Slika 2.5**), koji su ispoljili jak antiproliferativni efekat na HL-60 ćelije humane promijelocitne leukemije. Najefektivnije jedinjenje, 4-metoksifenilpirazolinski derivat, vidno je remetilo ćelijski ciklus i indukovalo manifestaciju markera rane apoptoze i sekundarne nekroze, što je delimično posledica njegovog inhibitorynog efekta na aktivnost ribonukleotidne reduktaze. Rezultati ove studije su pokazali da su solanidinski derivati nova porodica citotoksičnih steroidnih jedinjenja, vredna pažnje.



Slika 2.5: Struktura testiranih analoga solanidina. Preuzeto iz: *Minorics* i sar. (2011.)⁴⁶.

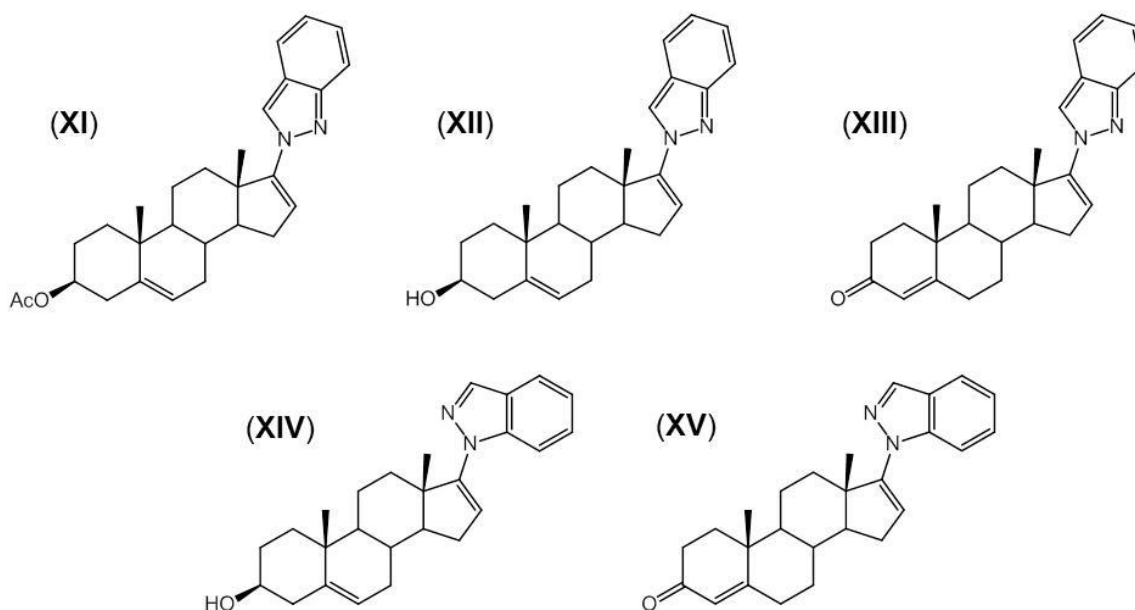
Abdelhalim i saradnici⁴⁷ su sintetisali i ispitali efekat nekih heterocikličnih kondenzovanih steroida koji sadrže azot na ćelije humanih kancera. Na **Slici 2.6** su prikazana najaktivnija jedinjenja prema ćelijskoj liniji HEPG2 humanog karcinoma jetre.



Slika 2.6: Struktura najaktivnijih iz serije heterocikličnih steroidnih derivata koja sadrže azot. Preuzeto iz: *Abdelhalim* i sar. (2011.)⁴⁷.

Moreira i saradnici⁴⁸ su sintetisali (**Slika 2.7**) seriju 1*H*- i 2*H*-indazolskih derivata od komercijalno dostupnog dehidroepiandrosteron acetata i ispitali inhibiciju humanog enzima 17 α -hidroksilaza-C_{17,20}-lijaza (CYP17) usled delovanja ovih jedinjenja, njihov afinitet vezivanja za androgeni receptor i citotoksični potencijal prema tri ćelijske linije karcinoma prostate.

Sintetisana jedinjenja su inhibirala aktivnost C_{17,20}-liaze. U ispitivanim koncentracijama nisu pokazala afinitet prema mutiranom androgenom receptoru (AR) LNCaP ćelija. 2*H*-indazolska serija androstanskih derivata (XI – XIII) je bila efektivna prema PC-3 ćelijama, kao i neka jedinjenja (XIV i XV) 1*H*-indazolske serije. Pošto PC-3 ćelije ne ekspresuju androgene receptore, pretpostavlja se da su mehanizmi kao što su apoptoza ili promena ćelijskog ciklusa doprineli inhibiciji proliferacije ovih ćelija.



Slika 2.7: Jedinjenja 2*H*- (XI – XIII) i 1*H*-17-indazolske serije androstanskih derivata (XIV i XV) koja su ispoljila najveći antiproliferativni efekat prema PC-3 ćelijama. Preuzeto iz: *Moreira i sar. (2007.)*⁴⁸.

2.2.3. Antitumorski efekat nitrilnih steroidnih derivata

Neka istraživanja vezana za derivate steroida odnose se na steroidne nitrile i ulogu nitrilne grupe u lekovima za borbu protiv kancera. Nitrilni steroidni derivati predstavljaju grupu jedinjenja sa obećavajućom antiproliferativnom aktivnošću na različite ćelije kancera. Ova jedinjenja sadrže nitrilnu funkciju:

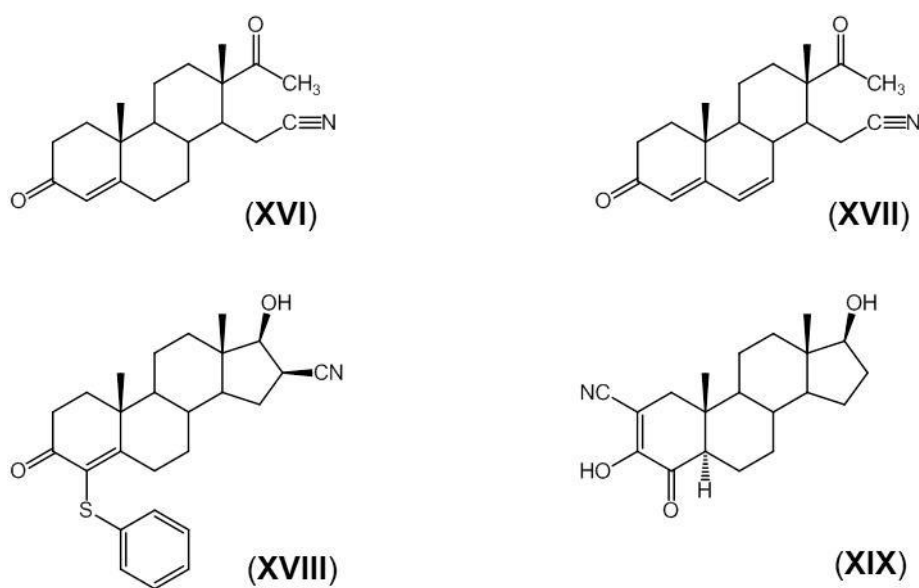


Nitrilna grupa je prilično stabilna i najčešće se ne metabolizuje. Nije posebno elektrofilna. Metabolički, veliki broj lekova koji sadrže ovu grupu, prođu kroz telo nepromenjeni⁴⁹. Nitrilna modifikacija se često koristi da bi se poboljšala fizičko-hemijska svojstva biološki aktivnih jedinjenja, kao i za povećanje rastvorljivosti jedinjenja u vodi (hidrofilnosti) i poboljšavanje njihovih farmakokinetičkih osobina. Farmakološki, nitrili služe kao bioizostere karbonilnih, karboksilnih, hidroksilnih grupa i halogena. U kompleksu ligand-protein, nitrili deluju kao

akceptori vodonične veze i formiraju nespecifične dipolne interakcije sa bočnim lancima proteina ili metalnim jonima, gde njihova linearna geometrija omogućava prodor u prostorno (sterno) poluzatvorene džepove proteina. Tako, na primer, steroidni lek Trilostan (4 α ,5 α -epoksi-3,17 β -dihidroksiandrost-2-en-2-karbonitril) inhibira 3 β -hidroksisteroid dehidrogenazu (3 β -HSD), tako što se uspostavi karakteristična nitril-serin interakcija. Inhibicija ovog enzima predstavlja dobru strategiju za kontrolu biosinteze steroidnih hormona (**Slika 2.2**). Inače, steroidni nitrili mogu da posluže kao fleksibilan model za dizajniranje jedinjenja koja mogu da menjaju neke od puteva steroidogeneze³¹.

U radu su navedeni neki farmakološki aktivni steroidni nitrili, od kojih se neki koriste kao terapeutici, dok su drugi u fazi prekliničkih ili kliničkih ispitivanja, kao i način na koji neki od njih ispoljavaju svoj efekat.

Najpoznatiji klinički korišćeni kompetitivni inhibitori aromataze (AIs – engl. *Aromatase Inhibitors*) su Formestan i Egzemestan. Neki snažni steroidni AIs su dobijeni modifikacijom strukture ovih molekula ili drugih jedinjenja androstanske serije⁵⁰. Tako su sinteza i ispitivanje delovanja D-seko-nitrilnih steroida ukazali na to da otvaranje D prstena i povećana nezasićenost u prstenovima A i/ili B povećavaju antiaromataznu aktivnost androstanskih derivata (**Slika 2.8**, jedinjenja **XVI** i **XVII**). Uvođenje 4-feniltio grupe u prsten A i cijano grupe u prsten D doveli su takođe do toga da ovo jedinjenje sa nitril grupom na položaju 16 (**Slika 2.8**, jedinjenje **XVIII**) izuzetno dobro inhibira aromatazu. Nitrilna grupa u A prstenu, na položaju 2, takođe je dovela do značajne inhibicije aromataze (**Slika 2.8**, jedinjenje **XVIII**)⁵⁰.



Slika 2.8: XVI i XVII – D-seko 16-nitrilni steroidi - inhibitori aromataze. XVIII – A-modifikovani 16-nitrilni steroid - inhibitor aromataze. XIX – 2-Nitrilni androstanski derivat - reverzibilni inhibitor aromataze. Prema: Ahmad i sar. (2015.)⁵⁰.

Rezultati bioloških testova koje su uradili Penov Gaši i sar.⁵¹ ukazali su na to da u slučaju D-seko androstanskih derivata konjugacija u prstenovima A i/ili B uglavnom povećava inhibiciju aromataze (**Slika 2.9**).



Komponente	IC ₅₀ (μM)
XVI (4-en-3-on)	0,42
XXII (4,6-dien-3-on)	0,22
XX (5-en-3-ol)	5,45
XXI (1,4,6-trien-3-on)	16,84

Slika 2.9: D-seko androstanski derivati i *in vitro* inhibicija aromataze. Prema: Penov Gaši i sar. (2001.)⁵¹.

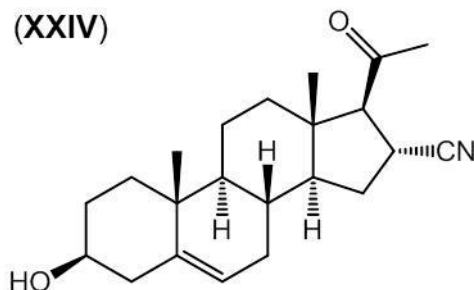
Ljudska 3β-hidroksisteroid dehidrogenaza/izomeraza tip 1 (3β-HSD1) je važan enzim u konverziji DHEA u estradiol u tumorima dojke i može biti meta u tretmanu raka dojke kod žena u postmenopauzi. Ljudska 3β-HSD2 učestvuje u proizvodnji kortizola i aldosterona. Trilostan (2α-cijano-4α,5α-epoksi-17β-ol-androstan-3-en, **Slika 2.10**, jedinjenje **XXII**) i epostan (**Slika 2.10**, jedinjenje **XXIII**) su kompetitivni inhibitori 3β-HSD1 i 3β-HSD2 u MCF-7 ćelijama u kojima je proliferacija indukovana sa DHEA⁵².



Slika 2.10: Trilostan (**XXII**) i epostan (**XXIII**) – inhibitori 3β-HSD. Prema: Tomas i sar. (2009.)⁵².

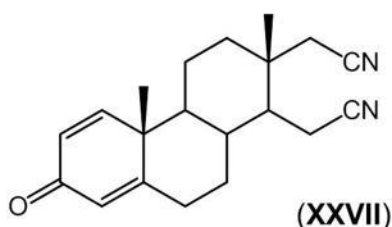
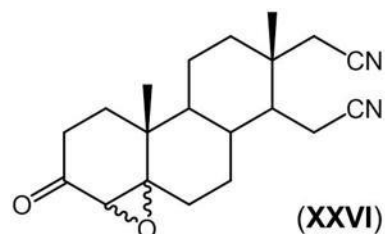
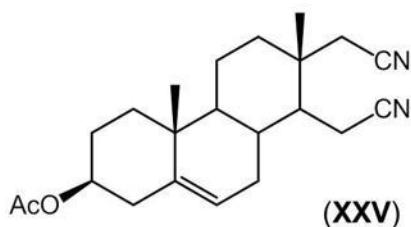
Intenzivno se radi i na razvoju inhibitora estrogen sulfataze, kao agensa za hemiopreveniru i hemioterapiju estrogen-zavisnog karcinoma dojke. Zu i saradnici⁵³ su pokazali da je pregnenolon 16α-karbonitril (PCN – **Slika 2.11**) potentni inhibitor mikrozomalne estrogen-3-

sulfataze jetre pacova i humane placente. Zanimljivo je to da analozi PCN bez 16 α -nitril grupe pokazuju veoma slab inhibitorski efekat, što ukazuje na značaj prisutne nitril grupe za selektivno vezivanje PCN za aktivno mesto enzima⁵³.



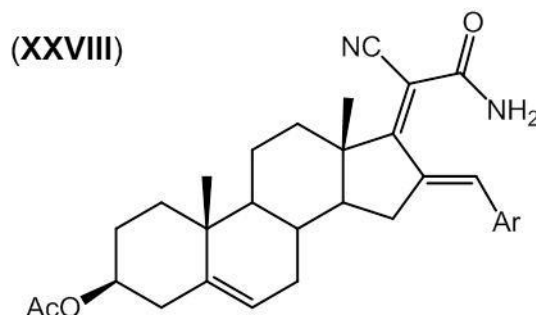
Slika 2.11: Pregnenolon 16 α -karbonitril - inhibitor estrogen sulfataze. Prema: Zhu i sar. (2000.)⁵³.

U *in vitro* antiproliferativnoj studiji Nikolić i sar. (2015.)³¹ pokazano je da su steroidni 16,17-seko-16,17a-dinitrili (**Slika 2.12**) ispoljili značajnu citotoksičnu aktivnost na ćelije karcinoma reproduktivnih tkiva, a molekularnim dokingom je predviđeno da bi se oni mogu vezati sa visokim afinitetom za hormonske receptore: estrogeni receptor α (ER α) i androgeni receptor (AR), što bi u velikoj meri bilo omogućeno fleksibilnošću D-seko sistema i prisustvom nitrilnih grupa³¹.



Slika 2.12: Jedinjenja **XXV**, **XXVI** i **XXVII** – Steroidni 16,17-seko-16,17a-dinitrili koji imaju afinitet ka ER α i AR. Prema: Nikolić i sar. (2015.)³¹.

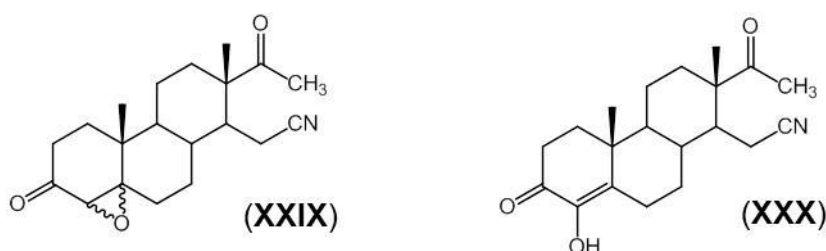
Yu i sar.³⁶ su sintetisali seriju steroidnih 21-nitril D-supstituisanih 17-dienamida (**Slika 2.13**) i procenili njihovu citotoksičnost prema ćelijskim linijama humanih karcinoma *in vitro* testovima.



Slika 2.13: Steroidni 21-nitril D-supstituisani 17-dienamidi. Preuzeto iz: Yu i sar. (2013.)³⁶.

Testirana jedinjenja su pokazala umerenu ili jaku citotoksičnu aktivnost. Protočno-citometrijska analiza je pokazala da najpotentnije jedinjenje (sa 4-hlorofenil grupom kao Ar) izaziva ranu ćelijsku apoptozu i zastoj ćelijskog ciklusa u G2/M fazi tretiranih MGC-803 ćelija gastričnog kancera. Jedinjenje je izazvalo nakupljanje ćelija u G2/M fazi na dozno-zavisani način, uz istovremeno smanjenje broja ćelija u drugim fazama ćelijskog ciklusa³⁶.

Sakač i saradnici (2008.)²⁶ su ispitivali antiproliferativni efekat A-supstituisanih D-seko 16-nitrila androstana (**Slika 2.14**) na ćelije kancera. Rezultati *in vitro* testova ukazali su na značajnu citotoksičnost 16,17-seko-4-en-3-on derivata **XVII** prema PC-3 ćelijama i umerenu citotoksičnost ostalih jedinjenja prema svim ćelijskim linijama nakon 48 h tretmana. Jedinjenje **XVII** takođe predstavlja relativno dobar inhibitor aromataze²⁶.



Komponente	IC ₅₀ (μM)			
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	MRC-5
XVII	54,8	27,2	0,62	>100
XXIX	66,7	30,2	25,9	>100
XXX	27,8	40,0	>100	>100
Formestan	>100	55,5	48,4	>100

Slika 2.14: Androstanski A-supstituisani D-seko 16-nitrili koji su se pokazali kao antiproliferativni agensi i inhibitori aromataze. U tabeli je data *in vitro* citotoksičnost jedinjenja **XVII**, **XXIX**, **XXX** i Formestana prema ispitivanim ćelijskim linijama. Prema: Sakač i sar. (2008.)²⁶.

2.2.4. Genotoksičnost steroida

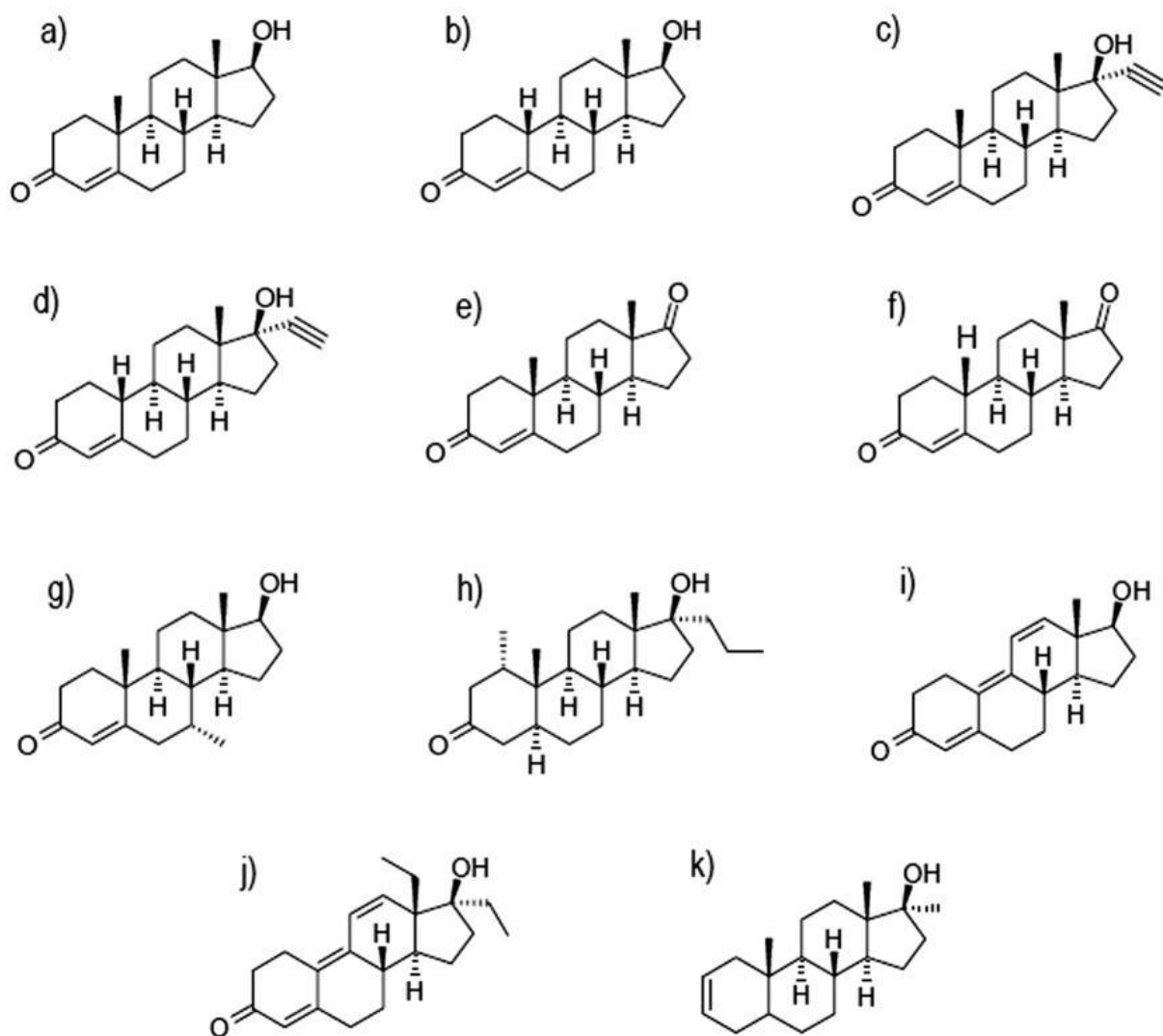
Genotoksikološka istraživanja se uglavnom sprovode posle ispitivanja citotoksičnosti novosintetisanih jedinjenja *in vitro* i *in vivo*, jer je to obavezna faza na putu razvoja sintetisanog ili jedinjenja izolovanog iz prirodnih izvora od sinteze do gotovog leka, spremnog za kliničku upotrebu. Genotoksičnost se može ispitivati i za prirodne proizvode, odnosno jedinjenja koja su prirodno i fiziološki prisutna u organizmu. Mogu se ispitivati pojedinačna jedinjenja ili njihove kombinacije sa prirodnim ili sintetičkim jedinjenjima u različitim fiziološkim i metaboličkim uslovima. Ispitivanje kombinacija preparata se sprovodi radi utvrđivanja eventualnih sinergističkih ili antagonističkih odnosa, ispitivanja protektivnog efekta, povećanja efikasnosti lekova i dr. Tako se u novijoj naučnoj literaturi mogu pronaći mnogi primeri proučavanja genotoksičnosti steroidnih jedinjenja.

Moguća genotoksičnost steroida predmet je mnogih istraživanja. Josten i saradnici ⁵⁴ su ispitivali genotoksičnost steroidnih hormona i ukazali na činjenicu da ova jedinjenja imaju široku upotrebu u medicini, ali da se o njihovim sporednim efektima ne zna dovoljno. Možda genotoksična aktivnost steroida predmet je mnogih istraživanja. Prirodni estrogene – estradiol, estron i estriol generalno su negativni na set standardnih genotoksikoloških testova, ali dobijeno je i nekoliko pozitivnih rezultata kada su ispitivani dodatni genotoksični aspekti. Genotoksična aktivnost 4-hidroksi metabolita estradiola i estrona je dobro proučena. Genotoksičnost sintetičkih estranskih derivata je takođe proučavana. Ciproteron acetat i neki od njegovih analoga imaju posebno mesto u grupi progestina i njihov genotoksični potencijal je takođe ispitan. Ostali progestini su primenom rutinskih testova dali negativne rezultate. Anti-glukokortikoidi, antiprogestini, kortikosteroidi, androgeni, steroidni anabolici i antiandrogeni su, kako se može zaključiti na osnovu ovih ispitivanja, lišeni genotoksičnih aktivnosti. Genotoksični potencijal estradiola, estrona i ciproteron acetata i njegovih analoga je takav da ne igra nikakvu ulogu u normalnim fiziološkim i terapijskim uslovima. Metabolički uslovi koji su potrebni za formiranje DNK-reaktivnih metabolita i kiseoničnih radikala verovatno ne postoje u ljudskom organizmu, što podržavaju onkološki epidemiološki podaci. Autori su takođe razmatrali važnost kriterijuma za izučavanje dozno-zavisnih odnosa kod genotoksikoloških podataka i njihovu upotrebu kod procene rizika.

S druge strane, Stoper i saradnici ⁵⁵ su proučavali aktuelnu naučnu literaturu u vezi genotoksičnosti i apoptotskog efekta fitoestrogena. Oni su istakli da, iako su fitohormoni veoma popularni kao alternativna medicina za mnoge bolesti, posebno kod žena koje ulaze u menopauzu i koje brinu o nuspojavama hormonske supstitucione terapije, nepovoljni efekti po zdravlje često se ignorišu. Genistein, kumestrol, kvercetin i resveratrol, kao i zearalenon (mikotoksin-ksenoestrogen) su pokazali genotoksični efekat u *in vitro* sistemima. Ostali

fitoestrogeni kao lignani, izoflavoni daidzein i glicetein, antocijanidini i flavonolfisetin su pokazali slabu genotoksičnost ili njeno odsustvo. Međutim, neki metaboliti daidzeina su ispoljili genotoksični efekat *in vitro*. Praktično svi fitoestrogeni su imali pro-apoptotsko dejstvo u pojedinim ćelijskim sistemima.

Dorn ⁵⁶ je u jednoj opsežnoj studiji ispitivala hromozomalnu genotoksičnost steroidnih hormona i njihovih derivata, vezano za razvoj lekova (Slika 2.15). Ona je u svojoj studiji ispitivala odnos između svojstava molekula i njihove genotoksičnosti. Polazeći od aktuelne strategije ispitivanja genotoksičnosti u procesu razvoja lekova predložila je reviziju te strategije i dala niz preporuka i pristupa razmatranju pojedinačnih pozitivnih rezultata genotoksikoloških testova.

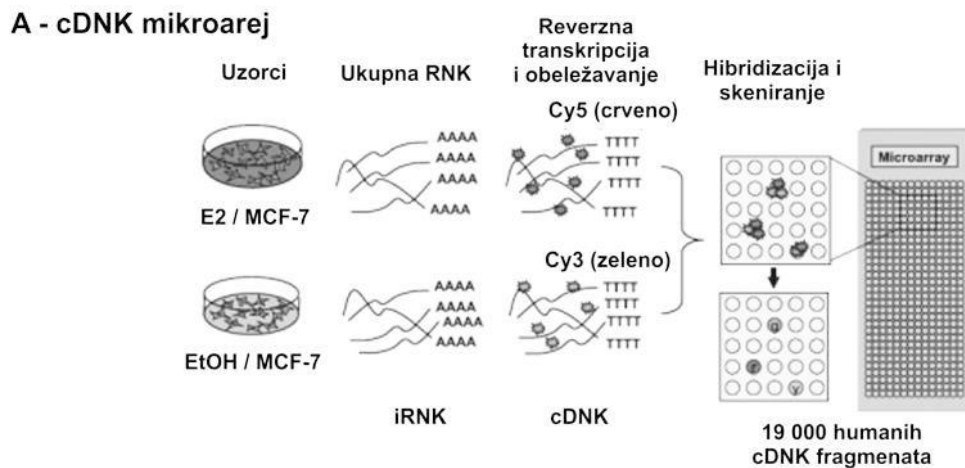


Slika 2.15: Strukture steroida koje je ispitivala Dorn (2007.)⁵⁶.

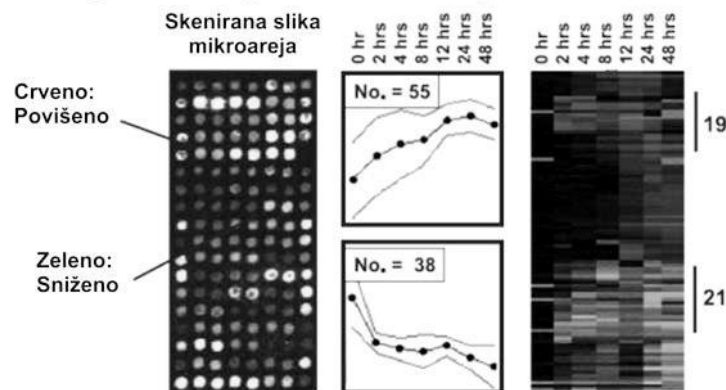
2.2.5.1. *Skrining endokrinih disruptora pomoću DNK mikromatrica*

Primena DNK mikroarej tehnologije za skrining supstanci koje su potencijalni endokrini disruptori (EDC - *Endocrine-Disrupting Compounds*) ima ogroman potencijal⁵⁸. DNK mikromatrica pružaju uvid u transkripcionu aktivnost uzoraka tkiva, pokazujući koji su geni u ćeliji aktivno eksprimirani u datoj vremenskoj tački. Kombinovanje ove tehnologije sa humanim ćelijskim linijama održavanim *in vitro*, trebalo bi da omogući brze i jasne testove za identifikovanje EDC posmatranjem promena u obrascu ekspresije gena kao odgovor na izlaganje.

Fransis i saradnici⁵⁸ su uradili studiju o mogućnosti korišćenja DNK mikromatrica za skrining EDC. Mikroareji omogućuju transkriptima informacione RNK (iRNK, eng. messenger RNA, *mRNA*) od dve različite ćelijske populacije da se međusobno uporede. RNK se izoluje iz dve ćelijske populacije i konvertuje u komplementarnu DNK (cDNA) i to tako da inkorporira delove fluorescentne boje u nukleotidni lanac. Dve boje su korišćene u ovoj studiji: Cyanine 3 (Cy3) i Cyanine 5 (Cy5), a svaka populacija iRNK je obeležena različitom bojom. Kada se jedan uzorak iRNK obeleži sa Cy3, a drugi sa Cy5, uzorci se spajaju i hibridizuju na mikromatricu, na mesta gde postoji odgovarajuća sekvenca, obeležavajući tako ta mesta sa Cy3 ili Cy5. Preparat se tada skenira konfokalnim mikroskopom i dobija se slika za obe fluorescencije. Svaka slika predstavlja transkripte iRNK prisutne u izvornim ćelijskim populacijama u vreme ekstrakcije. Poređenjem ova dva profila, svaka genska tačka može biti evaluirana na osnovu odnosa intenziteta signala dva markera. Približno jednaka vrednost odnosa markera za neki gen ukazuje na sličnu količinu transkripta u obe populacije. Nejednak odnos govori o tome da je određeni genski transkript više zastupljen u nekoj od populacija. Pošto promene u nivou iRNK ukazuju na promene u stopi transkripcije tog gena, DNK mikromatrica otkrivaju koji geni učestvuju u transkripciji, a koji su represirani. Mikromatrica korišćene u navedenoj studiji sačinjene su od kopija delova ekspresiranih sekvenci (cDNA fragmenti) od preko 19 000 odvojenih humanih gena imobilisanih na površini stakla mikroskopskog preparata pomoću robotizovanog printera. Autori su izabrali imortalizovane humane ćelijske linije (uključujući linije karcinoma dojke T-47D i MCF-7, koje ekspresuju estrogene receptore) kao test sistem iz koga su izolovali iRNK. Ove ćelijske linije su dobro izučene, lako se održavaju i ekspresuju hormonske receptore, uključujući estrogenske i androgenske receptore. Procedura za determinaciju obrasca ekspresije gena nakon izlaganja jedinjenjima prikazana je na **Slici 2.17-A**.



B - Bojenje mikroareja i analiza podataka - E2 odgovor



Slika 2.17: A – Prikaz DNK mikroarej metodologije za detektovanje gena koji su pod uticajem estrogena. Prvi korak: kultivacija ćelija sa fetalnim goveđim serumom iz koga su odstranjeni svi hormoni, nekoliko dana pre izlaganja. Drugi korak: Izlaganje jedne polovine ćelijske populacije estradiolu (dodat kao etanolni rastvor), a druge čistom rastvaraču (etanolu). Treći korak: Izolovanje ukupne RNK iz tretiranih i netretiranih ćelija. Četvrti korak: Izgradnja cDNK od iRNK pomoću reverzne transkriptaze, uz istovremenu ugradnju fluorescentne boje (Cy-3 ili Cy-5). Peti korak: Mešanje cDNK uzoraka i hibridizacija na matrici. Šesti korak: Analiziranje podataka da bi se odredio prosečan intenzitet fluorescencije u svakoj tački (tj. genu) i za svaku boju. **B** – Levi panel: Skenirana slika mikroareja otkriva više ili manje aktivne gene (odnos srednjih vrednosti intenziteta signala boja). Srednji panel: srednja vrednost intenziteta aktivnih ili neaktivnih gena koji rano reaguju na izlaganje estradiolu (npr. u prvih 4 h). Desni panel: Klaster analiza mikroarej podataka za nekoliko vremenskih tačaka. Svaki red predstavlja jedan gen ili tačku na matrici, a svaka kolona rezultate jednog mikroarej eksperimenta. Konzistentno aktivni ili neaktivni geni su jasno uočljivi po boji i intenzitetu na klaster dijagramu. Preuzeto iz: *Francois i sar. (2003.)*⁵⁸.

Autori su identifikovali ključni set aktiviranih i inaktiviranih gena kao odgovor na izlaganje estradiolu (E2) na MCF-7 ćelijama. Od posebnog interesa za detekciju primarnog efekta E2 na ćelije su bili geni koji su najranije zahvaćeni (npr. u roku od 2 – 4 sata) nakon izlaganja. Za ove najranije efekte se očekuje da budu reproducibilniji. Oko 55 gena je pokazalo ranu povećanu ekspresiju, a 38 gena smanjenu ekspresiju u MCF-7 ćelijama nakon izlaganja estradiolu (**Slika 2.17-B**). Za neke od ovih gena je potvrđeno da su regulisani estradiolom, najčešće potvrđivanjem

odgovora pomoću RT-PCR (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) testova sa prajmerima dizajniranim za fragmente cDNA detektovane mikroarej analizom. Ovo nezavisno potvrđivanje služi kao interna kontrola mikroarej rezultata. Rad se nastavlja do uspostavljanja sličnog obrasca ekspresije i za ostale hormone i suspektne endokrine disruptore.

Čim se uspostavi obrazac genske ekspresije za veći broj hormona, moći će se konstruisati posebna mikromatrica od identifikovanih hormon-reagujućih gena, što će učiniti lakšim rukovanje i analizu dobijenih podataka. Očekuje se da takva mikromatrica sadrži 500-1000 gena. Postoji nekoliko prednosti ovih testova u odnosu na ostale *in vitro* tehnike. DNK mikromatrice pružaju širok pogled na gensku ekspresiju u ćeliji, za razliku od rezultata odgovora pojedinačnih gena merenih drugim testovima kao što su testovi sa reporter-genima. Kao rezultat toga, DNK mikroareji mogu dati bolji uvid u regulatorne mehanizme koji stoje iza endokrinih poremećaja. Dalje, rezultati ovakvih testova mogu dovesti do otkrića novih veza u provođenju signala, kao što je za gene sa do tada nepoznatom funkcijom utvrđeno da se regulišu specifičnim endokrinim signalnim molekulima. Konačno, dok ostali *in vitro* testovi ispituju jedino sposobnost stimulacije jednog specifičnog hormonskog receptora, EDC testovima baziranim na mikroarejima može se uraditi skrining nekoliko različitih tipova interakcija EDC i receptora jednim jednim testiranjem.

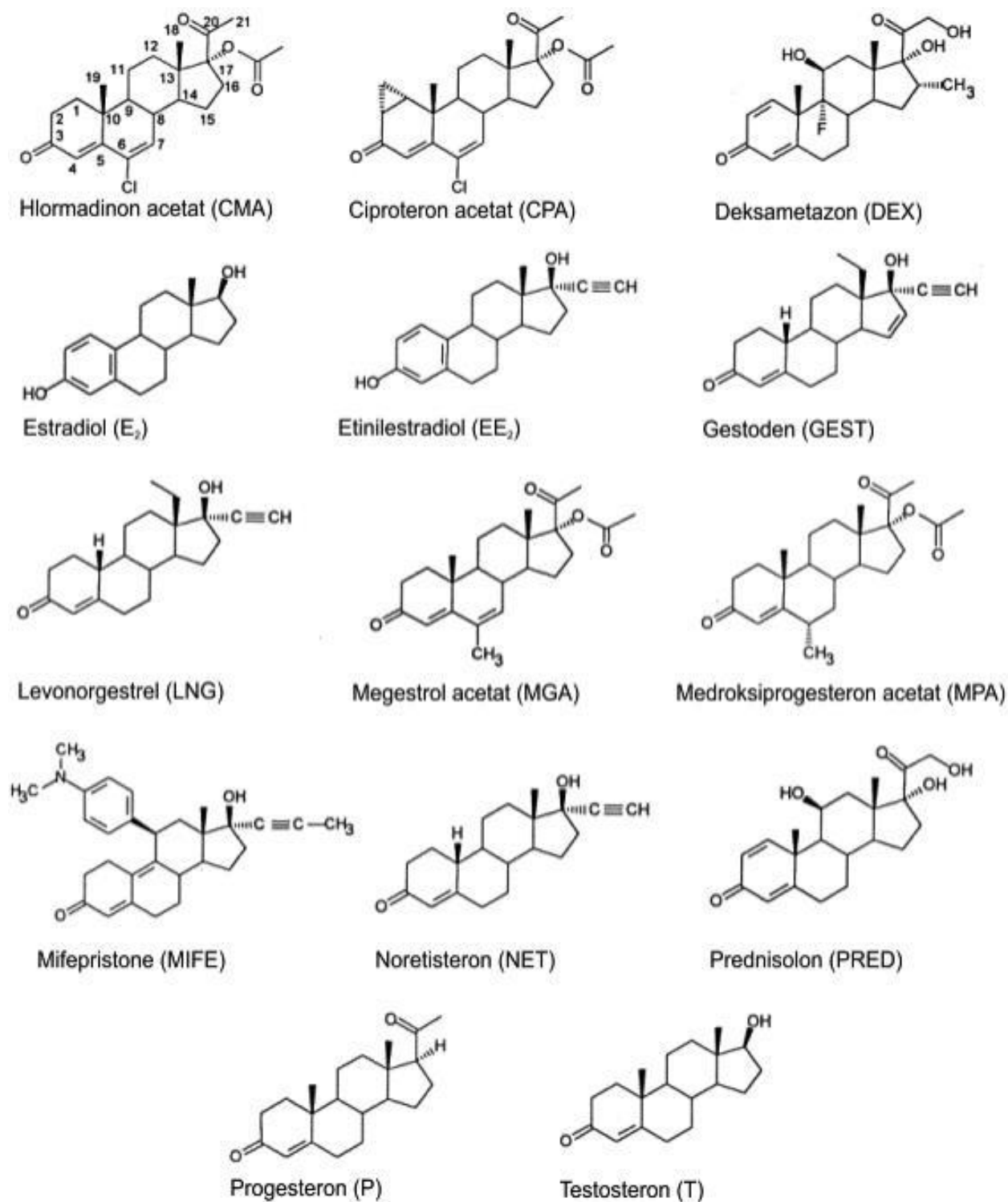
Svaka ćelija sintetiše više od jednog receptora za hormone i svaki receptor ima svoje sopstvene putanje prenošenja signala, kontrolišući tako ekspresiju za njega jedinstvenog skupa gena. Na osnovu toga, trebalo bi očekivati da svaki receptor ima jedinstveni profil ekspresije. Bilo bi moguće uporediti ekspresioni profil dobijen testom sa tipičnim profilom ekspresije za dati receptor i tako odrediti ne samo da li su endokrini disruptori prisutni, nego i kakvu vrstu aktivnosti pokazuju. Jedino teorijsko ograničenje za širinu spektra testa jeste broj različitih hormonskih receptora eksprimiranih u ćelijskoj liniji koja se koristi.

Mogućnost da se brzo izvrši skrining više tipova endokrinih poremećaja odjednom mogla bi ubrzati istraživanja i pomoći u odabiru odgovarajućih dodatnih *in vivo* testova. Čak bi bilo moguće rasčlaniti različite tipove mehanizama endokrinih poremećaja prisutnih u kompleksnim smešama endokrinih disruptora razdvajanjem dobijenih profila genske ekspresije u receptor-specifične podgrupe.

2.2.5.2. Ispitivanje fragmentacije i oštećenja DNK

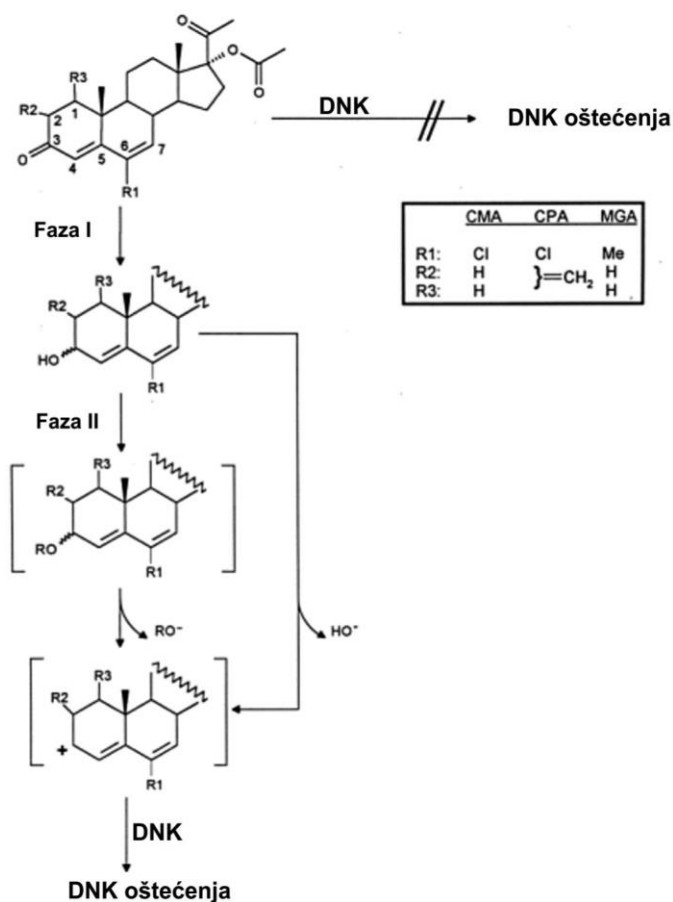
Feser i saradnici⁵⁹ su objavili istraživanje potencijala steroidnih hormona hlormadinon acetat (CMA), ciproteron acetat (CPA), deksametazon (DEX), estradiol (E2), etinilestradiol (EE2), gestoden (GEST), levonorgestrel (LNG), megestrol acetat (MGA), medroksi progesteron acetat (MPA), mifepriston (MIFE), noretisteron (NET), prednizolon (PRED), progesteron (P) i

testosteron (T) da stvaraju adukte sa DNK u jetri *in vitro* pomoću tehnike post-obeležavanja fosforom ^{32}P . Na **Slici 2.18** prikazana su jedinjenja ispitivana u toj studiji.



Slika 2.18: Strukture, nazivi i skraćenice generičkih naziva steroidnih hormona ispitivanih u studiji Fesera i saradnika (1998.)⁵⁹.

Sintetički steroidi CPA, CMA i MGA su proizveli oštećenja DNK u jetri svih životinja (**Slika 2.19**), a MPA samo kod nekih. Formiranje adukta sa DNK nije detektovano kod DEX, EE2, E2, GEST, LNG, MIFE, NET, PRED, P i T. Ukupni nivo oštećenja molekula DNK i obrasci oštećenja su bili različiti za svako ispitivano jedinjenje. Generalno, ukupni nivo oštećenja DNK opada sledećim redom: CPA>MGA>CMA>>MPA, dok je nivo oštećenja DNK individualan. Pri terapijskim koncentracijama od 1 mg/mL, koeficijent varijacije ukupnog oštećenja kretao se od 38% do 100%. Polno-specifična distribucija formiranja oštećenja DNK je detektovana jedino sa MPA. Adukti nastali sa MPA su predominantno nađeni u jetri ženskih jedinki.



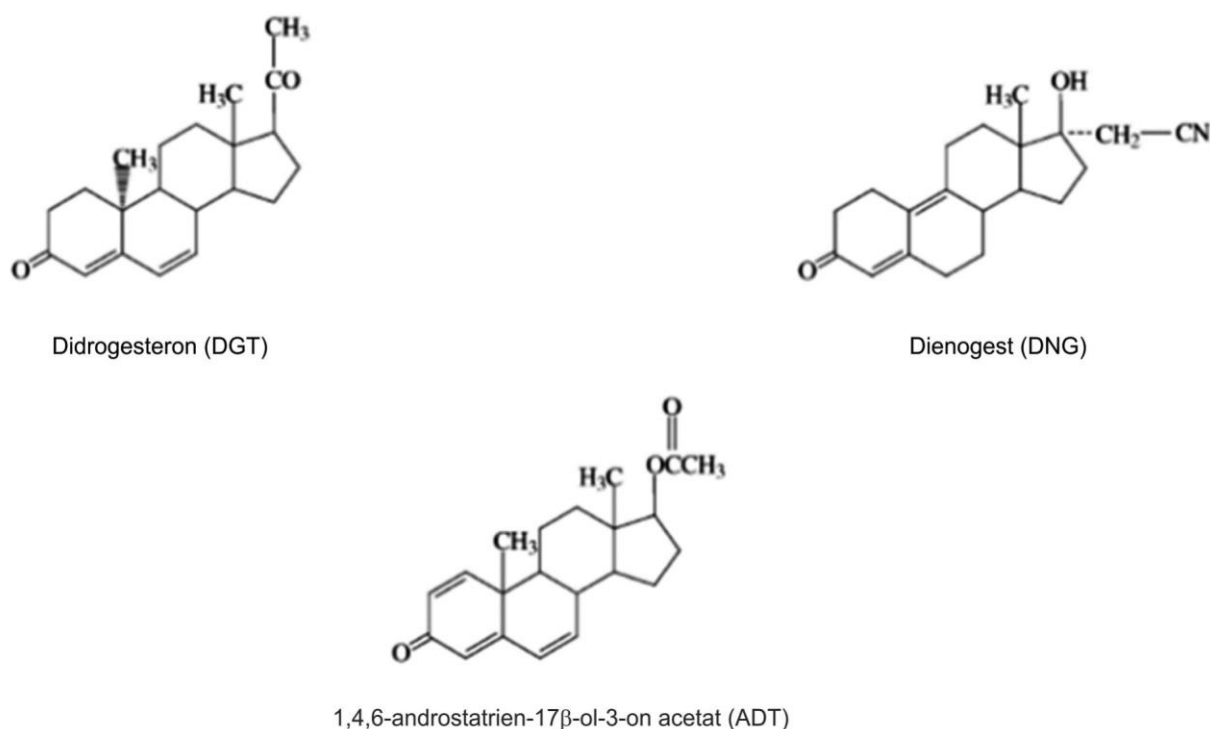
Slika 2.19: Predloženi mehanizam aktiviranja strukturalnih analoga CMA, CPA, MGA koji dovodi do formiranja oštećenja molekula DNK nakon redukcije 3-keto funkcije i konjugacije 3-hidroksi grupe koju su dali Feser i sar. (1998.)⁵⁹.

Upotreba sintetičkih steroida u hormonskoj terapiji je veoma rasprostranjena, bilo pojedinačno ili u kombinaciji. Povezanost između opšte upotrebe polnih steroidnih hormona i tumora jetre kod ljudi sugerisali su 1973. Baum i saradnici⁶⁰. Stoga je urađeno nekoliko „case-control“ studija koje se tiču tumorogenosti steroidnih hormona, ali ni jedna od njih nije ukazivala na jasnu vezu između upotrebe sintetičkih hormona i povećane incidencije tumora jetre⁵⁹. Na

osnovu ovih zapažanja dovedena je u pitanje biološka relevantnost formiranja ovih DNK adukata sa steroidnim hormonima. Ukratko, u datim uslovima testa, sposobnost stvaranja oštećenja DNK je ograničena samo na neke sintetičke steroide.

Matioli i saradnici ⁶¹ su ispitivali sintetičke progestine – ciproteron acetat (CPA), hlormadinon acetat (CMA), megestrol acetat (MGA) (**Slika 2.18**), koji su se pokazali kao relativno potentni genotoksični agensi.

U toj studiji, urađenoj da bi se bolje definisala veza između hemijske strukture i genotoksičnosti, jedinjenja Didrogesteron (DGT – sa dvostrukim vezama u pozicijama $\Delta 4,5$ i $\Delta 6,7$), Dienogest (DNG – sa dvostrukim vezama u pozicijama $\Delta 4,5$ i $\Delta 9,10$) i 1,4,6-androstatrien-17 β -ol-3-on acetat (ADT – sa dvostrukim vezama u pozicijama $\Delta 1,2$, $\Delta 4,5$ i $\Delta 6,7$), koji su prikazani na **Slici 2.20**, poređeni su sa CPA ($\Delta 4,5$ i $\Delta 6,7$) u sposobnosti da indukuju fragmentaciju molekula DNK i reparativnu sintezu DNK u primarnoj kulturi hepatocita pacova. Bočni nizovi ovih steroida takođe su se razlikovali.



Slika 2.20: Strukture sintetičkih progestina čiju su genotoksičnost ispitivali Matioli i sar. (2004.) ⁶¹.

U subtoksičnim koncentracijama, u rasponu od 10 do 90 μ M, svi steroidi su konzistentno indukovali dozno-zavisni porast fragmentacije DNK, koja je u svim slučajevima bila veća kod ženki nego kod mužjaka. Njihov potencijal za izazivanje oštećenja DNK opada po redosledu CPA > DNG > ADT > DGT. U istim eksperimentalnim uslovima, odgovori dobijeni testom

DNK reparativne sinteze su bili pozitivni ili neubedljivi u hepatocitima ženki pacova i konzistentno negativni u hepatocitima mužjaka pacova. U indukciji apoptotskih ćelija, ispitivanih u primarnim hepatocitima ženki pacova, CPA je bio aktivniji od ADT i DGT, a DNG je bio neaktivan.

Posmatrani kao celina, ovi rezultati sugerišu da genotoksični efekat specifičan za jetru, više izražen kod ženki nego kod mužjaka pacova, može biti uobičajeno zajedničko svojstvo steroida sa dve ili tri dvostruke veze. Rezultati studije su pokazali da je indukcija fragmentacije DNK u primarnoj kulturi hepatocita pacova, merena pomoću Komet eseja, detektovana u ćelijama svih životinja, za sve ispitivane steroide. Dakle, fragmentacija DNK / Komet esej u stanju je da da dokaz za pojavu umerene frekvencije lezija DNK u hepatocitima mužjaka pacova, dok DNK reparativni test daje negativne odgovore u tim istim hepatocitima. Ovo sugeriše da je Komet esej prikladniji za utvrđivanje genotoksične aktivnosti steroida slične strukture.

2.2.5.3. Genotoksični efekat steroida u slučaju Dišenove mišićne distrofije

Steroidi predstavljaju jedini farmakološki palijativni tretman za Dišenovu (*Duchenne*) mišićnu distrofiju. Međutim, oni imaju sporedne neželjene efekte i uprkos velikom broju objavljenih studija koje ukazuju na njihovu efikasnost, još uvek se ne koriste univerzalno. Razlog tome je, u najvećoj meri, nedostatak podataka u većini publikovanih naučnih radova o funkcionalnim posledicama i kvalitetu života pacijenata, pa su potrebne dodatne studije da bi se dobio odgovor na neke i dalje nejasne aspekte njihove uloge. Drugi važan aspekt steroidne terapije Dišenove distrofije je činjenica da nije poznat način delovanja steroida na distrofični mišić.

Muntoni i saradnici ⁶² su inicirali kolaborativnu studiju profilisanja gena pomoću DNK mikroarej metode na *mdx* miševima (organizmi bez ekspresije distrofina) tretiranim steroidima. cDNA mikroarej studije su urađene da bi se ispitala genska ekspresija skeletne muskulature *mdx* miševa tretiranih Prednizolonom tokom 1 i 6 nedelja. Preliminarni podaci za netretirane miševe sugerišu da je značajno različito gensko profilisanje mladih (starih 7 nedelja) u odnosu na odrasle (starih 12 nedelja) miševe. Šta više, veliki broj gena je pokazao značajne promene u ekspresiji na nivou iRNK pri tretmanu Prednizolonom. Geni koji su različito regulisani obuhvataju strukturne gene proteina (aktivirane steroidima), signalne gene (aktivirane ili deaktivirane steroidima) i gene uključene u imunološki odgovor organizma (deaktivirane steroidima).

Zaključno, ova studija je identifikovala izvestan broj gena različito regulisanih kod *mdx* miševa tretiranih steroidnim jedinjenjima. Rezultati studije navode na zaključak da promene u genima tretiranih životinja deluju tako da poboljšavaju snagu i funkciju distrofičnog mišića *mdx*

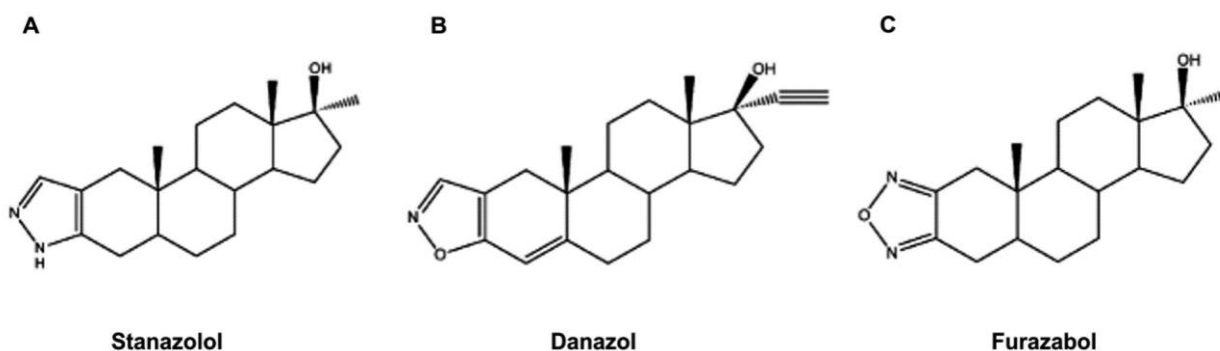
miša. Preliminarni rezultati takođe sugerišu da svi geni *mdx* miševa koji su različito regulisani hroničnom administracijom steroida, nisu tako regulisani kod kraćeg trajanja tretmana. Ovaj podatak je interesantan ako se uzme u obzir činjenica da su se i kontinuirani i isprekidani tretman steroidima pokazali kao povoljni u usporavanju progresije bolesti kod Dišenove distrofije. Preliminarni rezultati koji su pokazali razlike u profilisanju gena između mladih i odraslih jedinki podržava koncept da je mišićna distrofija dinamičan proces u kome različiti procesi mogu igrati različite uloge u različitim stadijumima bolesti, pa bi ispitivanje ovakvog obrasca ekspresije gena moglo da pomogne u razumevanju mehanizma delovanja kortikosteroida na progresiju bolesti kod Dišenove mišićne distrofije i razvijanju novih terapijskih pristupa ⁶².

2.2.5.4. Ispitivanje anaboličkih androgenih heterocikličnih steroida

U mnogim studijama pokušana je promena nukleofilnog okruženja steroidnog jezgra dodavanjem prstena ili supstituenata sa heterocikličnim atomima. Neka jedinjenja ovog tipa heterocikličnih steroida, sa pirazolskim, izoksazolskim ili furazanskim prstenom u $\Delta_{2,3}$ poziciji ispoljila su interesantnu i prilično neočekivanu endokrinološku aktivnost ⁶³.

2.2.5.4.1. Steroidi sa pirazolskim prstenom

Stanozolol (**Slika 2.21-A**) je tipičan primer ove klase jedinjenja. Sintetisan je 1961. i postao je prvi član serije anabolički aktivnih steroida koji imaju heterociklični prsten kondenzovan sa A prstenom steroidnog jezgra. Klinički, ovo jedinjenje je korišćeno u slučajevima osteoporoze i deficijencije u sintezi proteina.



Slika 2.21: Strukture anaboličkih androgenih heterocikličnih steroida: Stanozolola (**A**), Danazola (**B**) i Furazabola (**C**). Preuzeto iz: *Fragkaki i sar.* (2009.) ⁶³.

Neznatne modifikacije molekula stanozolola kao što su uvođenje dvostrukih veza imali su veliki efekat na opšti obrazac aktivnosti, tako da derivat sa $\Delta_{4,5}$ dvostrukom vezom ne podstiče

retenciju azota iako je miotrofan, slabo androgen i estrogen. Derivati sa dve dvostruke veze u pozicijama $\Delta_{4,5}$ i $\Delta_{6,7}$ su bili tipično estrogene bez anaboličke ili androgene aktivnosti.

Serijski androst-4-eno[3,2-c]pirazola i androsta-4,6-dieno[3,2-c]pirazola imala je odnos anaboličkog prema androgenom takav da se mogao porediti sa njihovim zasićenim analogima iz serije androstano[3,2-c]pirazola, što znači visok odnos za niže članove serije i rapidno smanjenje aktivnosti za sve iznad 17α -etil. I anaboličke i androgene aktivnosti naglo opadaju kod 17α -alkil- 17β -hidroksi-androstano[3,2-c]pirazola kada je 17α -alkil grupa veća od etil grupe, što više ukazuje na ozbiljna ograničenja kod uklapanja u mesto ćelijskog receptora kada je prisutan [3,2-c]pirazolov prsten. N-metilovanje i acilovanje pirazolovog prstena nije imalo uticaja na odnos anaboličkih i androgenih aktivnosti.

Još više je upadljiv efekat [3,2-c]pirazolnog segmenta na endokrinološku aktivnost, uočen kada je izvršena supstitucija u steroidnom jezgri molekula androstano- i androst-4-eno[3,2-c]pirazola kao što je uvođenje 6α -metil supstituenta ili 9α -fluoro- 11β -hidroksi grupa, kada su oba jedinjenja bila manje aktivna androgeno i anabolički od početnog jedinjenja, 17β -hidroksi- 17α -metilandrost-4-eno[3,2-c]pirazola. Sličan pad u posmatranim androgenim i anaboličkim aktivnostima primećen je kod 4-metilacije i kod 19-nor-steroidnih[3,2-c]pirazola⁶³.

2.2.5.4.2. Steroidi sa izoksazolnim prstenom

Danazol (**Slika 2.22-B**) je sintetički anabolički steroid koji sadrži izoksazolni prsten. Ovo jedinjenje je izoksazolni derivat 17α -metiltestosterona sa slabom androgenom aktivnošću i bez estrogenog i progestagenog dejstva. U kliničkoj upotrebi danazol se primenjuje za lečenje endometriozе. Danazol inhibira ovarijalnu steroidogenezu, što rezultuje smanjenom sekrecijom estradiola i može, takođe, povećati produkciju androgena.

U pogledu anaboličkih/androgenih svojstava, androstanoizoksazoli ispoljavaju obrazac aktivnosti sličan onom koji je uočen kod njihovih odgovarajućih androstano[3,2-c]pirazola. Najinteresantniji član iz serije izoksazola u smislu razdvajanja anaboličke i androgene aktivnosti je 17β -hidroksi- 17α -metilandrostano[2,3-d]izoksazol. Ekstenzija serije izoksazola prema višim homolozima (npr. 17β -hidroksi- 17α -etilandrostano[2,3-d]izoksazola) rezultovala je opadanjem aktivnosti. 17β -Hidroksi- 17α -metilandrost-4,6-dieno[2,3-d]izoksazol i analogi sa većim 17α -alkil lancem rezultovali su opadanjem aktivnosti. 17α -Etil- 17β -hidroksiandrostano[2,3-d]izoksazol i 17α -etil- 17β -hidroksiandrost-4-eno-[2,3-d]izoksazol (danazol) pokazali su priličnu miotrofnu i androgenu aktivnost.

Efekat supstituenata u androstano-izoksazolnom molekulu na drugačijim mestima od pozicije 17 ispitana je sintezom raznih derivata koji sadrže 4,4-dimetil, 6α -metil i 3'-alkil supstituente. Svi derivati su pokazali minimalnu miotrofnu aktivnost. 19-Nor nezasićeni izoksazoli su nešto više miotrofni i androgeni nego 19-nor zasićeni⁶³.

2.2.5.4.3. Steroidi sa furazanskim prstenom

Furazabol (**Slika 2.22-C**), kao sintetički anabolički steroid, je predstavnik ove klase jedinjenja. On se razlikuje od stanozolola po tome što ima furazanski umesto pirazolskog prstena. Furazabol se koristi za snižavanje nivoa lipida i pogodan je za duže tretmane ateroskleroze i hiperholesterolemije. Modifikovani molekul furazabola sa $\Delta_{4,5}$ dvostrukom vezom pokazao je sličnu aktivnost kao početno jedinjenje, dok 4,5-nezasićeni derivat stanozolola praktično nije bio aktivan ⁶³.

2.3. Metode za ispitivanje biološke aktivnosti jedinjenja

Prilikom ispitivanja efekta prirodnih steroida ili njihovih derivata na biološke sisteme, najčešće se ispituju: anabolička, androgena ili estrogena aktivnost, inhibicija enzima i kompetitivni odnosi sa hormonima, zatim citotoksičnost, antiproliferativni i antitumorski efekat, potencijal indukovanja apoptoze i nekroze, kao i genotoksičnost tih jedinjenja.

Imajući u vidu predmet istraživanja ove doktorske teze, u ovom delu su opisane neke od najčešće korišćenih metoda ispitivanja citotoksičnosti, proapoptotskog dejstva i genotoksičnosti.

2.3.1. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro*

Terapijski pristup lečenju kancera, kao jednog od najčešćih uzroka smrtnosti ljudi, obuhvata hirurške zahvate i jonizujuće zračenje kao lokalne terapije, a citostatike i gensku terapiju za sistemsko lečenje malignih oboljenja. Postoji veliki broj različitih antitumorskih lekova – citostatka, koji u terapijskim dozama mogu zaustaviti rast malignih ćelija, ali često pri tome značajno oštećuju i zdrave ćelije u organizmu bolesnika ^{64, 65}. Nedostatak selektivnosti antitumorskih lekova koji danas postoje je njihov najveći nedostatak. Citostatik koji bi selektivno neutralisao ćelije kancera, ne oštećujući ostala tkiva, smatrao bi se idealnim ⁶⁶.

Prvi korak na dugačkom putu stvaranja novih lekova od potencijalnih antitumorskih agenasa su *in vitro* ispitivanja citotoksičnog (antiproliferativnog) delovanja prema različitim tumorskim ćelijskim linijama. Ovim testovima se na različitim tipovima ćelija mogu meriti: vijabilnost, stepen proliferacije, integritet ćelijske membrane, sinteza DNK i drugi parametri ćelijskog metabolizma ⁶⁷. Za procenu bioloških efekata se koriste različite metode, koje mogu biti kvalitativne i kvantitativne, a u najširoj upotrebi su: test za procenu ćelijske vijabilnosti ispitivanjem integriteta ćelijske membrane pomoću odbacivanja boje sa tripan plavim (DET), testovi sa tetrazolijumovim solima (MTT, XTT, MTS, WST i dr.) za evaluaciju ćelijskog

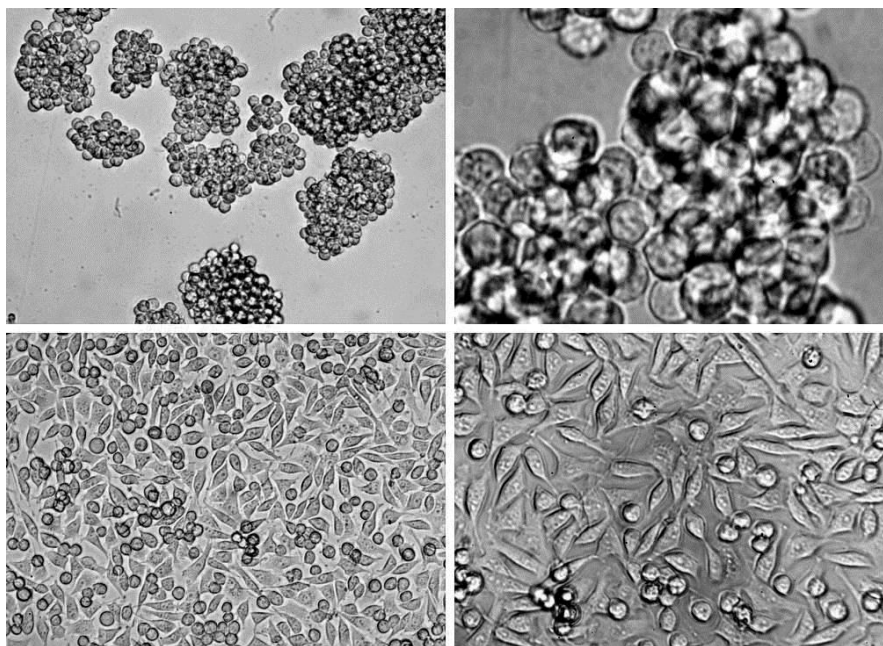
metabolizma (funkcije mitohondrija), kao i test sa sulforodaminom B (SRB test), kojim se, preko ukupnog sadržaja ćelijskih proteina, meri ćelijska proliferacija. Različita ćelijska oštećenja mogu nastati dejstvom ksenobiotika, kao i smrt ćelije. Cilj metoda koje se koriste za procenu antiproliferativnog efekta neke supstance je da objektivno izmere citotoksični (smanjenje ćelijske vijabilnosti) ili citostatski efekat (inhibicija normalne ćelijske funkcije bez obaveznog uticaja na vijabilnost). Kvantitativne metode su nespecifične i ne mogu objasniti mehanizam i reverzibilnost oštećenja ⁶⁸. Metodama koje su specifičnije (npr. testovi SRB i MTT) moguće je ispitati uticaj supstanci na metaboličke ili enzimske sisteme (pri čemu ne mora doći i do smrti ćelije) i često se primenjuju u proceni citotoksičnog i antiproliferativnog efekta.

2.3.1.1. Ćelijske linije

Gajenje (kultivisanje) ćelijskih linija u *in vitro* uslovima obuhvata održavanje i rast ćelija, uz očuvanje njihove građe i funkcije. Ćelijske kulture se danas koriste u istraživačkim biomedicinskim laboratorijama, a u upotrebi su duže od jednog veka ⁶⁹. Različite ćelijske linije, koje proliferišu u monosloju ili u suspenziji, koriste se u *in vitro* testovima citotoksičnosti i prilikom odabira ćelijskog sistema treba razmotriti njihove karakteristike i optimalne uslove za rast.

Ćelijske linije se dobijaju od primarnih ćelijskih kultura uspostavljenih direktno iz uzoraka tkiva pacijenata. Primarne kulture se teško mogu reprodukovati jer mnogi faktori (uzrast, hormonski status i dr.) utiču na vijabilnost i rast ćelija ⁶⁷. Iz tog razloga se od primarnih kultura različitim postupcima dobijaju trajne ćelijske linije, koje mogu biti diploidne, kontinuirane ili klonirane. Životni ciklus, npr. kulture humanih fibroblasta, može se podeliti u tri faze ⁷⁰. Prva (inicijalna) faza ima produženo vreme dupliranja sa velikim promenama u populaciji i rastu nakon prve i svake sledeće supkulture. U drugoj fazi, kultura postaje stabilnija i izdržljivija, sa smanjenim periodom udvajanja (eng. „*doubling time*“). Treća faza se odlikuje starenjem populacije, progresivnim produživanjem vremena dupliranja, degenerativnim procesima i završava smrću ćelija ⁷⁰.

Kontinuirane ćelijske linije tumora (**Slika 2.22**) su trajne linije dobijene od tumorskih ćelija, direktno ili transformacijom pomoću virusa, hemijskih mutagena ili zračenja, čime se dobija „besmrtna“ (imortalizovana) ćelijska linija. Ove ćelije su slične tumorskim i odlikuju se nekontrolisanom proliferacijom u kulturi zbog odsustva kontaktne inhibicije ⁶⁷. Maligno transformisana ćelijska linija može da raste kontinuirano u kulturi i da inicira formiranje tumora ubrizgavanjem u eksperimentalne životinje. Klonirane ćelijske linije su genetički homogene, jer se dobijaju od pojedinačnih ćelija. Danas je za *in vitro* istraživanja dostupan veliki broj kontinuiranih ćelijskih linija.



Slika 2.22: Izgled kultura ćelijskih linija. U gornjem redu: ćelije humane mijeloidne leukemije – K562 koje rastu plivajući u suspenziji, uvećanje 100× (levo), odnosno 400× (desno). U donjem redu: adherentne ćelijske linije adenokarcinoma dojke – MCF-7, uvećanje 100× (levo), odnosno 400× (desno).

Kontaktna inhibicija ograničava deobu ćelija kada one počinju da se dodiruju. Tada je u kulturi postignuta konfluencija ⁶⁷. Koncentracija ćelija je kritičan parametar za vijabilnost kulture. Zbog toga se ćelije moraju presađivati (pasažirati), da bi se redukovala gustina ćelija na optimalni nivo, uz dodavanje svežeg medijuma i seruma radi snabdevanja ćelija potrebnim nutrijentima. Smanjeno preuzimanje hranljivih materija iz medijuma može biti posledica smanjenja slobodne ćelijske površine kao rezultat većeg međućelijskog kontakata ⁷¹. Za svaku ćelijsku liniju se mora koristiti optimalni medijum za gajenje, saglasno njihovim specifičnostima proliferacije i nutricionim potrebama ⁷². Promene u sastavu medijuma tokom kultivacije minimalizuju se puferovanjem i obezbeđivanjem atmosfere sa CO₂ u inkubatorima, a isparavanje medijuma i stvaranje hipertoničnih rastvora sprečava se obezbeđivanjem visoke vlažnosti ⁶⁷.

2.3.1.2. Metode za ispitivanje citotoksičnosti i metaboličke aktivnosti ćelija

Kvantitativna ispitivanja imaju za prednost objektivnost merenja, ali i kvalitativni testovi mogu pružiti važne informacije za evaluaciju citotoksičnosti. Određivanje proliferacije i kvantifikacija broja ćelija se može uraditi različitim tehnikama: korišćenjem mikroskopa, hemocitometra ili elektronskog brojača. Kao parametar, najčešće se meri smanjenje broja ćelija usled inhibicije proliferacije ili pak lize ćelija. Brojanjem nativnih (nebojenih) ćelija teško je razlikovati mrtve od živih. Neke metode za procenu proliferacije zasnivaju se na razlici u

propusljivosti ćelijske membrane kod živih i mrtvih ćelija (metode ekskluzije/preuzimanja boje)^{73,74}. Za ispitivanje metaboličkih parametara ćelija koriste se biohemijske metode. One su objektivne i pogodne za kvantifikaciju.

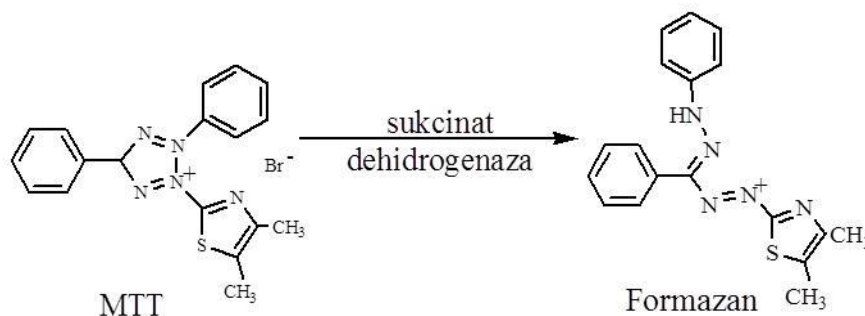
2.3.1.2.1. Test sa tripan-plavim (*Dye exclusion test, DET*)

Test odbacivanja boje Tripan plavo – DET (engl. *Trypan Blue Dye Exclusion Test*) se koristi za određivanje vijabilnosti ćelija. Ovaj test je brz i jednostavan, pogodan i za normalne i za tumorske ćelije i ne zahteva mnogo opreme. Zasniva se na činjenici da oštećenje ćelijske membrane omogućava ulazak boje u ćeliju⁷⁵. Neoštećene ćelije ne primaju i odbacuju boju, dok oštećene ćelije budu obojene jer nemaju ovaj zaštitni mehanizam. U mikroskopskoj komori za brojanje neoštećene ćelije se vide kao bezbojne, dok su oštećene obojene plavo. Postotak neobojenih ćelija je indeks ćelijske vijabilnosti (engl. *cell viability, CV*)⁷⁴. Očitavanje kod ovog testa je subjektivno, ali danas postoje savremeni automatizovani uređaji koji doprinose tačnosti merenja. Njime se može ispitivati toksičnost supstanci kao prvi korak u traženju potencijalnih antitumorskih lekova.

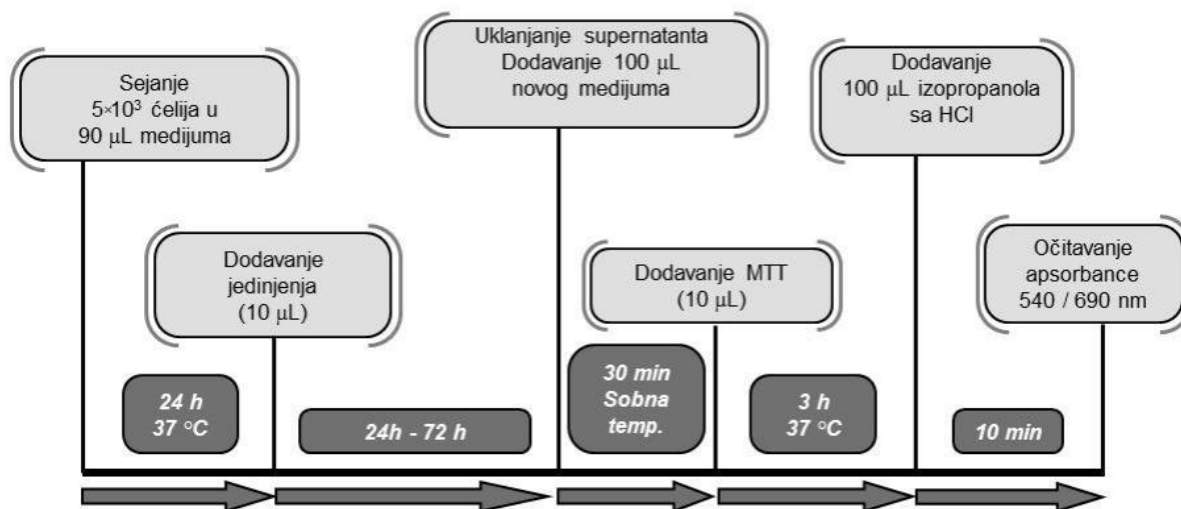
2.3.1.2.2. *MTT test ćelijske proliferacije*

MTT test se često primenjuje za ispitivanje citotoksičnog/antiproliferativnog efekta jedinjenja kao potencijalnih novih antitumorskih lekova^{68, 76}, ali i u drugim tipovima ispitivanja (enzimskim, histohemijskim, bakteriološkim)^{77 - 79}. Tetrazolijumove soli mogu da primaju elektrone od oksidovanih supstrata ili odgovarajućih koenzima (npr. NADH i NADPH) i redukuju se u obojeni produkt formazan.^{80 - 82}

Jedna od najvažnijih funkcija mitohondrija u ćelijama je proizvodnja dovoljne količine ATP-a (adenozin trifosfata). Tom prilikom se aktivno metabolišu piruvat, masne kiseline i aminokiseline, tako što se prevode u acetil CoA. On se u mitohondrijama uključuje u Krebsov ciklus, u kojem sukcesivnim delovanjem više enzima nastaju redukovani koenzimi oslobađajući se elektrona. Oni se uključuju u proces respiracije, što rezultuje proizvodnjom ATP-a. Sukcinat dehidrogenaza, jedan od enzima Krebsovog ciklusa, prevodi sukcinat u fumarat, a pri tom nastali par elektrona se koristi za proizvodnju novog molekula ATP. Jedinjenje 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolijum bromid (MTT) je supstanca svetlo žute boje koja takođe može biti supstrat sukcinat dehidrogenaze, a proizvod ove reakcije je tamno plavi pigment formazan. S obzirom na to da se ova konverzija događa samo ćelijama koje su metabolički aktivne, merenjem količine nastalog formazana moguće je proceniti broj živih ćelija. Na **Slici 2.23** prikazana je konverzija tetrazolijumove soli (MTT) u formazan, katalizovana sukcinat dehidrogenazom. Šema MTT testa dat je na **Slici 2.24**.



Slika 2.23: Metabolička transformacija MTT u formazan



Slika 2.24: Šematski prikaz toka kolorimetrijskog MTT testa.

Pošto formazan nije rastvorljiv u vodi, u MTT testu se kristali formazana moraju rastvoriti da bi se boja koja potiče od njih mogla kvantifikovati. MTT je hromofora slična MTS-u (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) i XTT-u (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboksanilid), pa daje sličnu boju i ispoljava iste redoks karakteristike kao oni, s tim da su proizvodi reakcije ove dve soli, formazali, rastvorni u vodi, pa MTS i XTT testovi imaju po jednu fazu manje. MTS i XTT su anjoni pri fiziološkom pH, dok je MTT katjon. Za potpuno razvijanje boje potrebno je 2 – 3 sata⁷⁸. Količina nastalog formazana kvantifikuje se merenjem apsorbance, koja je direktno proporcionalna broju živih ćelija.

2.3.1.3. Morfološki pokazatelji citotoksičnosti

Neke supstance mogu svojim toksičnim efektima dovesti do morfoloških promena na ćelijama, kao što su promene u veličini i obliku ćelije (piknoza ili gigantizam), promena u

citoplazmi, jedru, integritetu ćelijske membrane i dr. Ove promene mogu takođe da posluže u proceni citotoksičnosti⁶⁷.

Procesom **nekroze** vrši se liziranje ili degradacija mrtvih ćelija. U *in vitro* uslovima, nekroza se prepoznaje po bubrenju ćelije, rupturi membrane, kao i razaranju citoplazme i jedra.

Poseban vid ćelijske smrti je **apoptoza**, genetski regulisana – programirana ćelijska smrt, čije indukovanje danas predstavlja važan terapijski pristup u lečenju malignih bolesti. Za apoptozu su karakteristične morfološke promene, po kojima se ovaj vid ćelijske smrti razlikuje od nekroze. Iako je ćelija živog organizma izdvojena od okoline, ćelijska membrana omogućava komunikaciju između ćelija i učestvuje u složenom procesu transporta supstanci. Između dva sloja fosfolipida postoje membranski proteini, koji na površini formiraju pore. Neki od tih proteina služe kao receptori koji prenose signale i mogu predstavljati ciljna mesta selektivnog delovanja lekova⁸³. Celovitost, pa time i funkcionalnost ćelijske membrane, može da se prati na osnovu morfoloških promena. Tako se, na primer, bojenjem membranskih lipida, tačnije fosfatidil serinskih jedinki pomoću Aneksina V mogu prepoznati ćelije kojima je narušen integritet membrane, a one se mogu izbrojati protočnim citometrom⁸⁴.

2.3.2. Apoptoza – programirana ćelijska smrt

Apoptoza predstavlja složen, uređen i energetski zahtevan proces ćelijske smrti u kojem ćelija prolazi kroz različite fiziološke i morfološke promene dok ne nestane iz tkiva. Otkriće apoptoze je jedan od važnih događaja koji su unapredili biomedicinska istraživanja, naročito u onkologiji.

Kada se saznalo da smrt ćelije može predstavljati normalan fiziološki proces, da ćelija u njemu aktivno učestvuje, kao i zbog velikog broja faktora koji deluju po precizno određenom redosledu, uveden je termin „programirana ćelijska smrt“ koju su autori Ker, Vili i Kari nazvali „apoptoza“. Od tada su počela da se razlikuju dva načina smrti ćelija: apoptoza i nekroza^{85 – 88}. Tek kasnije se otkrilo da postoje i drugi načini kojima ćelija može da umre i da je važno dobro poznavati metode kojima se oni eksperimentalno mogu ustanoviti^{89, 90}. Stoga se danas navode i neki drugi vidovi smrti ćelije: apotoza, autofagija, nekroza, kornifikacija, anoikis, mitotička katastrofa i druge^{89, 91 – 94}. Za nekrozu i autofagiju su najčešće dovoljne morfološke metode ispitivanja, dok se za ispitivanje apoptoze, pored morfoloških, koriste biohemijske i molekularne metode. Nekroza, za razliku od apoptoze i autofagne smrti, nastupa usled narušavanja homeostaze ćelije. Ćelija u tom procesu ne učestvuje aktivno. Nekroptoza je poseban oblik programirane ćelijske smrti. Ovakva klasifikacija se ne može uvek egzaktno primeniti, jer su nekada istovremeno prisutne karakteristike različitih tipova ili njihove kombinacije.

Apoptoza se razlikuje od nekroze jer ćelija aktivno učestvuje u ovom procesu, odnosno, destrukcija ćelije se odvija „programirano“. Apoptoza je presudna za razvoj viševićijskih

organizama i neophodna je u embriogenezi⁹⁵⁻⁹⁹. Poremećaj regulacije apoptoze može dovesti do pojave različitih patoloških stanja, uključujući i maligne bolesti. Stoga je indukovanje apoptoze ćelija kancera jedan od najvažnijih terapijskih pristupa u lečenju maligniteta.

Apoptoza može da se kvantifikuje nekim biohemijskim metodama. Međutim, negativni rezultati biohemijskih parametara koji se određuju (npr. aktivnost enzima kaspaza) ne moraju uvek biti dokaz nepostojanja apoptoze, jer se ona može odvijati na više načina, od kojih neki mogu biti nezavisni od ispitivanih parametara (npr. kaspaza-nezavisna apoptoza)¹⁰⁰⁻¹⁰².

U procesu apoptoze događaju se karakteristične promene. Dolazi do smanjenja volumena ćelije, kondenzacije hromatina, stvaranja vakuola u citoplazmi i na kraju formiranja citoplazmatskih vezikula – apoptotskih telašaca¹⁰³⁻¹⁰⁵. Apoptotska telašca se uklanjaju fagocitozom, pa nema pojave inflamatorne reakcije u tkivu. Atributi apoptoze su i unakrsno povezivanje proteina, kao i fragmentacija molekula DNK. Takođe, događa se bubrenje ili „penušanje“ ćelijske membrane (eng. „*blebbing*“), a dolazi i do premeštanja molekula fosfatidilserina (PS) sa unutrašnje površine ćelijske membrane na spoljašnju¹⁰⁶.

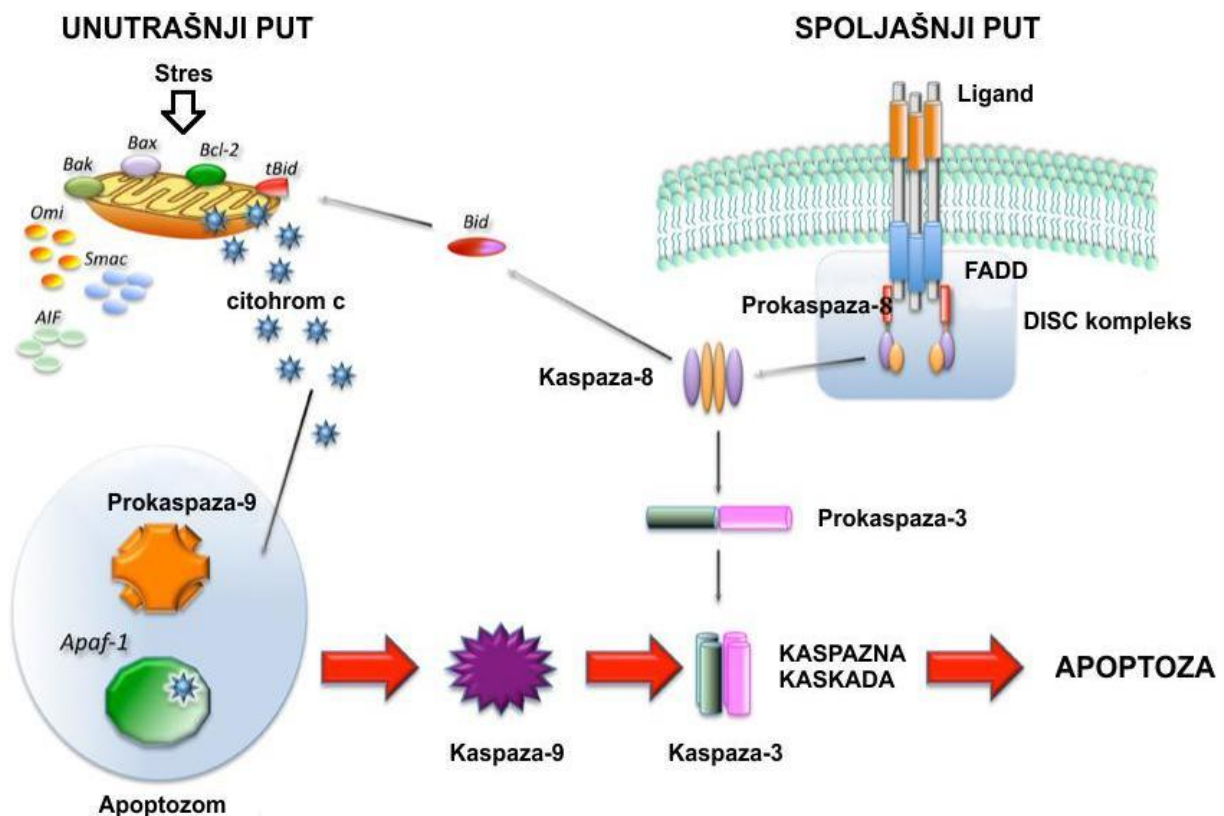
Apoptotsku ćelijsku smrt mogu pokrenuti određeni međućelijski signali i stanja organizma, ali se ona može indukovati i nedostatkom takvih signala¹⁰⁷. Apoptozu mogu da iniciraju i oštećenja DNK koja nastaju dejstvom jonizujućeg zračenja ili antitumorskih lekova¹⁰⁸, kao i reaktivne kiseonične vrste (ROS) koji menjaju permeabilnost membrana mitohondrija, a time i otpuštanje citohroma *c* (Cyt C)^{109,110}.

Mnogim tipovima ćelija je potreban kontakt sa površinom na kojoj rastu ili neprekidna stimulacija, a uloga faktora rasta, citokina i hormona je takođe veoma bitna¹⁰⁷. Naročito važnu ulogu imaju tzv. „receptori smrti“ na površini ćelije, za koji se vezuju: Fas ligand (FasL ili CD95 ligand), faktor nekroze tumora α (eng. „*Tumor Necrosis Factor*“ – TNF α), TRAIL (engl. „*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*“) i limfotoksin TNF β ^{12,111}.

Izvršenjem programa ćelijske smrti dolazi do aktiviranja citoplazmatskih cistein-aspartat specifičnih endoproteaza, poznatijih kao Kaspaze^{112,113}, koje su do aktivacije prisutne u citoplazmi kao proenzimi. Dvostrukim cepanjem i formiranjem tetramera kaspaze postižu punu proteolitičku aktivnost, a do toga može doći autokatalitički ili dejstvom druge kaspaze. Ovakva kaskada pojačava apoptotski signalni put i ubrzano dovodi do ćelijske smrti¹¹⁴. Signali koji mogu započeti ovaj proces mogu delovati intracelularno ili ekstracelularno. Aktivacijom „uzvodnih“ kaspaza na signalnom putu dolazi do proteolitičke aktivacije „efektornih“ kaspaza^{12,115-124}. Kada se jednom aktiviraju, efektorske kaspaze (Kaspaza-3, -6 i -7) razgrađuju veliki broj proteina neophodnih ćeliji: lamine, proteine jedarne ovojnice, citoskeleta, kao i enzime PARP (poli-ADP ribozu polimerazu) koji učestvuju u procesu reparacije DNK. Efektorske kaspaze takođe vrše fragmentaciju DNK i kondenzaciju hromatina, a sve to dovodi do nastanka

karakterističnih apoptotskih morfoloških promena¹². Kaspaza-3 je jedna od efektorskih kaspaza koja ima glavnu ulogu u apoptozi¹²⁵. Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu^{112, 126}.

Postoje spoljašnji i unutrašnji put aktivacije efektornih kaspaza (**Slika 2.25**). Spoljašnji put apoptoze ide preko receptora smrti, transmembranskih proteina iz familije TNF/Fas^{127 – 129}, čiji se unutarćelijski delovi nazivaju domeni smrti (DD – engl. „*Death Domain*“). Kada se Fas ligand (FasL) veže za Fas-receptor, dolazi do trimerizacije receptora i nakupljanja DD Fas receptora pomoću kompleksa proteina DISC (engl. „*Death-Inducing Signalling Complex*“). Preko adaptorskih molekula FADD (engl. „*Fas-Associated Death Domain Protein*“ koji imaju dva domena, aktivira se proenzim Prokaspaza-8^{12, 130}. Međusobnim vezivanjem domena smrti Fas receptora i molekula FADD, kao i regiona DED (engl. „*Death Effector Domain*“) molekula FADD za Prokaspazu-8 (ili Prokaspazu-10), dolazi do njenog cepanja i aktiviranja^{131 – 136}. Sa druge strane, vezivanjem TNF-liganda za TNFR1 receptor, aktivira se sličan proces, ovog puta sa adaptornim molekulima TRADD (engl. „*TNFR-Associated Death Domain*“), za čiji aktivirani deo receptora mogu da se vežu različiti proteini^{12, 137}. Ovaj signalni put može biti inhibiran proteinima iz familije FLIP (engl. *FasL Inhibitor Protein* – v-FLIP i c-FLIP). Ovi proteini se vežu za Fas-FADD kompleks kao homolozi Kaspaze-8 i inhibiraju aktivaciju enzima Prokaspaza-8^{115, 116, 118 – 120, 121, 138 – 140}.



Slika 2.25: Spoljašnji (A) i unutrašnji put apoptoze (B). Prema: Favaloro i sar. (2011.)⁵.

Unutrašnji apoptotski put (engl. „*Intrinsic Apoptotic Pathway*“), kao drugi signalni put, ide preko signala koji dovode do povećane propustljivosti membrane mitohondrija za molekule kao što je citohrom *c* (Cyt C). Izlaskom Cyt C iz mitohondrija i vezivanjem za citoplazmatski protein APAF-1 (engl. *Apoptosis Protease-Activating Factor-1*), dolazi do aktiviranja enzima Kaspaze-9^{12, 141 – 143}, koja zatim aktivira Kaspazu-3, čime započinje razgradnja ćelije. Signali za unutrašnji apoptotski put mogu poticati od raznih unutarćelijskih oštećenja ili stresa.

2.3.2.1. Apoptoza tumorskih ćelija

Značaj apoptoze u nastanku malignih bolesti shvaćen je zahvaljujući, dobrim delom, proučavanju mutacija na genu koji kodira protein *Bcl-2* (engl. *B-Cell Lymphoma*), a koji u zdravim ćelijama inhibira apoptozu. Zdrave ćelije imaju sposobnost oporavka i reparacije oštećenja, dok maligne ćelije preživljavaju čak i sa nakupljenim genetskim promenama. Apoptoza upravo i ima za cilj da spreči deobu i umnožavanje izmenjenih ćelija¹⁴⁴, a poremećaji u njoj regulaciji mogu da dovedu do mnogih bolesti, uključujući i maligne¹¹⁴. U zavisnosti od reakcije tumorskih ćelija na apoptozu može se pretpostaviti kakav će biti njihov odgovor na tretman zračenjem i hemioterapijom¹⁴⁵.

Reakcija ćelija na apoptozu zavisi od odnosa proapoptotskih i antiapoptotskih faktora¹⁴⁶. Proapoptotski proteini iz familije *Bcl-2* kao što su: BAD (engl. „*Bcl-2-Associated Death Promoter*“), BAX (engl. „*Bcl-2-Associated X Protein*“), BAK (engl. „*Bcl-2 Homologous Antagonist Killer*“) deluju kao detektori oštećenja ili stresa u citosolu. Antiapoptotski proteini kao: *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*¹⁴⁷ su locirani u mitohondrijama. Osim navedenih, mitohondrije sadrže i druge apoptotske faktore kao što su: AIF (engl. *Apoptosis-Inducing Factor*) koji, prelazeći u jedro, dovodi do cepanja DNK na fragmente i do kondenzacije hromatina¹⁴⁸, kao i Endonukleaza-G, koja utiče na internukleozomalno cepanje DNK^{149, 150}. AIF i Endonukleaza-G degradiraju molekule DNK nezavisno od kaspaza. Inhibitorni proteini apoptoze (IAP), koji direktno blokiraju kaspaze, takođe imaju ulogu u modulaciji apoptoze^{126, 151}. Sa apoptozom je povezan i tumor-supresorski gen *p53*, koji stimuliše produkciju proapoptotskih proteina ako oštećenja DNK ne mogu biti popravljena i time aktivira apoptozu. Gubitak funkcije ovog gena povećava akumuliranje oštećenja u ćeliji i može dovesti do transformacije ćelije^{144, 152 – 154}.

Promene na membranama mitohondrija mogu poslužiti kao indikator ranih apoptotskih promena¹⁵⁵. Apoptoza se može detektovati i kod pacijenata kod kojih je lečenjem došlo do spontane regresije tumora¹⁵⁶.

Do danas nema pravog odgovora na pitanje kojim mehanizmom se može postići selektivnost novih antitumorskih lekova kojima se podstiče apoptoza, odnosno, kako aktivirati proces

apoptoze samo kod tumorskih, a ne i zdravih ćelija, ali se na toj temi intenzivno radi u laboratorijama širom sveta ¹⁵⁷.

2.3.3. Ispitivanje genotoksičnosti

Cilj testiranja genotoksičnosti je otkrivanje različitih genetskih oštećenja i njihovo evaluiranje u kontekstu preživljavanja ćelija. Oštećenje genoma može se otkriti i meriti upotrebom nekoliko testova. U radu su opisane odabrane standardne citogenetske metode za ispitivanje genotoksičnosti koje se koriste za praćenje profesionalne, akcidentalne ili medicinske izloženosti ljudi ili za evaluaciju genotoksičnog efekta jedinjenja u prekliničkim testovima.

2.3.3.1. Hemijski faktori genotoksičnosti

Promene u genomu nastale tokom vremena kao posledica nasleđa, izlaganja mutagenima iz okoline i kao posledica životnih navika, ostaju u organizmu, akumuliraju se i prenose na potomstvo. Ove promene mogu da budu korisne, ali takođe mogu da dovedu do ozbiljnog narušavanja zdravlja, ubrzanog starenja i smrti nosioca. Savremena civilizacija je u svakodnevni život unela mnoga hemijska jedinjenja, ranije nepoznata živim bićima. Mnoga od tih jedinjenja, bilo direktnim unošenjem, prostom izloženošću, preko lanaca ishrane ili nekim drugim putevima, na kraju dospeju i u ljudsko telo. Ta jedinjenja nazivaju se ksenobioticima. Veliki broj jedinjenja se danas sintetiše sa ciljem da postanu novi lekovi. Ona su takođe strana živim organizmima, pa i čoveku. Nakon potvrđivanja njihove efikasnosti neophodno je, između ostalog, testirati i njihovu genotoksičnost.

Genomska nestabilnost (engl. „*genome instability*“) javlja se usled nagomilavanja genetskih promena, što može izmeniti normalnu funkciju ćelije. Ona je važna karakteristika tumora ¹⁵⁸. Genomsku nestabilnost, pored genskih mutacija, prate hromozomske preraspodele, aneuploidija, prekomerna ekspresija (amplifikacija) određenih gena, mikrosatelitska nestabilnost, a može biti i prva od nekoliko važnih faza u nastanku maligniteta ¹⁵⁹.

Ksenobiotici su hemijske supstancije kojima je čovek svakodnevno izložen i koje mogu izazvati različite promene genetskog materijala, dovodeći do transformacija ćelija usled mutacija. Farmaceutska sredstva su dugo predmet genotoksikoloških ispitivanja jer, pored korisnog, mogu imati i štetan (kancerogeni) efekat. Hemioterapeutici su jedna od genotoksikološki najispitivanijih grupa lekova jer su veoma toksični, mutageni i teratogeni. Hemijska jedinjenja mogu izazvati genetske promene direktno ili aktiviranjem unutarćelijskih metaboličkih puteva (indirektno, npr. stvaranjem azotnih i kiseoničnih radikala). Te promene mogu nastati hemijskim reakcijama alkilacije, arilacije i deaminacije, kao i interkalacijom i

inkorporacijom baznih analoga. Ako jedinjenja mogu da izazovu mutacije u genima, ona predstavljaju hemijske mutagene^{160–163}.

Hemijski kancerogeni izazivaju oštećenja DNK ili reparatorog sistema, dovodeći do mutacije gena i time maligne alteracije ćelija. Oni mogu biti genotoksični (ako deluju direktno), negenotoksični (ako dovode do epigenetskih promena) ili citotoksični (ako svojim indirektnim dejstvom iniciraju kancerogenezu)¹⁶⁴. Genotoksični kancerogeni su hemijski veoma reaktivni i u ćelijama se metabolišu do proizvoda koji se kovalentno vezuju za jedarnu ili mitohondrijalnu DNK¹⁶⁵. Nakupljanje mutacija (nastalih spontano ili izazvanih različitim spoljašnjim činiocima) u genima koji su zaduženi za rast ćelija predstavlja prvi korak u višestepenom procesu kancerogeneze, na koji takođe utiče i nepotpuna reparacija DNK¹⁶⁶. Latentni period hemijske kancerogeneze može trajati od nekoliko godina do nekoliko decenija, zavisno od vrste jedinjenja, koncentracije i dužine izlaganja, kao i individualnih karakteristika izložene osobe. Iako mehanizam transformacije normalne ćelije u malignu nije potpuno poznat do danas, zna se da delovanje mutagenih supstanci dovodi do oštećenja hromozoma koja rezultuju uvećavanjem, gubitkom ili relokacijom delova genoma¹⁶⁷. Kod razvića tumora najčešće genetske promene su translokacije, gubitak hromozoma i genske amplifikacije¹⁶⁸.

Terminom „biomarkeri“ su, po definiciji, obuhvaćeni parametri koji se koriste za merenje uticaja faktora iz spoljašnje sredine na biološki sistem¹⁶⁴. Biomarker nekog efekta predstavlja detektabilnu i merljivu promenu (biohemijsku, fiziološku ili drugu) u organizmu koja može poslužiti kao indikator narušene homeostaze¹⁶⁴ i ukazuje na efekte koje trpi biološki sistem pre razvoja bolesti¹⁶⁹. Biomarkeri genotoksičnosti se kvantifikuju različitim metodama u okviru genotoksikološkog ispitivanja.

2.3.3.1.1. Genotoksičnost hemioterapeutika

Hemioterapija predstavlja davanje lekova koji direktno uništavaju ili inhibiraju deobu ćelija kancera, sprečavajući tako njegov dalji rast. Pored opravdane upotrebe u lečenju malignih oboljenja, primena hemioterapije ima i niz negativnih aspekata. Štetan uticaj hemioterapije na zdrave ćelije je povezan sa brojnim neželjenim efektima, kao što su mučnina i povraćanje, gubitak apetita, gubitak kose, anemija, krvarenje, neuropatija, oštećenje bubrega itd.¹⁷⁰. Izlaganjem ćelija hemioterapiji dolazi i do različitih oštećenja genoma. Pored toga što direktno deluju na ćelije koje se dele, citostatici mogu povećati osetljivost ćelije uticajem na sistem za oporavak DNK. Dešava se da posle primarnog tretmana malignih tumora citostaticima nastanu sekundarni tumori. Jedan od razloga koji može dovesti do toga je hromozomska nestabilnost. Ćelije koje su trajno oštećene tretmanom, ali su još zadržale proliferativnu sposobnost, mogu se maligno transformisati, što može rezultirati pojavom novih, terapijom-izazvanih maligniteta.

2.3.3.2. Analiza hromozomskih aberacija

Biološka dozimetrija zasnovana na analizi dicentričnih hromozoma vrši se još od sredine šezdesetih godina prošlog veka i mnoga poboljšanja i unapređenja tokom decenija dovela su ovu tehniku do tačke da je analiza hromozomskih oštećenja postala rutinska komponenta radioloških programa zaštite u mnogim zemljama članicama Međunarodne agencije za atomsku energiju (IAEA) ^{171, 172}. Pored biodozimetrije, ovaj metod može da se primeni i za ispitivanje uticaja hemijskih materija. Tom prilikom se pažnja obraća na promene u vidu prekida hromozoma ili hromatida i druge vrste oštećenja. Procedura izvođenja testa prikazana je u eksperimentalnom delu (Poglavlje 4.) uz ostale genotoksikološke testove.

2.3.3.3. Test mikronukleusa

Test mikronukleusa je u širokoj upotrebi za utvrđivanje prisustva i obima oštećenja hromozoma koja su nastala kao rezultat izloženosti genotoksičnim agensima. Određivanjem incidencije mikronukleusa moguće je izmeriti učestalost prekida i gubitaka hromozoma, a sama metoda je lakša i vemenski kraća od klasične analize hromozomskih aberacija ¹⁶⁹. Ova metoda ima veliki značaj u prevenciji bolesti kod profesionalne izloženosti. Test mikronukleusa je varijacija testa hromozomskih aberacija, gde se umesto detekcije abnormalnosti na metafaznim hromozomima, mikronukleusi detektuju na interfaznom hromatinu nakon prvog ćelijskog ciklusa. Prednost testa mikronukleusa je relativno brzo analiziranje mnogo većeg uzorka (veći broj ćelija) nego što je to slučaj u analizi hromozomskih aberacija. Mikronukleusi predstavljaju odvojene delove jedarnog materijala obavijene takođe jedarnom membranom, tako da se na preparatu boje isto kao i jedro. Nastaju kao posledica narušene funkcije deobnog vretena ili oštećenja hromozoma u vidu acentričnih fragmenata ili celih hromozoma koji nisu sposobni da učestvuju u deobi, tj. da se kreću ka polovima deobnog vretena tokom mitoze. Predstavljaju meru hromozomskih prekida ¹⁶⁹.

Test mikronukleusa (CBMN – engl. *The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay*) prvi su opisali Feneč i Morli ¹⁷³. Dodatkom Citohalazina-B (Cyt-B) blokira se citokineza (deoba citoplazme) inaktivacijom aktinskih filamenata membrane. Pošto deoba jedra nije zaustavljena, nakon jedne ćelijske deobe dolazi do formiranja binuklearnih ćelija u kojima se može određivati broj mikronukleusa ^{173, 174}. Za brojanje mikronukleusa su usvojeni izvesni kriterijumi ¹⁷⁵:

- Prečnik mikronukleusa varira između 1/3 i 1/16 prečnika jedara (odnosno, 1/9 i 1/256 površine jedra, respektivno).
- Mikronukleusi su okruglog ili ovalnog oblika.
- Mikronukleusi nisu refraktilni i po tome se razlikuju od artefaktnih čestica boje.
- Sadržaj mikronukleusa se boji identično kao sadržaj glavnog jedra

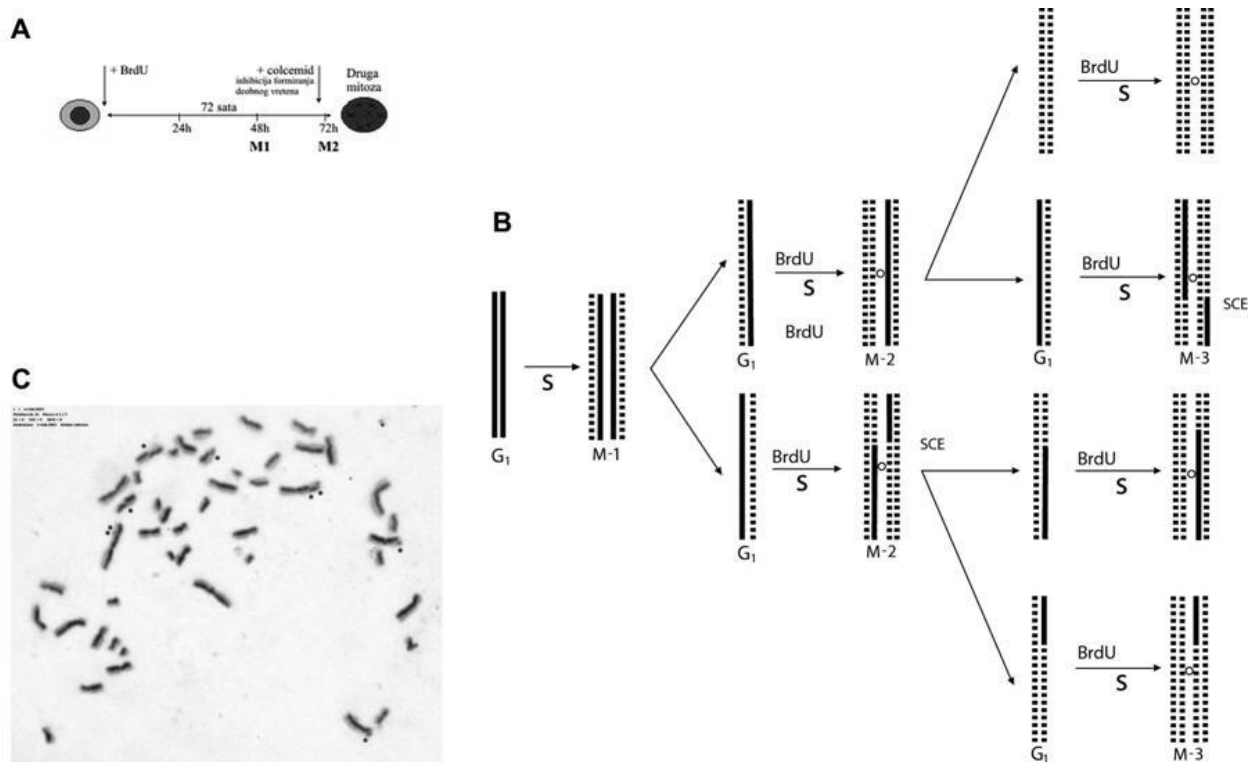
Osim limfocita, za test mikronukleusa mogu se koristiti i drugi tipovi ćelija kao što su fibroblasti i epitelijalne ćelije iz bazalnog sloja epitela (ne sa površine) ¹⁷⁶.

2.3.3.4. Test izmene sestrinskih hromatida (SCE test)

Test izmene sestrinskih hromatida (SCE – engl. *Sister Chromatide Exchange*) predstavlja jednokratnu detekciju recipročnih izmena segmenata DNK između sestrinskih hromatida metafaznih hromozoma, koje nastaju kao posledica izlaganja dejstvu mutagenih i kancerogenih materija iz okruženja. SCE test se može primeniti za skrining ukupne izloženosti kod ljudi i za ciljano ispitivanje mutagenih i kancerogenih svojstava određenih supstanci. Kod ispitanika se koristi kultura limfocita iz periferne krvi, a test se može *in vitro* sprovoditi i na kontinuiranoj ćelijskoj liniji fibroblasta.

SCE su prvi put zapažene na prstenastim (engl. „ring“) hromozomima kukuruza, a na linearnim hromozomima su ih je prvi našli Tejlor i sar. ¹⁷⁷, nakon što su sestrinske hromatide diferencijalno obeležili radioaktivnim analogom (tricijum timidin) i autoradiografski analizirali hromozome. Rezoluciju diferencijalnog bojenja hromatida su veoma unapredili Peri i Volf ¹⁷⁸, koji su razvili posebnu tehniku bojenja (FPG – engl. *Fluorescence Plus Giemsa*) obeležavanjem molekula DNK sa fluorescentnim jedinjenjem 5-bromo-2-deoksiuridinom (BrdU). Ovom metodom, nakon dve uzastopne ćelijske deobe u prisustvu analognog nukleotida BrdU, stvaraju se uslovi da timin u jednoj hromatidi bude zamenjen analogom samo u jednom lancu DNK, a da u drugoj hromatidi bude prisutan u oba lanca (**Slika 2.26-A**). Izmene se mogu uočiti zbog razlike u primanju boje dve hromatide, a koja nastaje zbog različite količine inkorporisanog BrdU ¹⁷⁹. Lakša diferencijacija SCE na hromozomima dovela je do povećanja broja studija genotoksičnosti pomoću SCE testa ^{163, 180, 181}.

Sama izmena materijala između homologih lokusa dve sestrinske hromatide citološki predstavlja recipročnu razmenu segmenata unutar jednog hromozoma. Izmene nastaju prekidanjem DNK lanca na mestima oštećenja, ukoliko ona nisu popravljena pre ulaska ćelije u sintetsku (S) fazu ćelijskog ciklusa ^{182 – 184}, kao i naknadnom rekombinacijom četiri novonastala DNK lanca prilikom spajanja ^{185, 186}. Ove izmene ne predstavljaju oštećenje jer ne dovode do promene genetskog koda ćelije.



Slika 2.26: **A** – Upotreba BrdU u SCE testu. **B** – Proces nastanka izmena sestrijskih hromatida. Neispredanom linijom označen je početni DNK lanac pre udvajanja, a isprekidanom DNK lanci sa ugrađenim analogom timidina - bromodeksiuridinom (BrdU) tokom dve uzastopne ćelijske deobe. SCE se u metafaznim ćelijama mogu uočiti nakon diferencijalnog bojenja hromatida. Na ovaj način nastaju karakteristični "harlekin" hromozomi, na kojima se jasno mogu videti izmene među susednim hromatidama, pošto je jedna svetlija, a druga tamnija. Preuzeto uz modifikaciju iz: Verma i Babu (1995.)¹⁸⁷. **C** – Preparat hromozoma sa diferenciranim hromatidama („harlekin“ hromozomi) na kome se vide izmene između sestrijskih hromatida.

2.3.3.4.1. Mehanizam nastanka i faktori koji utiču na SCE

Pretpostavka nekih autora je da su izmene među sestrijskim hromatidama (**Slika 2.26-B i -C**) rezultat replikacije oštećene DNK i da se događaju ako ta oštećenja nisu reparirana pre ulaska ćelija u S fazu¹⁸⁸. Pretpostavlja se da tokom replikacije SCE nastaju rekombinacijom lanaca DNK koji se udvajaju, na mestima spajanja lanaca koji počinju da se repliciraju i onih koji još nisu počeli¹⁸⁹. Drugi autori^{190 – 192} smatraju da ove izmene nastaju „zaobilaznjem oštećenja“ (engl. „*Damage Bypass*“) tokom procesa replikacije DNK. Pokazano je da se izmene među sestrijskim hromatidama najčešće događaju na oštećenim delovima genoma koji su transkripciono aktivni¹⁹³. Natarajan i sar.¹⁹⁴ su pomoću restrikcionih enzima pokazali da su dvolančani prekidi DNK molekula na početku S faze ćelijskog ciklusa preduslov za nastanak SCE. U indukovanju SCE efikasna su ona hemijskih jedinjenja koji mogu da alkiluju DNK. Rezultati ispitivanja povezanosti SCE izazvanih jonizujućim zračenjem sa određenim fazama

ćelijskog ciklusa pokazali su da je najviša vrednost SCE bila kod ćelija koje su ozračene u G1 fazi, a zatim u S fazi. Tretiranje ćelija u G2 fazi nije povećalo SCE vrednosti u odnosu na kontrolu ¹⁶³.

Značaj ove metode leži u njenoj osetljivosti, jer se pomoću nje mogu detektovati promene na molekulu DNK nastale dejstvom mnogih potencijalno genotoksičnih faktora u koncentracijama i do sto puta nižim od onih koje su potrebne da izazovu vidljive hromozomske aberacije ¹⁸¹. Zbog toga je ova metoda prihvaćena i od strane Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i uvršćena u listu standardnih kratkotrajnih (engl. „*Short-Term*“) metoda za skrining. Metoda je standardizovana kao citogenetska tehnika i izvodi se u mnogim laboratorijama širom sveta prilikom genotoksikoloških ispitivanja ¹⁹⁴.

2.3.3.5. Dizajn genotoksikoloških ispitivanja

Test izmene sestrinskih hromatida, kao jedna od osetljivijih genotoksikoloških metoda, često se koristi u proceni genotoksičnog efekta supstancija ^{163, 195}. S druge strane, test mikronukleusa i analiza hromozomskih aberacija predstavljaju metode koje se takođe smatraju nezaobilaznim, kako u biomonitoringu, tako i za ispitivanje uticaja hemijskih materija ^{163, 194}. Zbog toga se, na osnovu preporuka Svetske zdravstvene organizacije (WHO) ¹⁹⁶, ovi testovi koriste za ispitivanje efekata eksponiranja različitim genotoksičnim agensima, uz ispunjavanje tačno određenih uslova koji se pri tome zahtevaju. Za ispitivanje novosintetisanih hemijskih jedinjenja, potrebno je odabrati adekvatan *in vitro* eksperimentalni model i eksperimentalno odrediti optimalne koncentracije ispitivanih jedinjenja. Kod planiranja genotoksikoloških ispitivanja, od velike koristi mogu biti i prethodna ispitivanja citotoksičnosti na istom ćelijskom materijalu.

3. NAŠI RADOVI

Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje biomedicinskog potencijala 14 odabranih steroidnih jedinjenja na humanim tumorskim i zdravim ćelijskim linijama, kao i na zdravim limfocitima dobrovoljnih donora. Prvo je ispitan antiproliferativni efekat steroidnih derivata na osam ćelijskih linija. U drugom delu istraživanja ispitan je proapoptotski potencijal, a u trećem delu obavljena je genotoksikološka studija svih 14 jedinjenja.

3.1. Ispitivana jedinjenja

3.1.1. Steroidni derivati

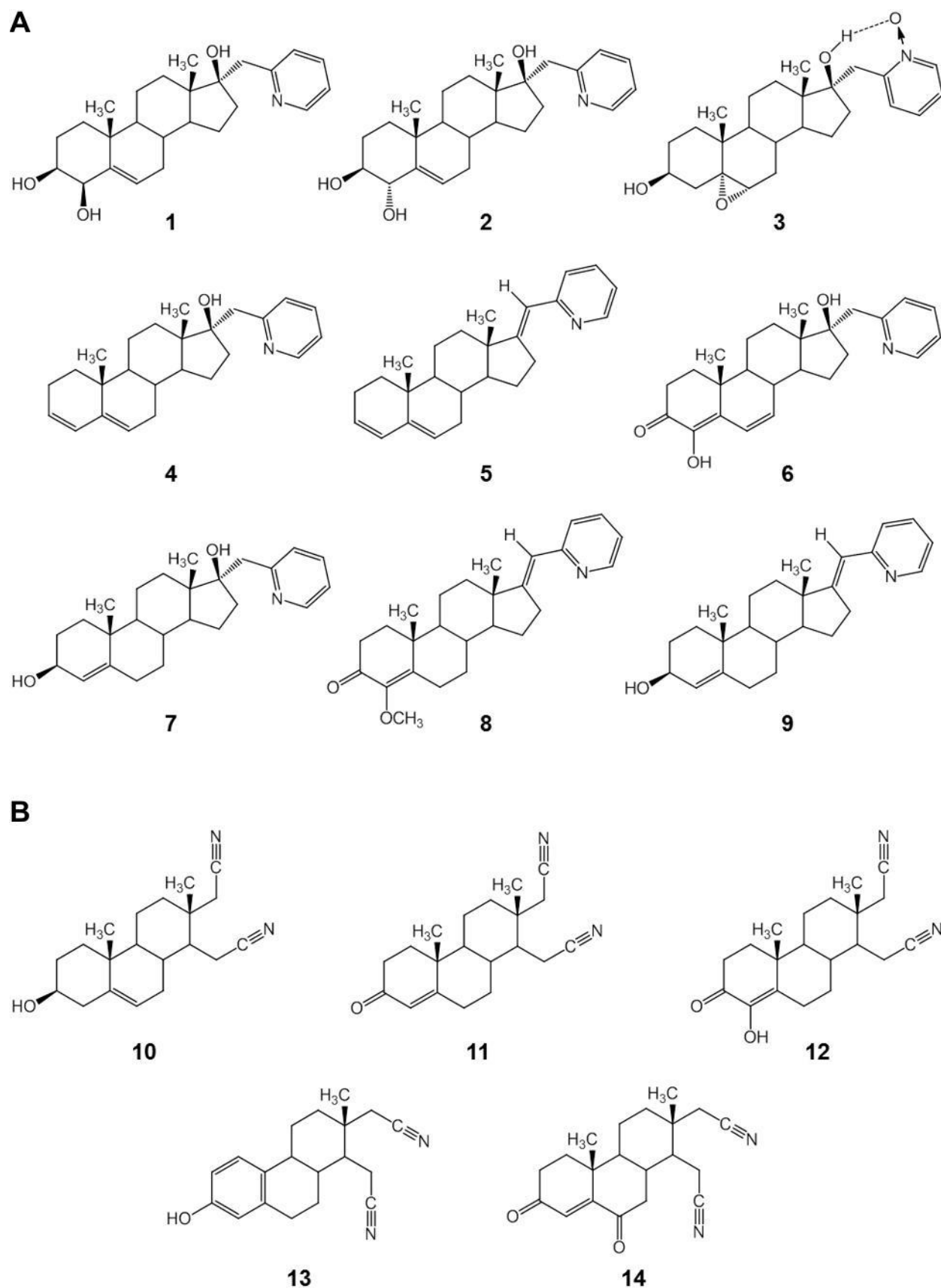
Sinteza, hemijska karakterizacija i preliminarna citotoksična aktivnost steroidnih derivata ispitivanih u ovoj studiji objavljeni su ranije (Djurendić i sar.; Nikolić i sar.)^{30, 31}.

3.1.1.1. Pikolinski i pikolinilidenski derivati

U radu Djurendić i sar. opisana je sinteza, karakterizacija i preliminarni skrining citotoksičnosti odabranih D-supstituisanih androstanskih derivata³⁰. U ovom radu ispitivani su pikolinski i pikolinilidenski derivati: 17 α -pikolil-androst-5-en-3 β ,4 β ,17 β -triol (**1**); 17 α -pikolil-androst-5-en-3 β ,4 α ,17 β -triol (**2**); 5 α ,6 α -epoksi-17 α -pikolil-androstan-N-oksid-3 β ,17 β -diol (**3**); 17 α -pikolil-androsta-3,5-dien-17 β -ol (**4**); 17-pikoliniliden-androsta-3,5-diene (**5**); 4,17 β -dihidroksi-17 α -pikolil-androsta-4,6-dien-3-on (**6**); 17 α -pikolil-androst-4-en-3 β ,17 β -diol (**7**); 4-metoksi-17-pikoliniliden-androst-4-en-3-on (**8**) i 17-pikoliniliden-androst-4-en-3 β -ol (**9**). Strukture ispitivanih pikolinskih i pikolinilidenskih derivata date su na **Slici 3.1-A**.

3.1.1.2. Seko-dinitrilni derivati

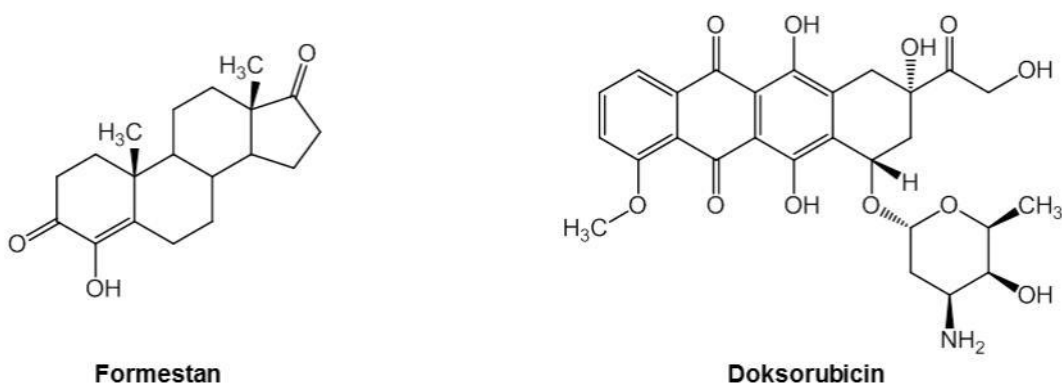
Sinteza, karakterizacija i preliminarni skrining citotoksičnosti odabranih 16,17-seko-16,17a-dinitrilnih androstanskih i estranskih derivata prikazani su u radu Nikolić i sar.³¹. U ovom radu ispitivani su sledeći seko-dinitrilni derivati: 3 β -hidroksi-16,17-sekoandrost-5-en-16,17a-dinitril (**10**); 3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**11**); 4-hidroksi-3-okso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**12**); 3-hidroksi-16,17-sekoestra-1,3,5(10)-trien-16,17a-dinitril (**13**) i 3,6-diokso-16,17-sekoandrost-4-en-16,17a-dinitril (**14**). Strukture ispitivanih dinitrilnih derivata date su na **Slici 3.1-B**.



Slika 3.1: **A** – Strukture ispitivanih 17α -pikolinskih (1 – 4, 6 i 7) i $17(E)$ -pikolinilidenskih (5, 8 i 9) androstanskih derivata. **B** – Strukture ispitivanih 16,17-seko-16,17 α -dinitril androstanskih (10 – 12 i 14) i estranskih (13) derivata.

3.1.2. Referentna jedinjenja

Efekti ispitivanih androstanskih derivata poređeni su sa efektima dva referentna jedinjenja, Formestanom i Doksorubicinom, čije su strukture date na **Slici 3.2**. Formestan je inhibitor enzima aromataze i često je lek izbora u terapiji estrogen-zavisnog karcinoma dojke, sam ili u kombinaciji sa antiestrogenima^{17, 18, 197 – 199}. U ovoj studiji je korišćen kao referentno steroidno jedinjenje. Doksorubicin, drugo referentno jedinjenje, je neselektivni antitumorski lek i deo je standardnih terapijskih protokola koji se koriste za lečenje različitih solidnih tumora, uključujući i karcinom dojke²⁰⁰.



Slika 3.2: Strukture referentnih jedinjenja Formestana i Doksorubicina.

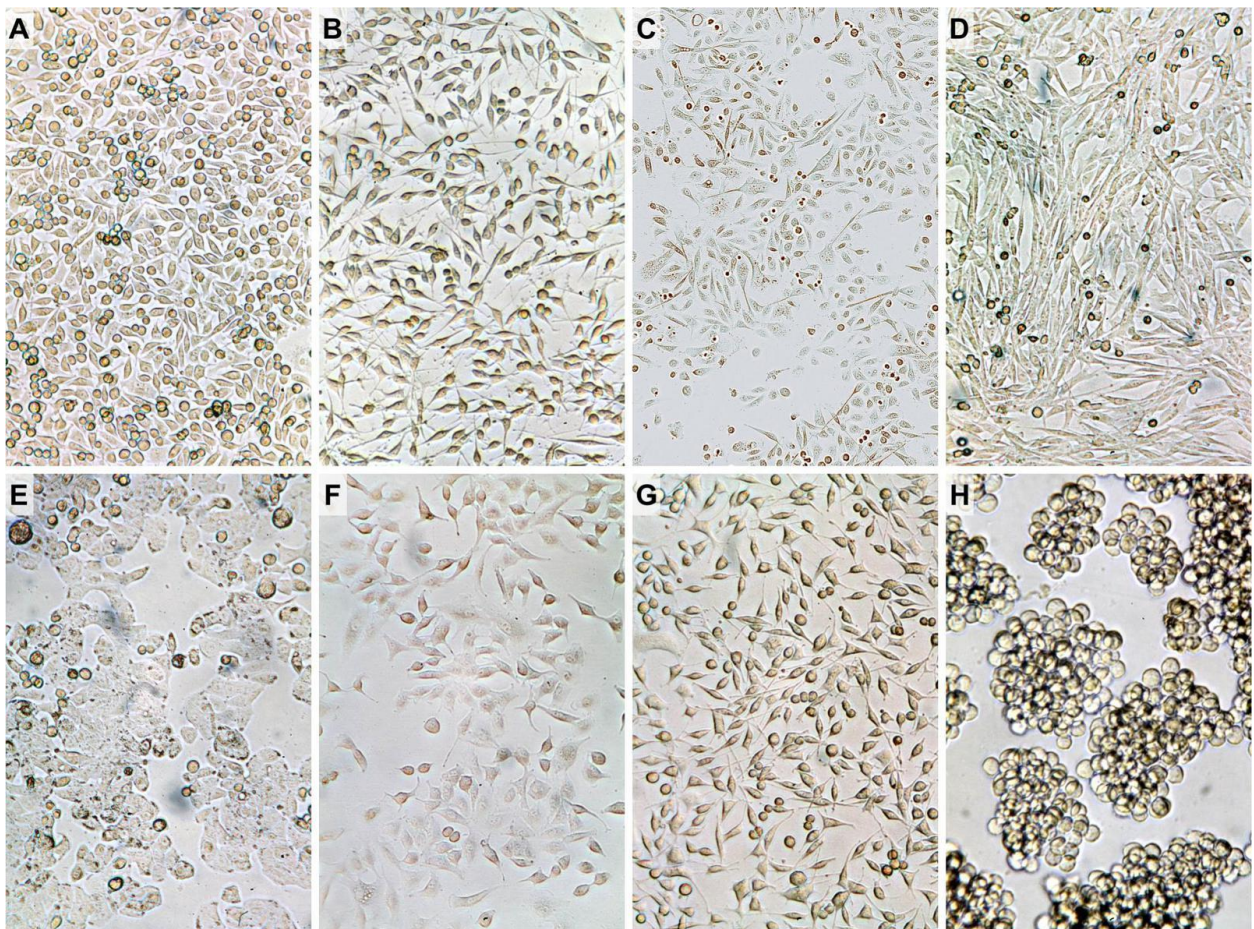
3.1.3. Ispitivane ćelijske linije

Efekat steroidnih jedinjenja ispitivan je na kulturama ćelija humanog porekla. Istraživanje je sprovedeno na osam kontinuiranih ćelijskih linija različitog porekla. Šest linija potiče od različitih solidnih tumora, među kojima su i dva tipa karcinoma dojke, jedna linija je leukemijska, a jedna je poreklom od zdravog tkiva. Ćelijske linije koje potiču od solidnih tumora i ćelijska linija zdravog tkiva su adherentnog tipa, tj. rastu zalepljene za podlogu kao jednorodni sloj ćelija („*monolayer*”) i morfološki imaju osobine epitelijalnih ćelija. Ispitivanjem je obuhvaćena i jedna vrsta humane leukemije koja u kulturi raste kao suspenzija pojedinačnih ćelija, kao i kulture limfocita periferne krvi zdravih donora. Ćelijske linije ispitivane u ovom radu su:

- **MCF-7** – ćelijska linija estrogen receptor pozitivnog (ER+) adenokarcinoma dojke,
- **MDA-MB-231** – ćelijska linija estrogen i progesteron receptor negativnog (ER –, PR –) i HER2 – adenokarcinoma dojke (engl. *Triple negative breast cancer* - TNBC),
- **PC-3** – ćelijska linija androgen receptor negativnog (AR –) adenokarcinoma prostate,
- **HeLa** – ćelijska linija karcinoma grlića materice,

- **HT 29** – ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva (kolona),
- **A549** – ćelijska linija karcinoma pluća,
- **K562** – ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije,
- **MRC-5** – ćelijska linija zdravog tkiva fibroblasta pluća.

Osnovni podaci o navedenim ćelijskim linijama dati su u „Poglavlju 6. – PRILOG (deo 6.1). Mikrofotografije ćelijskih linija prikazane su na **Slici 3.3**.



Slika 3.3: Mikrofotografije ćelijskih linija koje su održavane u sterilnim sudovima sa hranljivim medijumom: **A** – MCF-7, **B** – MDA-MB-231, **C** – PC-3, **D** – HeLa, **E** – HT-29, **F** – A549, **G** – MRC-5, **H** – K562. Fotografije su napravljene na invertnom mikroskopu (*Reichert Biostar*).

3.2. Antiproliferativna aktivnost steroidnih derivata

Jedinjenja koja pri niskim koncentracijama značajno smanjuju proliferisanje tumorskih ćelija predstavljaju neophodan preduslov za uspešan razvoj novih, efikasnijih terapeutika za lečenje obolelih od malignih bolesti. Antiproliferativna aktivnost, tj. sposobnost nekog jedinjenja da smanji broj ćelija u kulturi u odnosu na kontrolu kvantitativno se izražava u procentima za određenu koncentraciju i vreme izlaganja. Na osnovu vremenske i dozne zavisnosti citotoksičnog efekta mogu se izvesti zaključci o antiproliferativnoj aktivnosti ispitivanog jedinjenja. Efikasnost inhibicije proliferacije tumorskih ćelija ispitivanim jedinjenjem tokom određenog perioda se izražava IC_{50} vrednošću (engl. *Inhibitory Concentration*), koja predstavlja koncentraciju ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija u datom vremenu smanjuje za 50% u odnosu na netretirani kontrolni uzorak. Vrednost IC_{50} se određuje „Median effect“ analizom²⁰¹. Na osnovu IC_{50} vrednosti moguće je upoređivati efikasnost različitih jedinjenja na istoj ćelijskoj liniji. Mada ne postoji stroga podela jedinjenja na osnovu citotoksičnog efekta, među naučnicima koji se bave ovakvim istraživanjima prihvaćene su neke smernice u vezi kvantifikacije jačine antiproliferativnog (citotoksičnog) efekta: Ukoliko je IC_{50} vrednost niža od 10 μ M, smatra se da to jedinjenje pokazuje dobru citotoksičnost. Ako je IC_{50} u intervalu 10 – 100 μ M, supstanca pokazuje umeren do slab citotoksični efekat, dok se jedinjenja sa IC_{50} vrednošću preko 100 μ M smatraju praktično netoksičnim.

3.2.1. Ispitivanje citotoksičnosti in vitro

U ovom radu antiproliferativna aktivnost (citotoksičnost) steroidnih jedinjenja ispitana je *in vitro* kolorimetrijskim testom u kome se koristi tetrazolijumova so MTT^{81, 202, 203}. Kulture humanih ćelijskih linija u mikrotitar pločama izložene su delovanju steroidnih jedinjenja **1 – 14** tokom 48 sati u rasponu koncentracija od 0,01 do 100 μ M. Formestan i Doksorubicin su korišćeni kao referentna jedinjenja, u istim koncentracijama. Izmereni citotoksični efekti jedinjenja poređeni su sa kontrolnim uzorcima netretiranih ćelija. Da bi se utvrdilo da li ova jedinjenja pokazuju selektivnu citotoksičnost, ispitan je njihov uticaj na rast različitih tipova ćelija, među kojima je, osim tumorskih, i jedna ćelijska linija zdravih ćelija.

Ispitivani steroidni derivati su pokazali različitu antiproliferativnu aktivnost prema tretiranim tumorskim ćelijskim linijama. Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti svih četrnaest steroidnih derivata i referentnih jedinjenja Formestana i Doksorubicina, koji su dobijeni pomoću MTT testa na osam humanih ćelijskih linija, prikazani su kao IC_{50} vrednosti u **Tabeli 3.1**.

Tabela 3.1: IC₅₀ vrednosti (50% inhibitorna koncentracija) [μM] testiranih steroida **1 – 14** i referentnih jedinjenja Formestana (For) i Doksorubicina (Dox), određene „*median effect*“ analizom iz rezultata citotoksičnosti dobijenih *in vitro* MTT testom nakon tretiranja humanih ćelijskih linija tokom 48 h. Naznačene su IC₅₀ vrednosti manje od 10 μM.

Jedinjenja	Ćelijske linije								
	MCF-7	MDA-MB-231	PC-3	HeLa	HT-29	A549	K562	MRC-5	
Pikolinski i pikolinilidenski derivati	1	>100	6,43	41,29	23,97	5,29	>100	>100	>100
	2	>100	4,56	22,38	21,07	2,46	>100	>100	>100
	3	/	5,18	28,21	32,73	17,41	>100	/	/
	4	12,32	2,17	19,37	22,38	10,46	>100	13,72	>100
	5	52,70	3,82	20,62	18,69	1,04	16,87	52,44	/
	6	4,11	1,03	21,37	29,74	>100	>100	30,74	>100
	7	>100	2,50	22,53	24,25	/	12,74	27,31	>100
	8	>100	3,46	33,16	10,25	45,83	>100	>100	>100
	9	>100	5,18	11,50	7,82	16,43	>100	75,57	>100
Dimitrilni derivati	10	30,04	34,82	19,12	2,15	>100	>100	>100	/
	11	15,02	15,51	8,27	5,73	>100	>100	>100	>100
	12	56,31	39,59	8,69	14,71	>100	>100	>100	>100
	13	16,96	3,96	11,18	7,32	>100	>100	>100	>100
	14	>100	6,66	9,65	4,02	>100	>100	>100	>100
Referentna jedinjenja	For	>100	53,29	45,65	1,90	>100	>100	>100	>100
	Dox	0,62	0,17	89,90	1,68	0,10	7,52	0,42	0,11

/ - IC₅₀ vrednost nije određena zbog nelinearne dozne zavisnosti ili hormetičkog efekta.

Na osnovu rezultata prikazanih u **Tabeli 3.1** vidi se da modifikovani steroidi ispoljavaju snažnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama MDA-MB-231, PC-3 i HeLa i delimično prema MCF-7 i HT-29.

Prema MCF-7 ćelijskoj liniji estrogen-receptor pozitivnog (ER+) adenokarcinoma dojke jedinjenja **4 – 6 i 10 - 13** su pokazala snažniji ili umeren efekat nakon 48 h inkubacije, dok su ostala jedinjenja zajedno sa Formestanom praktično bila neaktivna. Najpotentnija citotoksičnost na ovoj liniji registrovana je za pikolinski derivat **6**.

Ćelijska linija estrogen- i progesteron-receptor negativnog (ER-, PR-) adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 se pokazala izuzetno osetljiva na tretiranje steroidnim derivatima. Derivati **1** – **9**, **13** i **14** su bili veoma aktivni prema ovoj vrsti karcinoma dojke, sa IC_{50} vrednostima manjim od $10 \mu M$. Aktivnost ovih derivata je bila veća od aktivnosti referentnog jedinjenja Formestana. Iz tog razloga je ispitivanje antiproliferativnog efekta prošireno za oba tipa karcinoma dojke, obuhvatajući periode inkubacije od 24, 48 i 72 sata, a rezultati su posebno prikazani u delu **3.2.2**.

Prema PC-3 ćelijskoj liniji androgen-receptor negativnog (AR-) adenokarcinoma prostate svi ispitivani derivati su ispoljili znatnu antiproliferativnu aktivnost, koja je veća od aktivnosti oba referentna jedinjenja. Pikolinski derivat **9** i skoro svi dinitrilni derivati (**10**, **11**, **13** i **14**) pokazali su snažan antiproliferativni efekat ($IC_{50} < 10 \mu M$) prema HeLa ćelijskoj liniji. Formestan je na ovoj ćelijskoj liniji ispoljio sličnu ili jaču citotoksičnost u odnosu na ispitivana jedinjenja. Na PC-3 i HeLa ćelijama su IC_{50} vrednosti za sve testirane steroide bile ispod $50 \mu M$. Iako je uticaj na ćelije HT-29 bio generalno slabiji, tri od četrnaest testiranih jedinjenja (**1**, **2** i **5**) su imali snažno dejstvo ($IC_{50} < 10 \mu M$), a pikolinilidenski derivat **5** je ispoljio najjači efekat. Antiproliferativnu aktivnost su pokazali još i pikolinski derivati **3**, **4** i **9**. Sa druge strane, dinitrilni derivati (**10** – **14**) i Formestan nisu inhibirali rast HT-29 ćelija. Derivati su većinom bili neaktivni prema A549 ćelijskoj liniji karcinoma pluća, izuzev jedinjenja **5** i **7**.

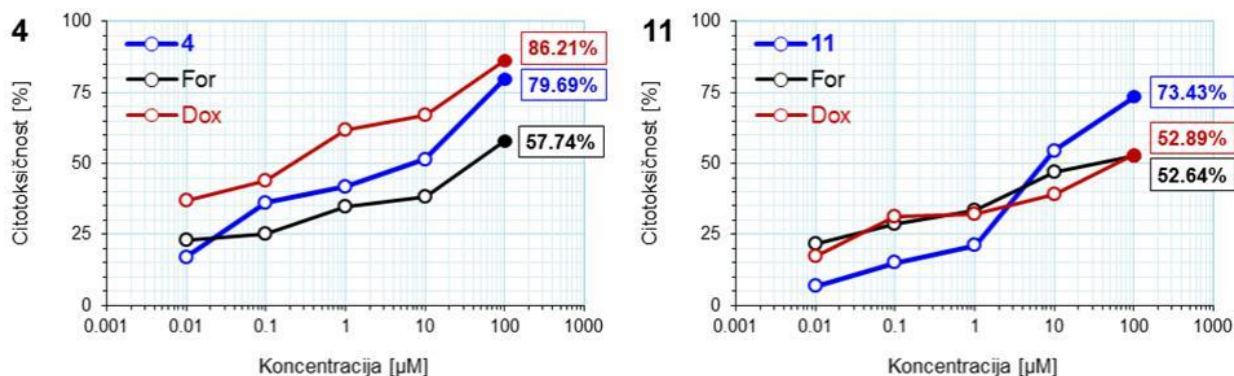
Treba naglasiti da ni jedno od ispitivanih steroidnih jedinjenja (uključujući i Formestan) nije bilo aktivno prema zdravoj ćelijskoj liniji fibroblasta pluća MRC-5. Osim veoma slabog antiproliferativnog efekta svih ispitivanih steroida, uticaj na ove ćelije karakterisao se nekad i nelinearnim odgovorom (rezultati su dati u delu „Poglavlje 6. – PRILOG“).

Na osnovu IC_{50} vrednosti određenih za K562 ćelijsku liniju, može se zaključiti da su samo pikolinski derivati **4**, **6** i **7** značajnije inhibirali rast ove leukemijske ćelijske linije, pri čemu je derivat **4** bio najaktivniji. Pikolinilidenski derivati **5** i **9** su imali IC_{50} vrednosti veće od $50 \mu M$. Dinitrilni derivati nisu uticali na proliferaciju ove ćelijske linije.

Formestan, kao referentno jedinjenje, je pokazao snažan efekat samo na HeLa ćelijama i umerenu citotoksičnost prema PC-3 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama. Doksorubicin, dosledno svojoj nespecifičnoj citotoksičnosti²⁰⁰, bio je toksičniji od ispitivanih steroidnih jedinjenja prema svim ćelijskim linijama, osim prema PC-3 ćelijama, gde je ispoljio izuzetno slab citotoksični efekat ($IC_{50} = 89,9 \mu M$), mnogo slabiji u poređenju sa Formestanom i svim testiranim derivatima.

Jačina antiproliferativnog efekta na različitim ćelijskim linijama zavisila je od ispitivanih jedinjenja i od njihove koncentracije. Najveći efekti citotoksičnosti ostvareni su pri najvišim koncentracijama, od 10 ili $100 \mu M$. Najsnažnija citotoksičnost od 79,69% postignuta je na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji sa pikolinskim jedinjenjem **4** posle tretmana od 48 h u

koncentraciji od 100 μM . Citotoksičnost >70% za isto vreme izlaganja i pri istoj koncentraciji zabeležena je i za dinitrilno jedinjenje **11** na PC-3 ćelijama. Oba ova jedinjenja su tom prilikom imala veću aktivnost od referentnog jedinjenja Formestana, pa čak i od Doksorubicina u slučaju jedinjenja **11**, što je prikazano na **Slici 3.4**.



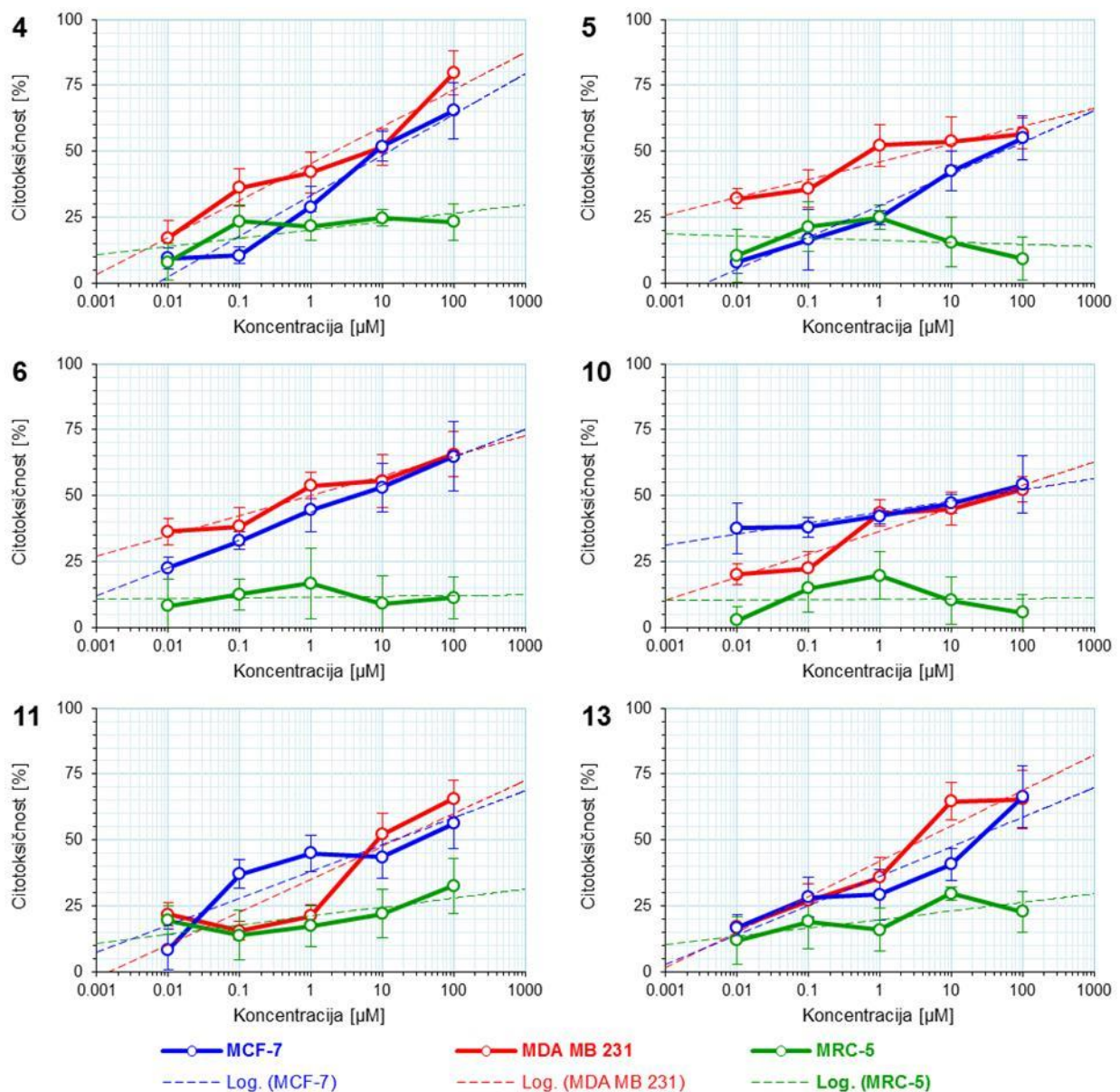
Slika 3.4: Najveća pojedinačna citotoksičnost posle 48 h tretmana zabeležena je za jedinjenje **4** na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 i jedinjenje **11** na ćelijskoj liniji PC-3, u koncentraciji od 100 μM . Na grafikonima su paralelno prikazani i efekti referentnih jedinjenja Formestana (For) i Doksorubicina (Dox).

Antiproliferativna aktivnost steroidnih derivata zavisila je i od vrste tretiranih ćelija. Dobijeni rezultati MTT testa idu u prilog selektivnosti ispitivanih jedinjenja prema tumorskim ćelijama. Na **Slici 3.5** prikazana je citotoksičnost jedinjenja **4 – 6, 10, 11 i 13** prema obe ćelijske linije tumora dojke u punom rasponu koncentracija tokom 48 h i istovremeno njihov slab efekat ili neaktivnost prema MRC-5 liniji zdravih fibroblasta pluća. Osim razlike u intenzitetu citotoksičnosti, može se još uočiti slaba dozna zavisnost (npr. kod derivata **6**) i odsustvo linearnosti antiproliferativnog odgovora MRC-5 ćelija (kao kod derivata **5 i 10**).

3.2.2. Uticaj steroidnih jedinjenja na ćelije tumora dojke

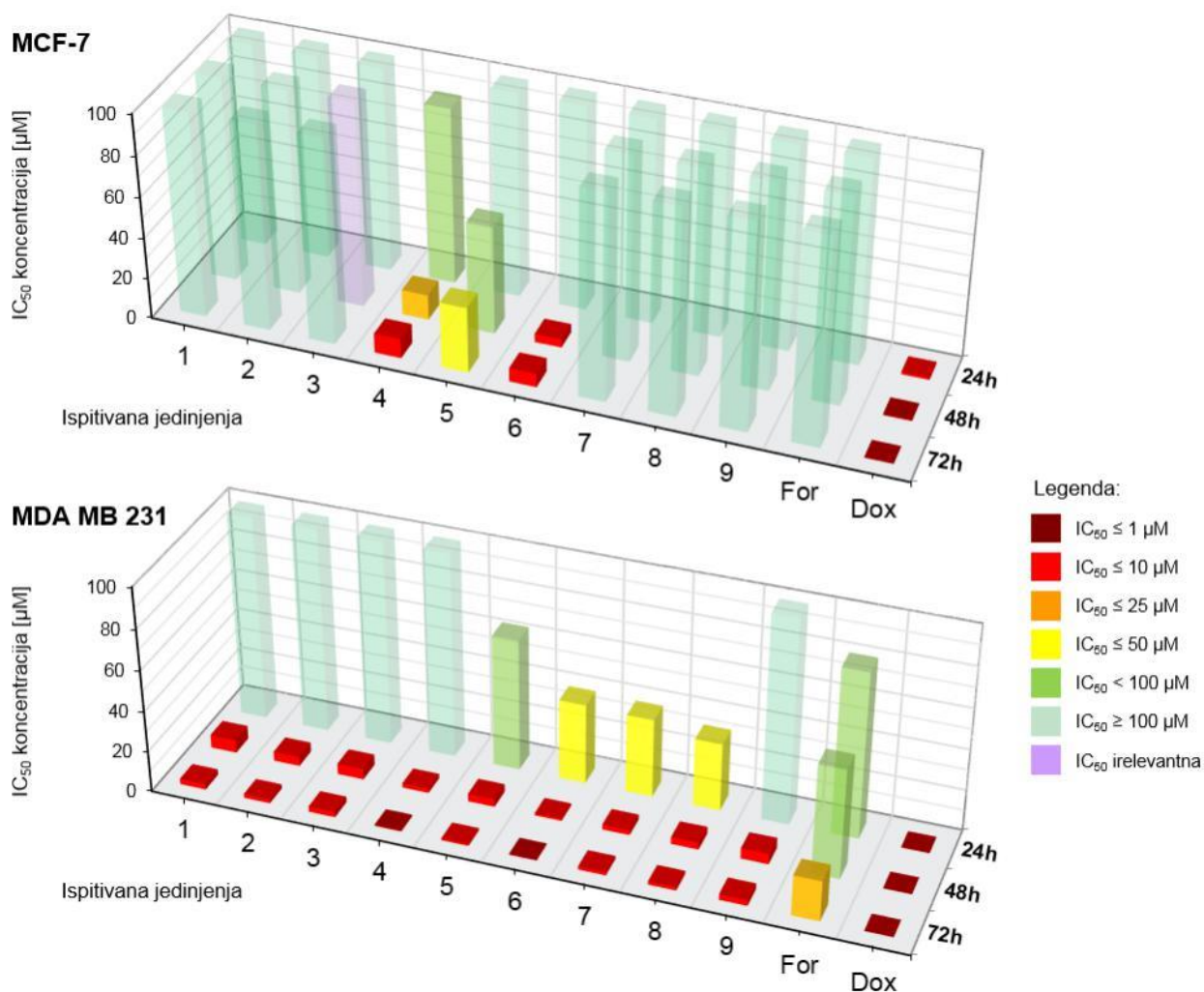
Ćelijske linije oba tipa karcinoma dojke, MCF-7 i MDA-MB-231, tretirane su tokom 24, 48 ili 72 sata steroidnim derivatima **1 – 14** i referentnim jedinjenjima Formestanom i Doksorubicinom u pet koncentracija (u rasponu od 0,01 do 100 μM).

Ispitivani steroidi su imali različit efekat na ćelijske linije ova dva tipa karcinoma dojke, različita po prisustvu steroidnih receptora (**Slika 3.6 i 3.7**). Na MCF-7 ćelijama estrogen-receptor pozitivnog karcinoma dojke samo su derivati **4, 6 i 11** pokazali snažnu aktivnost, i to nakon 72 h (jedinjenje **6** i nakon 48 h). Jedinjenja **5, 10, 12 i 13** su takođe bila aktivna tokom 48 i 72 sata, a jedinjenje **4** je jedino pokazalo slabu citotoksičnost nakon 24 h. Neka od ispitivanih jedinjenja (kao i Formestan) nisu delovala na MCF-7 ćelije ni u jednom od vremena izlaganja.



Slika 3.5: Primeri selektivnog antiproliferativnog dejstva ispitivanih androstanskih derivata **4**, **5**, **6**, **10**, **11** i **13** prema ćelijskim linijama tumora dojke MCF-7 i MDA-MB-231, nakon 48 h tretmana, u odnosu na zdravu ćelijsku liniju MRC-5.

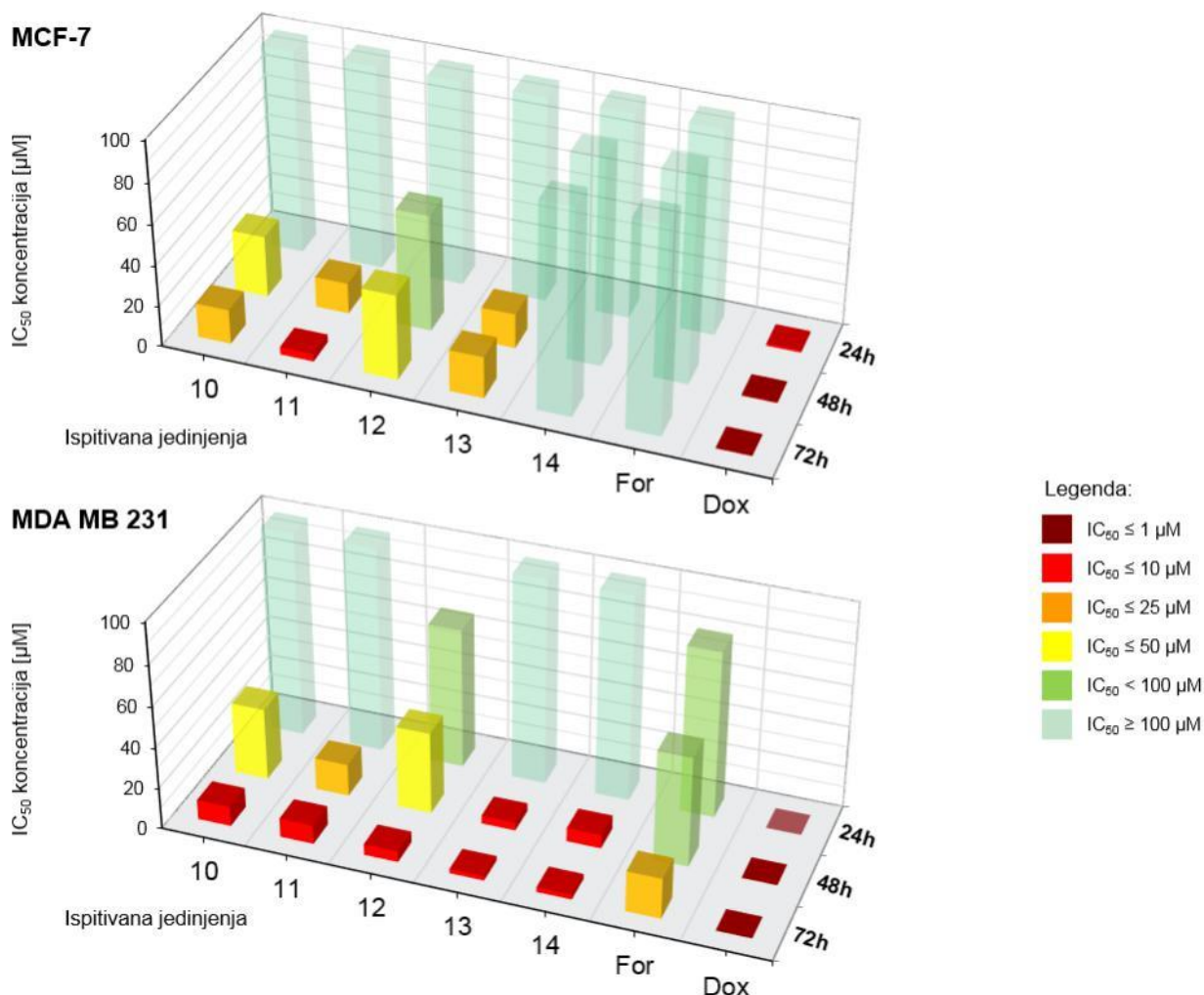
Za razliku od MCF-7 ćelija, antiproliferativna aktivnost pet derivata (**5** – **8** i **12**) zabeležena je na MDA-MB-231 ćelijama estrogen- i progesteron-receptor negativnog karcinoma dojke, već posle 24 h tretmana. Nakon 48 h, svi pikolinski i pikolinilidenski derivati kao i dinitrili **13** i **14** su imali veoma jak efekat sa IC_{50} vrednostima 1 – 7 μM. Nakon najdužeg vremena izlaganja (72 h) IC_{50} vrednost svakog od ispitivanih jedinjenja bila je manja od 10 μM, a IC_{50} vrednost za jedinjenja **4** i **6** je čak bila manja od 1 μM. Jedinjenje **6** je, sa IC_{50} vrednošću od 0,56 μM, na ovoj ćelijskoj liniji ujedno i najefikasnije antiproliferativno steroidno jedinjenje ispitivano u ovom radu.



Slika 3.6: IC₅₀ vrednosti pikolinskih i pikolinilidenskih derivata (1 – 9), kao i referentnih jedinjenja Formestana (For) i Doksorubicina (Dox) na ćelijskim linijama karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231, nakon 24, 48 i 72 sata tretmana.

Formestan, kao inhibitor enzima aromataze, koji se koristi u terapiji velikog broja estrogen-zavisnih bolesti, pa i estrogen-zavisnog adenokarcinoma dojke^{17, 18, 197 – 199}, nije delovao na MCF-7 ćelije ni u jednom od tri vremena izlaganja, dok je prema MDA-MB-231 ćelijama ispoljio umereni antiproliferativni efekat tokom 24 i 48 sati, a nešto jači nakon 72 h delovanja. Doksorubicin je ispoljio jaku, submikromolarnu aktivnost prema ćelijama obe linije tumora dojke u sva tri ispitivana vremena (**Slika 3.6 i 3.7**).

Može se zaključiti da su svi testirani steroidni derivati selektivno smanjili proliferaciju ćelijske linije MDA-MB-231, a stepen inhibicije rasta zavisio je od koncentracije jedinjenja i od vremena tretmana. Antiproliferativni efekti jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji su bili većinom linearni, naročito kod najdužeg perioda izlaganja (grafikoni su dati u „Poglavlju 6. – PRILOG“).



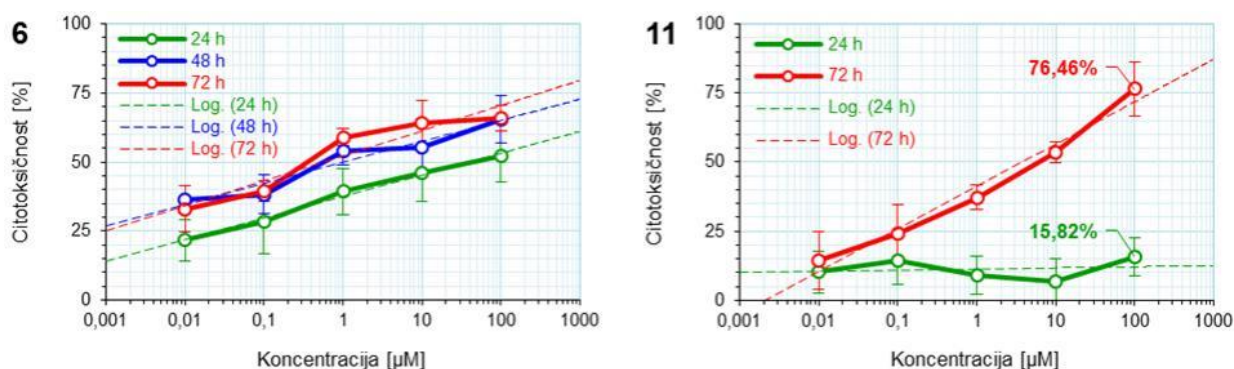
Slika 3.7: IC₅₀ vrednosti seko-dinitrilnih derivata (10 – 14), kao i referentnih jedinjenja Formestana (For) i Doksorubicina (Dox) na ćelijskim linijama karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231, nakon 24, 48 i 72 sata tretmana.

Pikolinski derivati su nakon inkubacije od 24 h pri koncentracijama od 1 – 100 µM u većini slučajeva ispoljili gotovo isti efekat kao i referentno jedinjenje Formestan. Nakon 48 i 72 sata pri istim koncentracijama skoro svi derivati su pokazali veći antiproliferativni efekat od Formestana. Pri najvećoj koncentraciji od 100 µM Formestan je pokazao sličan ili slabiji antiproliferativni efekat (57,74% za 48 h i 54,94% za 72 h), dok su derivati **1 – 3** i **6** (60 – 65% za 48 h i 66 – 68% za 72 h) bili efikasniji, a najefikasniji **4** i **7** (77 – 79% za 48 h i 66 – 78% za 72 h). Od svih ispitivanih steroidnih derivata jedinjenje **4** je izazvalo najviši procenat citotoksičnosti (79,69%) pri najvećoj aplikovanoj koncentraciji (100 µM) za period izlaganja od 48 h.

Pikolinilidenski derivati **5**, **8** i **9** pokazali su gotovo identičnu citotoksičnost, u sva tri ispitivana vremena inkubacije, za ceo raspon koncentracija (21 – 58% za jedinjenje **5**, 10 – 69% za jedinjenje **8** i 6 – 65% za jedinjenje **9**). Formestan je imao znatno veći antiproliferativni efekat za 24 h, samo u odnosu na jedinjenje **9** pri svim koncentracijama.

Dinitrilni derivati (jedinjenja **10 – 14**) su inhibirali rast MDA-MB-231 ćelija. Na dijagramima se može uočiti pravilna dozna zavisnost (PRILOG 3), tj. stepen inhibicije rasta ćelijske populacije je zavisio od koncentracije ispitivane supstance. Jedinjenje **12** je jedini dinitrilni derivat koji je nakon 24 h na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji imao IC₅₀ vrednost manju od 100 μM, a ujedno nižu i od Formestana. Ovaj derivat je u istom vremenu izazvao najviši procenat citotoksičnosti (56,51%) pri najvećoj aplikovanoj koncentraciji (100 μM). Tokom 48 h inkubacije, sva ispitivana dinitrilna jedinjenja pokazala su aktivnost sličnu Formestanu, dok su derivati **13** i **14** bili aktivniji pri koncentracijama od 10 i 100 μM. Nakon 72 h inkubacije derivati **10** i **12 – 14** su smanjili broj ćelja za čak 69 – 72% u odnosu na kontrolu, dok je dejstvom Formestana pri istoj koncentraciji, postignut antiproliferativni efekat od oko 55%.

Na **Slici 3.8** je prikazana zavisnost citotoksičnog delovanja od vremena inkubacije ćelija sa odabranim jedinjenjima. Neki derivati su imali veći efekat sa porastom koncentracije u svakom od tri vremena tretmana (npr. jedinjenje **6** na obe ćelijske linije karcinoma dojke). S druge strane, neki derivati, kao što je npr. jedinjenje **11** (**Slika 3.8**), su pokazali linearni porast aktivnosti sa porastom koncentracije tek nakon dužeg delovanja (u nekim slučajevima nakon 48 h, a češće nakon 72 h).



Slika 3.8: Primeri različitog vremenski- i dozno-zavisnog antiproliferativnog dejstva. Pikolinski derivat **6** je na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 pokazao sličan efekat u sva tri vremena tretiranja (24, 48 i 72 sata), koji je više zavisio od koncentracije jedinjenja nego od trajanja ekspozicije. S druge strane, aktivnost dinitrilnog derivata **11** prema MCF-7 liniji zavisila je od dužine izlaganja i tek posle 72 h je citotoksičnost ovog jedinjenja imala potpunu linearnu doznu zavisnost.

3.2.3. Sinergizam i antagonizam najaktivnijih steroidnih derivata

U cilju ispitivanja mogućeg sinergističkog ili antagonističkog delovanja androstanskih derivata, ispitana je antiproliferativna aktivnost nekoliko kombinacija najaktivnijih steroida. Kombinacije su pravljene uzimanjem jednakih zapremina odabranih jedinjenja koncentracije 100 μM. Na taj način su dobijeni radni rastvori kombinacija jedinjenja, čije se ukupne koncentracije

tretirane kao 100 μM . Čelije linije MDA-MB-231 su tretirane 48 h odgovarajućim rastvorima kombinacija jedinjenja na isti način kao i rastvorima pojedinačnih jedinjenja. Na osnovu rezultata citotoksičnosti kombinacija (koji su dati u „Poglavlju 6. – PRILOG“) izračunate su IC_{50} vrednosti kombinacija jedinjenja. Rezultati su dati u **Tabeli 3.2**.

Tabela 3.2: Rezultati antiproliferativnog efekta kombinacija najaktivnijih pikolinskih (**4 i 6**), pikolinilidenskih (**5 i 8**) i dinitrilnih derivata (**13 i 14**) na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji nakon 48 h tretmana, prikazani kao IC_{50} vrednosti [μM]. Istaknute su IC_{50} vrednosti manje od 10 μM .

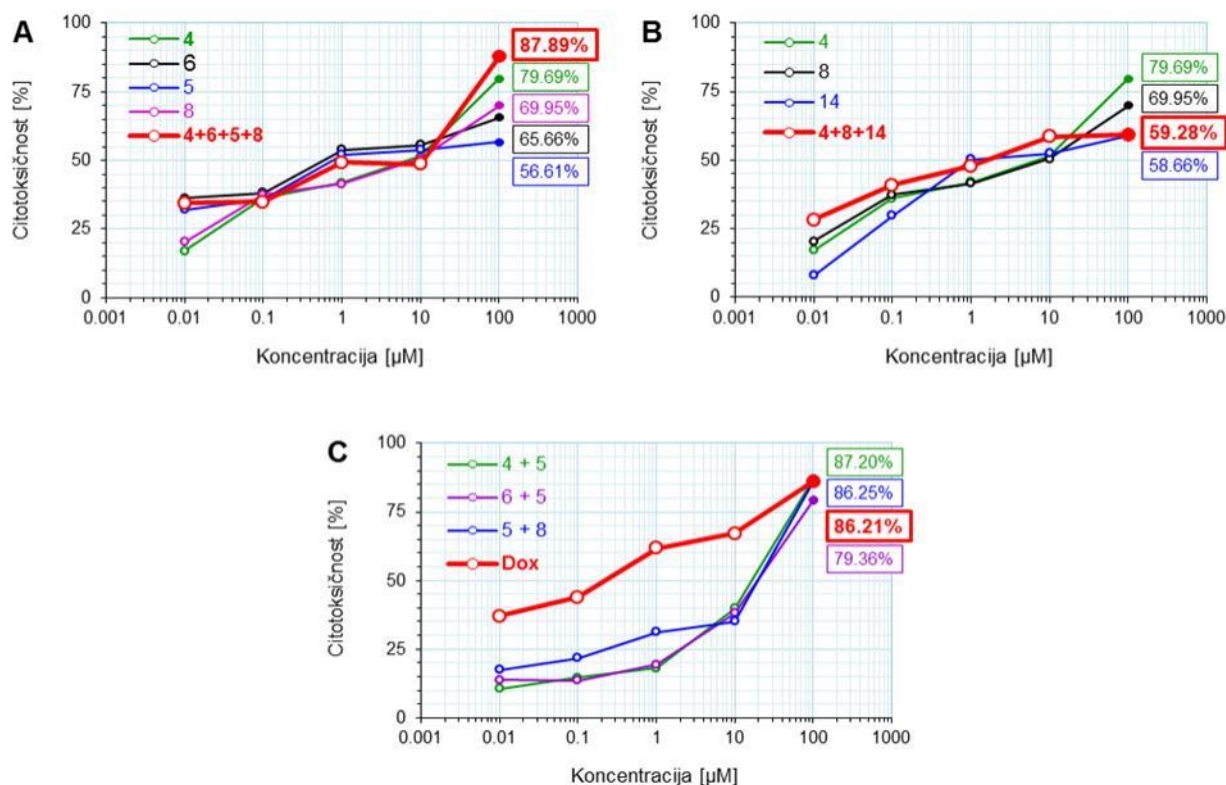
Tip derivata	Jedinjenja	IC_{50} *	Kombinacije	IC_{50}	Kombinacije	IC_{50}
Pikolinski	4	(2.17)	4 + 6	>100	4 + 5 + 13	2.95
	6	(1.03)	4 + 5	7.82	4 + 5 + 14	>100
			4 + 8	>100	4 + 8 + 13	7.48
Pikolinilidenski	5	(3.82)	6 + 5	12.62	4 + 8 + 14	2.41
	8	(3.46)	6 + 8	23.65	6 + 5 + 13	12.78
			5 + 8	5.90	6 + 5 + 14	>100
Dinitrilni	13	(3.96)			6 + 8 + 13	35.40
	14	(6.66)	4 + 6 + 5 + 8	0.83	6 + 8 + 14	14.84

* IC_{50} vrednosti pojedinačnih jedinjenja su prikazane radi lakšeg poređenja.

Na osnovu dobijenih IC_{50} vrednosti za kombinacije od po dva najaktivnija pikolinska (**4 i 6**) i pikolinilidenska derivata (**5 i 8**), kao i kombinacije ova četiri jedinjenja (**Tabela 3.2**), može se videti da su se jedinjenja u kombinacijama međusobno odnosila uglavnom antagonistički, tj. da su IC_{50} vrednosti kombinacija bilo koja dva jedinjenja uvek bile veće od IC_{50} vrednosti tih jedinjenja kada su delovala pojedinačno. Jedino je kombinacijom sva četiri jedinjenja iz klase 17-supstitisanih steroida (**4 + 5 + 6 + 8**) postignuta jača aktivnost u odnosu na pojedinačna jedinjenja ($\text{IC}_{50} = 0,83 \mu\text{M}$, **Slika 3.9–A**).

U **Tabeli 3.2** su takođe date IC_{50} vrednosti kombinacija sastavljenih od po tri najaktivnija steroidna jedinjenja iz svake grupe modifikovanih androstanskih derivata. Kombinovani su po jedan pikolinski (**4 ili 6**), pikolinilidenski (**5 ili 8**) i dinitrilni derivat (**13 ili 14**). Iz rezultata se vidi da su neke kombinacije bile efikasnije od samih derivata **5, 8, 13 i 14** pojedinačno, ali da ni jedna kombinacija nije ostvarila citotoksičnost veću od najaktivnijih jedinjenja u svom sastavu. Najefikasnija je bila kombinacija sastavljena od jedinjenja **4, 8 i 14** sa IC_{50} vrednošću od 2,41

μM , ali to nije bilo dovoljno da nadmaši samo jedinjenje **4** ($\text{IC}_{50} = 2,17 \mu\text{M}$). Poređenje citotoksičnog efekta ove kombinacije sa efektima pojedinačnih jedinjenja dato je na **Slici 3.9–B**.



Slika 3.9: Sinergistički i antagonistički efekti jedinjenja nakon 48 h tretmana ćelijaske linije MDA-MB-231 u punom rasponu koncentracija. **A** – Poređenje citotoksičnosti najaktivnije kombinacije (**4 + 5 + 6 + 8**) sa efektom pojedinačnih derivata; **B** - Poređenje citotoksičnosti najefikasnije kombinacije od tri jedinjenja (**4 + 8 + 14**) i pojedinačnih derivata; **C** – Poređenje između citotoksičnog efekta kombinacija sa po dva steroidna jedinjenja i referentnog jedinjenja Doksorubicina. Objašnjenja su data u tekstu.

Analizirajući citotoksični efekat najuspešnije kombinacije (**4 + 5 + 6 + 8**) i efekat pojedinačnih jedinjenja u punom rasponu koncentracija (**Slika 3.9–A**), može se uočiti da se sinergistički efekat, ako postoji, javlja samo pri najvećoj primenjenoj koncentraciji od 100 μM .

Kod kombinacije (**4 + 8 + 14**) se može videti antagonizam jedinjenja koji se ispoljio takođe pri najvećoj koncentraciji od 100 μM (**Slika 3.9–B**). Međutim, iako je pri toj koncentraciji zabeležen pad citotoksičnosti u odnosu na jedinjenja činioce, veća aktivnost kombinacije pri manjim dozama (0,01 – 0,1 μM) doprinosi da njena IC_{50} vrednost bude skoro ista kao kod najaktivnijeg jedinjenja (**4**).

Poređenjem citotoksičnih efekata binarnih kombinacija (**4 + 5**), (**6 + 5**) i (**5 + 8**) sa efektom referentnog jedinjenja Doksorubicina (**Slika 3.9–C**), može se videti da pri najvećoj koncentraciji (100 μM) kombinacije ostvaruju citotoksičnost od 79,36 do 87,2%, slično Doksorubicinu (86,21%), što je i najveći postignuti procenat citotoksičnosti u okviru 48 h tretmana. Međutim,

aktivnost jedinjenja pri nižim koncentracijama (0,01 – 10 μ M) je mnogo slabija, što doprinosi tome da njihove IC₅₀ vrednosti budu relativno visoke.

Prethodni primeri pokazuju da je za uspešnost neke kombinacije jedinjenja kao potencijalnog antikancerskog leka od velike važnosti, uz odabir dobre kombinacije pojedinih jedinjenja, još i snažna antiproliferativna aktivnost pri niskim (terapijskim) koncentracijama.

3.3. Studija indukcije apoptoze ispitivanim steroidima

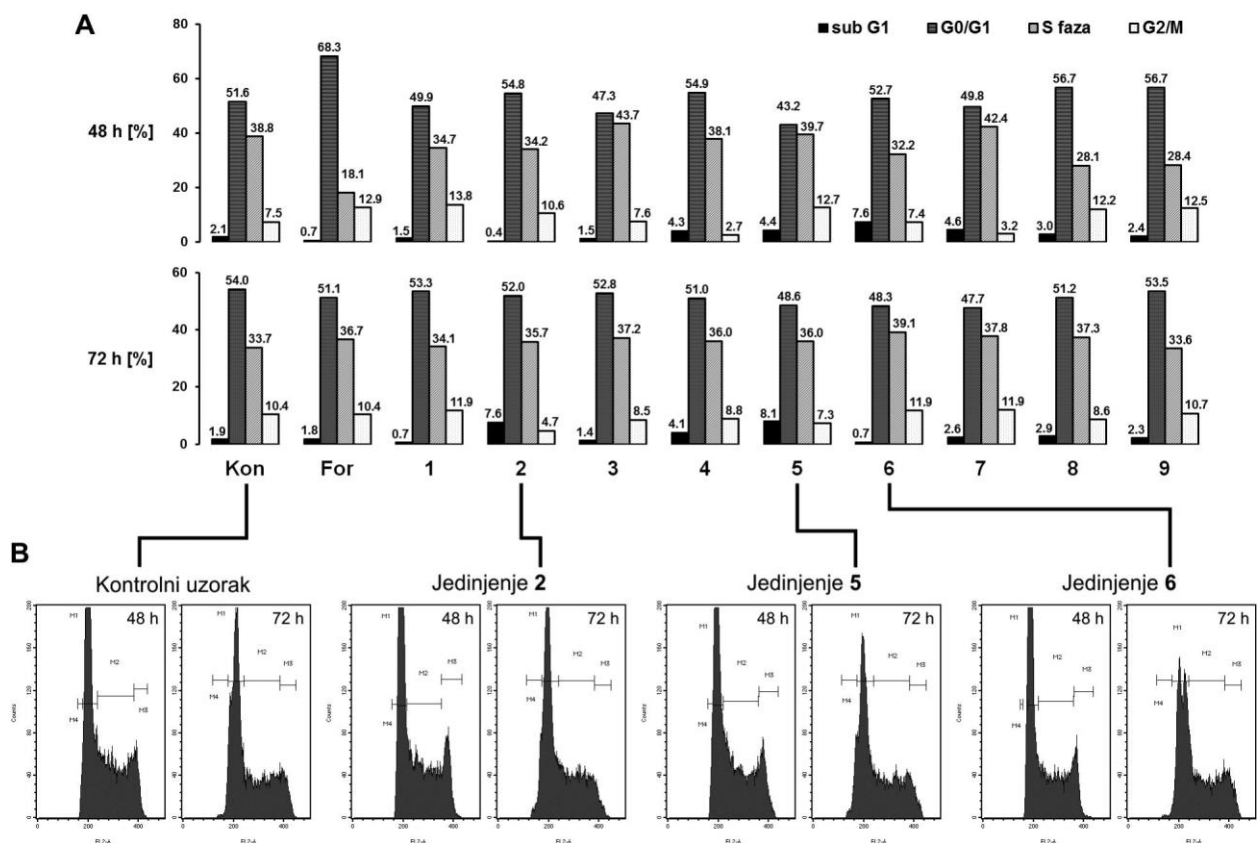
Novosintetisana steroidna jedinjenja su ispoljila značajan antiproliferativni potencijal prema estrogen- i progesteron-receptor negativnim MDA-MB-231 ćelijama karcinoma dojke. Zato se naredna etapa naših istraživanja odnosila na proučavanje mehanizama njihovog delovanja na ove ćelije. Ispitivan je uticaj na ćelijski ciklus, indukciju apoptoze i nekroze, ekspresiju proteina iz apoptotskog signalnog puta, a takođe su analizirane i morfološke promene ćelija nakon 48 i 72 sata tretmana sa IC₅₀ koncentracijama jedinjenja (ekvitoksične doze) za data vremena izlaganja. Ćelijama je tokom inkubacionog perioda od 48 h i 72 h omogućen prolazak kroz dve, odnosno tri mitotičke deobe.

3.3.1. Ispitivanje modulacije ćelijskog ciklusa

MDA-MB-231 ćelije su ispoljile veliku osetljivost na sve ispitivane modifikovane steroide. Zbog toga smo analizirali uticaj jedinjenja na ćelijski ciklus ovih ćelija tokom tretmana ekvitoksičnim dozama jedinjenja u trajanju od 48 ili 72 sata.

Distribucija ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG1, G0/G1, S i G2/M) analizirana je merenjem sadržaja ćelijske DNK u MDA-MB-231 ćelijama fiksiranim etanolom i obojenim propidijum jodidom, pomoću *Becton Dickinson* (BD) imunocitometrijskog sistema. Izračunat je procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa. Frakcija ćelija u subG1 fazi je posmatrana kao populacija apoptotičnih ćelija.

Izračunata procentualna zastupljenost ćelija u subG1, G0/G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa nakon tretmana ispitivanim steroidnim derivatima, uporedo sa kontrolnim uzorkom i Formestanom, prikazana je na **Slici 3.10** za jedinjenja **1 – 9** i **Slici 3.11** za jedinjenja **10 – 14**.

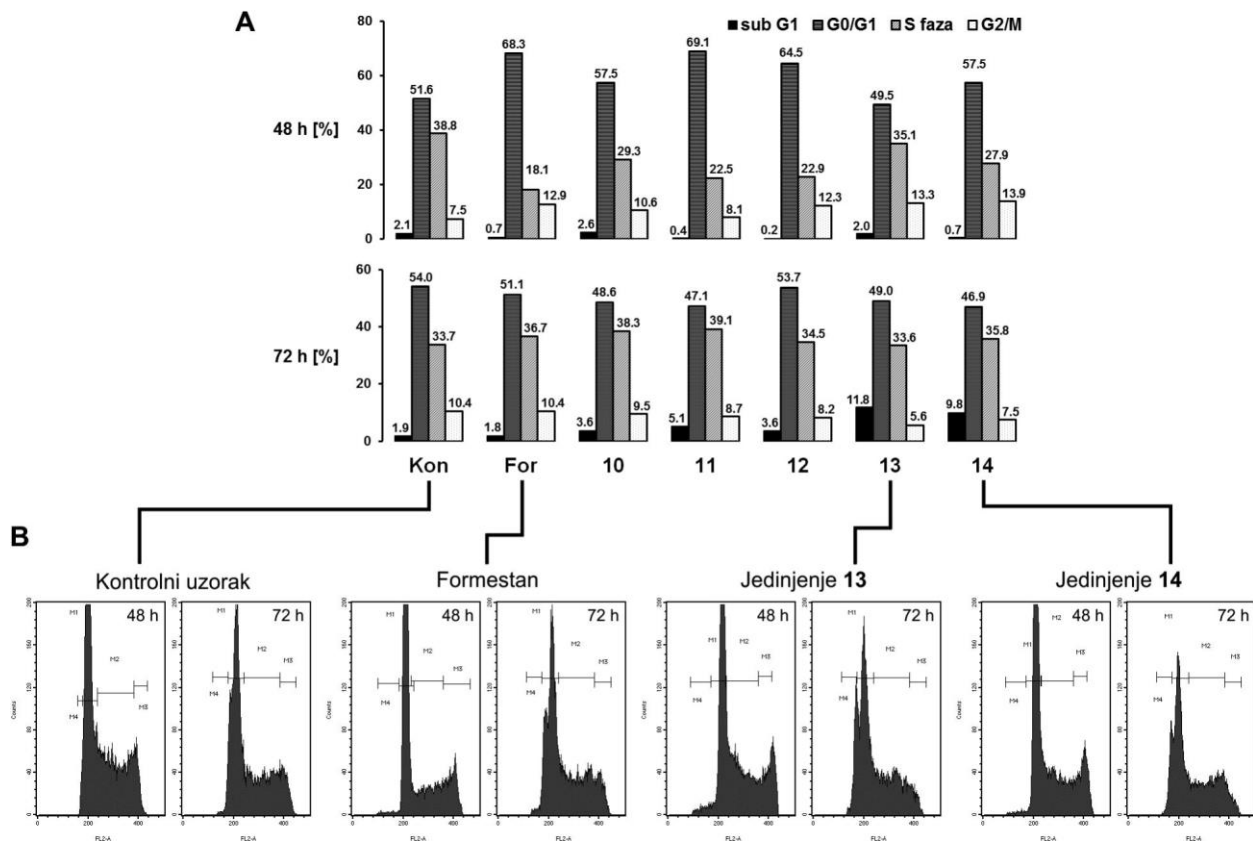


Slika 3.10: A – Distribucija ćelijskog ciklusa tretiranih MDA-MB-231 ćelija data kao procenat (%) po različitim fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 h i 72 h izlaganja ekvitoksičnim dozama (IC_{50} koncentracijama) testiranih 17 α -pikolil i 17-pikolinidenskih jedinjenja (1 – 9) i Formestana (For), pored netretiranog kontrolnog uzorka (Kon). **B** – Histogrami uzoraka MDA-MB-231 ćelija tretiranih jedinjenjima 2 i 5, koja su indukovala najveće povećanje subG1 faze u poređenju sa kontrolnim uzorkom, i jedinjenjem 6, koji je imao najmanje ćelija u subG1 populaciji.

Posle tretmana steroidnim derivatima, najveći deo ćelija (oko 50%) u svim uzorcima je bio u G0/G1 fazi tokom oba vremena izlaganja.

Formestan je nakon 48 h indukovao veći porast broja ćelija u G0/G1 fazi (68,3%) u poređenju sa svim pikolinskim i pikolinilidenskim derivatima. Najveći procenat ćelija u ovoj fazi ćelijskog ciklusa indukovao je dinitrilni derivat 11 (69,08%). Jedinjenja 1, 3, 5, 7 i 13 su za isti vremenski period smanjila tu ćelijsku populaciju (jedinjenje 5 skoro 20%). Sintetska faza ćelijskog ciklusa (S) je nakon 48 h najviše bila umanjena Formestanom i jedinjenjima 6, 8, 9, 11 i 12. Tretman dinitrilnim steroidnim derivatima posle 72 h doveo je do smanjenja G0/G1 i povećanja S faze, dok je tretman pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima indukovao male promene u ovim fazama ćelijskog ciklusa, tako da su procenti ćelija kod ove grupe bili prilično uniformni, bez obzira na tip jedinjenja. Procenat ćelija u G2/M fazi je više varirao između uzoraka pikolinskih i pikolinilidenskih derivata nakon oba perioda tretmana. Najveće povećanje broja ćelija G2/M faze posle 48 h je izazvano jedinjenjima 13 (13,32%) i 14 (13,93%). Formestan i jedinjenja 1, 2,

5, 8, 9 i 12 su takođe dovela do povećanja broja ćelija u ovoj fazi nakon 48 h, a jedinjenja **1, 6 i 7** i tokom 72 h tretmana. Svi ostali uzorci su bili na nivou kontrole. Jedino su derivati **4 i 7** nakon 48 h, kao i jedinjenje **2** nakon 72 h, značajno smanjili udeo ćelija u G2/M fazi u poređenju sa kontrolnim uzorkom.



Slika 3.11: **A** – Distribucija ćelijskog ciklusa tretiranih MDA-MB-231 ćelija data kao procenat (%) po različitim fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 h i 72 h izlaganja IC_{50} koncentracijama (ekvitoksičnim dozama) testiranih seko-dinitrilnih jedinjenja (**10 – 14**) i Formestana (For), uporedo sa netretiranim kontrolnim uzorkom (Kon). **B** – Histogrami uzoraka MDA-MB-231 ćelija tretiranih jedinjenjima **13** i **14** koja su indukovala najveće povećanje subG1 faze u poređenju sa kontrolnim uzorkom i Formestanom.

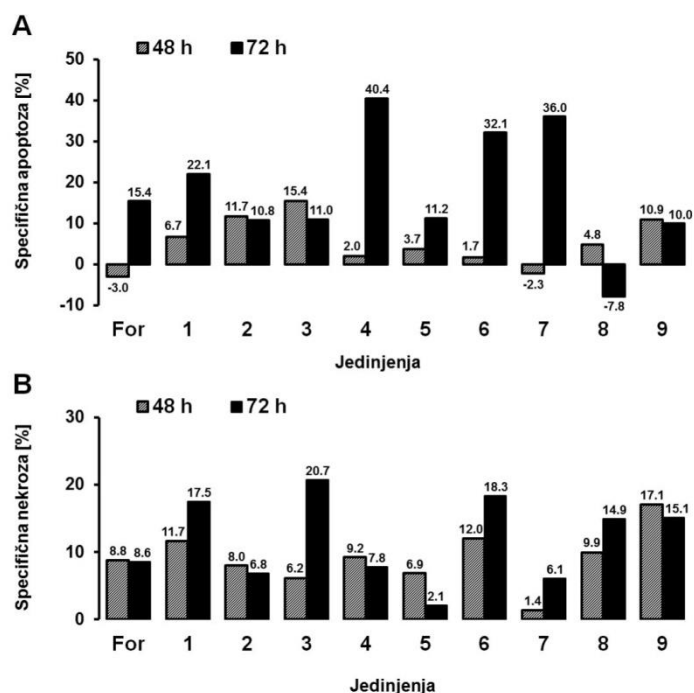
Ćelije koje su u subG1 fazi ćelijskog ciklusa smatraju se populacijom apoptotskih ćelija²⁰⁴ i zato su u ovom istraživanju od posebnog interesa. Kod skoro svih uzoraka tretiranih pikolinimskim i pikolinilidenskim jedinjenjima (**1 – 9**) evidentno je uvećanje ove populacije u poređenju sa kontrolom (**Slika 3.10**), bez obzira na vreme ekspozicije, izuzev za jedinjenja **1 – 3** i Formestan za 48 h i jedinjenja **1, 3 i 6** za 72 h. Za razliku od toga, većina dinitrilnih derivata (**11, 12 i 14**) je dovela do vidljivog smanjenja subG1 faze nakon 48 h, a do povećanja nakon 72 h delovanja, u odnosu na kontrolu (**Slika 3.11**). Najveće povećanje subG1 grupe ćelija posle 48 h zabeleženo je za ispitivana jedinjenja **4 – 9**, među kojima je jedinjenje **6** indukovalo više nego trostruko veću vrednost u poređenju sa kontrolom (7,8%) i desetstruko više od Formestana. Nakon 72 h

ćelijskog tretmana, svi dinitrilni derivati su izazvali veći procenat ćelija u subG1 fazi, a od pikolinskih i pikolinilidenskih derivata samo jedinjenja **2**, **4** i **5**. Jedinjenje **13** je indukovalo najveći postotak ćelija u subG1 fazi (11,81%), što je više od šest puta veća vrednost u odnosu na kontrolu i Formestan; za jedinjenje **14** je zabeleženo 9,83%, a 8,8% za jedinjenje **5**. Ova tri jedinjenja su indukovala najveći porast subG1 faze ćelijskog ciklusa. U delu „Poglavlje 6. – PRILOG“ dati su svi pojedinačni rezultati analize ćelijskog ciklusa, kao i grafikoni njegove modulacije nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima u odnosu na kontrolu.

3.3.2. Ispitivanje apoptoze i nekroze protočnom citometrijom

Indukcija apoptoze je evaluirana pomoću *FACS* („*Fluorescence Activated Cell Sorting*“) analize^{84, 204, 205}, uz korišćenje *Annexin V-FITC* detekcionog kita (*BD Biosciences, Pharmingen*). Pripremljene suspenzije ćelija su analizirane pomoću *BD FACSCalibur E440* (*Becton Dickinson*) protočnog citometra i *BD CellQuest* kompjuterskog programa. Rezultati su dobijeni kao frakcije vijabilnih, rano-apoptotičnih, kasno-apoptotičnih i nekrotičnih ćelija. Na osnovu tih podataka izračunate su specifična apoptoza i nekroza u tretiranim uzorcima prema metodi Bendera i saradnika (2011.)²⁰⁶. Spontana apoptoza i nekroza prisutne u uzorcima netretiranih ćelija korišćene su kao kontrola za sva poređenja u ovoj studiji.

Specifična apoptoza MDA-MB-231 ćelija indukovana testiranim pikolinskim i pikolinilidenskim steroidnim jedinjenjima (**1** – **9**), određena na osnovu rezultata merenja apoptoze protočnom citometrijom, data je na **Slici 3.12-A**. Kod većine tretiranih uzoraka može se videti povećanje ukupne indukovane apoptoze (veći broj Aneksin V-pozitivnih ćelija) nakon 72 sata u odnosu na tretman od 48 sati, osim za jedinjenja **2**, **3**, **8** i **9**, kod kojih je posle dužeg izlaganja zabeležen manji procenat ćelija u apoptozi. Veća indukcija apoptoze i u odnosu na kontrolu zabeležena je kod skoro svih tretiranih uzoraka, osim za jedinjenje **7** i Formestan posle 48 h, kao i za jedinjenje **8** nakon 72 h, kod kojeg je detektovan najveći pad indukcije apoptoze tokom dužeg delovanja. Osam od devet testiranih 17-supstituisanih steroidnih derivata indukovalo je veći apoptotski odgovor u poređenju sa Formestanom posle 48 h, a četiri od njih i nakon 72 h. Najprominentnija su bila jedinjenja **4**, **6** i **7** posle tretmana od 72 h, a donekle i jedinjenje **1** (**Slika 3.12-A**). Ova četiri jedinjenja indukovala su apoptozu više nego referentno jedinjenje Formestan.

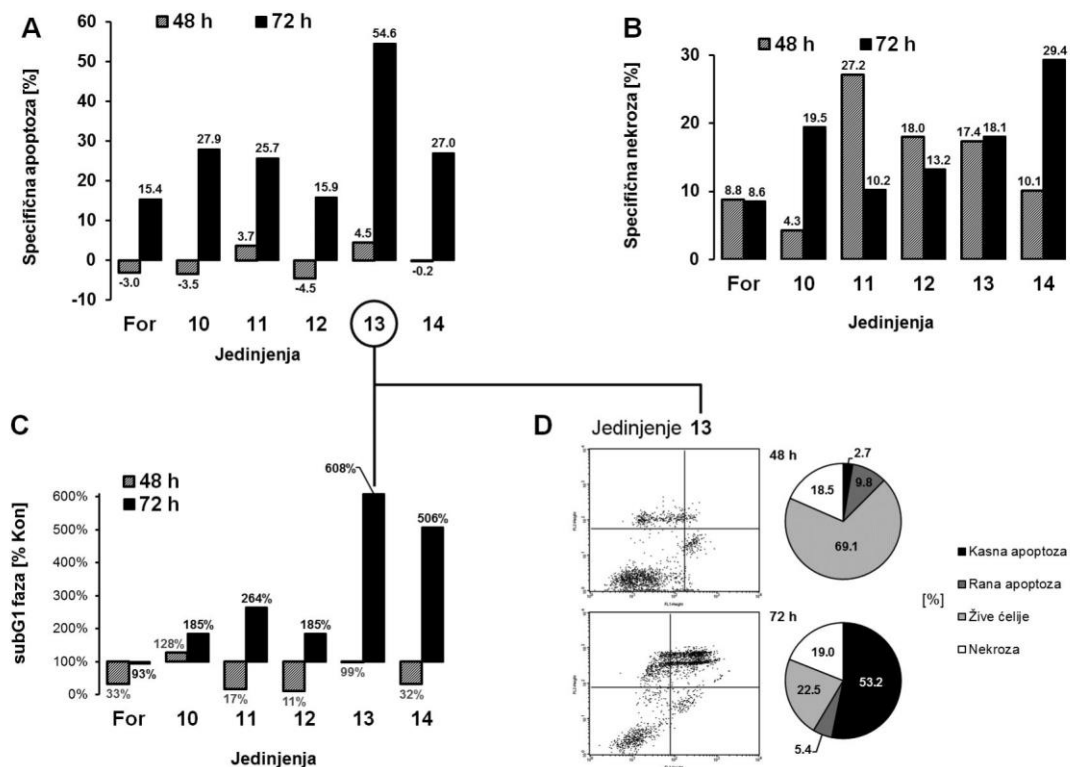


Slika 3.12: Specifična apoptoza (**A**) i nekroza (**B**) MDA-MB-231 ćelija u uzorcima tretiranim 48 i 72 sata sa pikolinskim i pikolinilidenskim steroidnim derivatima (1 – 9) i referentnim jedinjenjem Formestanom (For), dobijene analizom pomoću protočne citometrije sa Aneksinom V.

Rezultati određivanja procenata specifične apoptoze kod uzoraka tretiranih dinitrilnim derivatima (10 – 14) dati su na **Slici 3.13-A**. Dinitrilni derivati, osim jedinjenja 11 i 13, su nakon 48 h skoro svi indukovali niži procenat specifične apoptoze nego što je zabeleženo u kontrolnom uzorku. Međutim, nakon 72 h, rezultati su potpuno drugačiji: četiri (10, 11, 13 i 14) od pet jedinjenja iz ove grupe je ostvarilo vrednost specifične apoptoze >25%, a sva jedinjenja su imala jači efekat od Formestana (**Slika 3.13-A**). Od svih ispitivanih derivata postotak specifične apoptoze najviši je za jedinjenje 13 (54.59%). Na **Slici 3.13** (pod **C** i **D**) je istaknut efekat jedinjenja 13 u modulaciji subG1 faze ćelijskog ciklusa i indukciji apoptoze nakon 48 i 72 sata delovanja.

Analizom na protočnom citometru zasnovanoj na bojenju Aneksinom V mogu se razlučiti nekrotične od apoptotičnih ćelija. Rezultati određivanja specifične nekroze za pikolinske i pikolinilidenske derivate (1 – 9) prikazani su na **slici 3.12-B**, a za dinitrilne derivate (10 – 14) na **slici 3.13-B**. Sva ispitivana jedinjenja su tokom oba perioda tretmana dovela do većeg postotka nekroze ćelija u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Nakon dužeg vremena inkubacije svi pikolinski i pikolinilidenski derivati, osim jedinjenja 5, indukovala su sličan ili veći procenat nekrotičnih ćelija u poređenju sa onim dobijenim posle 48 sati tretmana i većina ovih jedinjenja je pokazala snažniji efekat od Formestana. Nakon tretmana od 72 h najmanju nekrozu izazvalo je jedinjenje 5, a najveći efekat su imala jedinjenja 1, 3, 6, 8, kao i jedinjenje 9 tokom oba

vremenska perioda. Dinitrilni derivati su u proseku indukovali veći procenat nekrotičnih ćelija od pikolinskih i pikolinilidenskih derivata, pogotovo nakon dužeg tretmana. Dinitrilni derivati **11** i **12** su nakon 72 h indukovali manje nekroze nego posle 48 h. Jedinjenje **13** je izazvalo skoro podjednaku nekrozu MDA-MB-231 ćelija (oko 18%) nakon oba inkubaciona perioda. Najveći procenat nekrotičnih ćelija od svih ispitivanih derivata nakon 48 h izazvalo je jedinjenje **11** (27,16%), a nakon 72 h jedinjenje **14** (29,35%).



Slika 3.13: Specifična apoptoza (**A**) i nekroza (**B**) MDA-MB-231 ćelija u uzorcima tretiranim 48 i 72 sata seko-dinitrilnim steroidnim derivatima (**10 – 14**), dobijene analizom pomoću protočne citometrije sa Aneksinom V. Referentno jedinjenje Formestan (For) je prikazano i na ovoj slici radi poređenja. Može se uočiti da je jedinjenje **13**, koje je indukovalo najveći postotak ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa (**C**) nakon 72 h tretmana, imalo za isti period i najveću specifičnu i ukupnu apoptozu detektovanu aneksinskim testom (**D**).

3.3.3. Analiza ekspresije apoptotskih proteina *Western blot* metodom

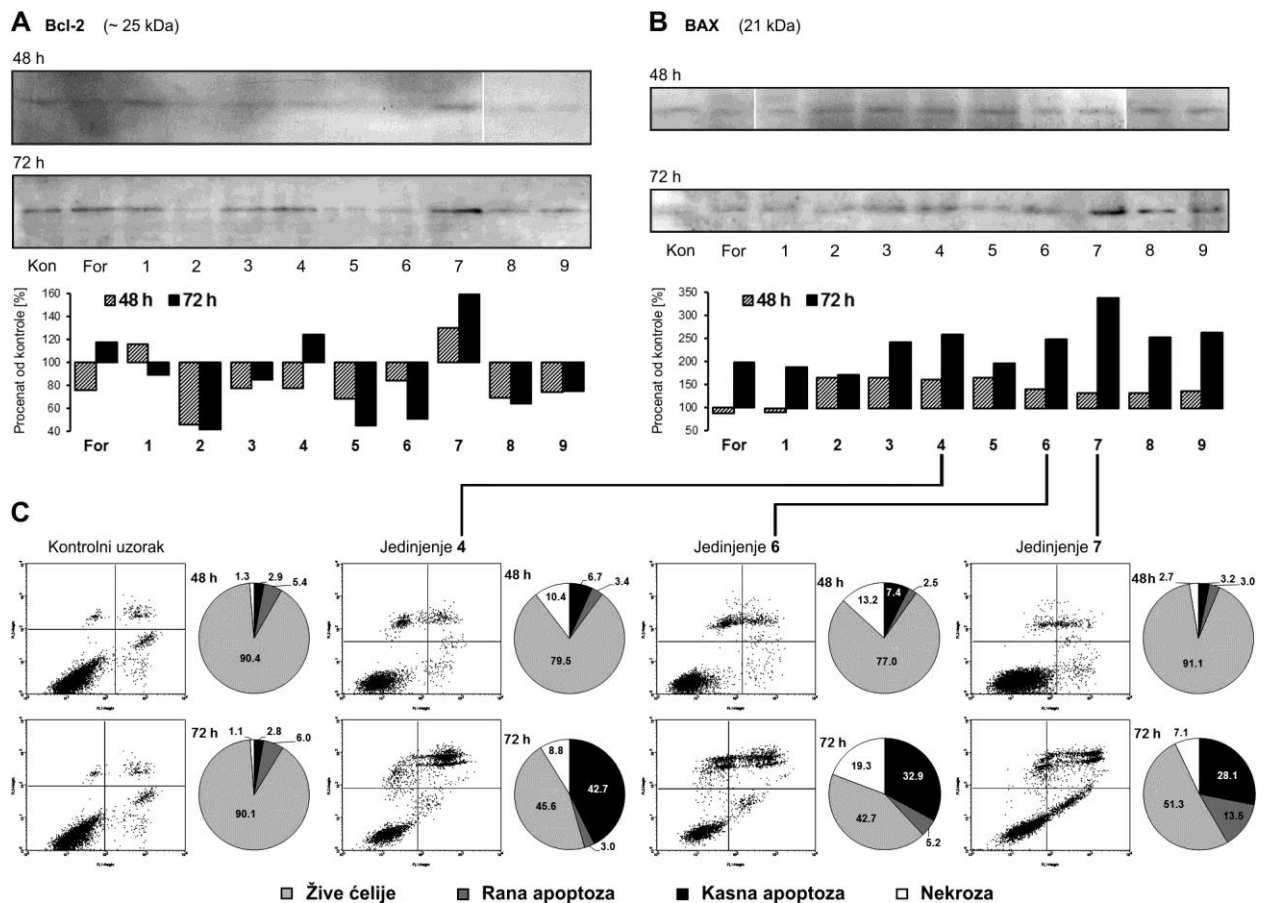
Western blot tehnika je analitička metoda koja se koristi za detekciju prisustva i kvantifikaciju ekspresije specifičnih proteina u ispitivanom uzorku homogenata tkiva ili ekstrakta ćelija. Ova tehnika koristi gel elektroforezu na kojoj se u električnom polju razdvajaju nativni proteini prema njihovoj trodimenzionalnoj strukturi ili denaturisani polipeptidni lanci u zavisnosti od njihove dužine. Proteini se nakon elektroforetskog razdvajanja prenose na postojanu membranu,

najčešće nitroceluloznu ili *PVDF* (polivinil difluorid), gde se detektuju pomoću specifičnih, najčešće monoklonskih antitela.

Nakon određivanja procenta apoptotskih ćelija, ispitivali smo ekspresiju ćelijskih proteina koji pripadaju apoptotskom signalnom putu. Koncentracija proteina u lizatu MDA-MB-231 ćelija je određena Bradfordovim proteinskim testom ²⁰⁷. Za *Western blot* analizu, po 10 μ L uzorka pripremljenog lizata koji sadrže po 50 μ g proteina je razdvojeno pomoću *SDS-PAGE* vertikalne elektroforeze i inkubirano sa primarnim monoklonskim antitelima za proteine apoptotskog signalnog puta: Bcl-2, BAX (*Bcl-2-associated X protein*), kaspazu-3 i PARP (*Poly-ADP-Ribose Polymerase*). Protein β -Actin je korišćen kao interna kontrola. Proteinski „blotovi” su razvijeni sa *ECL Plus (Enhanced Chemiluminescence)* detekcionim kitom koji sadrži sekundarna antitela obeležena peroksidazom. Hemiluminiscentni signali su zabeleženi na Hiperfilmove (*Amersham Biosciences*) i fotografisani digitalnom kamerom. Slike proteinskih ekspresija na gelovima su analizirane nakon neznatnih podešavanja nivoa osvetljenosti i kontrasta u kompjuterskom programu *ImageJ (NIH Image, <http://imagej.nih.gov>)*, a denzitometrijski podaci tretiranih uzoraka su poređeni sa podacima za kontrolni uzorak.

Nakon 48 h tretmana, od pikolinskih i pikolinilidenskih derivata, samo su jedinjenja **1** i **7** povećala ekspresiju anti-apoptotskog Bcl-2 proteina (**Slika 3.14-A**). S druge strane, ekspresija pro-apoptotskog BAX proteina je povećana u svim eksperimentalnim uzorcima osim za jedinjenje **1** i Formestan (**Slika 3.14-B**). Ekspresija enzima kaspaza-3 posle 48 h tretiranja, posebno njegove aktivne subjedinice, bila je vidljivo veća kod uzoraka izloženih jedinjenjima **1**, **2**, **6**, **7** i **9** nego kod kontrolnog uzorka i uzorka tretiranog Formestanom (**Slika 3.15**). Ekspresija PARP proteina i detekcija njegovih produkata cepanja je bila mnogo veća kod svih tretiranih uzoraka u poređenju sa kontrolom (**Slika 3.16-A**).

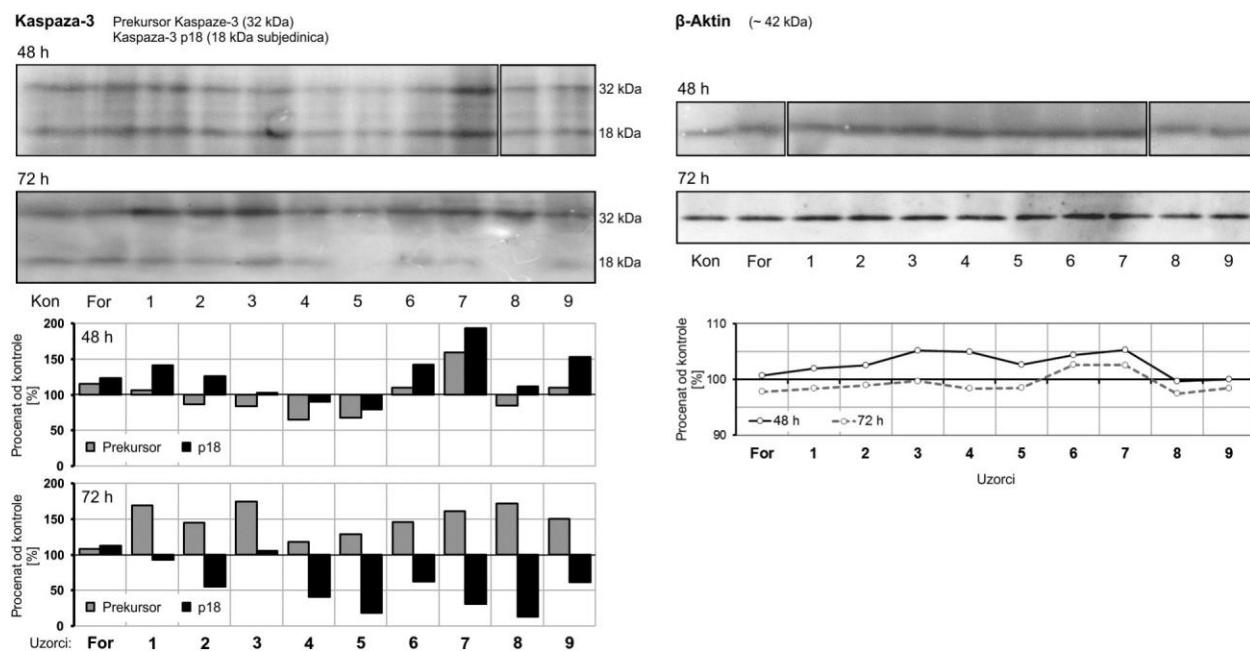
Ekspresija ispitivanih proteina posle 72 sata tretmana pikolinskim ili pikolinilidenskim jedinjenjima ukazuje na to da se proces apoptoze odigrao. To je potvrđeno detekcijom cepanja PARP proteina, koje je čak izraženije nego nakon 48 h tretmana u svim tretiranim uzorcima (**Slika 3.16-A**). Takođe, povećana ekspresija BAX proteina u odnosu na kontrolni uzorak uočena je kod svih testiranih uzoraka u većem obimu nego posle 48 h. Jedinjenje **7** je indukovalo najveću ekspresiju BAX proteina nakon 72 h izlaganja (**Slika 3.14-B**). Najznačajnije umanjene ekspresije Bcl-2 proteina nakon 72 h uočeno je kod uzoraka tretiranih jedinjenjima **2**, **5**, **6**, **8** i **9**, dok su povećanu ekspresiju izazvali derivati **4** i **7** i Formestan (**Slika 3.14-A**). Ekspresija enzima kaspaza-3 nakon 72 sata tretmana daje drugačiju sliku nego nakon 48 h. Produžena inkubacija sa pikolinskim ili pikolinilidenskim steroidnim jedinjenjima dovela je kod većine uzoraka do povećanja količine prekursora kaspaze-3 i smanjenja p18 subjedinice u poređenju sa kontrolom, sugerišući opadanje aktivnosti kaspaze-3 (**Slika 3.15**).



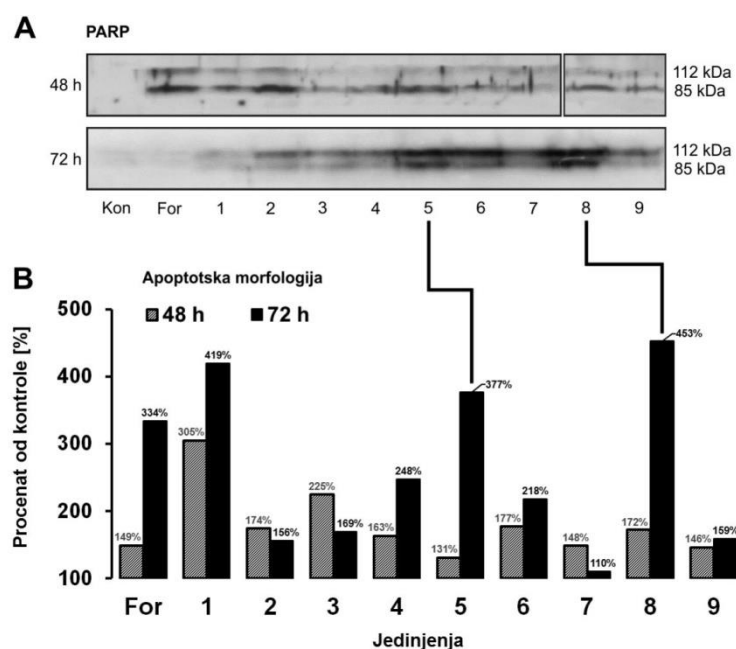
Slika 3.14: **A** i **B** – Ekspresija apoptotskih proteina Bcl-2 i BAX određena nakon tretmana 17-supstituisanim steroidima (1 – 9) i Formestanom (For) tokom 48 i 72 sata. Rezultati denzitometrijske analize su prikazani kao postotak od kontrole u dijagramima ispod svakog para detekcionih filmova. **C** – „Dot plot“ dijagrami od *Annexin V* protočno-citometrijske analize jedinjenja 4, 6 i 7 koja su indukovala najveću ekspresiju proapoptotskog BAX proteina i kontrolni uzorak radi poređenja. Procentualna zastupljenost ćelijskih populacija je prikazana dijagramima. Objašnjenje poređenja je dato u tekstu.

Ekspresija ćelijskog proteina β -aktina, koji je korišćen kao interna kontrola u eksperimentu, bila je uniformna kod svih uzoraka, a varijacije su bile unutar opsega od $\pm 5\%$ u poređenju sa kontrolnim uzorkom nakon oba tretmana (**Slike 3.15** i **3.17**).

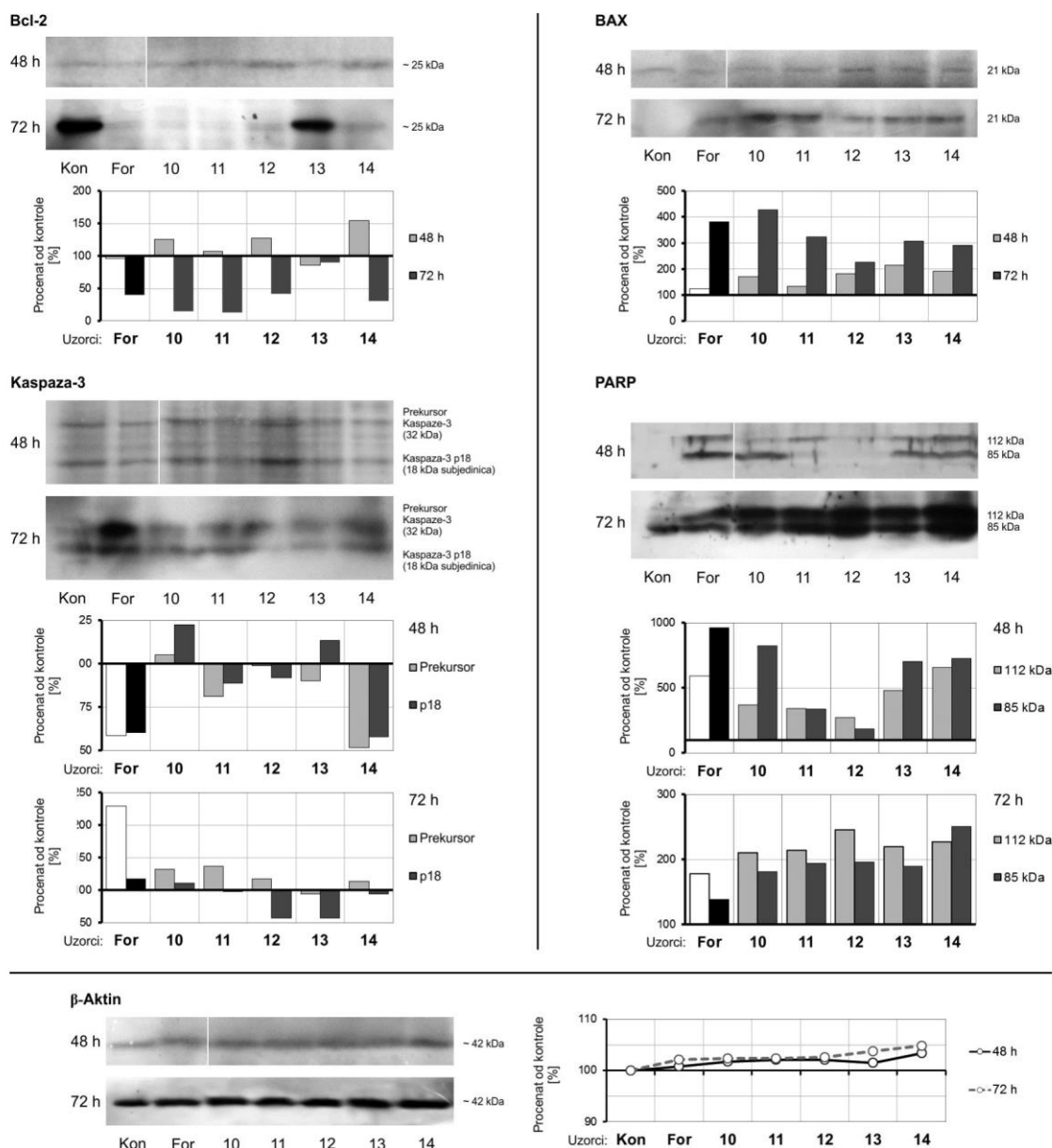
Rezultati ekspresije apoptotskih proteina kod uzoraka tretiranih dinitrilnim derivatima (**10** – **14**) dati su na **Slici 3.17**. Na sličan način kao i kod određivanja apoptoze ovih jedinjenja, rezultati nakon 72 h se razlikuju od onih dobijenih nakon 48 h delovanja. Ekspresija Bcl-2 proteina bila je nakon 48 h u nivou kontrole, osim kod jedinjenja **14**. Nakon 72 sata primetno se smanjuje ekspresija Bcl-2 proteina („downregulation“) za skoro sve dinitrilne derivate osim za **13**, što je najizraženije za jedinjenja **10** i **11**. Ekspresija BAX proteina bila je za sve dinitrilne derivate povećana već posle 48 h, a nakon 72 h dostiže maksimum za jedinjenje **10**, sa ekspresijom ovog proteina većom nego za Formestan. Jedinjenja **11**, **13** i **14** su, prilično ujednačeno, izazvala oko tri puta veću ekspresiju BAX proteina u odnosu na kontrolu.



Slika 3.15: Ekspresija enzima kaspaze-3 i proteina β-aktina određena *Western blot* analizom na MDA-MB-231 ćelijama nakon 48 i 72 sata tretmana ispitivanim steroidnim jedinjenjima (1 – 9) i Formestanom (For). Rezultati denzitometrijske analize su prikazani kao postotak od kontrolnog uzorka u dijagramima ispod slika detekcionih filmova proteina.



Slika 3.16: Poređenje nivoa ekspresije PARP proteina i indukovane apoptotske morfologije. **A** – Ekspresija PARP nakon 48 i 72 sata tretmana MDA-MB-231 ćelija ekvitoksičnim (IC_{50}) dozama ispitivanih steroidnih jedinjenja (1 – 9) i Formestana (For). **B** – Zastupljenost MDA-MB-231 ćelija apoptotske morfologije u eksperimentalnim uzorcima istih jedinjenja, prikazana kao postotak od kontrole (netretirane ćelije), procenjena vizuelnom obzervacijom nakon 48 i 72 sata tretmana IC_{50} dozama ispitivanih steroida. Objašnjenje je dato u delu 3.3.4.



Slika 3.17: Ekspresija proteina apoptotskog signalnog puta određena *Western blot* analizom na MDA-MB-231 ćelijskoj liniji nakon 48 i 72 sata tretmana seko-dinitrilnim steroidima (**10 – 14**). Formestan (For) je prikazan radi poređenja. Rezultati denzitometrijske analize su prikazani kao postotak od kontrolnog uzorka u dijagramima ispod slika detekcionih filmova proteina.

Aktivnost enzima kaspaze-3, sudeći prema ekspresiji njegovog prekursora i aktivne subjedinice, bila je različita za derivat **14** nakon 48 h u odnosu na druge dinitrilne derivate. Ovo jedinjenje, slično Formestanu, skoro dvostruko manje ekspirira oba proteinska markera kaspaze-3 u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon 72 h, ekspresija kaspaze-3 je pod dejstvom svih dinitrilnih jedinjenja bila u nivou kontrole. Detekcija PARP proteina rezultovala je povišenim vrednostima nakon 48 h u uzorcima sa jedinjenjima **10**, **13** i **14** (slično Formestanu), dok je nakon 72 h ekspresija ovog proteina, iako nešto niža u odnosu na 48 h, bila ujednačenija, sa najvišom vrednošću za jedinjenje **14**. Modulacija ekspresije apoptotskih proteina od strane seko-

dinitrilnih steroidnih derivata je takođe pokazala da, u poređenju sa pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima, ova jedinjenja deluju drugačijim mehanizmom.

3.3.4. Morfološke promene ćelija kao pokazatelj apoptoze

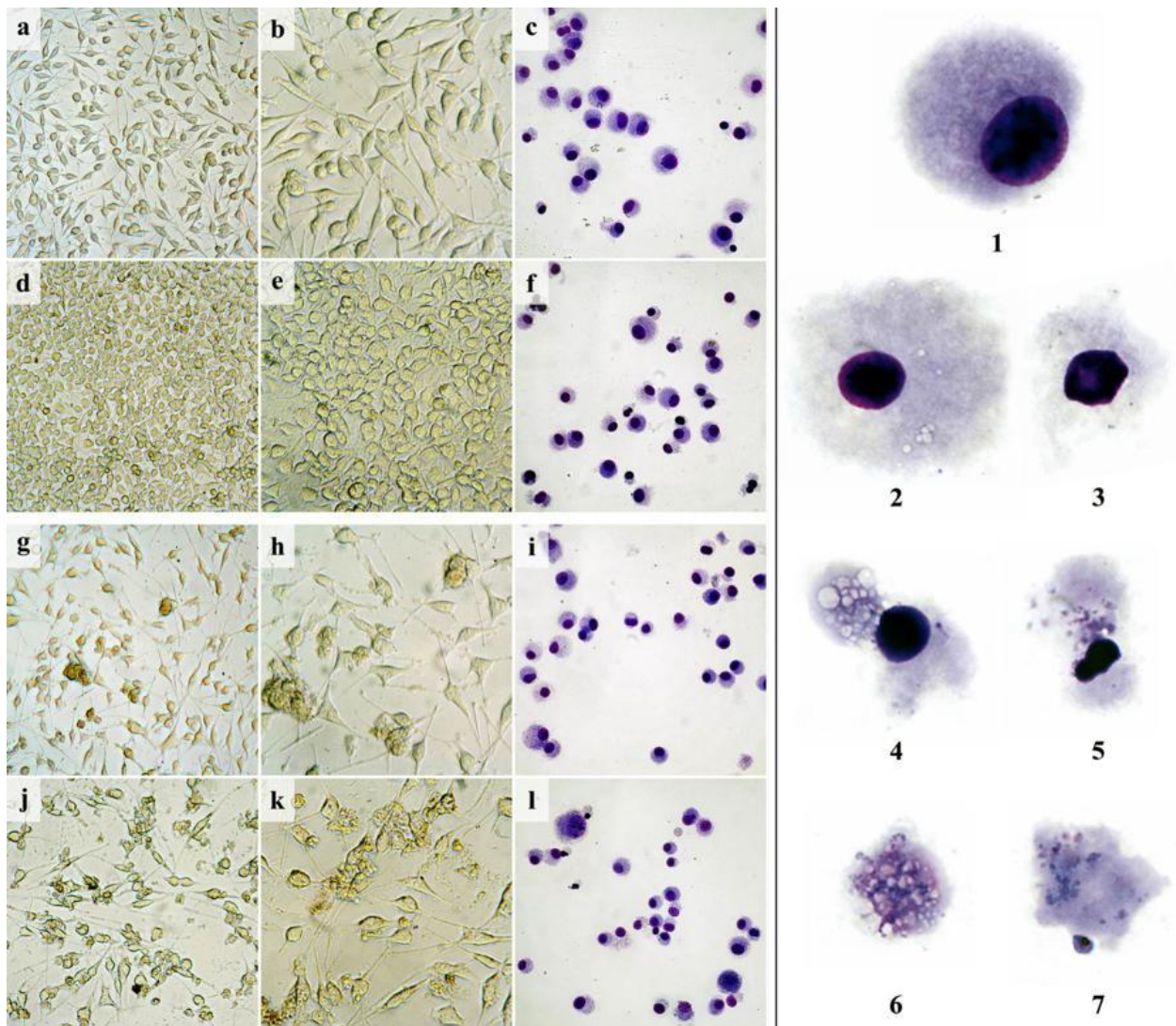
Naredna etapa istraživanja odnosila se na proučavanje sposobnosti steroidnih jedinjenja da indukuju apoptozu najsenzitivnijih ćelija, MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke, uočavanjem nastalih promena u morfologiji ćelija nakon tretiranja ispitivanim jedinjenjima, i to promena koje su povezane sa apoptotskim procesom u ćelijama. Apoptotska morfologija MDA-MB-231 ćelija je ispitivana vizuelnom opservacijom pomoću svetlosnog mikroskopa i beleženjem morfoloških promena koje se pripisuju apoptozi. Ćelije su sakupljene po istoj metodologiji kao za protočno-citometrijsku analizu. Obrada uzoraka je sprovedena po proceduri koja se koristi za citogenetski test mikronukleusa^{172, 208}. Sve manipulacije uzorcima tokom obrade bile su prilagođene, sa ciljem očuvanja citoplazme, čija retencija je bila važna radi validne detekcije i identifikacije svih morfoloških promena vezanih za apoptozu. Iz svakog uzorka je analizirano po najmanje 1000 ćelija. Procenat apoptotske morfologije uključivao je sve zabeležene morfološke promene, u odnosu na normalan ćelijski izgled.

Morfološke promene u ćelijama koje prolaze kroz apoptozu predstavljaju važan eksperimentalni dokaz apoptotskog procesa. Identifikovana je serija tipičnih morfoloških promena koji se pripisuju apoptozi (**Slika 3.18**), među kojima su: smanjenje ćelija, kondenzacija hromatina, fragmentacija i degradacija jedara i vakuolizacija citoplazme. Zabeleženo je takođe i formiranje apoptotskih telašaca kao konačni stadijum apoptotskih promena²⁰⁹. Osim navedenih morfoloških karakteristika, kod tretiranih ćelija su se mogli videti i znakovi narušavanja plazma membrane i ćelijske dezintegracije.

Kod kontrolnih uzoraka većina ćelija je izgledala normalno (**Slika 3.18-1**), sa okruglim i homogenim jezgrom. Većina tretiranih ćelija je takođe imala normalnu morfologiju. Međutim, posle tretmana ispitivanim jedinjenjima, promene u veličini ćelije, obliku i strukturi jedra i citoplazme, uočene su u znatno većem broju. Ćelije u različitim stadijumima apoptoze u tretiranim kulturama su se mogle lako razlikovati.

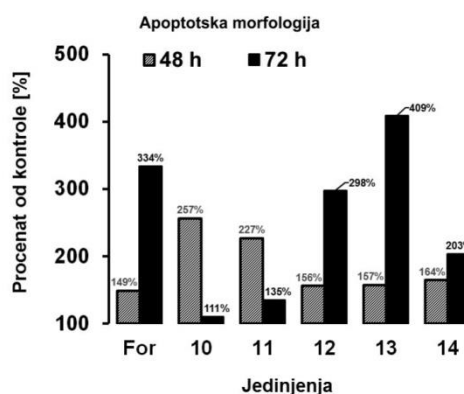
Rezultati praćenja procesa apoptoze vizuelnom opservacijom ćelijske morfologije pod mikroskopom nakon tretiranja 48 ili 72 sata IC₅₀ koncentracijama pikolinskih ili pikolinilidenskih jedinjenja (**1 – 9**) prikazani su na **Slici 3.16-B** kao procenat ćelija sa apoptotskim promenama u odnosu na ukupan broj pregledanih ćelija. U oba perioda tretmana sva ispitivana jedinjenja su indukovala veći broj ćelija sa apoptotskom morfologijom u poređenju sa netretiranim uzorkom. Nakon 48 h, većina pikolinskih i pikolinilidenskih steroidnih derivata je izazvala apoptotske morfološke promene u ćelijama slično kao kod uzorka tretiranog

Formestanom. Izdvajaju se uzorci tretirani tokom 48 h jedinjenjima **1** i **3**, koji su imali tri, odnosno dva puta veći broj ćelija sa morfološkim karakteristikama apoptoze u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Nakon 72 sata tretmana, dosledno povišena indukcija apoptotskih promena nađena je za jedinjenja **1**, **5** i **8** (oko četiri puta veća vrednost od kontrole) i Formestan. Nešto slabiji efekat imala su jedinjenja **4** i **6**. Ostala jedinjenja su indukovala promene slično ili neznatno više od onih u kontrolnom uzorku (**Slika 3.16-B**).



Slika 3.18: Morfologija netretiranih MDA-MB-231 ćelija (a – c za 48 h i d – f za 72 h) i ćelija tretiranih rastvorom jedinjenja **5** (g – i za 48 h i j – l za 72 h). Prve dve kolone slika sa leve strane sadrže mikrofotografije nativnih ćelija u kulturi fotografisanih na invertnom mikroskopu sa objektivom uvećanja 20× (leva kolona) i 40× (srednja kolona). Obojeni preparati (kolona desno) su fotografisani na svetlosnom mikroskopu sa objektivom uvećanja 10×, nakon bojenja Gimza bojom. Ćelije u tretiranim kulturama su se razlikovale po različitim stadijumima apoptoze. Apoptotska ćelijska morfolologija nasuprot normalnih ćelija (**1**) je bila jasno uočljiva u vidu kondenzovanog jedra (**2**, **3** i **4** – tamnije, piknotično jedro), vakuolizovane citoplazme (**2**, **4** i **6**), degradiranog jedra (**5**) i citoplazme (**3**, **4** i **6**), kao i preko formiranih apoptotskih telašaca (**7**). Bubrenje membrane ćelija se moglo videti samo pod većim uvećanjem.

Dinitrilni derivati su takođe izazvali apoptotične promene na tretiranim MDA-MB-231 ćelijama u postotku većem od kontrolnog uzorka (**Slika 3.19**). Nakon 48 h tretmana, za sve uzorke je taj postotak bio veći i od referentnog jedinjenja Formestana, a jedinjenja **10** i **11** su bila najefektivnija u indukovanju apoptoze. Nakon 72 h u probama sa ova dva jedinjenja je zabeležen pad apoptotskih morfoloških promena na nivo skoro jednak kontroli (posebno za jedinjenje **10**). S druge strane, za derivate **12** – **14** zabeležen je porast procenta apoptotske morfologije nakon dužeg tretiranja ćelija. Najveće vrednosti, skoro trostruko više od kontrolnog uzorka, zabeležene su za jedinjenje **12** (297,97%) i četverostruko više za jedinjenje **13** (409,16%).



Slika 3.19: Apoptotska morfologija MDA-MB-231 ćelija u eksperimentalnim uzorcima, prikazana kao postotak od kontrole (netretirane ćelije), procenjena vizuelnom opservacijom nakon 48 i 72 sata tretmana IC_{50} dozama ispitivanih seko-dinitrilnih steroida

Rezultati ispitivanja apoptoze skringom apoptotske morfologije koju su izazvali seko-dinitrilni derivati dobro se slažu sa rezultatima analize apoptoze i ćelijskog ciklusa dobijenih pomoću protočne citometrije, naročito za uzorke tretmana od 72 h. Usaglašenost sa ekspresijom proteina apoptotskog puta je nešto veća za vreme izlaganja od 48 h.

3.4. Ispitivanje genotoksičnosti steroidnih jedinjenja

Genotoksičnost steroidnih jedinjenja ispitana je na kulturama stimulisanih limfocita periferne krvi setom standardnih citogenetskih testova kojima se ovakva istraživanja vrše kod ispitivanja rizika profesionalne izloženosti ili prilikom karakterizacije novih materijala. Urađena je analiza hromozomskih aberacija i test izmene sestrinskih hromatida na preparatima metafaznih hromozoma, zatim test mikronukleusa, a oštećenja DNK su ispitana i testom „Komete“. Ove metode su osetljive, a parametri koji su ispitivani predstavljaju važne biomarkere oštećenja

hromozoma i molekula DNK, što su veoma važni parametri prilikom preliminarnih i predkliničkih ispitivanja potencijalnih lekova.

Kulture limfocita su nakon stimulacije na deobu tretirane rastvorima ispitivanih jedinjenja u koncentraciji od 100 μM , jer pri nižim koncentracijama ispitivana jedinjenja nisu pokazala značajniji uticaj. Optimalna koncentracija jedinjenja za genotoksikološka ispitivanja utvrđena je eksperimentalno. Dobijeni rezultati tretiranih uzoraka su poređeni sa kontrolnim uzorkom netretiranih limfocita i sa efektom referentnog jedinjenja Formestana.

3.4.1. Rezultati analize hromozomskih aberacija

Ispitivanje hromozomskih aberacija (HA) u kulturama limfocita je jedan od najprihvaćenih načina za procenu efekta rane biološke izloženosti genotoksičnim kancerogenim i mutagenim agensima kod ljudi^{210, 211}. U cilju otkrivanja genotoksičnog efekta, date su preporuke da se svaka eksperimentalna (izložena) grupa upoređuje sa odgovarajućom kontrolnom grupom. S druge strane, uspostavljanje „apsolutnih“ referentnih vrednosti HA je praktično nemoguće, zbog individualne varijabilnosti subjekata²¹². Iz tog razloga, ispitivanje hromozomskih aberacija izvršeno je na uzorcima limfocita periferne krvi tri dobrovoljna zdrava davaoca na osnovu informisane saglasnosti i eksperiment je ponavljen dva puta.

Preparati kompletnih metafaznih garnitura uniformno obojenih hromozoma (**Slika 3.20**) posmatrani su pod mikroskopom (uvećanje 100 \times sa uljanom imerzijom) i zbrajane su strukturne hromozomske aberacije. Po 200 metafaznih garnitura hromozoma pregledano je za svaki uzorak, a eksperiment je ponavljen dva puta.

Rezultati analize hromozomskih aberacija prikazani su u **Tabeli 3.3** kao procenti nađenih ćelija sa aberacijama. U delu „Poglavlje 6. – PRILOG“ dati su svi rezultati ove analize.

Steroidni derivati nisu izazvali veliki broj strukturnih hromozomskih oštećenja. Stabilni hromozomski rearanžnani, translokacije, inverzije i endoreduplikacije ili simetrične hromatidne izmene nisu nađene. Što se tiče nestabilnih aberacija, uočene su samo hromozomske i hromatidne pukotine (engl. „gaps“), hromozomski prekidi, acentrični fragmenti i minutni hromozomi. Dicentrični i prstenasti (engl. „ring“) hromozomi (sa ili bez centromere) sa pratećim acentričnim fragmentima nisu nađeni ni u kontrolnom ni u eksperimentalnim uzorcima, što je ujedno i bio uslov za uključivanje uzoraka u ovu analizu, čime je isključen uticaj drugih faktora, kao što je jonizujuće zračenje.



Slika 3.20: Preparat uniformno obojenih metafaznih hromozoma limfocita tretiranih Formestanom. Strelica pokazuje jednu hromatidnu leziju. Fotografisano pri uveličanju od 100×10 sa uljanom imerzijom.

Tabela 3.3: Učestalost hromozomskih aberacija u ispitivanim uzorcima, predstavljena kao broj nađenih aberacija na 100 metafaznih ćelija (%).

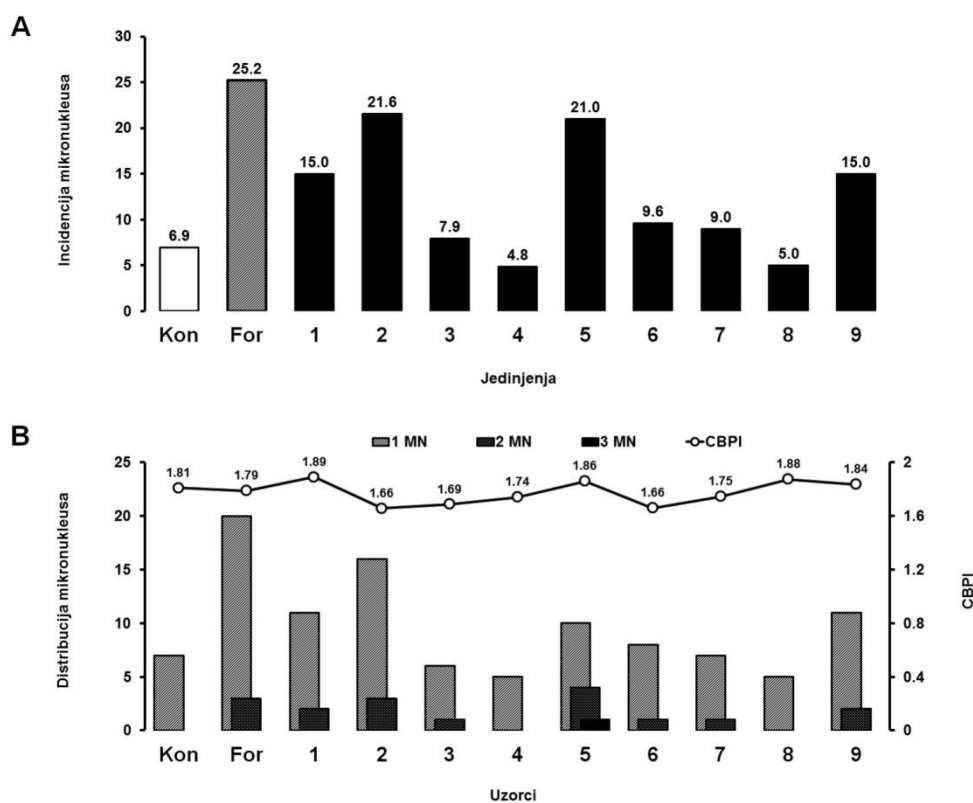
	Kontrola	For	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hromatidne aberacije:																
Hromatidne lezije (chtg)	-	0.25	-	0.08	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-
Hromatidni prekidi (chtb)	0.25	0.83	0.17	0.42	0.17	0.25	0.25	0.25	0.17	0.08	0.50	0.17	-	0.33	0.42	0.33
Hromozomske aberacije:																
Hromozomski prekidi (chrp)	0.17	0.42	-	0.42	0.08	-	0.17	-	0.08	-	0.17	-	0.25	0.25	0.08	0.08
Acentrični fragmenti (ace)	-	-	-	0.17	-	-	0.08	-	-	-	0.08	-	-	0.08	-	-
Minutni hromozomi (min)	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Rezultati predstavljaju srednju vrednost pronađenih oštećenja iz dva odvojena testiranja tri uzorka krvi zdravih dobrovoljnih davalaca, nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima u koncentraciji od 100 μ M

Najučestalije aberacije u uzorcima su bili hromozomski i hromatidni prekidi (**Tabela 3.3**). Može se videti da su ispitivana jedinjenja izazvala manji broj oštećenja nego referentno jedinjenja Formestan. Od pikolinskih i pikolinilidenskih derivata najviše aberacija je nađeno za jedinjenja **2**, **5** i **9**. Za dinitrilne derivate se može reći da su delovali ujednačenije. U uzorku sa jedinjenjem **13** je nađen najveći broj hromatidnih prekida. Svi ostali tretirani uzorci su bili uporedivi sa kontrolnim (**Tabela 3.3**).

3.4.2. Rezultati testa mikronukleusa

Kulture limfocita periferne krvi su inkubirane sa rastvorima ispitivanih jedinjenja (100 μ M). Citokineza je blokirana Citohalazinom-B, a na obojenim preparatima je pod mikroskopom analizirano po najmanje 1000 binuklearnih ćelija za svaki uzorak. Rezultati testa mikronukleusa (MN) izvedenog na kulturama limfocita periferne krvi koje su tretirane ispitivanim steroidnim derivatima **1 – 9** dati su na **Slici 3.21**, a za seko-dinitrilna jedinjenja **10 – 14** na **Slici 3.22**.



Slika 3.21: Rezultati testa mikronukleusa. **A** – Učestalost (incidencija) mikronukleusa u kulturama limfocita periferne krvi tretiranih pikolinskim ili pikolinilidenskim derivatima (**1 – 9**) i referentnim jedinjenjem Formestanom (For) u poređenju sa netretiranim kontrolnim uzorkom (Kon). **B** – Distribucija mikronukleusa (dijagram sa stubićima) predstavljena kao broj mikronukleusa (1, 2 ili 3) u binuklearnim ćelijama i proliferacioni indeks blokiranog citokineze (CBPI) kod istih uzoraka (linijski dijagram).

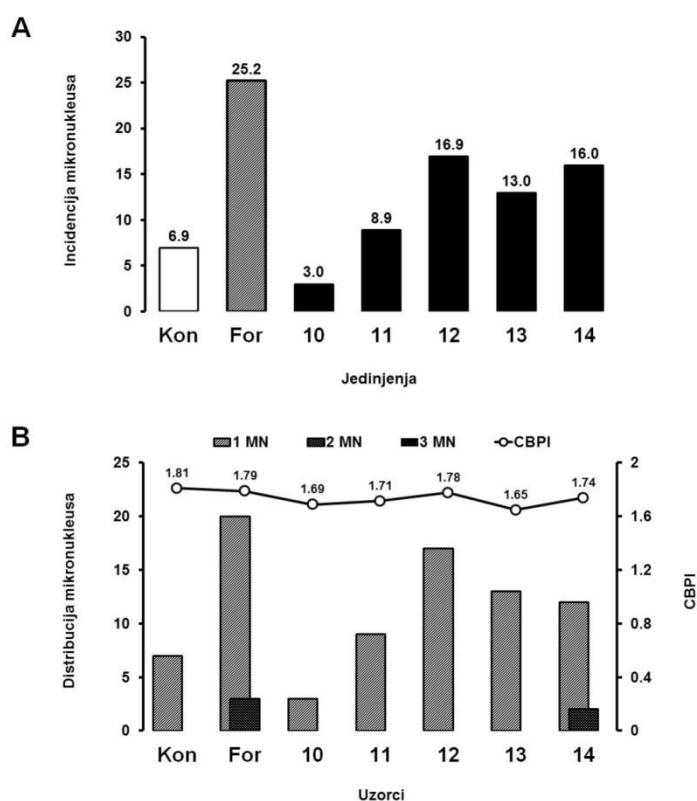
Učestalost (incidencija) mikronukleusa (MNI) je kod skoro svih uzoraka tretiranih sa pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima bila veća od kontrole, osim kod uzoraka tretiranih jedinjenjima **4** i **8**. Formestan je imao najveću incidenciju MN (25,19). Od ispitivanih jedinjenja, najveći broj mikronukleusa su indukovali derivati **2** (21,57) i **5** (20,98), a na **Slici 3.21-A** se može videti da su relativno povišene vrednosti zabeležene i za jedinjenja **1** (14,96) i **9** (14,97).

Proliferacioni indeks u kulturama uzoraka sa blokiranom citokinezom (CBPI) kretao se u granicama od 1,6 do 2,0, što su optimalne vrednosti za validnost testa i potvrda uspešne

stimulacije limfocitnih kultura. Na **Slici 3.21-B** (linijski dijagram) se vidi da je CBPI, koji inače može preslikavati proliferacioni kapacitet kao meru oštećenja genoma, opao kod većine eksperimentalnih uzoraka, sa najnižom vrednošću kod uzoraka tretiranih jedinjenjima **2**, **6** i Formestanom.

Rezultati distribucije mikronukleusa u kontrolnom i eksperimentalnim uzorcima su predstavljani kao broj binuklearnih ćelija koje sadrže od 1 do 3 (veće vrednosti nisu nađene u našim uzorcima tretiranih ili kontrolnih ćelija) mikronukleusa na 1000 analiziranih ćelija (**Slika 3.21-B**, dijagram sa stubićima). Tretman ćelija steroidnim jedinjenjima je unekoliko povećao broj binuklearnih ćelija koje sadrže više od jednog mikronukleusa, odnosno, distribucija kod ove grupe jedinjenja je bila pomerena ka većem broju mikronukleusa u ćelijama. Kod većine uzoraka su uočeni binukleari sa više od jednog mikronukleusa.

Tretiranje limfocita dinitrilnim derivatima doveo je takođe do nešto povišenih vrednosti incidencije mikronukleusa (**Slika 3.22-A**) za sve uzorke sa izuzetkom jedinjenja **10**, gde je zabeležena najmanja vrednost MN (2,98). Najveću učestalost mikronukleusa imali su derivati **12** (16,92) i **14** (15,97).

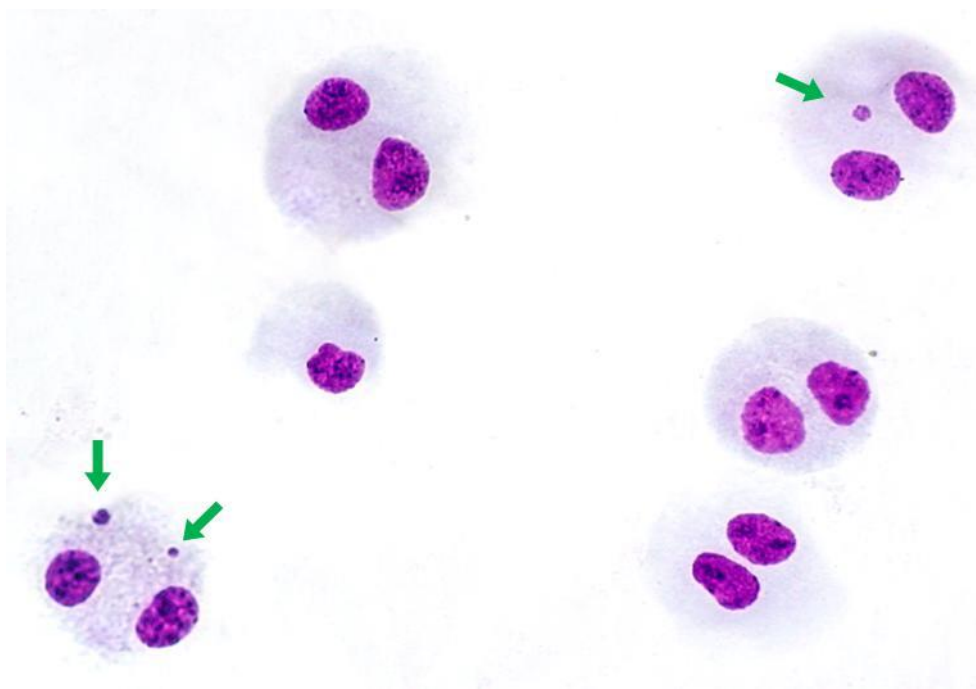


Slika 3.22: Rezultati testa mikronukleusa. **A** – Učestalost (incidenca) mikronukleusa u kulturama limfocita periferne krvi tretiranih seko-dinitrilnim steroidnim derivatima (**10** – **14**) u poređenju sa netretiranim kontrolnim uzorkom (Kon) i referentnim jedinjenjem Formestanom (For). **B** – Distribucija mikronukleusa (dijagram sa stubićima) predstavljena kao broj mikronukleusa (1, 2 ili 3) u binuklearnim ćelijama i proliferacioni indeks blokirane citokineze (CBPI) kod istih uzoraka (linijski dijagram).

Proliferacioni indeks (CBPI) kod ovih kultura je takođe bio u okviru 1,6 – 2,0, a najnižu vrednost su imali uzorci tretirani jedinjenjima **10** i **13**. Distribucija mikronukleusa nije bila izmenjena nakon tretmana ovom grupom jedinjenja (**Slika 3.22-B**).

Nije uočena značajnija razlika u kvalitetu preparata i morfološkom izgledu dobijenih binuklearnih ćelija između kontrolnog i tretiranih uzoraka u pogledu veličine i oblika ćelija i odnosa citoplazma/jedro. Na **Slici 3.23** može se videti izgled preparata uzorka tretiranog jedinjenjem **2**, koje je indukovalo najveću incidenciju mikronukleusa od svih testiranih jedinjenja, kao i označene binuklearne ćelije koje sadrže jedan, odnosno dva mikronukleusa.

Ostali parametri testa mikronukleusa, kao što su nukleoplazmatski mostići (NPB – „*Nucleo-Plasmatic Bridge*“) i jedarni pupoljci (NB – „*Nuclear Budding*“) su takođe bili obuhvaćeni analizom. Veći broj jedarnih pupoljaka, procesa pomoću kojeg mikronukleusi nastaju, u odnosu na kontrolu (2) nađen je kod uzoraka tretiranih jedinjenjima **2** (5), **10** (7), **12** (5), **13** (4) i **14** (3), dok ih je kod ostalih uzoraka bilo manje ili nisu nađeni.



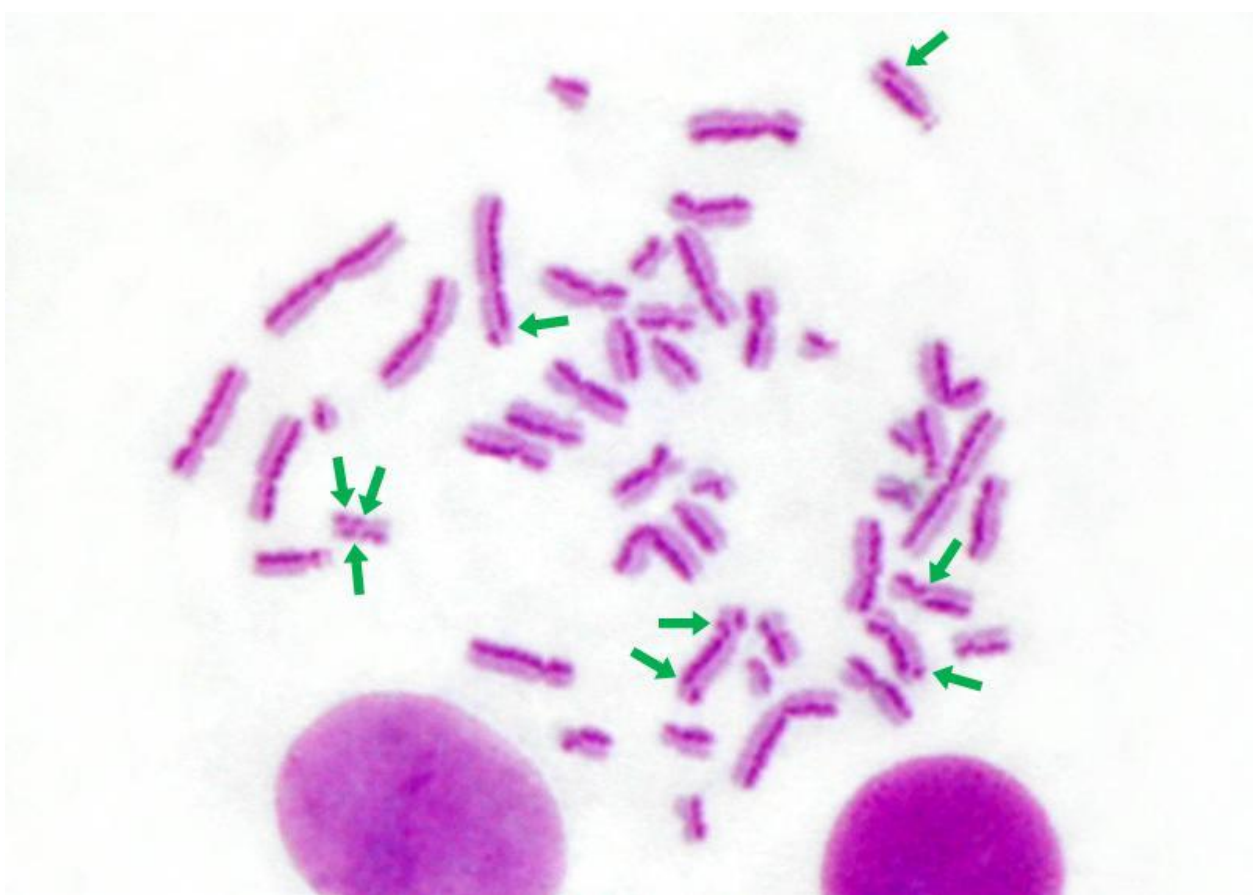
Slika 3.23: Preparat stimulisanih limfocita sa blokiranom citokinezom tretiranih rastvorom jedinjenja **2**, pripremljen za test mikronukleusa (uveličanje 40×). Vide se ćelije sa dva jedra (binukleari) i jasnim granicama citoplazme. Strelice pokazuju mikronukleuse u binuklearnim limfocitima.

Test mikronukleusa predstavlja varijaciju analize hromozomskih aberacija, budući da mikronukleusi, kao odvojeni delovi jedarnog materijala, nastaju od hromozomskih fragmenata ili celih hromozoma koji ne učestvuju u deobi. Rezultati testa mikronukleusa samo potvrđuju nalaze dobijene analizom hromozomskih aberacija i to je najvidljivije u slučaju pikolinskih i

pikolinilidenskih jedinjenja **2**, **5** i **9**, kao i seko-dinitrilnih derivata **12** – **14**. Povišena incidencija mikronukleusa u odnosu na kontrolni uzorak govori o delovanju ispitivanih derivata. Međutim, efekat svih jedinjenja je manji od referentnog jedinjenja Formestana.

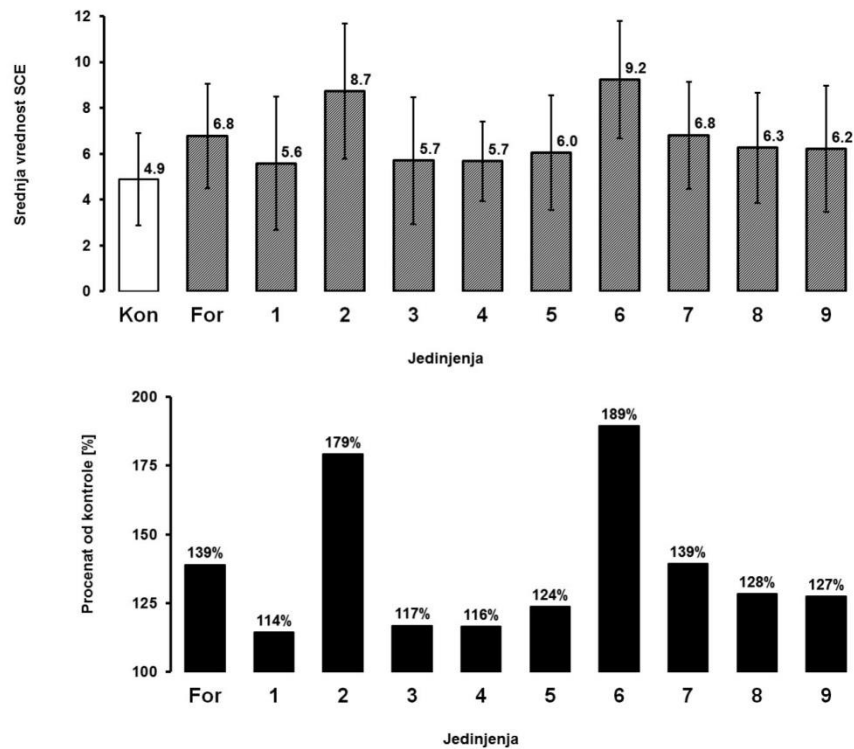
3.4.3. Rezultati SCE testa

Kulture limfocita u koje je dodat bromdeoksi-uridin (BrdU) kao analog nukleotida su nakon zasađivanja tretirane ispitivanim jedinjenjima u finalnoj koncentraciji od 100 μ M. Preparati metafaznih hromozoma su diferencijalno obojeni FPG postupkom (*Fluorescence Plus Giemsa*) i analizirani pod mikroskopom. Izmene među sestrinskim hromatidama su izbrojane analizom dva odvojena seta preparata za svaki uzorak. Prosečan broj izmena sestrinskih hromatida (SCE) je dobijen od ukupno 50 kompletnih metafaza ($2n = 46$) po uzorku, a izračunata je standardna devijacija (SD), kao i odnos sa kontrolnim uzorkom u obliku procenta. Metafazni hromozomi na svim preparatima su bili optimalno rašireni, sa dobro diferenciranim hromatidama, što se može videti na **Slici 3.24**.



Slika 3.24: Preparat hromozoma na kome se vide izmene (ukupno 9) među diferencijalno obojenim sestrinskim hromatidama limfocita tretiranih jedinjenjem **10** (uveličanje 100×10 , sa uljanom imerzijom).

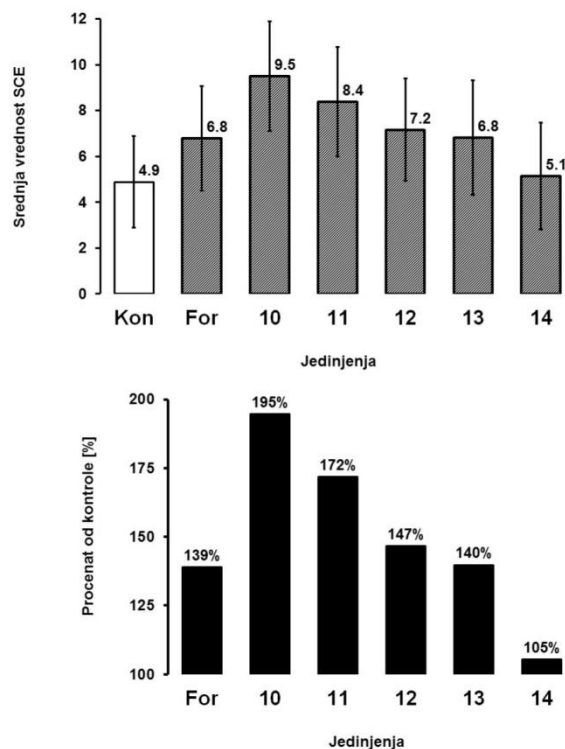
Rezultati testa izmene sestrinskih hromatida (*SCE – Sister Chromatide Exchange Test*) na kulturama limfocita tretiranim pikolinskim ili pikolinilidenskim derivatima **1 – 9** prikazani su na **Slici 3.25** kao srednja vrednost SCE dva nezavisna merenja i kao postotak od kontrolnog uzorka. Prosečna vrednost SCE po metafazi u kontrolnom uzorku iznosila je 4,88, a za Formestan je ova vrednost iznosila 6,78.



Slika 3.25: Rezultati SCE testa za pikolinske i pikolinilidenske derivate (**1 – 9**) i referentno jedinjenje Formestan (For) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Kon). Rezultati su dati u obliku izračunate srednje vrednosti SCE po metafazi iz dva odvojena ponavljanja testa (gornji dijagram) i kao postotak od kontrolnog uzorka (donji dijagram).

Kod svih pikolinskih i pikolinilidenskih derivata prosečna vrednost SCE je bila veća od kontrole, a to povećanje se kretalo od 15 do 40 procenata. Kod većine jedinjenja je SCE vrednost bila manja od Formestana. Najveći broj izmena u ovoj grupi uzoraka nađen je za jedinjenja **2** (8,74) i **6** (9,24), što predstavlja gotovo dvostruko veće vrednosti u odnosu na kontrolu.

Rezultati SCE testa za dinitrilna jedinjenja **10 – 14** dati su na **Slici 3.26**. U ovoj grupi, skoro svi derivati osim jedinjenja **14** indukovali su veću vrednost SCE i od Formestana. Najveća vrednosti SCE od svih ispitivanih steroidnih derivata dobijena je sa jedinjenjem **10** (9,50).



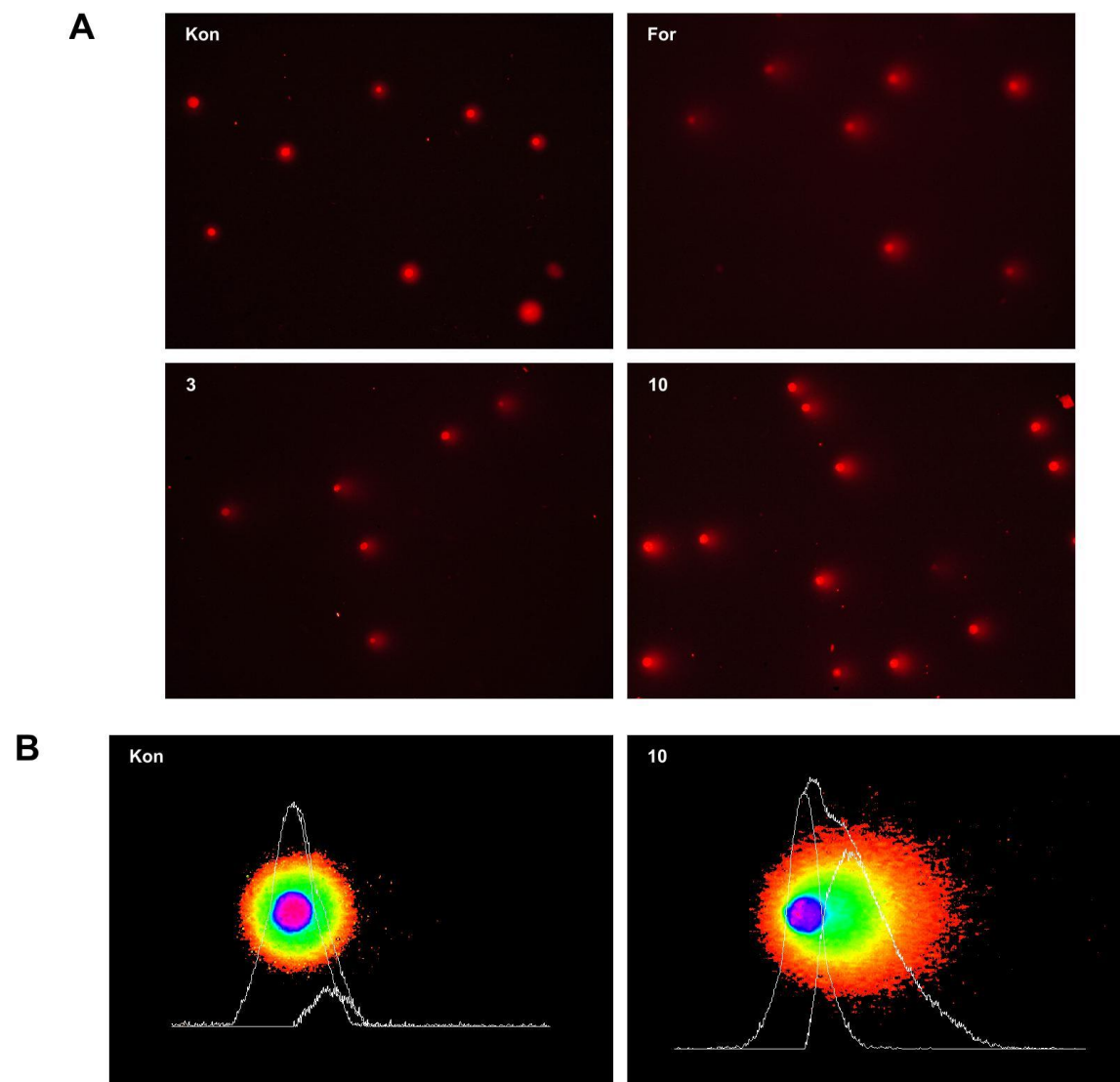
Slika 3.26: A – Rezultati testa izmene sestrinskih hromatida za ispitivane seko-dinitrilne derivate (**10** – **14**) i referentno jedinjenje Formestan (For) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Kon). Rezultati su dati u obliku srednje vrednosti SCE po metafazi iz dva odvojena eksperimenta (gornji dijagram) i kao postotak od kontrolnog uzorka (donji dijagram).

Izmene koje se dešavaju između sestrinskih hromatida unutar hromozoma ne predstavljaju oštećenja genetskog materijala ćelije i smatraju se čak protektivnim mehanizmom, odnosno reakcijom kojom ćelije „izbegavaju“ veća hromozomska oštećenja. Zbog toga je SCE test veoma osetljiva genotoksikološka metoda, a rezultati dobijeni za ispitivane derivate govore o njihovoj sličnoj ili čak manjoj genotoksičnosti u odnosu na jedinjenja koja se već koriste u terapiji.

3.4.4. Analiza oštećenja DNK pomoću testa komete

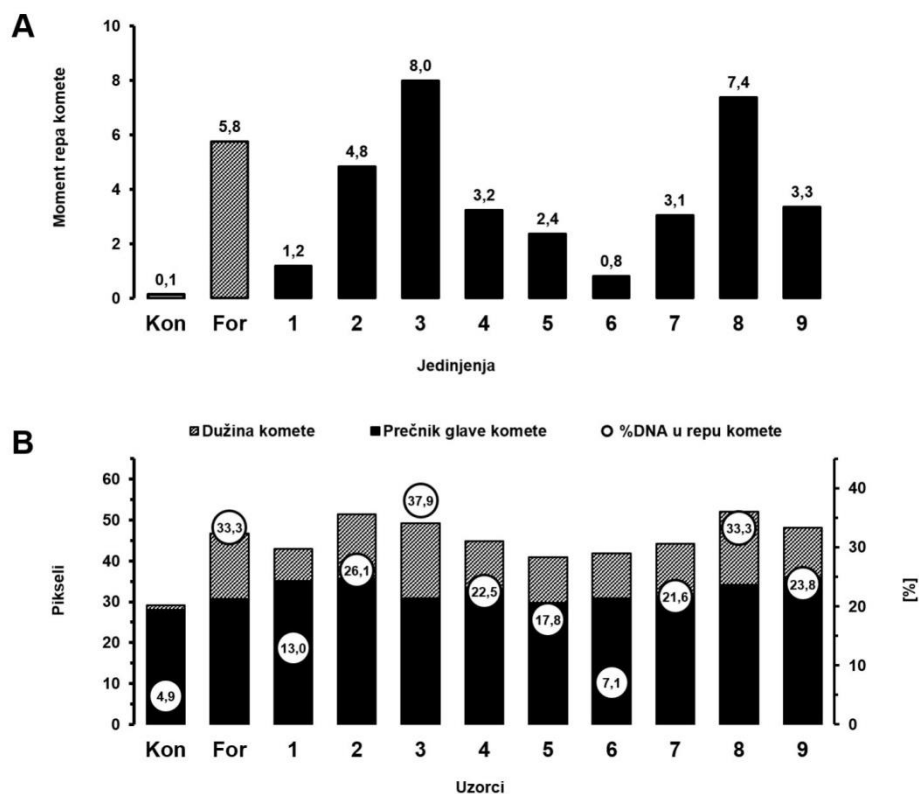
Komet esej zasniva se na elektroforetskom razdvajanju nukleinskih kiselina iz pojedinačnih ćelija (SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis*) imobilisanih u sloju agaroze. Fragmenti molekula DNK putuju u električnom polju i prelaze različitu distancu u zavisnosti od svoje mase, ostavljajući trag pored fiksirane ćelije, koji nakon bojenja fluorescentnim bojama podseća na kometu. U ovoj studiji smo koristili alkalnu varijantu Komet eseja²¹³ za procenu oštećenja DNK nakon tretiranja K562 ćelija hronične mijeloidne leukemije ispitivanim steroidnim jedinjenjima. Digitalne fotografije kometa (**Slika 3.27**) su analizirane kompjuterskim programom *CometScore*, i kvantifikovani su parametri na osnovu intenziteta fluorescentnog signala obrađenih piksela.

Program analizira više parametara. Rezultati dobijeni analiziranjem većeg broja kometa od svakog uzorka su tabelarno prikazani kao numeričke vrednosti u delu „Poglavlje 6. – PRILOG“.



Slika 3.27: **A** – Fotografije preparata kometa obojenih nakon elektroforeze fluorescentnom bojom etidijum bromid. Prikazani su preparati kontrolnog uzorka netretiranih ćelija (Kon), kao i uzoraka ćelija tretiranih Formestanom (For) i jedinjenjima **3** i **10**. Mogu se uočiti komete sa vidno drugačijom dužinom i gustinom repa kod različitih uzoraka. **B** – Poređenje kometa iz kontrolnog uzorka (Kon) i uzorka tretiranog jedinjenjem **10**, koje su analizirane kompjuterskim programom *CometScore*.

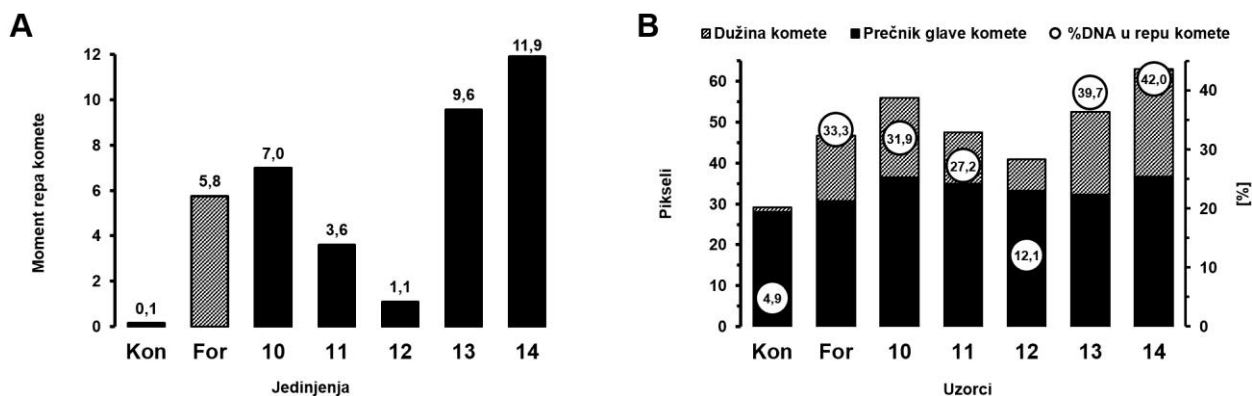
Moment repa komete („*Tail Moment*“) je uzet kao parametar za evaluaciju fragmentacije DNK. Ovaj parametar obuhvata podatke kao što su: veličina glave i repa komete, sadržaj DNK u njima, denzitet i neke druge. Rezultati Komet eseja za uzorke tretirane pikolinskim i pikolinilidenskim steroidnim derivatima prikazani su na **Slici 3.28** u obliku kvantitativnih numeričkih vrednosti parametra momenta repa komete, dimenzija repa i sadržaja DNK.



Slika 3.28: Rezultati Komet eseja za uzorke tretirane pikolinskim i pikolinilidenskim derivatima (1 – 9) i referentnim jedinjenjem Formestanom (For), zajedno sa kontrolnim uzorkom (Kon), dobijeni analizom digitalnih slika kometa kompjuterskim programom *CometScore*. **A** – Kvantifikovane vrednosti momenta repa komete. **B** – Parametri dužine komete i prečnika glave komete, kao i procenat DNK u repu komete, korišćeni za izračunavanje momenta repa komete kao glavnog parametra za evaluaciju.

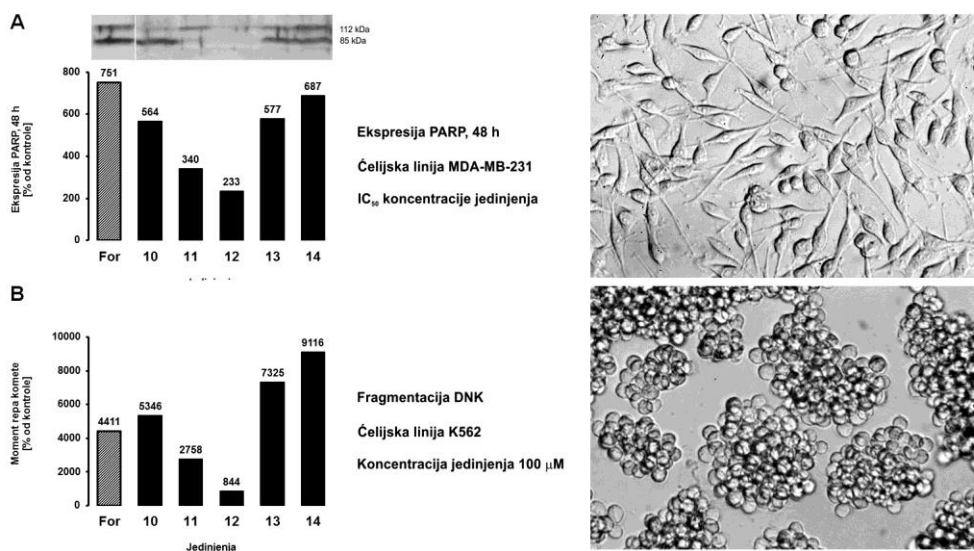
U kontrolnom uzorku (netretirane ćelije) fragmentacija DNK je bila na veoma niskom nivou (moment repa komete 0,131), dok je kod svih ispitivanih jedinjenja bila veća. Vrednost momenta repa komete je za Formestan bila je 5,758. Od pikolinskih i pikolinilidenskih derivata samo su sa derivatima **3** (7,983) i **8** (7,372) dobijene veće vrednosti ovog parametra u poređenju sa referentnim jedinjenjem. Najmanje vrednosti su dobijene za jedinjenja **1** i **6**.

Rezultati testa komete za seko-dinitrilne derivate prikazani su na **Slici 3.29**. Tri (**10**, **13** i **14**) od pet jedinjenja iz ove grupe su dala veću vrednost momenta repa kometa od Formestana. Najveća vrednost i više nego dvostruko veća od Formestana dobijena je sa jedinjenjem **14** (11,901). Od dinitrilnih steroidnih derivata, najmanje fragmentacije DNK indukovalo je jedinjenje **12** (1,102).



Slika 3.29: Rezultati Komet eseja za uzorke tretirane seko-dinitrilnim derivatima (**10 – 14**) i referentnim jedinjenjem Formestanom (For), prikazani zajedno sa kontrolnim uzorkom (Kon), dobijeni analizom digitalnih slika komete kompjuterskim programom *CometScore*. **A** – Kvantifikovane vrednosti momenta repa komete. **B** – Parametri dužine komete i prečnika glave komete, kao i procenat DNK u repu komete, korišćeni za izračunavanje momenta repa komete kao glavnog parametra za evaluaciju.

Osim za procenu genotoksičnosti, rezultati Komet eseja mogu da se posmatraju i kao pokazatelj apoptotskog procesa, budući da je fragmentacija i degradacija molekula DNK jedna od faza u tom složenom procesu. Na **Slici 3.30** je prikazana sličnost rezultata fragmentacije DNK K562 ćelija leukemije, dobijenim pomoću Komet eseja sa rezultatima ekspresije PARP proteina kod MDA-MB-231 ćelijske linije karcinoma dojke nakon 48 h tretmana dinitrilnim derivatima.



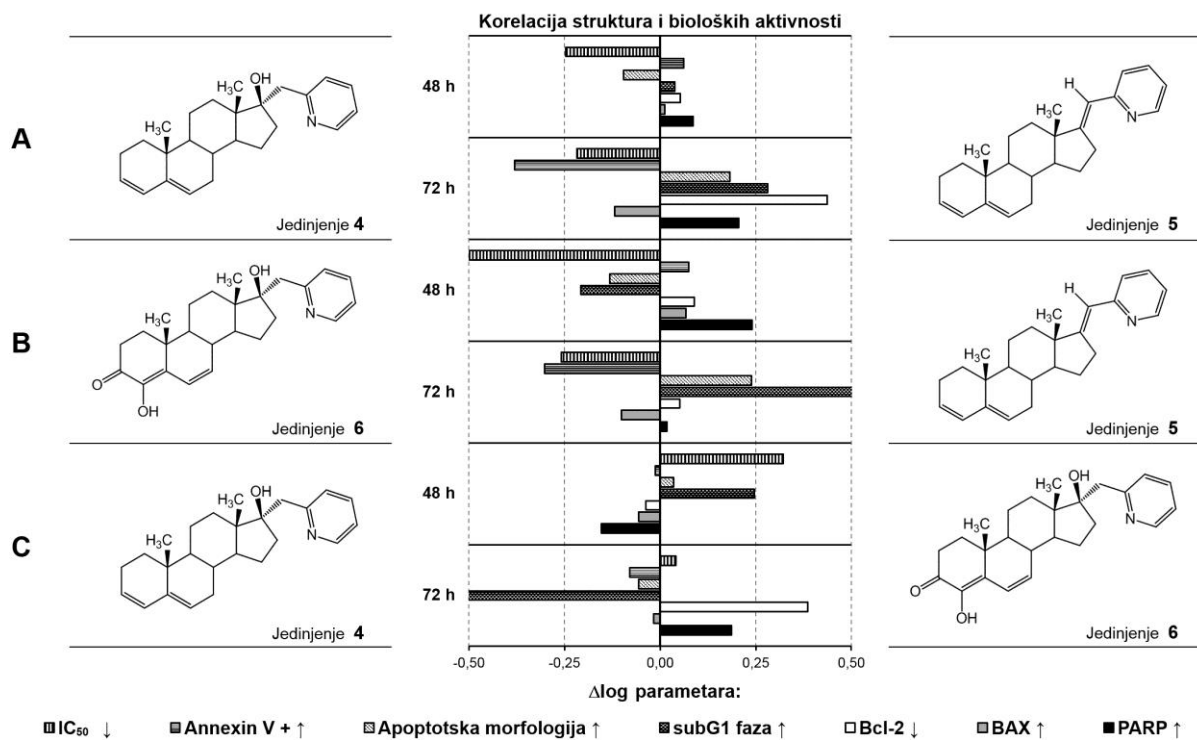
Slika 3.30: Poređenje rezultata ekspresije PARP proteina kod MDA-MB-231 ćelijske linije karcinoma dojke nakon tretmana od 48 h sa IC_{50} koncentracijama seko-dinitrilnih derivata (**10 – 14**) i Formestana (For) prikazanih kao procenat od kontrolnog uzorka (**A**) sa rezultatima ispitivanja DNK fragmentacije na ćelijskoj liniji K562 pomoću Komet eseja nakon tretmana istim jedinjenjima koncentracije $100 \mu\text{M}$ u vidu parametra momenta repa komete prikazanim takođe kao postotak od kontrole (**B**). Može se uočiti velika sličnost efekata, uprkos činjenici da su ispoljeni prema različitim tipovima ćelija. Gornja mikrofotografija prikazuje adherentne MDA-MB-231 ćelije, a donja ćelije K562 linije, koje rastu u suspenziji.

3.5. Korelacioni odnosi strukture i biološke aktivnosti

U poslednjoj etapi istraživanja urađena je analiza odnosa između strukture ispitivanih modifikovanih steroidnih jedinjenja i njihove biološke aktivnosti (*SAR*, engl. „*Structure-Activity Relationship*“), sa ciljem pronalaženja korelacije između strukturnih karakteristika tih jedinjenja i njihovog biološkog efekta. U okviru grupe pikolinskih i pikolinilidenskih jedinjenja, poređenja su vršena između derivata koji sadrže pikolil ili pikolinilidenil funkciju i različite hemijske veze u A i/ili B prstenu. Poređenja između seko-dinitrilnih steroidnih derivata su vršena po istim kriterijumima. Analizom korelacionih odnosa između strukture i aktivnosti obuhvaćeno je ukupno 6 ispitivanih jedinjenja čija se struktura kod parova čija se aktivnost poredi razlikuje samo u po jednoj funkciji.

Uzimajući u obzir rezultate ove studije, odabrana su tri od pikolinskih i pikolinilidenskih androstanskih derivata za poređenje: jedinjenja **4**, **5** i **6**. Ova jedinjenja su pokazala najjači antiproliferativni efekat na ćelijskim linijama oba tipa karcinoma dojke. Poredili smo efekte na MDA-MB-231 ćelijama nakon tretmana od 48 i 72 sata. Analizirani parametri uključuju IC_{50} vrednosti citotoksičnosti, broj ćelija u subG1 fazi i indukovanu apoptozu izmerenu *Annexin V* testom, morfološkim skriningom i preko ekspresije proteina Bcl-2, BAX i PARP. Rezultati ispitivanja odnosa strukture i aktivnosti odabranih jedinjenja prikazani su na **Slici 3.31**.

Komparacija između pikolinskih i pikolinilidenskih funkcionalnih grupa je urađena poređenjem efekata jedinjenja **4** i **5**, koji imaju isto steroidno jezgro, a razlikuju se po supstituentu u položaju 17. Iako je 17α -pikolil grupa omogućila jači antiproliferativni efekat i krajnju ekspresiju BAX proteina nakon oba perioda inkubacije, $17(E)$ -pikolinilidenski derivat ima konzistentno veću subG1 populaciju, kao i smanjenje Bcl-2 i povećanje ekspresije PARP proteina (**Slika 3.31-A**). Ovaj odnos se menja kada poredimo jedinjenje **6** sa jedinjenjem **5** (androstanski derivati različitih supstituenata u položajima 3, 4 i 17). Modulacija apoptotskih proteina je u korist jedinjenja **5**, barem za ekspoziciju od 48 h, ali jedinjenje **6** pokazuje jaču citotoksičnost (**Slika 3.31-B**). Uticaj modifikovanja A i B prstenova molekula androstana je analiziran i poređenjem bioloških efekata jedinjenja **4** i **6**. Jedinjenje **6** (koje ima proširenu konjugaciju i supstituente u prstenovima A i B, u odnosu na jedinjenje **4**) je ispoljilo mnogo veći antiproliferativni efekat nego jedinjenje **4**, kao i povećanje subG1 frakcije ćelija nakon 48 h. Produženo vreme izlaganja vraća jedan deo ovih prednosti jedinjenju **4**, ali za uzvrat oduzima ekspresiju PARP proteina i dovodi do velikog smanjenja Bcl-2 (**Slika 3.31-C**).



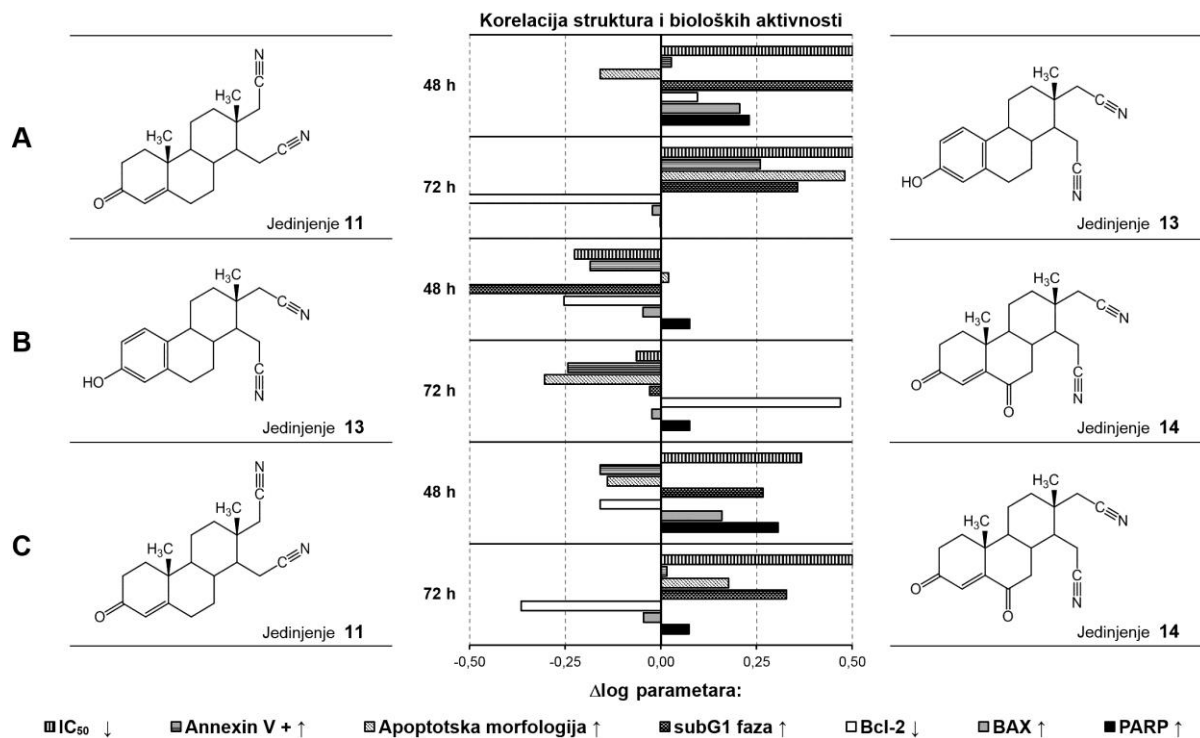
Slika 3.31: Korelacija strukture i biološke aktivnosti testiranih jedinjenja 4, 5 i 6. Efekti jedinjenja su kvantifikovani i izraženi kao $\Delta \log$, što predstavlja razliku dekadnih logaritama izmerenih vrednosti parametara derivata koji se porede: [$\log(\text{efekat 2. poređenog jedinjenja}) - \log(\text{efekat 1. izabranog jedinjenja})$]. Negativna vrednost od $\Delta \log$ odgovara većoj aktivnosti prvog derivata (leva strana dijagrama), dok pozitivna vrednost ukazuje na to da drugi derivat ima jači uticaj u odnosu na prvi (desni kvadrant). Kod parametara koji imaju reverznu korelaciju, odnosno, kada niža vrednost parametra znači jači efekat, npr. IC_{50} vrednost i smanjivanje ekspresije Bcl-2, $\Delta \log$ je izračunat obrnuto: [$\log(\text{efekat 1. jedinjenja}) - \log(\text{efekat 2. jedinjenja})$]. Objašnjenja poređenja A, B i C su data u tekstu.

Poređenje između seko-dinitrilnih steroidnih derivata **11**, **13** i **14** urađeno je na isti način i sa istim parametrima. Rezultati ispitivanja odnosa strukture i aktivnosti prikazani su na **Slici 3.32**.

Odabrana jedinjenja su pokazala jak antiproliferativni efekat na najvećem broju tretiranih ćelijskih linija, od kojih su sve pripadale malignim tumorima reproduktivnih organa, uključujući oba tipa karcinoma dojke (MCF-7 i MDA-MB-231), karcinom prostate (PC-3) i grlića materice (HeLa). Iako je derivat **14** bio neaktivan prema ćelijama MCF-7 linije, pokazao je veoma jak efekat prema ostalim navedenim linijama ($IC_{50} < 10 \mu M$). Dinitrilni derivati čiji su biološki efekti poređeni razlikovali su se u stepenu zasićenosti A prstena i prisustvu supstituenta u položaju 6.

Upoređivanje efekata seko-androstanskog derivata **11** i seko-estranskog derivata **13**, pokazalo je da jedinjenje **13** ima veći efekat po pitanju gotovo svih ispitivanih parametara za oba vremena izlaganja. Jedinjenje **11** je bilo aktivnije jedino u indukciji apoptotske morfologije nakon 48 h i

obaranju ekspresije Bcl-2 proteina (s neznatnim povećanjem ekspresije BAX proteina) nakon 72 h (Slika 3.32-A).



Slika 3.32: Korelacija strukture i biološke aktivnosti testiranih seko-dinitrilnih jedinjenja 11, 13 i 14. Kvantifikovani efekti jedinjenja su izraženi na isti način kao na Slici 3.30. Objašnjenja poređenja A, B i C su data u tekstu.

Kod poređenja seko-estranskog derivata 13 i seko-androstanskog 6-okso derivata 14, imali smo veoma sličan primer veće efikasnosti jedinjenja 13. Razlika je jedino u ekspresiji PARP proteina, koja je dosledno bila na strani jedinjenja 14 za oba perioda tretiranja (Slika 3.32-B).

Komparacijom efekata seko-androstanskih derivata 11 i 14 na MDA-MB-231 ćelije uočava se da je efektivnost jedinjenja ravnomernije raspodeljena. Tako je npr. veća aktivnost u indukciji membranskih i morfoloških apoptotskih promena nađena za jedinjenje 11, ali samo za kraći tretman (48 h). Posle tretmana od 72 h, ova prednost prelazi na stranu njegovog 6-okso analoga, tj. jedinjenja 14. Većina drugih parametara je pokazala veću vrednost za jedinjenje 14 za oba vremena tretmana. Izuzetak je ekspresija BAX proteina, koja je posle 72 h neznatno veća za jedinjenje 11. Jedino je veća sposobnost umanjavanja („downregulation“) ekspresije Bcl-2 proteina, za oba perioda tretiranja, bila na strani jedinjenja 11 (Slika 3.32-C).

Ova poređenja sugerišu da keto grupa u položaju 6 doprinosi smanjenju ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 proteina. Međutim, na osnovu poznavanja delovanja velikog broja prirodnih biološki aktivnih steroida¹⁷, podjednako je indikativna i suprotna mogućnost – da

hidroksilna grupa u položaju 3 i/ili aromatičnost A prstena (koji su odlika estrogena) dovode do povećane ekspresije Bcl-2 proteina. Ovakve pretpostavke se mogu potvrditi jedino novim, ciljanim modifikacijama steroidnih molekula, na koje upućuju rezultati komparativnih studija, što je i bio jedan on važnijih ciljeva našeg rada.

3.6. Diskusija rezultata

Iako ćelijska linija MDA-MB-231 potiče od metastatskog, hormonski nezavisnog tumora dojke, bila je veoma osjetljiva na sva ispitivana steroidna jedinjenja. Pored vidljivog antiproliferativnog efekta, jedinjenja su indukovala i apoptozu kod ove rezistentne ćelijske linije.

3.6.1. Biološki efekti pikolinskih i pikolinilidenskih jedinjenja

Rezultati naše studije su pokazali da su svi testirani 17α -pikolinski i 17(E)-pikolinilidenski androstanski derivati selektivno smanjili proliferaciju MDA-MB-231 (ER-) ćelija karcinoma dojke nakon 48 i 72 sata tretmana. Jedinjenja **4**, **5** i **6** su pritom pokazala antiproliferativnu aktivnost i prema MCF-7 (ER+) ćelijama. Sva jedinjenja su takođe bila aktivna prema PC-3 i HeLa ćelijama, a neka od njih i prema HT-29, A549 i K562 ćelijskim linijama. Nijedno od testiranih steroidnih jedinjenja nije bilo toksično prema zdravim fibroblastima pluća (MRC-5 linija).

Sva jedinjenja su menjala distribuciju faza ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke, pomerajući ćelijsku populaciju prema subG1 ili G2/M fazama, smanjujući pritom G0/G1 i sintetičku (S) fazu. Promene u distribuciji ćelijskog ciklusa su zavisile od jedinjenja i vremena izlaganja. Međutim, nijedno jedinjenje nije zaustavilo ćelije u pojedinoj fazi ćelijskog ciklusa tokom 72 h tretmana. Neki od derivata su imali specifičan način delovanja s obzirom na period izlaganja, kao npr. jedinjenje **2**, koje je izazvalo suprotan odgovor nakon 48 i 72 sata za subG1 i G2/M fazu ćelijskog ciklusa.

Prema rezultatima ispitivanja apoptoze protočno-citometrijskom analizom, najaktivnija nakon tretmana od 72 h su bila jedinjenja **1**, **4**, **6** i **7**. Morfološka studija je to potvrdila za **1**, **4** i **6**, ali je ukazala takođe i na morfološke promene koje su izazvala jedinjenja **5** i **8**. Test sa Aneksinom V je pokazao da ispitivana jedinjenja deluju na različite načine. Derivati **4** i **8** su, na primer, izazvali različit apoptotski i nekrotični odgovor u zavisnosti od dužine perioda tretiranja ćelija. To je posebno evidentno za jedinjenje **8**, koje je indukovalo više nekroze nego apoptoze u obe vremenske tačke.

Rezultati morfološke studije se generalno slažu sa rezultatima dobijenim protočnom citometrijom za većinu testiranih pikolinskih i pikolinilidenskih steroida i to je najvidljivije za jedinjenja **2**, **3**, **5** i **9**. Međutim, neka neslaganja postoje između rezultata različitih testova. Najveće odstupanje je vezano za jedinjenje **8**. Čelije tretirane ovim jedinjenjem tokom 72 h su u 18% pokazale apoptoske morfološke promene, dok Aneksin V-pozitivne ćelije nisu uopšte zabeležene protočnom citometrijom. Ova kontradikcija može da se objasni kasnom ćelijskom apoptozom i značajnom nekrozom u uzorku, što rezultira finalnom degradacijom ćelija i efektivno sprečava ukupnu detekciju membranskih apoptotskih promena koje upravo detektuje test sa Aneksinom V.

Western blot analiza je otkrila da je ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2 manja u skoro svim tretiranim uzorcima, osim za jedinjenja **1** i **7** posle 48 h i Formestana nakon 72 h izlaganja. Svi derivati su, osim jedinjenja **1** posle 48 h, indukovali veću ekspresiju proapoptotskog proteina BAX. *Western blot* analiza je takođe ukazala na to da ekspresija nekih od proteina iz apoptotskog signalnog puta nije uvek u saglasnosti sa rezultatima protočne citometrije i morfoloških testova apoptoze. Zapravo, potpuno poklapanje rezultata se ne može ni očekivati jer se manifestacija apoptotskog fenotipa događa kasnije, nakon ekspresije proteina i metaboličke aktivnosti. U biološkim sistemima mnogi faktori imaju višestruke uloge u apoptozi i mogu uticati na njen krajnji ishod²¹⁴. Ova činjenica je i bila glavni razlog zbog kojeg smo ispitivali apoptotski proces različitim metodama. Analiza ekspresije proteinskih markera apoptoze može dati bolji uvid u intracelularne procese. Proteini Bcl-2 i BAX su ključni članovi Bcl familije proteina koji se nalaze na početku apoptotskog signalnog puta^{12, 214}. Poremećaj u njihovom balansu može odvesti ćelije ili prema preživljavanju ili u smrt. Antiapoptotski Bcl-2 proteini koji potentno blokiraju unutrašnji apoptotski put su povišeni u humanim karcinomima i smatraju se ciljevima za terapijske intervencije, npr. sa strategijom snižavanja njihove ekspresije^{214, 215}. Zbog toga, smanjenje ekspresije Bcl-2 proteina koje je postignuto testiranim jedinjenjima predstavlja važan rezultat. Sa druge strane, sposobnost selektivnog povećanja ekspresije BAX proteina takođe predstavlja željeno svojstvo u takvoj strategiji. Dobro poklapanje nivoa ekspresije BAX proteina sa ukupnom indukovanom apoptotskom smrću ćelija, detektovanom pomoću protočne citometrije nakon 72 h tretmana MDA-MB-231 linije, pokazala su jedinjenja **4**, **6** i **7** (**Slika 3.14**). Detekcija cepanja PARP proteina koji je lociran na kraju apoptotskog signalnog puta, nakon oba perioda tretmana (48 i 72 sata) u svim tretiranim uzorcima, potvrđuje signalnu aktivnost i završetak apoptotskog procesa. Nivo apoptotičnih morfoloških promena takođe prati ekspresiju PARP proteina, naročito kod jedinjenja **5** i **8**. Iako je detekcija produkata cepanja PARP proteina u svim uzorcima tretiranim pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima potvrdila apoptotski proces, odsustvo aktivacije kaspaze-3 jedinjenjima **3**, **4**, **5** i **8** nakon 48 h i

svih jedinjenja izuzev **3** i Formestana posle 72 h sugeriše da ovi derivati indukuju apoptozu na način nezavisan od kaspaza.

Apoptoza tretiranih MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke je potvrđena sa više aspekata, od morfologije do ekspresije proteina. Na osnovu ovih rezultata, ispitivani 17 α -pikolinski i 17(E)-pikolinilidenski androstanski derivati mogu biti dobri kandidati za razvoj antitumorskih terapeutika. Stoga je naš rad obuhvatio i proučavanje genotoksikoloških karakteristika ovih jedinjenja, kao i novih potencijala koji mogu biti postignuti u formi kombinacija dva ili više jedinjenja koja deluju na različite načine sa međusobno sinergističkim dejstvom.

3.6.2. Biološki efekti steroidnih seko-dinitrila

Skrining antiproliferativne aktivnosti seko-dinitrilnih steroida je pokazao da su sva testirana jedinjenja ove grupe značajno smanjivala proliferaciju PC-3, HeLa i MDA-MB-231 ćelija. Sva jedinjenja su nakon 48 i 72 sata tretmana bila prilično aktivna prema ER- (MDA-MB-231), a većina njih i prema ER+ (MCF-7) ćelijama karcinoma dojke. Jedinjenja **11** i **13** su nakon 48 h imala IC₅₀ vrednost manju od 20 μ M kod čak četiri tumorske ćelijske linije (MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 i HeLa), a derivat **14** je za isto vreme delovanja imao IC₅₀ < 10 μ M kod tri ćelijske linije (MDA-MB-231, PC-3 i HeLa). Za razliku od ispitivanih pikolinskih i pikolinilidenskih jedinjenja, nijedno od dinitrilnih derivata nije pokazalo značajniju antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama HT-29, A549 i K562. Nijedan od ispitivanih seko-dinitrila nije značajnije smanjivao proliferaciju zdravih fibroblasta pluća (MRC-5 linija).

Osim nesumnjivo selektivnog antiproliferativnog efekta na ćelije kancera, steroidni seko-dinitrili su uticali i na distribuciju faza ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke. Dinitrilni steroidni derivati su ispoljili različite efekte zavisno od dužine tretmana. Većina dinitrilnih derivata (**11**, **12** i **14**) je nakon 48 h dovela do vidnog smanjenja broja ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, da bi nakon 72 h ćelijskog tretmana svi dinitrilni derivati izazvali veći procenat ćelija ove apoptotske frakcije. Najveći porast subG1 faze indukovala su jedinjenja **13** (šest puta više od kontrole i Formestana) i **14**. Takođe, za razliku od 48-časovnog, tretman od 72 h je rezultovao i smanjenjem broja ćelija u G0/G1 i G2/M fazama i povećanjem u S fazi (**Slika 3.11**).

Rezultati ispitivanja indukcije apoptoze protočnom citometrijom su pokazali skoro iste rezultate modulacije subG1 faze ćelijskog ciklusa, naročito nakon tretmana od 72 h. Svi dinitrilni derivati su za 48 h indukovali niži ili neznatno veći procenat specifične apoptoze nego u kontrolnom uzorku. Međutim, nakon 72 h, većina jedinjenja (**10**, **11**, **13** i **14**) je ostvarila vrednost od preko 25% specifične apoptoze. Sva jedinjenja su bila efektivnija od Formestana. Za jedinjenje **13** je zabeleženo čak 54.59% specifične apoptoze. Dinitrilna jedinjenja su takođe

izazvala i nekrozu MDA-MB-231 ćelija nakon oba inkubaciona perioda. Najveći procenat nekrotičnih ćelija (od svih ispitivanih derivata) izazvalo je jedinjenje **11** (27,16%) nakon 48 h i jedinjenje **14** (29,35%) nakon 72 h.

Osim membranskih apoptotskih promena detektovanih protočnom citometrijom, apoptozu MDA-MB-231 ćelija koju su izazvali seko-dinitrilni derivati potvrdila je i morfološka studija, čiji rezultati idu u prilog prethodnim, naročito za vreme tretmana od 72 h, koje je u ovom slučaju značajnije. Nakon 48 h, dinitrili su izazvali apoptotične promene na tretiranim ćelijama više od Formestana, a jedinjenja **10** i **11** su bila najefektivnija. Nakon 72 h, ova dva jedinjenja vraćaju apoptotske morfološke promene na nivo kontrolnih vrednosti (naročito jedinjenje **10**), a kod derivata **12** – **14** uočen je porast apoptotske morfologije, sa najvećom vrednošću opet za jedinjenje **13** (409,16%).

Iako se rezultati morfološkog skrininga apoptoze slažu sa rezultatima protočne citometrije za tretman od 72 h, saglasnost sa rezultatima ekspresije apoptotskih proteina je ipak veća za ekspoziciju od 48 h. Osim toga, slično kao kod rezultata ispitivanja apoptoze, ekspresija proteina nakon 48 h se razlikuje od one nakon 72 h. Naime, ekspresija Bcl-2 proteina je nakon 48 h bila u nivou kontrole kod svih jedinjenja osim **14**, a nakon 72 sata je primetan pad, takođe za većinu dinitrilnih derivata (izuzev **13**), što je najizraženije za jedinjenja **10** i **11**. Ekspresija proapoptotskog BAX proteina je kod svih dinitrilnih derivata bila povećana u odnosu na kontrolu već posle 48 h, a posle 72 h još izraženija, sa maksimalnom ekspresijom za jedinjenja **10** (većom i od Formestana), **11**, **13** i **14**.

Ekspresija prekursora i aktivne subjediniće kaspaze-3 (na osnovu čega se može pretpostaviti i aktivnost ovog enzima) nakon 48 h bila je manja od kontrole samo za derivat **14** (slično Formestanu), a nakon 72 h je za sva dinitrilna jedinjenja bila u nivou kontrole. Aktivacijom enzima kaspaze-3 dolazi do cepanja različitih "nizvodnih" proteina u signalnom putu, uključujući poli-(ADP-riboza) polimerazu (PARP)^{216, 217}. *Western blot* analizom smo pokazali proteolitičko cepanje enzima PARP u ćelijama MDA-MB-231 nakon tretmana od 72 h sa svim ispitivanim steroidnim dinitrilima, nezavisno od strukture. Ekspresija PARP proteina je bila povišena nakon 48 h za jedinjenja **10**, **13** i **14** (slično Formestanu), dok je nakon 72 h bila manja, ali ujednačenija. Evidentna ekspresija PARP proteina govori o postojanju aktivnosti signalnog puta u završnoj fazi procesa apoptoze.

Enzim PARP je uključen u mehanizam kojim se popravljaju oštećeni molekuli DNK tokom ćelijskog ciklusa isecanjem baza (engl. „*base excision repair*“) i zbog toga predstavlja jedno od biohemijskih obeležja apoptoze²¹⁸. Okidač za povećanu ekspresiju PARP proteina, tačnije produkta njegovog cepanja (i apoptozu, u krajnjoj liniji), može da bude nastanak oštećenja DNK u onoj meri u kojoj bi reparacija tih oštećenja energetski potpuno iscrpela ćeliju²¹⁸, tako da bi

ona fiziološki bila osuđena na smrt. Tada kaspaza-3 proteolitičkim cepanjem inaktivira PARP protein. Ekspresija proteinskih markera može pomoći da se sagleda u kom pravcu je prevagnula ćelijska ravnoteža prilikom iniciranja apoptoze. Ako uporedimo ekspresiju PARP proteina nakon tretmana dinitrilnim derivatima u trajanju od 48 h sa rezultatima fragmentacije DNK dobijenim pomoću Komet eseja za isto vreme izlaganja (**Slika 3.30**), može se uočiti velika sličnost izmerenih efekata, bez obzira što su ti efekti postignuti na različitim ćelijskim linijama (pa čak i različim koncentracijama jedinjenja). To se može objasniti pretpostavkom da ovi različiti parametri sa različitih aspekata opisuju jedan isti proces – fragmentaciju DNK kao posledicu inicijacije apoptoze. U prilog ovoj pretpostavci idu i rezultati ispitivanja apoptoze i ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom. To takođe može objasniti i razliku između rezultata ispitivanja genotoksičnosti citogenetskim metodama i rezultata Komet eseja. Iako je kod svih ovih testova korišćena praktično ista vrsta ćelija (kulture limfocita), kod citogenetskih testova one su stimulisane na deobu. Za ćelije u apoptozi to predstavlja barijeru koju ne mogu preći i one jednostavno nestaju iz okvira analize samim procesom obrade materijala ili po kriterijumima testiranja.

Modulacija ekspresije apoptotskih proteina je još jednom pokazala da dinitrilni steroidni derivati deluju na drugačiji način u poređenju sa pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima. Rezultati su pokazali da ispitivani seko-dinitrilni derivati, pored antiproliferativnog, imaju i proapoptotski efekat i da mogu biti podjednako dobri kandidati za razvijanje antitumorskih lekova.

3.6.3. Genotoksičnost ispitivanih steroida

Genotoksikološka studija predstavlja vredan dodatak našem *in vitro* ispitivanju citotoksičnog efekta odabranih modifikovanih steroida. Ispitujući antiproliferativnu aktivnost, citotoksične i citostatičke efekte ovih steroidnih jedinjenja na ćelijskim linijama solidnih tumora, otkrili smo da neki derivati pokazuju realan potencijal za razvoj antitumorskih lekova. Nakon ovih ispitivanja, postavilo se pitanje kako oni utiču na genetski materijal izloženih humanih ćelija. Iako bi ovakvi podaci o genotoksičnosti steroidnih jedinjenja prema humanom biološkom materijalu bili veoma značajni, nema ih mnogo^{17, 56}. U okviru ispitivanja genotoksičnosti uradili smo tri citogenetska testa: analizu hromozomskih aberacija, test mikronukleusa i test izmene sestrinskih hromatida na normalnim humanim limfocitima periferne krvi, kao i test komete na leukemijskoj ćelijskoj liniji K562. Rezultati ovih testova su generalno pokazali umerenu ili slabu genotoksičnost ispitivanih steroidnih derivata. Ovakva tvrdnja može se dati na osnovu velikog broja genotoksikoloških analiza kojima su ispitane razne klase hemijskih jedinjenja, kao i velikog broja ispitanika²¹⁹, a

uzimajući u obzir i činjenicu da u naučnoj literaturi ne postoji zvanično definisan opseg referentnih vrednosti genotoksikoloških promena.

Sprovodeći standardnu analizu hromozomskih aberacija (kao što se to čini prilikom rutinske radiološke zaštite ili ispitivanja agresivnih materijala), zapravo nije očekivano uočavanje značajnijeg povećanja hromozomskih aberacija. Cilj ovog testa je bio da se ustanovi da li su steroidni derivati svojim delovanjem izazvali oštećenja hromozoma u ćelijama. Pažnja je, pri tom, bila usmerena ka hromozomskim oštećenjima manjeg stepena, kao što su hromozomski i hromatidni prekidi i lezije, više nego prema formiranju dicentričnih i prstenastih hromozoma, acentričnih fragmenata i drugih tipova nestabilnih hromozomskih rearanžmana. Rezultati analize hromozomskih aberacija ukazuju da ispitivana jedinjenja ne izazivaju hromozomske aberacije. Kao što smo pretpostavili, primenjena koncentracija od 100 μM (najveća koja je korišćena za ispitivanje antiproliferativnog efekta), još uvek nije bila dovoljna da izazove primetne promene u strukturi i morfologiji hromozoma.

Neki od ispitivanih derivata su povećali incidenciju mikronukleusa (**1**, **2**, **5**, **9** i **12 – 14**) i do 300% u odnosu na kontrolu (**2** i **5**), utičući istovremeno i na njihovu distribuciju. Broj binuklearnih ćelija koje sadrže više od jednog mikronukleusa je povećan u uzorcima tretiranim steroidnim jedinjenjima. Međutim, sa aspekta genotoksičnosti, to ne predstavlja veliko povećanje, pogotovo ako se uzme u obzir izrazita genotoksičnost mnogih antitumorskih lekova koji su u upotrebi (npr. Mitomicin C, cisplatina, Doksorubicin i dr.)^{163, 220}. Proliferacioni indeks (CBPI), koji odražava proliferacioni kapacitet ograničen oštećenjem genoma ćelije, ukazao je na to da je ćelijska proliferacija neznatno umanjena za jedinjenja **2**, **6** i **13**.

Rezultate testa mikronukleusa treba posmatrati zajedno sa rezultatima analize hromozomskih aberacija, jer mikronukleusi i nastaju kao posledica hromozomskih aberacija ili poremećene funkcije deobnog vretena. Najčešće potiču od acentričnih hromozomskih fragmenata ili celih hromozoma, koji tokom mitoze nisu uspeli da se povežu sa deobnim vretenom. Test mikronukleusa takođe ima upotrebu u merenju hromozomskih prekida, rearanžmana, gubitka i nerazdvajanja hromozoma, amplifikacije gena, nekroze i apoptoze^{163, 221}.

Smatra se da bazalni nivo SCE predstavlja odgovor ćelija na genotoksične faktore iz okruženja i one endogenog porekla¹⁴². Ako se proces izmena sestrinskih hromatida razmotri kao neka vrsta odbrambenog mehanizma žive ćelije izložene štetnim materijama, kojim se neizbežne ireverzibilne promene na hromozomima preobraćaju u one koje su reverzibilne, pa, samim tim, i manje opasne (*recombination repair*), tada svaka supstanca koja može da modulira broj SCE može da se okarakteriše kao potencijalno genotoksičan i mutageni faktor. Rezultati SCE testa su pokazali evidentan porast izmena sestrinskih hromatida u ćelijama tretiranim jedinjenjima **2**, **6** i **10 – 13**, koje su bile skoro dvostruko brojnije za derivate **6** i **10**. Međutim, u skladu sa

navedenim podacima iz literature, genotoksičnost ispitivanih steroidnih jedinjenja ne bi se mogla okarakterisati kao značajna.

U svetu i u našoj zemlji postoji veliki broj obolelih od malignih bolesti, i terapija često nije adekvatna, odnosno, osim pozitivnih efekata usled delovanja na tkivo tumora, terapeutici deluju i na zdrava tkiva, čime podrivaju opšte zdravlje pacijenta. Zbog toga su genotoksikološka istraživanja veoma važna u pretkliničkim ispitivanjima. Steroidi su endogeni molekuli koje ljudski organizam prepoznaje kao sopstvene. Prirodna steroidna jedinjenja, generalno, nisu toksična po humane ćelije, tumorske niti zdrave. Međutim, modifikovanjem strukture molekula menja se i njihov biološki uticaj. Čak i male promene u strukturi mogu da dovedu do značajnih promena biološkog odgovora. To ovu grupu jedinjenja svrstava u potencijalne farmakone^{17, 56}. Bilo je očekivano da ispitivani steroidni derivati imaju umeren genotoksični efekat u odnosu na druge klase mnogo agresivnijih jedinjenja. S obzirom na veliki broj novih jedinjenja koja se svakodnevno sintetišu, postoji velika verovatnoća da će neki od njih naći medicinsku primenu. Stoga bi bilo neophodno znati kakve citotoksične i genotoksične efekte ispoljavaju ta jedinjenja.

Rezultati dobijeni našom genotoksikološkom studijom su pokazali da devet novosintetisanih 17 α -pikolinskih i 17(E)-pikolinilidenskih, kao i pet seko-dinitrilnih androstanskih derivata mogu biti korisna jedinjenja za dizajniranje i razvijanje lekova velikog antikancerskog potencijala sa malim genotoksičnim efektom, pa time i malim neželjenim posledicama pri terapijskim koncentracijama.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Kultivacija ćelija

4.1.1. Gajenje ćelijskih kultura

Za potrebe istraživanja ćelije su gajene u sudovima i medijumima u skladu sa specifičnim potrebama pojedinih linija. Kulture ćelija su uzgajane u potrebnoj količini za svaki pojedinačni test i sve kulture, kako za eksperimentalne tako i za kontrolne grupe, sejane su u duplikatu.

Sve hemikalije korišćene za gajenje ćelija i izvođenje eksperimenata, ukoliko nisu navedene specifikacije, su bile komercijalni reagensi *pro analysi*. Isti reagensi od različitih proizvođača nisu korišćeni istovremeno u pojedinačnim eksperimentima već su dosledno upotrebljavani kako bi uzorci koji se porede bili ispitivani u identičnim uslovima.

4.1.1.1. Sejanje i uzgajanje ćelija

Ćelijske kulture su sejane i održavane za potrebe eksperimenata u flaskonima površine 25 cm² (*Costar*) u 10 mL hranljivog medijuma sa 4,5% glukoze, 2 mM L-glutamina uz dodatak 10% (V/V) fetalnog telećeg seruma (FCS - *Foetal Calf Serum*, *Sigma Chemical Co.*, *St. Louis, MO, USA*) i rastvora antibiotika i antimikotika (*Sigma*) ili alternativno 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina (*ICN Galenika*, *Beograd, Srbija*). Kulture ćelija MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, HT-29, HeLa, A549 i MRC-5 koje rastu u jednom sloju zalepljene za podlogu (adherentne ćelije) kultivisane su u medijumu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*, *Sigma*). Ćelijska linija K562 koja raste u suspenziji i stimulisani limfociti periferne krvi zdravih ispitanika kultivisani su u medijumu RPMI 1640 (*Sigma*). Kulture su inkubirane u mraku na 37°C, u atmosferi visoke vlažnosti (>95%) i 5% CO₂ (inkubator *HeraCell*, *Heraeus*). Ćelije su pasažirane dva puta nedeljno, po postizanju konfluentnosti od 80% do 90%.

Uzorci krvi dobrovoljnih donora, na osnovu informisane saglasnosti, uzimani su venskom punkcijom u vakutajnere zapremine 5 mL koji sadrže heparin kao antikoagulant (*BD Vacutainer LH 102 I.U.*, *REF 36886*, *Becton Dickinson*) ili je uzorcima krvi dodat heparin (*ICN Galenika*) do finalne koncentracije 100 I.J./mL. Limfociti periferne krvi kultivisani su tako što je 0,5 mL pune krvi sa heparinom zasađeno u hranljivi medijum (5 mL RPMI-1640; 1 mL FCS; 2 mM L-glutamin i antibiotici). Limfociti su stimulisani na deobu fitohemaglutininom (PHA-M, PAA ili

Gibco) koncentracije 2 $\mu\text{g/mL}$. Postavljene kulture su nakon toga inkubirane u istim uslovima kao ćelijske linije.

4.1.1.2. Sakupljanje kultivisanih ćelija

Kulture ćelija su nakon kultivisanja sakupljane i tretirane postupkom specifičnim za tip ćelija. Suspenzija pojedinačnih ćelija adherentnih linija dobijana je tripsinizacijom, tj. dodavanjem rastvora 0,1% tripsina u EDTA (*Sigma* ili *Serva*), nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37°C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem kompletnog medijuma, pri čemu komponente seruma inaktiviraju tripsin. Suspenzija ćelija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1500 obrtaja u minuti (rpm), a talog ćelija zatim resuspendovan u svežem medijumu. Ćelije linije K562 u suspenziji i kultivisani limfociti periferne krvi su centrifugirani 10 minuta na 1500 rpm, a talog ćelija resuspendovan u svežem medijumu. Sve ćelije kontinuiranih linija su sakupljane u logaritamskoj fazi rasta, nakon čega su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost DET testom. U **Tabeli 4.1** su prikazani tipovi ispitivanih ćelija, uslovi i reagensi potrebni za njihovo kultivisanje.

Tabela 4.1. Uslovi održavanja i presađivanja (pasažiranja) ćelijskih kultura.

Naziv linije i tip	Kultivisanje	Pasažiranje
MCF-7 - Karcinom dojke (ER+)	DMEM + 2 mM glutamin + 10% FCS	2 puta nedeljno; 2-5×10 ⁴ /mL 0.05% tripsin u 0.1% EDTA-PBS
MDA-MB-231 - Karcinom dojke (ER-)		
PC3 - Adenokarcinom prostate		
HeLa - Karcinom grlića materice		
HT-29 - Karcinom debelog creva		
A549 - Karcinom pluća		
MRC-5 - Zdravi fibroblasti pluća		
K562 - Hronična mijelogeno leukemija	RPMI 1640 + 2 mM glutamin + 10% FCS	2 puta nedeljno; 5-10×10 ⁴ /ml
Stimulisani limfociti periferne krvi	+ 10% FCS	–

4.1.2. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

U svim eksperimentima su korišćene vijabilne ćelije između trećeg i desetog presađivanja u ekspanzionalnoj fazi rasta. Vijabilnost ćelija je bila >90% i određena je pomoću DET testa odbacivanja boje tripan plavo.

4.1.2.1. Test odbacivanja boje - DET

Za potrebe održavanja ćelijskih linija, broj ćelija i njihova vijabilnost određena je pomoću testa odbacivanja boje sa 0,1% rastvorom boje tripan plavo (DET - *trypan blue Dye Exclusion Test*)¹⁴² koja ulazi u ćeliju ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane. Tako se mrtve ćelije boje plavo, pa ih je na ovaj način moguće razlikovati od živih.

Suspenzija ćelija zapremine 50 μL je razblažena sa 200 μL rastvora boje 0,5% tripan plavo i ćelije su odmah brojane u hemocitometru (Neubauer-ova komora) na invertnom mikroskopu. Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

gde je N = ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije; N_0 = broj živih ćelija izbrojan po kvadrantu komore hemocitometra; 5 = faktor razblaženja; 10^4 = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u mL).

Vijabilnost ćelija je izračunata prema formuli:

$$V (\%) = (N_0 / (N_0 + M_0)) \times 100$$

gde je M_0 = broj mrtvih ćelija izbrojanih po kvadrantu komore hemocitometra.

4.1.3. Tretman ćelija rastvorima ispitivanih jedinjenja

Osnovni (*Stock*) rastvori ispitivanih steroidnih jedinjenja (0,1 M) u metilen hloridu kao rastvaraču su razblaženi medijumom za kultivisanje bez dodatog seruma do radnih koncentracija. U svim eksperimentima sa ćelijskim kulturama, paralelno sa eksperimentalnim uzorcima ćelija koje se tretiraju ispitivanim jedinjenjima, postavljane su i kulture netretiranih ćelija, koje su služile kao kontrole. Eksperimentalno je utvrđeno da metilen hlorid nije uticao na ćelije u koncentracijama koje su korišćene za rastvaranje jedinjenja i nije dodavan u kontrolne uzorke.

Za *in vitro* testove proliferacije (testove citotoksičnosti) ćelije su sejane osmokalnom automatskom pipetom (*Eppendorf*) u volumenu od 90 μL odgovarajućeg medijuma u mikrotitar ploče sa 96 otvora ravnog dna (*Sarstedt*). Ćelije MCF-7, MDA-MB-231, PC3, HT-29, HeLa, A549 i MRC-5 linija su zasejane po 5×10^3 ćelija po otvoru, a ćelije K562 5×10^4 ćelija po otvoru. Svaki uzorak je postavljan u kvadrplikatu prilikom svakog eksperimenta. Tako posejane ploče su stajale u inkubatoru preko noći, omogućavajući kulturama da počnu svoj rast i adherentnim ćelijama da se zalepe za dno otvora ploče. Nakon inicijalne inkubacije od 24 h, kulturama ćelija je dodato po 10 μL rastvora ispitivanih jedinjenja određene koncentracije. Ćelije su tretirane sa radnim rastvorima pet različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja, u rasponu od 10^{-8} do 10^{-4} M

(odnosno, od 0,01 do 100 μM) i dalje inkubirane pod istim uslovima. Kao referentna jedinjenja u ovim testovima su korišćeni neselektivni antiproliferativni agens Doksorubicin²⁰⁰ i steroidni inhibitor enzima aromataze Formestan^{17, 18, 197 – 199}. Ukupno vreme inkubacije kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih ispitivanim jedinjenjima za ispitivanje antiproliferativnog efekta bilo je 48 h za sve ćelijske linije, osim za linije karcinoma dojke MCF-7 i MDA-MB-231, kod kojih su izvedeni eksperimenti koji su obuhvatali tretmane u trajanju 24 h, 48 h ili 72 h, nakon čega je rađen MTT test. Kombinacije su pravljene uzimanjem jednakih zapremina odabranih jedinjenja koncentracije 100 μM . Na taj način su dobijeni radni rastvori kombinacija jedinjenja, čije se ukupne koncentracije tretirane kao 100 μM . Ćelije linije MDA-MB-231 su tretirane 48 h odgovarajućim rastvorima kombinacija jedinjenja na isti način kao i rastvorima pojedinačnih jedinjenja. Razblaženjem ovih početnih radnih rastvora kombinacija dobijene su i ostale ispitivane koncentracije od 10, 1, 0,1 i 0,01 μM . Ćelije su tretirane rastvorima kombinacija kao da se radi o samo jednom derivatu.

Za ispitivanje modulacije ćelijskog ciklusa i indukcije apoptoze, MDA-MB-231 ćelije su tretirane u flaskonima kao što su predhodno i uzgajane ili u pločama sa 6 otvora dimenzija 60×15 mm (*6-Well Plate, NUNC*), zavisno od potrebnog broja ćelija. U flaskone je sejano po 5×10^5 ćelija u 10 mL medijuma, a u ploče po 2×10^5 ćelija po otvoru u 3 mL medijuma. Sudovi sa zasejanim ćelijama su stajali u inkubatoru preko noći da se ćelije zalepe za površinu dna. Slično kao kod *in vitro* testa citotoksičnosti, ispitivana jedinjenja **1 – 14** i Formestan dodati su eksperimentalnim kulturama kao rastvor zapremine 1 mL (za flaskone) ili 300 μL (za otvore *6-well* ploča) odgovarajuće koncentracije kako bi se dobila finalna ekvivalentna koncentracija u kulturama koja je jednaka njihovoj IC_{50} vrednosti, predhodno određenoj MTT testom, za tu ćelijsku liniju i predviđeni period ekspozicije. Ćelije su zatim ponovo inkubirane, tako da je ukupno vreme izlaganja steroidnim derivatima u ekspanzionalnoj fazi rasta bilo 48 h ili 72 h (kao i za kontrolni uzorak). To je omogućilo ćelijama da prođu dve ili tri mitotičke deobe, respektivno. Nakon tog vremena tretman je prekinut i ćelije su odvojene od površine flaskona tripsinizacijom (0,1% tripsin u rastvoru EDTA), istaložene centrifugiranjem 10 min na 200×g (800 rpm) i izbrojane u 0,1% rastvoru boje tripan plavo (DET test). Pripremljene suspenzije ćelija su korišćene za eksperimente protočne citometrije i mikroskopije, kao i za *Western blot* analizu.

Za genotoksikološke testove kultivisane su ćelije K562 i stimulirani limfociti periferne krvi u flaskonima ili u pločama sa 6 otvora (*NUNC*), a ispitivana jedinjenja su dodavana odmah nakon sejanja u ekvimolarnoj koncentraciji, tako da je njihova finalna koncentracija u svim kulturama bila 100 μM . Optimalna koncentracija jedinjenja za genotoksikološke testove određena je

eksperimentalno, vodeći se delom i rezultatima citotoksičnosti jedinjenja prema ćelijskoj liniji K562 dobijenih MTT testom.

4.2. Ispitivanje citotoksičnosti *in vitro*

Antiproliferativna aktivnost odabranih steroidnih jedinjenja je evaluirana pomoću kolorimetrijskog MTT testa⁸¹ u mikrotitar pločama sa tretiranim kulturama. Test se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid] (MTT) do plavo obojenog proizvoda formazana (Slika 2.23 u Poglavlju 2. OPŠTI DEO) delovanjem enzima sukcinat dehidrogenaze iz mitohondrija. Ovim testom se detektuju vijabilne ćelije nakon tretmana jer je količina nastalog formazana direktno proporcionalna njihovom broju. Zbog toga se ovaj test može koristiti za merenje citotoksičnosti ili promena u ćelijskoj proliferaciji.

4.2.1. MTT test

Nakon završetka inkubacije u svaki otvor mikrotitar ploča dodato je po 10 µL sveže pripremljenog sterilnog rastvora MTT (5 mg/mL, *Sigma*) i inkubacija je nastavljena naredna 3 sata. Istaloženi kristali formazana su rastvoreni dodavanjem 100 µL acidifikovanog (0,04 mol/L HCl) 2-propanola u svaki otvor ploče. Nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbancija je očitana pomoću spektrofotometra (*Multiskan Accent, Thermo Labsystems*) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na pločama sa ćelijama bez ispitivanih supstanci su služili kao kontrola. Otvori koji sadrže samo kompletan medijum, bez ćelija, su korišćeni kao slepa proba (blank). Srednja vrednost kvadriplikata uzeta je za konačnu vrednost apsorbancije svakog ispitivanog uzorka.

Citotoksičnost (CI) za svaku koncentraciju ispitivanog jedinjenja izražena je u procentima, prema sledećoj formuli:

$$CI [\%] = (1 - A_s / A_k) \times 100$$

pri čemu je A_k apsorbancija kontrolnog uzorka, a A_s apsorbancija uzoraka sa ispitivanom supstancijom.

4.2.1.1. Kontrola kvaliteta MTT testa i analiza podataka

Tokom izvođenja ove grupe eksperimenata primenjeni su postupci i principi koji obezbeđuju dobijanje relevantnih rezultata testiranja citotoksičnosti. Vijabilnost posađenih ćelija je bila veća od 90%, što je određeno testom sa tripan plavim. Ćelije su korišćene u broju koji omogućava logaritamski rast u kulturama tokom trajanja celog testa. Apsorbancija (A) kontrolnih uzoraka

(netretirane ćelije u medijumu) bila je najmanje tri puta veća od srednje vrednosti A za slepu probu (samo medijum). Svaki test je ponavljen najmanje dva puta u odvojenim iteracijama za svaku koncentraciju ispitivanih jedinjenja i tokom svakog vremena izlaganja. Analiza dobijenih rezultata, statistička obrada podataka i sva izračunavanja urađena su pomoću kompjuterskog programa *Microsoft Office Excel*. Srednja vrednost, standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) izračunati su za replikate uzoraka (najmanje za triplikat) u svakom ponavljanju. Koeficijent varijacije eksperimentalnih i kontrolnih uzoraka bio je manji od 15%, a za većinu uzoraka je bio ispod 10%.

Antiproliferativna aktivnost je izražena kao IC_{50} vrednost za svako ispitivano jedinjenje, na svakoj od ispitivanih ćelijskih linija i za svaki period izlaganja. Ova vrednost je definisana kao doza jedinjenja (koncentracija za određeno vreme tretmana) koja dovodi do inhibicije rasta kulture ćelija za 50% u odnosu na netretirane ćelije kontrolni uzoraka. IC_{50} vrednost je određena „Median effect” analizom²⁰¹ takođe pomoću programa *Microsoft Office Excel*. Sinergizam citotoksičnosti jedinjenja u kombinacijama analiziran je i u kompjuterskom programu *Biosoft CalcuSyn*²⁰¹.

4.3. Metode protočne citometrije

Protočnom citometrijom je ispitana modulacija ćelijskog ciklusa i indukcija apoptoze i nekroze delovanjem steroidnih derivata na ćelije karcinoma dojke MDA-MB-231. Ispitivanje je urađeno pomoću FACS (*Fluorescence Activated Sorting Cells*) imunocitometrijskog sistema koji čine protočni citometar *BD FACSCalibur E440* i kompjuterski program *BD Cell Quest Pro* (*Becton Dickinson, San Diego, CA, USA*).

4.3.1. Ispitivanje ćelijskog ciklusa na protočnom citometru

Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je analizirana merenjem sadržaja ćelijske DNK u MDA-MB-231 ćelijama fiksiranim alkoholom i obojenim propidijum jodidom (PI) prema proceduri datoj u originalnom uputstvu proizvođača²²².

4.3.1.1. Priprema reagenasa i ćelija za DNK analizu

Rastvor ribonukleaze A (*Sigma Aldrich*) 200 jedinica/mL u 5 mL fosfatnog pufera (1×PBS – *Phosphate-buffered saline*: 9,1 mM Na_2HPO_4 ; 1,7 mM NaH_2PO_4 ; 150 mM NaCl, pH = 7,4) ugrejan je na 75 °C 20 minuta i ohlađen na sobnu temperaturu. Rastvor propidijum jodida za

bojenje ćelija napravljen je rastvaranjem 10 mg PI (*Calbiochem*), 0,1 mL *Triton X-100* (*Sigma*) i 3,7 mg EDTA (*Sigma*) u 90 mL PBS i zapremina je istim puferom podešena na 100 mL. Napravljeni rastvori su ohlađeni u frižideru i čuvani do upotrebe.

Nakon tretiranja MDA-MB-231 ćelija ispitivanim steroidnim jedinjenjima tokom 48 ili 72 sata, iz kultura je odliven medijum, a ćelije zalepljene za podlogu su isprane fosfatnim puferom (1×PBS). Ćelije su zatim tripsinizirane, sakupljene u 1 mL kompletnog medijuma (sa FCS, radi inhibicije tripsina) i izbrojane. Suspenzije su zatim centrifugirane 5 minuta na 300×g i isprane ledeno-hladnim fosfatnim puferom. Po 1 mL suspenzije (sa po 1×10^6 ćelija) u hladnom PBS-u je prebačeno u BD epruvete od 5 mL (*Becton Dickinson Falcon No. 2052*). Nakon toga su ćelije fiksirane alkoholom: u 1 mL suspenzije ćelija je dodato kap po kap 2 ml hladnog apsolutnog metanola uz mešanje na vorteksu, nakon čega su inkubirane 30 minuta na ledu, a zatim centrifugirane 5 minuta na 300×g. Supernatant je aspiriran Pasterovom pipetom. U epruvete sa istaloženim ćelijama je zatim dodato po 500 µL pripremljenog rastvora za bojenje uz laganu resuspenziju na vorteksu. Potom je dodato po 500 µL rastvora ribonukleaze A (finalne koncentracije 100 jedinica po mL) i epruvete su ponovo promešane na vorteksu. Uzorci su nakon toga inkubirani u mraku na sobnoj temperaturi 30 minuta. Pre analize na protočnom citometru, svaki uzorak je profiltriran kroz najlonsku mrežicu veličine pora 35 µm.

4.3.1.2. Očitavanje distribucije faza ćelijskog ciklusa

Opseg talasnih dužina za lasersku ekscitaciju ćelija sa propidijum jodidom je 488 – 514 nm, dok je emisiona fluorescencija PI na talasnoj dužini oko 610 nm. Parametar FL2 protočnog citometra *BD FACSCalibur E440* je korišćen za jednoparametrijsku analizu. U okviru svake analize, 20 hiljada očitavanja je zabeleženo i procenat ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (subG1, G0/G1, S i G2/M) je izračunat pomoću kompjuterskog programa *BD CellQuest Pro* (*Becton Dickinson*). Frakcija subG1 ćelijskog ciklusa je posmatrana kao apoptotska ćelijska populacija.

Rezultati očitavanja su dobijeni u obliku histograma i tabela sa numeričkim vrednostima ispitivanih parametara koji su posle obrađeni i upoređivani u kompjuterskom programu *Microsoft Office Excel*.

4.3.2. Merenje apoptoze i nekroze na protočnom citometru

4.3.2.1. Annexin-V-FITC test

Ranu fazu apoptoze karakterišu promene na površini ćelije, tj. na nivou membrane. Jedna od takvih membranskih promena je i translokacija fosfatidil-serina (PS) sa unutrašnje na spoljašnju

površinu plazma membrane. *Annexin-V* je Ca^{2+} -zavisni fosfolipid-vezujući protein (35-36 kDa) sa visokim afinitetom vezivanja za PS. Na ovoj specifičnoj reakciji vezivanja Aneksina-V za PS eksponovan na spoljašnjoj strani ćelijske membrane zasniva se detekcija apoptotskih ćelija u populaciji, ali ne i u tkivima. Budući da PS i kod nekrotičnih ćelija izlazi na spoljašnju stranu membrane, istovremeno bojenje ćelija Aneksinom-V konjugovanim sa fluorescein izotiocijanatom (FITC) i propidijum-jodidom omogućava razlikovanje apoptotskih ćelija od nekrotičnih.

Apoptoza MDA-MB-231 ćelija tretiranih 48 ili 72 sata IC_{50} koncentracijama ispitivanih steroida je evaluirana *Annexin-V-FITC* detekcionim kitom (*BD Biosciences, Pharmingen*). Po 1×10^6 ćelija svih uzoraka je sakupljeno centrifugiranjem 5 minuta na $200 \times g$ (800 rpm, *Megafuge 1.0 R, Heraeus, Thermo Fisher Scientific*), a talozi su resuspendovani u po 1 mL fosfatnog pufera (PBS, pH = 7,2). Ćelije su isprane hladnim PBS-om (po 1 mL) dva puta, a zatim resuspendovane do koncentracije 1×10^6 ćelija/mL u inkubacionom Aneksin-V vezujućem, „binding“ puferu (10 mM HEPES/NaOH, pH = 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl_2). Za proceduru bojenja, po 100 μL ćelijskih suspenzija (sa po 1×10^5 ćelija) je prebačeno u epruvete za kulture od 5 mL i pomešano sa 5 μL Aneksina-V i 5 μL propidijum jodida. Ćelije su blago promešane na vorteks mešalici i inkubirane sa dodatim fluorescentnim bojama 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, po 400 μL „binding“ pufera je dodato u svaku epruvetu i suspenzije su analizirane 1 sat kasnije na protočnom citometru *BD FACSCalibur E440* sa *Cell Quest Pro* kompjuterskim programom (*Becton Dickinson*) koristeći 488 nm za ekscitaciju i 515 nm „bandpass“ filter za detekciju fluoresceina, kao i filter >560 nm za detekciju PI. Rezultati su dobijeni kao udeo odvojenih grupa Aneksin-V i/ili PI pozitivnih ćelija, odnosno, frakcije nepromenjenih (Aneksin⁻/PI⁻), rano apoptotičnih (Aneksin⁺/PI⁻), kasno apoptotičnih (Aneksin⁺/PI⁺) i nekrotičnih (Aneksin⁻/PI⁺) ćelija.

Procenat specifične apoptoze (A_{sp}) je određen prema formuli:

$$A_{\text{sp}} [\%] = 100 \times (A_e [\%] - A_c [\%]) / (100\% - A_c [\%])$$

gde je A_e procenat apoptoze eksperimentalnog uzorka, a A_c procenat spontane apoptoze kontrolnog uzorka.

Procenat specifične nekroze određen je po sličnoj formuli.

4.4. Analiza ekspresije proteina

Western blot tehnika je analitička metoda koja se koristi za detekciju prisustva i kvantifikaciju ekspresije specifičnih proteina u ispitivanom uzorku homogenata tkiva ili ekstrakta ćelija. Ova

tehnika koristi gel elektroforezu kojom se u električnom polju razdvajaju nativni proteini prema njihovoj trodimenzionalnoj strukturi ili denaturisani polipeptidni lanci u zavisnosti od njihove dužine. Proteini se nakon elektroforetskog razdvajanja prenose na postojanu membranu, gde se zatim detektuju korišćenjem specifičnih, u prvom redu monoklonskih antitela.

4.4.1. Western blot analiza

4.4.1.1. Određivanje koncentracije proteina u lizatu ćelija

4.4.1.1.1. Pripremanje lizata za Western blot analizu

Za *Western blot* analizu pripremljeni su proteinski uzorci ćelija MDA-MB-231 linije, koje su bile tretirane ispitivanim jedinjenjima (IC_{50} koncentracijama) u pločama sa 6 otvora (6 well, NUNC). Nakon isteka inkubacije (48 ili 72 sata), ćelije su tripsinizirane, centrifugirane i isprane PBS-om, zatim prebrojane, resuspendovane u destilovanoj vodi i ostavljene 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 1300 rpm, određena je koncentracija proteina „*micro-assay*“ metodom po Bradfordu ²⁰⁷.

4.4.1.1.2. Određivanje koncentracije proteina mikro Bradford metodom

Koncentracija proteina u lizatu MDA-MB-231 ćelija je određena u mikrotitar pločama sa 96 otvora, na spektrofotometru (*Multiscan Accent, ThermoLab Systems*). Bradfordov reagens (BR) je napravljen tako što je 25 mg *Coomassie-Blue G-250*, 12,5 mL 95% etanola i 25 mL 85% H_3PO_4 dopunjeno destilovanom vodom do 25 mL. Rastvor BR je profiltriran i čuvan na 4 °C do upotrebe.

Prilikom pripreme standardne krive za određivanje koncentracije proteina u ćelijskom lizatu MDA-MB-231 ćelija, kao standard korišćen je goveđi serum albumin (BSA - *Bovine Serum Albumin*), rastvoren u destilovanoj vodi tako da koncentracija osnovnog rastvora bude 1 mg/mL. Od toga su napravljeni radni rastvori koncentracije 0,2 mg/mL koji su zamrznuti u alikvotima za bržu upotrebu. Za standardnu krivu napravljena je serija od pet razblaženja BSA (0,4; 1; 1,4; 2 i 3 μ g/mL). Analize su urađene u oktoplikatu u ukupnoj zapremini od 250 μ L po otvoru. Bradfordov reagens bez BSA je služio kao nulti standard, a destilovana voda korišćena je kao slepa proba („blank“). Standardna kriva za određivanje koncentracije proteina je memorisana kompjuterskim programom čitača *Multiscan Ascent* nakon očitavanja apsorbanci na ploči sa standardima na talasnoj dužini 620 nm.

Za merenje koncentracije proteina iz svakog uzorka liziranih ćelija je uzeto po 50 μ L, preneto u predviđene otvore nove mikrotitar ploče u koje je dodato i po 200 μ L BR. Apsorbance uzoraka su nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi očitavane na talasnoj dužini 620 nm.

Koncentracija proteina u uzorcima je izračunata na osnovu memorisane standardne krive kompjuterskim programom čitača *Multiscan Accent*.

4.4.1.2. SDS-PAGE elektroforeza

Elektroforeza proteina urađena je na natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE – *Sodium Dodecil Sulphate Polyacryl Amide Gel Electrophoresis*) pomoću aparature *MiniVE Vertical Electrophoresis Submarine Unit* (Höefer).

Proteinski ekstrakti ćelijskih lizata i pufer za uzorke (1 mL 1,25 M TRIS, pH = 6,8; 3 mL 10% natrijum-dodecil sulfat – SDS; 0,5 mL β-merkaptotanol; 2 mg brom-fenilplavo; 1 mL glicerol) su pomešani u odnosu 1:1 i zagrejani na 95 °C tokom 5 minuta.

Gelovi za elektroforezu su pripremljeni u dve faze, tako što je u okvire nosača naliven prvi sloj koji čini akrilamidni „*separate*“ gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/bis-akrilamidni štok: 30% T, 2,67% C; 0,375 M TRIS-HCl, pH = 8,8; 0,1% natrijum-dodecil sulfat – SDS; 0,675% TEMED; dopunjeno do 10 mL sa dH₂O; sa dodatkom 50 μL sveže pripremljenog 10% amonijum-persulfata – APS, neposredno pre upotrebe). Nakon polimerizacije (1 h na sobnoj temperaturi) preko prvog sloja naliven je i drugi sloj, akrilamidni „*stacking*“ gel za koncentrovanje (4,5% akrilamid/bis-akrilamid; 0,125 M TRIS-HCl, pH = 6,8; 0,1% SDS; 0,1% TEMED; dopunjeno do 10 mL sa dH₂O; sa dodatkom 100 μL svežeg 10% APS, neposredno pre razlivanja). Nakon završene polimerizacije i drugog sloja (1 h na sobnoj temperaturi), nosači sa spremnim gelovima su postavljeni u aparaturu.

Za *Western blot* analizu, 50 μg proteina po uzorku (u oko 50 μL lizata ćelija) je ubačeno mikropipetom i nastavcima sa tankim i izduženim vrhovima (*GELoader Tips*, *Eppendorf*) u bunariće pripremljenih poliakrilamidnih gelova i razdvojeno u puferu za elektroforetsko razdvajanje („*Running buffer*“: TRIS-HCl; Glicin; SDS) pomoću vertikalne elektroforetske jedinice sklopljene za dva nosača gelova dimenzija 8 × 10 cm i debljine 0,75 mm, sa izvorom struje podešenim na 250 V, 20 mA (po 10 mA za svaki gel), tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Marker molekulske mase za proteine su nabavljeni od proizvođača *Amersham Biosciences*.

4.4.1.3. Detekcija blotova

Nakon elektroforeze usledio je transfer proteina sa poliakrilamidnih gelova na poliviniliden difluoridnu (PVDF) membranu („*Hybond-P*“, *Amersham Biosciences*) u puferu za transfer (25 mM Tris; 0,2 M glicin; 20% CH₃OH; pH = 8,5) sa aparaturom podešenom na 25 V, 350 mA, 1 h na sobnoj temperaturi uz hlađenje ledom. Posle završenog elektro-transfera, membrana je obojena bojom „*Ponceau S*“ (0,1 % *Ponceau S*; 1% CH₃COOH), 5 minuta na sobnoj

temperaturi, kako bi se proverila uspešnost transfera, a potom je obezbojena u rastvoru za obezbojavanje (1% NaOH).

Sledeći korak bio je blokiranje mesta za nespecifično vezivanje na membrani inkubiranjem membrana 1 sat na sobnoj temperaturi u puferu za blokiranje (PBS; 5% bezmasno mleko u prahu; 0,1% *Tween-20*). Po završenom blokiranju membrana je isprana 2 puta po 15 minuta na sobnoj temperaturi u puferu za ispiranje (1×PBS; 0,1% *Tween-20*) uz stalno mešanje.

Nakon toga je izvršena detekcija proteina apoptotskog signalnog puta monoklonskim primarnim antitelima. Mišija monoklonska antitela za humani Bcl-2 protein i enzim Kaspazu-3 (*Caspase-3*) nabavljeni su od proizvođača *R&D Systems*, a za BAX protein (*Bcl-2-associated X protein*) i β-Aktin (koji je korišćen kao interna eksperimentalna kontrola) kupljeni su od *Calbiochem*. Zečije antitelo za *anti-poly-(ADP-ribose)-polymerase* (PARP) je kupljeno od *Santa Cruz Biotechnology*. Membrane su inkubirane sa primarnim antitelima (koncentracije 0,1 – 1 µg/mL u puferu za blokiranje) na sobnoj temperaturi 1 h, uz mešanje. Zatim su isprane 3 puta po 5 minuta u puferu za ispiranje, pa inkubirane sa sekundarnim antitelima rastvorenim u puferu za blokiranje (1:1000) na sobnoj temperaturi 1 h uz neprestano mešanje. Membrane su potom ponovo isprane 2 puta po 10 minuta puferom za ispiranje. Vezana antitela su detektovana na osnovu hemiluminescencije. Blotovi su vizuelizovani *ECL Plus* (*ECL – Enhanced ChemiLuminescence, Amersham Biosciences*) detekcionim kitom koji sadrži magareća anti-zečija i ovčija anti-mišija sekundarna antitela obeležena peroksidazom, koja su korišćena za detekciju proteina sa vezanim primarnim monoklonskim antitelima.

Hemiluminescentni signali su zabeleženi na filmovima (*Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences*), koji su razvijani sa *Kodak EX-OMAT II* razvijanjem i fiksirom, a potom fotografisani na negatoskopu sa *Canon 1100D* kamerom postavljenom na mini-tronožac. Digitalne slike ekspresije proteina, sa neznatnim podešavanjima nivoa osvetljenosti, zasićenosti i kontrasta, analizirane su denzitometrijski pomoću *ImageJ* kompjuterskog programa (NIH Image, <http://imagej.nih.gov>)²²³. Rezultati denzitometrijskog merenja upoređivani su i statistički obrađeni u programu *Microsoft Office Excel*.

4.5. Morfološka studija apoptoze

4.5.1. Analiza apoptotske morfologije svetlosnom mikroskopijom

Indukcija apoptoze MDA-MB-231 ćelija ekvitoksičnim dozama ispitivanih steroidnih derivata **1 – 14** i formestana tokom 48 ili 72 sata tretmana je takođe praćena svetlosnom

mikroskopijom, posmatranjem i poređenjem morfologije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) ćelija, odnosno, identifikacijom i zbrajanjem morfoloških promena koje se pripisuju apoptozi.

Svaka kultura ćelija, za kontrolne i eksperimentalne grupe, je sejana u duplikatu. Ista metodologija kultivacije, tretmana i sakupljanja ćelija je korišćena kao i za analize protočne citometrije. Svaka kultura je sakupljena i obrađena pojedinačno, u aseptičnim uslovima, a dalji proces obrade uzoraka sproveden je praćenjem procedure preparacije ćelija kao za citogenetski test mikronukleusa, sa izvesnim modifikacijama^{171, 172, 208}.

4.5.1.1. Obrada kultura i priprema preparata

Postupci tokom obrade su modifikovani sa osnovnim ciljem da se što više očuva ćelijska morfologija. Obrada je obuhvatala hipotoničan tretman, u cilju adekvatnog širenja ćelija i dobijanja visoko kvalitetnih ćelijskih preparata.

Ćelije su tripsinom odvojene od površine flaskona i međusobno. Nakon toga, kulture od svakog ispitivanog uzorka su prebačene u graduisane sterilne plastične epruvete, resuspendovane i centrifugirane 5 minuta na 1200 rpm. Zatim je pažljivo odstranjen supernatant Pasterovim pipetama (posebno za svaki uzorak) do oznake „1 mL“ i ćelije su tretirane tokom 2 minita hladnim (4 °C) hipotoničnim rastvorom (0,075 mol/L KCl) u ukupnoj zapremini 7 mL. Hipotonični tretman ćelija je imao za svrhu bubrenje ćelija, te time i olakšavanje posmatranja morfoloških karakteristika. Po isteku hipotonije uzorci su centrifugirani 8 minuta na 1200 rpm. Supernatant je aspiriran pipetom do 1 mL i dodato je 4 mL fiksativa, koji se sastojao od smeše metanola i sirćetne kiseline u odnosu 3:1, respektivno i sa 1% formaldehida. Fiksativ je polako dodavan, uz agitaciju ćelija, kako ne bi došlo do formiranja agregata. Uloga fiksativa je višestruka: fiksiranjem se iz biološkog materijala istiskuje voda, inaktiviraju degradacioni enzimi i sprečava mikrobiotsko dejstvo (konzervacija materijala). Uzorci su fiksirani dva puta. Nakon dodavanja prvog fiksativa, uzorci su resuspendovani, centrifugirani 8 minuta na 1100 rpm i supernatant uklonjen do 1 mL, posle čega je usledila druga fiksacija sa običnim fiksativom (bez formaldehida) do zapremine 7 mL uz blago resuspendovanje. Samo prvi fiksativ je sadržao 1% formaldehida zbog očuvanja ćelijske morfologije. Za dalji postupak se koristio običan fiksativ bez formaldehida. Suspenzija ćelija je zatim ponovo centrifugirana 8 minuta na 1200 rpm i nakon uklanjanja supernatanta, ćelije u talogu su dva puta isprane na isti način fiksativom (do 5 mL) i blago resuspendovane. Nakon poslednjeg centrifugiranja maksimalno je pipetom uklonjen supernatant, tako da se ne remeti talog ćelija. Finalna suspenzija ćelija je napravljena dodavanjem fiksativa do 0,8 mL i nakon resuspendovanja naneta na čista i suva predmetna stakla. Tako napravljeni preparati su ostavljeni da se potpuno osuše, a zatim su nakon 24 h dehidracije obojeni 2%-tnim rastvorom Gimza boje (*Giemsa, Merck*) u kalijum fosfatnom

puferu (Sorensenov pufer, pH = 7,3). Napravljeno je po najmanje dva preparata od svake obrađene kulture.

Broj ćelija u različitim fazama apoptoze, kao i broj nekrotičnih i neizmenjenih ćelija određivan je mikroskopiranjem, pri čemu je za prepoznavanje morfoloških struktura korišćena Gimza boja. Iako je Gimza boja specifična za fosfatne grupe DNK i vezuje se za regione bogate A-T parovima baza, ovom bojom se mogu vizuelizovati i ostale ćelijske strukture i to u citoplazmi svetlo-plavom bojom, a u jedru ćelije ljubičastom.

4.5.1.2. Analiza morfologije

Sve manipulacije prilikom obrade ćelijskog materijala (hipotonični tretman, fiksacija i centrifugiranje) prilagođene su najviše radi očuvanja ćelijske citoplazme. Retencija citoplazme je važna zbog validne detekcije i identifikacije svih morfoloških karakteristika vezanih za apoptozu. Preparati su posmatrani i analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa (*Olympus BX51*). Svi mikroskopski preparati su kodirani pre mikroskopiranja i posmatrani bez informacija o poreklu materijala radi što objektivnije analize.

Analizirano je po najmanje 1000 ćelija za svaki uzorak. Morfološke promene brojane su pri uvećanju od 40×15, a određene morfološke karakteristike su posmatrane i analizirane i pri uvećanju od 100×15. Identifikovane morfološke karakteristike ćelija koje su brojane tokom eksperimenta su uključivale normalne ćelije i sve oblike indukovanih morfoloških promena koje predstavljaju attribute apoptoze²⁰⁹.

Snimci nativnih ćelija u kulturi, kao i analiziranih obojenih preparata napravljeni su digitalnim fotoaparatom *Canon EOS 1100D* postavljenim na invertni mikroskop *BioStar (Reichert)* sa uvećanjima 10×10, odnosno 20×10 i digitalnom kamerom *Olympus Camedia 3040* postavljenom na svetlosni mikroskop i povezanom sa kompjuterom, pri uvećanjima 10×15, 40×15 i 100×15 sa uljanom imerzijom. Fotografije sa izgledom ćelija u kulturi i na preparatima su u obliku mozaika dati u prilogu ovog rada (deo PRILOG 3).

Podaci dobijeni u ovom eksperimentu su tabelarno obrađeni i upoređeni pomoću kompjuterskog programa *Microsoft Office Excel*²²⁴.

4.6. Metode ispitivanja genotoksičnosti

Genotoksikološka studija ispitivanih steroidnih jedinjenja sprovedena je setom od 4 testa. Izvršene su analize hromozomskih aberacija, test izmene sestrinskih hromatida, mikronukleus test i Komet esej. Genotoksičnost derivata je ispitivana na kulturama stimulisanih limfocita

zdravih dobrovoljnih davalaca (na osnovu potpisane informisane saglasnosti) ili na ćelijama K562 linije.

4.6.1. Analiza hromozomskih aberacija

Strukturna oštećenja hromozoma ispitana su standardizovanim metodama dobijanja i analize preparata metafaznih hromozoma čoveka. Hromozomske aberacije predstavljaju važan biomarker opšte genotoksičnosti. Delovanjem hemijskih supstanci može doći do promena koje se manifestuju kao hromozomske ili hromatidne lezije, prekidi i druge vrste strukturnih hromozomskih oštećenja^{171, 172, 187, 221, 226, 227}.

Zasađene kulture limfocita periferne krvi su nakon stimulacije fitohemaglutininom inkubirane sa ispitivanim jedinjenjima u koncentraciji od 100 μM tokom 48 h, pri čemu su ćelije u kulturi prošle samo jednu mitotičku deobu i jednu potpunu replikaciju hromozoma. Ovo je od osnovne važnosti za ovakav tip analize, da bi se nastala oštećenja na hromozomima mogla uočiti, jer se ona već u prvoj narednoj deobi mogu sakriti u vidu balansiranih ili nebalansiranih hromozomskih rearanžmana (koje je mnogo teže detektovati), reparirati ćelijskim mehanizmima ili jednostavno izgubiti u preparaciji propadanjem ćelije. U poslednja 2 sata ćelijske kulture su inkubirane u prisustvu kolhicina (*Demelcocine, Sigma*), u finalnoj koncentraciji od 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Kolhicin zaustavlja mitozu ćelija u metafazi, kada su hromozomi udvojeni i kondenzovani, što omogućava njihovo bojenje i analizu. Nakon centrifugiranja ćelijske suspenzije, sledio je hipotonični tretman sa 0,075 M KCl, 30 minuta na 37 °C. Hipotonijom su iz uzoraka eliminisani krvni elementi bez jedra, u prvom redu eritrociti. Fiksacija ćelija je izvršena fiksativom napravljenim od metanola i glacijalne sirćetne kiseline u odnosu 3:1, dva puta po 15 minuta, a uzorci su zatim ispirani još dva puta istim fiksativom i centrifugiranjem 10 minuta na 1500 rpm. Preparati metafaznih hromozoma su napravljeni nakapavanjem fiksiranog i ispranog materijala sa visine 10 – 15 cm na dobro oprane, hladne i vlažne pločice.

Uniformno bojenje hromozoma (**Slika 3.20** u „Poglavlju 3. – NAŠI RADOVI“) izvršeno je 2% rastvorom *Giemsa* boje. Preparati su pregledani na mikroskopu i tražene su strukturne hromozomske aberacije. Od svakog uzorka je analizirano 200 dobro raširenih kompletnih metafaznih garnitura hromozoma ($2n = 46$). Sve uočene iregularosti u strukturi, a u prvom redu aberacije koje su mogle nastati pod dejstvom hemijskih faktora (hromozomski i hromatidni prekidi, lezije i druge) su beležene. Zbog nepostojanja referentnih vrednosti hromozomskih aberacija, kao i zbog individualne varijabilnosti subjekata²¹² i uticaja faktora okruženja, ispitivanje je izvršeno na uzorcima limfocita periferne krvi od tri dobrovoljna zdrava davaoca i eksperiment je urađen dva puta, sa dva vremenski odvojena uzorkovanja materijala. Kao konačni

rezultati uzete su srednja vrednosti svih izvršenih merenja, koje su izražene kao procenti, odnosno, učestalost datih hromozomskih aberacija na 100 metafaznih ćelija.

4.6.2. Test mikronukleusa

Test mikronukleusa je takođe izveden na stimulisanim kulturama humanih limfocita periferne krvi po standardizovanim metodama koje su u širokoj upotrebi za određivanje prisustva i obima hromozomskih oštećenja izazvanih genotoksičnim agensima^{171, 172, 208}. Ovaj test predstavlja metodu kojom se kod ćelija stvaraju uslovi da se genetska oštećenja prikažu u vidu pojave konkretnih morfoloških struktura, prvenstveno mikronukleusa, ali i drugih pokazatelja (kao što su jedarni pupoljci, nukleoplazmatski mostovi i dr.); i da se u zavisnosti od njihove brojnosti može proceniti ukupan genotoksični efekat nekog agensa. Mikronukleusi predstavljaju odvojene delove jedarnog materijala (nukleusa) koji se na preparatu boje isto kao i normalni ćelijski nukleusi (**Slika 3.23** u „Poglavlju 3. – NAŠI RADOVI“). Nastaju od hromozomskih fragmenata ili celih hromozoma, koji nisu sposobni da učestvuju dalje u deobi. Mikronukleusi predstavljaju meru hromozomskih prekida i gubitaka hromozoma, a pokazano je da su osetljiv indikator hromozomskih oštećenja.

Za test mikronukleusa uzet je uzorak krvi od dobrovoljnog davaoca kod koga je analizom hromozomskih aberacija detektovan najveći broj oštećenja hromozoma nastalih delovanjem ispitivanih jedinjenja.

Zasađene kulture limfocita sa dodatim ispitivanim supstancama u ekvimolarnoj koncentraciji od 100 µM su inkubirane 72 h. U 44. satu inkubacije u medijume kultura je dodat Citohalazin B (*Cytochalasin-B*, *Sigma*, 6 µg/mL) radi blokiranja citokineze. Kultivisanje je prekinuto 72 sata nakon zasejavanja sakupljanjem suspenzija ćelija centrifugiranjem (5 minuta na 1200 rpm). Nakon odlivanja supernatanta, dodat je hladni hipotonični rastvor (4° C) 0,075 M KCl koji je razblažen sa 50% fiziološkog rastvora (0,9% m/V NaCl). Nakon 2 minuta inkubiranja na sobnoj temperaturi suspenzije ćelija su centrifugirane 8 minuta na 1200 rpm i supernatant je ponovo odliven. Nakon hipotoničnog tretmana, ćelijski materijal je konzerviran fiksativom od metanola i glacijalne sirćetne kiseline (u odnosu 3:1) sa 1% formaldehida i odmah centrifugiran 8 minuta na 1100 rpm. Materijal je fiksiran još jednom sa običnim fiksativom bez formaldehida, sa kojim je nakon toga izvršeno i ispiranje još dva puta. Preparati su napravljeni nakapavanjem suspenzije obrađenog materijala na dobro oprane i osušene mikroskopske pločice. Pločice su bojene 9 minuta u 2% rastvoru Gimza boje (*Merck*) u destilovanoj vodi, sa dodatkom jedne kapi amonijum hidroksida.

Za test mikronukleusa je analizirano po najmanje 1000 binuklearnih limfocita iz svakog uzorka. Tokom analize uočeni su i izbrojani limfociti sa jednim ili više mikronukleusa, kao i

mono-, bi- i poli-nuklearni limfociti, te određen njihov udeo i ukupnom broju izbrojanih ćelija. Na taj način su dobijeni rezultati za incidenciju (učestalost) i distribuciju mikronukleusa, kao i za proliferacioni indeks (CBPI – *Cytokinesis Block Proliferation Index*).

Incidencija (učestalost) mikronukleusa predstavlja broj uočenih mikronukleusa na 1000 analiziranih binuklearnih ćelija.

Indeks proliferacije CBPI je izračunat po formuli:

$$CBPI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times (M_3 + M_4)) / N$$

gde su $M_1 - M_4$ izbrojane ćelije koje sadrže 1 – 4 jedra (nukleusa), dok N predstavlja ukupan broj analiziranih ćelija.

Distribucija mikronukleusa, odnosno, broj binuklearnih ćelija koje sadrže od 1 do 5 (ili više) mikronukleusa, prikazana je grafički.

Test mikronukleusa je urađen dva puta, na dva odvojeno uzorkovana materijala. Kao konačni, uzeti su rezultati od ponavljanja sa najvišim dobijenim vrednostima incidencije mikronukleusa.

4.6.3. Test izmene sestrinskih hromatida

Kulture limfocita periferne krvi su za test izmene sestrinskih hromatida (SCE – *Sister-Chromatid Exchanges*), zbog osetljivosti metode ¹⁸¹, postavljene od uzorka krvi dobrovoljnog davaoca kod koga je predhodno analizom hromozomskih aberacija detektovan najmanji broj oštećenja hromozoma nastalih kao rezultat delovanja ispitivanih steroidnih jedinjenja.

Po 0,4 mL heparinizovane krvi zasađeno u 5 mL medijuma RPMI-1640 u koji je dodato 20% FCS, 2 mM glutamina i rastvor antibiotika. Odmah nakon zasejavanja, u eksperimentalne kulture su dodati rastvori steroidnih jedinjenja **1 – 14** i formestana, tako da je njihova finalna koncentracija u kulturama bila po 100 µM. Time je postignuto da kulture limfocita eksperimentalne grupe budu izložene ispitivanim jedinjenjima u ekvimolarnim koncentracijama. Nakon jednog sata u inkubatoru kulture su stimulisane na deobu dodavanjem fitohemaglutinina (PHA-M, PAA) u finalnoj koncentraciji od 2 µg/mL. Tom prilikom u kulture je dodat i nukleotidni analog timina, 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU, *Sigma*), čija je finalna koncentracija u kulturi bila 10 µg/mL. Od trenutka dodavanja BrdU u zasejane kulture, ceo postupak obrade i preparacije uzoraka vršen je u zamračenom prostoru kako bi se sprečila fotodegradacija BrdU. Kulture su tada vraćene u inkubator i inkubirane ukupno 72 h da bi ćelije mogle proći tačno po dve uzastopne ćelijske deobe. To je od suštinske važnosti za ovaj test jer tokom te dve deobe dolazi do pravilne inkorporacije BrdU u DNK, što je preduslov za uspešnu diferencijaciju novosintetisanih hromatida u hromozomima. Jedan sat pre završetka inkubacije dodat je kolhicin

(*Demecolcine*, *Sigma*) radi zaustavljanja druge deobe ćelija u metafazi, u finalnoj koncentraciji od 0,1 µg/mL.

Kultivisane ćelije su nakon inkubacije sakupljene centrifugiranjem (1500 rpm, 10 minuta) i tretirane hipotoničnim rastvorom (0,075 M KCl, 30 minuta na 37 °C). Konzervacija ćelijskog materijala pomoću fiksativa (metanol i glacijalna sirćetna kiselina u odnosu 3:1) je izvršena sa dve fiksacije od po 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su uzorci sa ćelijama centrifugirani (1500 rpm, 10 minuta) i isprani 2 puta sa istim fiksativom. Preparati metafaznih hromozoma su napravljeni na prethodno pripremljenim dobro opranim i ohlađenim pločicama. Obradeni materijal je nanošen na vlažne pločice nakapavanjem sa visine 10 – 15 cm i preparati su ostavljeni da se dobro osuše pre bojenja.

Hromatide su diferencijalno obojene (**Slika 3.24** u Poglavlju 3. NAŠI RADOVI) tehnikom „*fluorescence-plus-Giemsa*“ (FPG), fluorescentnom bojom Hoechst 33258 (*Sigma*), prema metodi *Perry i Wolff* (1974)¹⁷⁸. Po nekoliko kapi rastvora fluorescentne boje Hoechst (150 µg/ml: 1,5 mg Hoechst 33258; 10 mL dH₂O) dodato je na pločice svakog od pripremljenih preparata hromozoma i pokriveno pokrovnim stakalcem. Preparati su ostavljeni tako da odstoje 15 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Nakon toga su uklonjena pokrovna stakla, a preparati su isprani u destilovanoj vodi i ostavljeni da se osuše u mraku. Na horizontalno postavljene preparate pažljivo je preko cele površine pločice naneto po oko 2 mL rastvora 2×SSC (*Saline Sodium Citrate*: 17,5 g NaCl; 8,8 g [Na₃C₆H₅O₇×2H₂O]; 1 L dH₂O; pH = 7,0). Preparati su tada izloženi jakom UV svetlu (laboratorijska lampa za sterilizaciju) tokom 1 sata. Nakon toga, pločice su isprane u destilovanoj vodi i zatim inkubirane 1 h u posudi sa 2×SSC na 65 °C u vodenom kupatilu. Pločice su posle toga ponovo isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše u mraku. Suvi preparati su obojeni u sveže napravljenom rastvoru 2% Gimza boje u fosfatnom puferu (5,26 g KH₂PO₄; 8,65 g Na₂HPO₄; 1 L dH₂O; pH = 7,0) u trajanju od 15 minuta. Trajni preparati su napravljeni korišćenjem sredstva *Neomount* (*Merck*).

Od svakog uzorka je na mikroskopu (*Olympus BX51*) analizirano po 25 kompletnih metafaznih garnitura hromozoma (2n = 46) sa dobro diferenciranim i nepreklopljenim hromatidama. Brojane su hromatidne izmene na kracima hromozoma. Izmene u regionu centromere nisu uzimane u obzir zbog slobodne rotacije tog dela hromozoma.

SCE test je urađen dva puta, na dva nezavisno uzeta uzorka krvi. Rezultati SCE testa predstavljani su kao srednje vrednosti izbrojanih izmena sestrinskih hromatida po metafazi u ispitivanim uzorcima iz dva nezavisna eksperimenta^{178, 196, 228}.

4.6.4. Test komete

Ćelije humane mijeloidne leukemije K562 su zasađene u 12-well pločama (po 5×10^5 ćelija u 4 mL medijuma po otvoru) i tretirane 48 h ekvimolarnim koncentracijama ispitivanih jedinjenja od 100 μ M. Netretirane ćelije su služile kao negativna kontrola. Ćelije tretirane sa Doksorubicinom služile su kao pozitivna kontrola. Vijabilne ćelije iz kontrolnih i tretiranih uzoraka su korišćene za Komet esej.

Za evaluaciju oštećenja DNK (jednolančani i dvolančani prekidi) izvedena je modifikovana verzija alkalnog Komet testa²¹³. Nakon tretmana kulture su držane na ledu da bi se inhibirao proces reparacije DNK. Ispitivane ćelije su dalje obrađene po protokolu Komet testa. Po 50 μ L suspenzije sa po oko 25×10^4 ćelija/mL u PBS-u (oko 1000 ćelija) svakog uzorka pomešano je sa 0,2 mL rastopljene 1,5% agaroze niske tačke topljenja (LMA – *Low Melting Point Agarose*, Sigma) i naneto na celu površinu mikroskopskih pločica prethodno impregniranih jednim slojem agaroze. Pločice su zatim pokrivene i trećim slojem, ponovo samo agarozom, tako da se sloj sa imobilisanim ćelijama nalazio u sredini. Ravnomerno prekrivanje površine pločica slojevima od agaroze u još tečnom stanju urađeno je pokrivanjem sa pokrovnim ljusticama i njihovim pažljivim horizontalnim skidanjem nakon hlađenja na ledu i očvršćavanja nanetog sloja.

Ćelije su lizirane na 4 °C preko noći u puferu za liziranje (5 M NaCl; 0.5 M EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH = 10,0; sa dodatkom 1% Triton i 10% DMSO neposredno pre upotrebe), a zatim izložene delovanju alkalnog rastvora EDTA (300 mM NaOH; 1 mM EDTA, pH = 13,0) tokom 1 h. Nakon denaturacije u alkalnim uslovima, pločice su postavljene u aparaturu za horizontalnu elektroforezu, koja je vršena 20 minuta na 25 V i 40 mA. Pločice su zatim isprane u profiltriranoj vodi dva puta po 5 minuta, osušene apsolutnim etanolom i obojene etidijum bromidom (2 μ g/mL). Obojeni preparati su analizirani pomoću fluorescentnog mikroskopa (*Olympus BX51*). Napravljena je serija mikrofotografija za svaki uzorak (može se videti na **Slici 3.27-A** u „Poglavlju 3. – NAŠI RADOVI“) pomoću digitalne kamere (*Olympus CAMEDIA C3040*) postavljene na mikroskopu. Digitalne slike su obrađene u pomoću kompjuterskog programa *ImageJ* (NIH Image, <http://imagej.nih.gov>)²²³. Analiza ćelijskih kometa urađena je pomoću *CometScore* kompjuterskog programa. Na preparatu svakog uzorka analizirano je po 50 ćelija sa jasno definisanim kometama i različiti parametri su tom prilikom automatski programski evaluirani. Srednja vrednost parametra „*Tail Moment*“ (momet repa komete), koji se izračunava iz vrednosti dužine repa (u pikselima) i procenta DNK u repu komete (u relativnim svetlosnim jedinicama – engl. *Relative Light Units*, RLU), izabrana je kao veličina za poređenje uzoraka (**Slika 3.27-B** u „Poglavlju 3. – NAŠI RADOVI“). Rezultati dobijeni kao numeričke vrednosti su obrađeni u kompjuterskom programu *Microsoft Office Excel*²²⁴.

4.7. Analiza rezultata i obrada podataka

4.7.1. Statistička analiza

Srednje vrednosti rezultata iz ponavljanih eksperimenata dobijene su od srednjih vrednosti multiplikata svakog pojedinačnog eksperimenata. Standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV) izračunati su kao prosek vrednosti dobijenih zasebno za svaki multiplikat.

Kod parametara koji nisu mogli biti prikazani kao srednja vrednost ponovljenih eksperimenata, kao konačan uzet je rezultat od najreprezentativnijih iteracija u pogledu kontrolnog i eksperimentalnih uzoraka (rezultati protočne citometrije i *Western blot* analize) ili od ponavljanja sa maksimalnim dobijenim vrednostima ispitivanih parametara (test mikronikleusa).

Rezultati ispitivanja eksperimentalnih grupa poređeni su sa kontrolnim uzorkom u svim eksperimentima ove studije. Rezultati ispitivanih uzoraka su takođe prikazivani i kao procenat od kontrole u slučajevima kada je takav način prikaza bio informativniji.

U fokusu ovog istraživanja bio je antiproliferativni i proapoptotski efekat 14 novih jedinjenja. Njihov biomedicinski potencijal je ispitan pomoću više testova i sa više aspekata. Zbog toga, umesto određivanja statističke značajnosti razlika u njihovom delovanju za svaki pojedinačni test, bilo je svrsishodnije porediti efekte jedinjenja sagledavajući rezultate svih ispitivanja i tražiti vezu između strukture jedinjenja i njihovog biološkog efekta.

4.7.2. Ispitivanje odnosa struktura-aktivnost

Odnos između strukturnih varijacija i aktivnosti ispitivanih jedinjenja (SAR – *Structure-Activity Relationship*) proučavan je sa različitih aspekata indukcije apoptoze odabranim jedinjenjima. Poređeni su efekti na MDA-MB-231 ćelije derivata koji sadrže različite funkcionalne grupe na steroidnom jezgri i imaju različit stepen zasićenosti A i B prstenova.

Efekti jedinjenja su kvantifikovani kao vrednost $\Delta\log$ koja predstavlja razliku dekadnih logaritama od izmerenih parametara derivata koji se porede:

$$\Delta\log = \log(\text{derivat 2}) - \log(\text{derivat 1})$$

pri čemu derivati 1 i 2 predstavljaju par ispitivanih jedinjenja čije se strukture i efekti porede. Rezultati ovakvog poređenja su predstavljeni grafikonom sa horizontalnim stubićima (za više parametara istovremeno). Negativna vrednost $\Delta\log$ podrazumeva veću aktivnost prvog derivata (što se manifestuje pojavom stubića na levoj strani dijagrama), dok pozitivna vrednost ukazuje

da drugi od upoređenih derivata ima jači efekat (pojavljivanje stubića u desnom kvadrantu). Za parametre koji imaju obrnutu korelaciju, tj., kad niža vrednost parametra znači jači efekat, npr., IC₅₀ vrednost ili obaranje („*downregulation*“) ekspresije Bcl-2 proteina, $\Delta\log$ je izračunat inverzno: $\log(\text{derivat 1}) - \log(\text{derivat 2})$.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan uticaj 14 odabranih steroidnih jedinjenja, devet 17α -pikolinskih ili $17(E)$ -pikolinilidenskih (jedinjenja **1 – 9**) i pet $16,17$ -seko-dinitrilnih steroida (jedinjenja **10 – 14**) na ćelijske linije humanih kancera. Ispitana je *in vitro* antiproliferativna aktivnost ovih jedinjenja na šest ćelijskih linija humanih solidnih tumora (MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, HeLa, HT-29 i A549), jednoj leukemijskoj (K562) i jednoj zdravoj humanoj ćelijskoj liniji (MRC-5). Njihova antiproliferativna aktivnost je upoređena sa aktivnošću referentnih jedinjenja – Formestana i Doksorubicina. Takođe, ispitan je mehanizam delovanja jedinjenja na MDA-MB-231 ćelije estrogen- i progesteron-receptor negativnog adenokarcinoma dojke, kao ćelije najsenzitivnije ćelijske linije na delovanje ispitivanih modifikovanih steroida. Analizirana je distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana MDA-MB-231 ćelija ispitivanim jedinjenjima. Indukcija apoptoze ispitana je protočnom citometrijom, vizuelnom opservacijom morfoloških promena pomoću svetlosnog mikroskopa i analizom ekspresije proteina apoptotskog signalnog puta. U svim testovima uticaj ispitivanih steroidnih jedinjenja poređen je sa kontrolnim uzorkom netretiranih MDA-MB-231 ćelija. Korelirani su biološki efekti modifikovanih steroidnih derivata sa njihovom strukturom. U drugom delu ove teze urađena je i studija genotoksičnosti ovih jedinjenja. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

Antiproliferativni efekat

- Sva ispitivana steroidna jedinjenja su pokazala antiproliferativni efekat prema većini ćelijskih linija humanih solidnih tumora, ali u različitoj meri ka različitim tipovima ćelija.
- Svi pikolinski i pikolinilidenski derivati (jedinjenja **1 – 9**) su bili aktivni prema MDA-MB-231, PC-3 i HeLa ćelijama, a neka od njih i prema HT-29, A549 i K562 ćelijskim linijama. Jedinjenja **4, 5 i 6** su pokazala antiproliferativnu aktivnost i prema MCF-7 (ER+) ćelijama karcinoma dojke.
- Svi seko-dinitrilni steroidni derivati (jedinjenja **10 – 14**) su pokazali jaku antiproliferativnu aktivnost prema PC-3 i HeLa ćelijskim linijama, a većina njih i prema MDA-MB-231(ER-) i MCF-7 (ER+) ćelijama karcinoma dojke.

- Proliferaciju ćelijske linije metastatskog, hormonski nezavisnog tumora dojke MDA-MB-231 snažno su inhibirali svi ispitivani steroidni derivati. Svi 17 α -pikolinski i 17(E)-pikolinilidenski androstanski derivati su selektivno smanjili proliferaciju MDA-MB-231 (ER-) ćelija karcinoma dojke nakon 48 i 72 sata tretmana. Seko-dinitrili su takođe bili aktivni, naročito nakon 72 h.
- Nijedno od testiranih steroidnih jedinjenja (**1** – **14**) nije bilo toksično prema zdravim MRC-5 ćelijama, za razliku od Doksorubicina, citostatika koji se često koristi u terapiji malignih bolesti.
- U odnosu na referentna jedinjenja, većina ispitivanih steroidnih derivata bila je efikasnija od Formestana na svim tretiranim ćelijskim linijama osim HeLa, a prema PC-3 ćelijskoj liniji su svi ispitivani steroidi bili toksičniji od Doksorubicina.
- Ispitivanje kombinacija najaktivnijih derivata pokazalo je da ispitivana steroidna jedinjenja ne deluju sinergistički pri koncentracijama manjim od 100 μ M.

Modulacija ćelijskog ciklusa i indukcija apoptoze MDA-MB-231 ćelija

- Sva ispitivana steroidna jedinjenja su indukovala apoptozu u MDA-MB-231 ćelijama, u manjoj ili većoj meri.
- Pikolinski i pikolinilidenski derivati su uticali na distribuciju faza ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 ćelija, uglavnom pomerajući ćelijsku populaciju prema subG1 ili G2/M fazi, a smanjujući G0/G1 i S fazu. Promene su specifične za jedinjenje i period tretiranja ćelija.
- Steroidni seko-dinitrili su takođe uticali na distribuciju faza ćelijskog ciklusa MDA-MB-231 ćelija, a promene su zavisile od dužine tretmana. Derivati **11**, **12** i **14** su nakon 48 h smanjili broj ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, a nakon 72 h svi dinitrili su izazvali porast ove apoptotske frakcije, kao i S faze, uz smanjenje populacije u G0/G1 i G2/M fazama. Najveći porast broja ćelija u subG1 fazi indukovala su jedinjenja **13** i **14**.
- Ispitivanjem indukcije apoptoze MDA-MB-231 ćelija testom sa Aneksinom V se pokazalo da ispitivana jedinjenja deluju na različite načine. Apoptotski i nekrotični odgovor na dejstvo steroida zavisio je i od dužine tretiranja ćelija.
- Prema rezultatima protočno–citometrijske analize, najveći postotak specifične apoptoze indukovali su pikolinski i pikolinilidenski derivati **1**, **4**, **6** i **7** nakon tretmana od 72 h.
- Svi dinitrilni derivati su tokom 48 h indukovali nizak procenat specifične apoptoze MDA-MB-231 ćelija, ali su jedinjenja **10**, **11**, **13** i **14** nakon 72 h indukovala specifičnu apoptozu od preko 25%. Sva jedinjenja ove grupe su bila efektivnija od Formestana. Jedinjenje **13** je indukovalo najveći postotak specifične apoptoze (preko 50%).

- Rezultati apoptoze indukovane dinitrilnim seko-steroidima su veoma slični rezultatima modulacije subG1 faze ćelijskog ciklusa, naročito nakon tretmana od 72 h. Pokazalo se da seko-dinitrilna jedinjenja deluju drugačije od pikolinskih i pikolinilidenskih i kada je u pitanju dužina tretiranja ćelija.
- Najveću nekrozu MDA-MB-231 ćelija od svih ispitivanih steroidnih derivata nakon 48 h dejstva izazvalo je jedinjenje **11**, a nakon 72 h jedinjenje **14**.

Ekspresija apoptotskih proteina u MDA-MB-231 ćelijama

- Svi pikolinski i pikolinilidenski derivati, osim jedinjenja **1** posle 48 h, su indukovali veću ekspresiju proapoptotskog proteina BAX u tretiranim uzorcima MDA-MB-231 ćelija i smanjili ekspresiju antiapoptotskog proteina Bcl-2, osim jedinjenja **1** i **7** posle 48 h.
- Detekcija produkata proteolitičkog cepanja PARP proteina u svim uzorcima tretiranim pikolinskim ili pikolinilidenskim derivatima je potvrdila signalnu aktivnost i završetak apoptotskog procesa.
- Odsustvo aktivacije enzima kaspaza-3 jedinjenjima **3**, **4**, **5** i **8** nakon 48 h i svih jedinjenja izuzev **3** i Formestana posle 72 h sugeriše da ovi derivati indukuju apoptozu nezavisno od kaspaza.
- Ekspresija apoptotskih proteina indukovana u MDA-MB-231 ćelijama dinitrilnim derivatima značajno se razlikuje, zavisno od dužine tretmana. Tako je ekspresija Bcl-2 proteina povišena nakon 48 h samo za jedinjenje **14**, a nakon 72 sata najizraženiji pad zabeležen za jedinjenja **10** i **11**.
- Ekspresija BAX proteina je bila povećana već posle 48 h, a još izraženija posle 72 h, u svim uzorcima tretiranim dinitrilnim derivatima. Najveću ekspresiju su indukovala jedinjenja **10**, **11**, **13** i **14**.
- Jedinjenja **10**, **13** i **14** (kao i Formestan), povećala su ekspresiju PARP proteina nakon 48 h, koja je nakon 72 h bila manja i ujednačenija. Evidentna ekspresija PARP proteina u MDA-MB-231 ćelijama, izazvana svim ispitivanim steroidnim dinitrilima, nezavisno od njihove strukture, govori o aktivnosti signalnog puta u završnoj fazi procesa apoptoze.
- Modulacija ekspresije apoptotskih proteina je pokazala da neka od ispitivanih steroidnih jedinjenja (**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **13** i **14**) imaju proapoptotski efekat, ali da dinitrilni derivati deluju na drugačiji način na ekspresiju apoptotskih proteina u poređenju sa pikolinskim i pikolinilidenskim jedinjenjima.

Morfološke apoptotske promene MDA-MB-231 ćelija

- Od pikolinskih i pikolinilidenskih jedinjenja najviše apoptotskih morfoloških promena tretiranih MDA-MB-231 ćelija indukovali su derivati **1**, **4 – 6** i **8**, od kojih jedinjenja **1**, **5** i **8** više i od Formestana.
- Dinitrilni derivati **10** i **11** su bili najefikasniji u indukciji apoptotskih morfoloških promena MDA-MB-231 ćelija nakon 48 h, a derivati **12 – 14** nakon 72 h. Najviše apoptotskih morfoloških promena izazvalo je jedinjenja **13**.

Odnos između strukture i biološke aktivnosti ispitivanih modifikovanih steroida

- Apoptoza tretiranih MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke je potvrđena sa više aspekata, uključujući promenu morfologije tretiranih ćelija, detektovanje apoptoze protočnom citometrijom i identifikovanje ekspresije proteina apoptotskog puta.
- Poređenje aktivnosti pikolinskih i pikolinilidenskih derivata pokazalo je da jedinjenja sa 17α -pikolil funkcijom u steroidnom molekulu uglavnom ostvaruju jači antiproliferativni efekat i krajnju ekspresiju BAX proteina, dok $17(E)$ -pikolinilidenski derivati stvaraju veću subG1 populaciju, smanjuju ekspresiju Bcl-2 i povećavaju ekspresiju PARP proteina.
- SAR analizom steroidnih dinitrila koji se razlikuju po prisutnim funkcionalnim grupama u pozicijama 3 i 6 i po nezasićenosti A prstena, pokazalo se da je u većini bioloških testova najefikasnije bilo jedinjenje estranske serije, sa aromatičnim A prstenom i hidroksilnom grupom u položaju 3.

Genotoksičnost steroidnih derivata

- Rezultati genotoksikoloških testova su pokazali nisku genotoksičnost ispitivanih steroidnih derivata.
- Ispitivana jedinjenja u koncentraciji od 100 μ M ne izazivaju hromozomske aberacije.
- Jedinjenja **1**, **2**, **5**, **9** i **12 – 14** su povećala incidenciju mikronukleusa (derivati **2** i **5** čak do 300% u odnosu na kontrolu), pomerajući distribuciju mikronukleusa ka većem broju po binuklearnoj ćeliji. Proliferacioni indeks (CBPI) kao proliferacioni kapacitet nezatno je umanjen oštećenjem genoma ćelija tretiranim jedinjenjima **2**, **6** i **13**.
- Evidentan porast izmena sestrinskih hromatida u odnosu na kontrolni uzorak zabeležen je u ćelijama tretiranim jedinjenjima **2**, **6** i **10 – 13**. Skoro dvostruko veća vrednost nađena je u uzorcima tretiranim derivatima **6** i **10**.
- Detektovana povišena incidencija mikronukleusa i povećanje SCE u odnosu na kontrolni uzorak, pokazuju izvesno delovanje ispitivanih steroida na genetski materijal. Međutim,

njihov genotoksični efekat nije velik i uporediv je sa efektom referentnog jedinjenja Formestana.

- Najviši nivo fragmentacije molekula DNK, izmeren testom komete, izazvala su jedinjenja **2, 8, 10, 13 i 14**, pri čemu je nivo fragmentacije DNK bio veći nego sa Formestanom.
- Zbog sličnosti ekspresije PARP proteina sa rezultatima Komet eseja kod jedinjenja **8, 13 i 14**, može se pretpostaviti da je fragmentacija DNK izazvana ovim jedinjenjima rezultat apoptotskog procesa ćelijske autodestrukcije. U prilog tome ide i razlika između rezultata testa komete i nalaza ostalih genotoksikoloških testova za ova jedinjenja.
- Rezultati genotoksikoloških testova su pokazali da devet ispitivanih 17α -pikolinskih i $17(E)$ -pikolinilidenskih i pet seko-dinitrilnih steroidnih derivata mogu biti dobra osnova za razvijanje antikancerskih lekova koji indukuju apoptozu, sa malim genotoksičnim efektom pri terapijskim koncentracijama.

Uzimajući u obzir sve rezultate ove doktorske disertacije, može se zaključiti da neki od ispitivanih androstanskih derivata imaju biomedicinski potencijal i da mogu biti potencijalni kandidati za razvoj efikasnih i selektivnih antitumorskih lekova, naročito imajući u vidu pro-apoptotski potencijal i male genotoksične posledice po organizam kao sistem.

SUMMARY

EFFECT OF MODIFIED STEROID COMPOUNDS ON CELL CYCLE, APOPTOSIS INDUCTION AND OCCURRENCE OF GENETIC DEFECTS IN HUMAN TUMOR CELLS

The present thesis aimed at investigating the impact of 14 selected steroid compounds on human cancer cell lines.

Nine androstane 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene derivatives are: 17 α -picolyl-androst-5-en-3 β ,4 β ,17 β -triol (**1**); 17 α -picolyl-androst-5-en-3 β ,4 α ,17 β -triol (**2**); 5 α ,6 α -epoxy-17 α -picolyl-androstane-N-oxide-3 β ,17 β -diol (**3**); 17 α -picolyl-androsta-3,5-dien-17 β -ol (**4**); 17-picolinyliden-androsta-3,5-diene (**5**); 4,17 β -dihydroxy-17 α -picolyl-androsta-4,6-dien-3-one (**6**); 17 α -picolyl-androst-4-en-3 β ,17 β -diol (**7**); 4-methoxy-17-picolinyliden-androst-4-en-3-one (**8**); and 17-picolinyliden-androst-4-en-3 β -ol (**9**).

Five 16,17-seco-steroid dinitriles are: 3 β -hydroxy-16,17-secoandrost-5-ene-16,17 α -dinitrile (**10**); 3-oxo-16,17-secoandrost-4-ene-16,17 α -dinitrile (**11**); 4-hydroxy-3-oxo-16,17-secoandrost-4-ene-16,17 α -dinitrile (**12**); 3-hydroxy-16,17-secoestra-1,3,5(10)-triene-16,17 α -dinitrile (**13**); 3,6-diookso-16,17-secoandrost-4-en-16,17 α -dinitrile (**14**).

The *in vitro* antiproliferative activity of compounds was tested against six cell lines of human solid tumors (MCF-7, MDA MB-231, PC-3, HeLa, HT-29 and A549), one leukemia (K562) and one healthy human cell line of lung fibroblasts (MRC-5). The antiproliferative activity of steroidal derivatives was compared to the activity of reference compounds – Formestane and Doxorubicin. The mechanism of action of tested compounds was investigated in estrogen- and progesterone-receptor negative breast cancer cells MDA-MB-231, as the cell line that was the most affected by the tested modified steroids. We analyzed the distribution of cells in different phases of the cell

cycle after treatment of MDA-MB-231 cells with steroidal compounds. Induction of apoptosis was examined by flow cytometry, by visual observation of morphological changes using light microscopy, and by the analysis of protein expression of the apoptotic signaling pathway. In all tests, the influence of the investigated steroidal compounds was compared to untreated tumor cells as a control sample. Biological effects of modified steroidal derivatives were correlated to their structure. Finally, the genotoxicity study of these compounds was performed. Based on the obtained results, the following may be concluded:

Antiproliferative effect of tested steroidal derivatives

- All of the tested steroidal compounds showed antiproliferative activity against the most of the treated human solid tumors cell lines.
- All of the 17 α -picolyl and 17(E)-picolinylidene compounds (**1 – 9**) were active against MDA-MB-231, PC-3 and HeLa cells, and some of them against HT-29, K562 and A549 cell lines. Compounds **4**, **5** and **6** also showed antiproliferative activity towards MCF-7 (ER +) breast cancer cells.
- All of the seco-steroid dinitrile derivatives (compounds **10 – 14**) showed strong antiproliferative activity against PC-3 and HeLa cell lines, and most of them against MDA-MB-231 (ER–) and MCF-7 (ER +) cells. The largest antiproliferative effect among steroidal dinitrile derivatives expressed compounds **11**, **13** and **14** against MCF-7, MDA-MB-231, PC-3 and HeLa cell lines.
- The proliferation of metastatic, hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231 was strongly inhibited by all of the investigated steroid derivatives.
- None of the tested steroidal compounds (**1 – 14**) was toxic against healthy MRC-5 cells, unlike Doxorubicin, a cytostatic widely used in the therapy of malignant diseases.
- When compared to the reference compounds, the majority of the investigated steroid derivatives was more effective than Formestane, except in HeLa cell line, and all of them were more toxic than Doxorubicin only to the PC-3 cells.
- Testing a combination of the most active derivatives showed that the tested steroidal compounds do not act synergistically in concentration below 100 μ M of applied combination.

Cell cycle modulation and apoptosis induction in MDA-MB-231 cells

- All tested steroidal compounds, more or less, induced apoptosis in MDA-MB-231 cells.
- Picolyl and picolinylidene derivatives influenced the cell cycle phase distribution of MDA-MB-231 cells, primarily by shifting the cell population toward subG1 or G2/M phase, and reducing the G0/G1 and S phase. The changes were specific for the compound and the treatment period.
- Steroidal seco-dinitriles also affected the cell cycle phase distribution of MDA-MB-231 cells. Changes depended on the treatment time. Derivatives **11**, **12** and **14** lowered the subG1 phase of the cell cycle after 48 h, while after 72 h all dinitriles caused an increase of this apoptotic cell fraction, as well as the S phase, with a reduction in G0/G1 and G2/M phases. The largest increase in subG1 phase induced compounds **13** and **14**.
- The Annexin V apoptosis induction assay shown that the tested compounds act via different mechanisms. The apoptotic and/or necrotic response of the cells to the derivatives depended on the length of cell treatment.
- According to the results of the flowcytometric analysis, the largest percentage of specific apoptosis was induced by picolyl and picolinylidene derivatives **1**, **4**, **6** and **7**, after 72 h treatment.
- All dinitrile derivatives induced low percentage of specific apoptosis during 48 h. However, after 72 h, compounds **10**, **11**, **13** and **14** achieved a value of specific apoptosis more than 25%, and all of them were more effective than Formestane. Compound **13** induced the highest percent of specific apoptosis (over 50%).
- The results of apoptosis induced by dinitrile derivatives were very similar to those of the subG1 cell cycle phase modulation, especially after 72 hours of treatment.
- Among all tested steroidal derivatives, compounds **11** (after 48 h) and **14** (after 72 h) caused the highest necrosis of the treated MDA-MB-231 cells.

Expression of apoptotic proteins in MDA-MB-231 cells

- All picolyl and picolinylidene derivatives (except compound **1**) after 48 h induced a high expression of proapoptotic BAX protein in treated MDA-MB-231 cells and reduced the expression of the antiapoptotic Bcl-2 proteins (with the exception of compounds **1** and **7**).

- Detection of the proteolytic cleavage of the PARP protein in MDA-MB-231 cell samples treated with all picolyl and picolinylidene compounds confirmed the signaling activity and the completion of the apoptotic process.
- The lack of Caspase-3 activation by compounds **3**, **4**, **5** and **8** after 48 h, as well as by all the picolyl and picolinylidene compounds after 72 h (except compound **3** and Formestane), suggests that these derivatives induced apoptosis in Caspase-independent manner.
- The apoptotic protein expression in MDA-MB-231 cells differed significantly among dinitrile derivatives, depending on treatment duration. Thus, the expression of Bcl-2 was increased after 48 h only for compound **14**, and the most pronounced decrease was observed after 72 h for compounds **10** and **11**.
- The expression of BAX protein in MDA-MB-231 cells was increased in all samples treated 48 h with dinitrile derivatives, which was even more evident after 72 h treatment. The highest BAX expression was induced by compounds **10**, **11**, **13** and **14**.
- According to the expression of precursors and active subunit of Caspase-3, it was lower than control one only for derivative **14** and Formestane after 48 h, with a nearly control level for all dinitrile compounds after 72 h.
- Compounds **10**, **13** and **14** (as well as Formestane) increased the expression of PARP protein after 48 h, which was smaller and more uniform after 72 h. Evident PARP expression in MDA-MB-231 cells, induced by all the tested steroidal dinitriles, regardless their structure, tells about the activity of the signaling pathway in the final stages of apoptosis.
- Modulation of the apoptotic protein expression showed that some of the investigated steroidal derivatives (**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **13** i **14**) have proapoptotic effect and that dinitrile derivatives act differently on the expression of apoptotic protein in comparison to picolyl and picolinylidene compounds.

Apoptotic morphology of MDA-MB-231 cells

- Among tested picolyl and picolinylidene derivatives, the most of apoptotic morphological changes in MDA-MB-231 cells induced compounds **1**, **4** – **6** and **8**, where **1**, **5** and **8** more than Formestane.
- Among dinitrile derivatives, compounds **10** and **11** were the most efficient in the induction of apoptotic morphology after 48 h, and derivatives **12** – **14** after 72 h

treatment. The most apoptotic morphological changes sparked estrane compound **13** after 72h of treatment.

Structure – activity relationship

- Apoptosis of the treated MDA-MB-231 breast cancer cells was confirmed by different methods, including study of apoptotic morphology of the treated cells, apoptosis detection by flowcytometry, and expression of proteins of the apoptotic signaling pathway.
- Comparison of the activity of picolyl vs. picolinylidene derivatives showed that compounds with 17 α -picolyl function bound to a steroid molecule could generate stronger antiproliferative effect and final BAX protein expression, while the 17(E)-picolinylidene derivatives induce more cells in subG1 phase, reduce Bcl-2 expression, and increase the expression of PARP protein.
- Comparing the steroid dinitriles that differ in functional groups present at positions 3 and 6, and in number and arrangement of double bonds in the ring A, it was demonstrated that the most efficient compound was estrane derivative, with an aromatic A ring and a hydroxyl group at the position 3. Only the expression of PARP protein was stronger for compound with keto function in position 3 and 6, and a double bond in position 4.

Genotoxicity of tested steroids

- The results of genotoxicity tests showed moderate genotoxicity of investigated steroidal derivatives.
- Tested compounds do not cause chromosomal aberrations at concentrations below 100 μ M.
- Compounds **1**, **2**, **5**, **9** and **12** - **14** increased incidence of micronuclei (derivatives **2** and **5**, even up to 300%, relatively to control), shifting the micronucleus distribution to a larger number of micronuclei per binuclear cell. The cytokinesis-block proliferation index (CBPI) as a measure of proliferation capacity was slightly reduced by damaged genome of cells treated with the compounds **2**, **6** and **13**.
- The evident increase in sister chromatid exchanges was noted in cells treated with compounds **2**, **6** and **10** – **13**. Almost twice higher value was found in samples treated with derivatives **6** and **10**.
- Detected increase in micronucleus incidence and sister chromatid exchanges related to control sample, showed some activity of the tested derivatives.

However, their genotoxic effect is not strong and is comparable to the effect of the reference compound Formestane.

- The highest level of DNA molecule fragmentation, measured by comet assay, was caused by compounds **2**, **8**, **10**, **13** and **14**, wherein the DNA fragmentation levels were higher than with Formestane.
- Due to the similarity of PARP protein expression with the comet assay results for compounds **8**, **13** and **14**, it can be assumed that the DNA fragmentation caused by these compounds was indeed a result of self-destruction process of the apoptotic cells. In support to this is the difference between the comet test results and the findings of other genotoxicity tests for these compounds.
- The results of genotoxicity tests showed that all of nine selected picolyl and picolinylidene, as well as five seco-dinitrile steroidal derivatives can be appropriate lead compounds for anticancer drug design and development, regarding their proapoptotic potential and low genotoxic effects at therapeutic concentrations.

Taking into account all the results presented in this doctoral thesis, it could be concluded that some of the examined steroidal derivatives have biomedical potential and that may be potential candidates for the development of effective and selective anticancer drugs, especially bearing in mind their strong proapoptotic and weak genotoxic effects on whole organism as a system.

6. PRILOG

Dodatne informacije o korišćenim ćelijskim linijama, kao i rezultati u vidu grafikona, tabela, histograma, „dot-plot“ dijagrama i fotografija iz ove doktorske disertacije koji nisu prikazani u Poglavlju 3. – „Naši radovi“ priloženi su kao „Dodatni materijal“ na CD-u, koji je, zajedno sa štampanim delom, sastavni deo ove doktorske disertacije.

LITERATURA

1. Boyle, P. *Ann Oncol* **2012**, 23, vi7.
2. Dietze, E. C.; Sistrunk, C.; Miranda-Carboni, G.; O'Regan, R.; Seewaldt, V. L. *Nat Rev Cancer* **2015**, 15, 248.
3. Cleator, S.; Heller, W.; Coombes, R. C. *Lancet Oncol* **2007**, 8, 235.
4. Lopez, J.; Tait, S. W. G. *Br J Cancer* **2015**, 112, 957.
5. Favaloro, B.; Allocati, N.; Graziano, V.; Di Ilio, C.; De Laurenzi, V. *AGING* **2012**, 4, 330.
6. Chen, G. G.; Lai, P. B. S. Editors, *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy, Apoptosis in Cancer*, Springer Science+Business Media B.V., 2009.
7. Gewirtz, D. A.; Holt, S. E.; Grant, S. Editors, *Apoptosis, senescence, and cancer*, Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 2007.
8. Leena Sankari, S.; Masthan, K. M. K.; Aravindha Babu, N.; Tathagata Bhattacharjee; Elumalai, M. *Asian Pacific J Cancer Prev* **2012**, 13, 4873.
9. Fulda, S. *Front Oncol* **2011**, 1, 23.
10. Wong, R. S. Y. *J Exp Clin Cancer Res* **2011**, 30, 87.
11. Jain, M. V.; Paczulla, A. M.; Klonisch, T.; Dimgba, F. N.; Rao, S. B.; Roberg, K.; Schweizer, F.; Lengerke, C.; Davoodpour, P.; Palicharla, V. R.; Maddika, S.; Łos, M. *J Cell Mol Med* **2013**, 17, 12.
12. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J.M.; Alnemri, E.S.; Baehrecke, E.H.; Blagosklonny, M.V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; El-Deiry, W.S.; Fulda, S.; Gottlieb, E.; Green, D.R.; Hengartner, M.O.; Kepp, O.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lipton, S.A.; Lu, X.; Madeo, F.; Malorni, W.; Mehlen, P.; Nuñez, G.; Peter, M.E.; Piacentini, M.; Rubinsztein, D.C.; Shi, Y.; Simon, H.-U.; Vandenabeele, P.; White, E.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Melino, G.; Kroemer, G. *Cell Death Differ* **2011**, 19, 107.
13. Guerriero, J. L.; Ditsworth, D.; Fan, Y.; Zhao, F.; Crawford, H. C.; Zong, W. -X. *Cancer Res* **2008**, 68, 9595.
14. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. *Cell Prolif* **2003**, 36, 131.
15. Sun, X.; Li, Y.; Li, W.; Zhang, B.; Wang, A. J.; Sun, J.; Mikule, K.; Jiang, Z.; Li, C. J. *Cell Cycle* **2006**, 5, 2029.
16. Lecis, D.; De Cesare, M.; Perego, P.; Conti, A.; Corna, E.; Drago, C.; Seneci, P.; Walczak, H.; Colombo, M. P.; Delia, D.; Sangaletti, S. *Cell Death Dis* **2013**, 4, 920.
17. Salvador, J. A. R.; Carvalho, J. F. S.; Neves, M. A. C.; Silvestre, S. M.; Leitão, A. J.; Silveira, M. M. C.; Sã e Melo, M. L. *Nat Prod Rep* **2013**, 30, 324.
18. Gupta, A.; Kumar, B. S.; Negi, A. S. *J Steroid Biochem* **2013**, 137, 242.
19. Saha, P.; Debnath, C.; Bérubé, G. *J Steroid Biochem* **2013**, 137, 271.
20. Huang, L. -H.; Zheng, Y. -F.; Lu, Y. -Z.; Song, C. -J.; Wang, Y. -G.; Yu, B.; Liu, H. -M. *Steroids* **2012**, 77, 710.
21. Elmegeed, G. A.; Khalil, W. K. B.; Mohareb, R. M.; Ahmed, H. H.; Abd-Elhalima, M. M.; Elsayed, G. H. *Bioorgan Med Chem* **2011**, 19, 6860.

22. Guo, H.; Zhang, G.; Zhang, T.; He, X.; Wu, Z.; Xiao, Y.; Pan, Y.; Qiu, G.; Liu, P.; Hu, X. *Eur J Med Chem* **2011**, 46, 3662.
23. Penov Gaši, K.M.; Oklješa, A.M.; Petri, E.T.; Čelić, A.S.; Djurendić, E.A.; Klisurić, O.R.; Csanádi, J.J.; Batta, G.; Nikolić, A.R.; Jakimov, D.S.; Sakač, M.N. *Med Chem Commun* **2013**, 4, 317.
24. Djurendić, E.; Daljev, J.; Sakač, M.; Čanadi, J.; Jovanović-Šanta, S.; Andrić, S.; Klisurić, O.; Kojić, V.; Bogdanović, G.; Djurendić-Brenesel, M.; Novaković, S.; Penov Gaši, K. *Steroids* **2008**, 73, 129.
25. Savić, M.; Djurendić, E.; Petri, E.; Čelić, A.; Klisurić, O.; Sakač, M.; Jakimov, D.; Kojić, V.; Penov Gaši, K. *RSC Advances* **2013**, 3, 10385.
26. Sakač, M.; Gaković, A.; Stojanović, S.; Djurendić, E.; Kojić, V.; Bogdanović, G.; Penov Gaši, K. *Bioorg Chem* **2008**, 36, 128.
27. Penov Gaši, K.; Djurendić, E.; Dojčinović-Vujašković, S.; Gaković, A.; Jovanović-Šanta, S.; Kojić, V.; Sakač, M. *Chem Pap* **2012**, 66 284.
28. Ajduković, J. J.; Djurendić, E. A.; Petri, E. T.; Klisurić, O. R.; Čelić, A. S.; Sakač, M. N.; Jakimov, D. S.; Penov Gaši, K. M. *Bioorgan Med Chem* **2013**, 21, 7257.
29. Oklješa, A.; Jovanović-Šanta, S.; Klisurić, O.; Sakač, M.; Djurendić, E.; Jakimov, D.; Aleksić, L.; Penov Gaši, K. *J Braz Chem Soc* **2013**, 24, 1613.
30. Djurendić, E. A.; Ajduković, J. J.; Sakač, M. N.; Csanádi, J. J.; Kojić, V. V.; Bogdanović, G. M.; Penov Gaši, K. M. *Eur J Med Chem* **2012**, 54, 784.
31. Nikolić, A. R.; Petri, E. T.; Klisurić, O. R.; Čelić, A. S.; Jakimov, D. S.; Djurendić, E. A.; Penov Gaši, K. M.; Sakač, M. N. *Bioorgan Med Chem* **2015**, 23, 703.
32. Ajduković, J. J.; Penov Gaši, K. M.; Jakimov, D. S.; Klisurić, O. R.; Jovanović-Šanta, S. S.; Sakač, M. N.; Aleksić, L. D.; Djurendić E. A. *Bioorgan Med Chem* **2015**, 23, 1557.
33. Jakimov, D. S.; Kojić, V. V.; Aleksić, L. D.; Bogdanović, G. M.; Ajduković, J. J.; Djurendić, E. A.; Penov Gaši, K. M.; Sakač, M. N.; Jovanović-Šanta S. S. *Bioorgan Med Chem* **2015**, 23, 7189.
34. Lajšić, S.; Grujić-Ignjac, B. *Hemija prirodnih proizvoda*. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu, 1998.
35. Häggström, M.; Richfield, D. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity J Med* **2014**, 1, 1.
36. Yu, B.; Shi, X.-J.; Ren, J.-L.; Sun, X.-N.; Qi, P.-P. *Eu J Med Chem* **2013**, 66, 171.
37. Diklić, V.; Kosanović, M.; Nikolis, J.; Dukić, S. *Biologija sa humanom genetikom*, Medicinski fakultet, Institut za biologiju i humanu genetiku, Beograd, 1997.
38. Séralini, G. E.; Moslemi, S. *Mol and Cell Endocrinol* **2001**, 178, 117.
39. Yadav, M. R.; Sabale, P. M.; Giridhar, R.; Zimmer, C.; Hartmann, R. W. Steroidal carbonitriles as potential aromatase inhibitors. *Steroids* **2012**, 77, 850.
40. Marcotte, P. A.; Robinson, C. H. *Steroids* **1982**, 39, 325.
41. Lønning, P. E.; Geisler, J.; Johannessen, D. C.; Gschwind, H.; Waldmeier, F.; Schneider, W.; Galli, B.; Winkler, T.; Blum, W.; Kriemler, H.; Miller, W. R.; Faigle, J.F. *J Steroid Biochem* **2001**, 77, 39.
42. Lombardi, P. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2002**. 1587, 326.
43. De Bono, J.S.; Logothetis, C.J.; Molina A, et al. *N Engl J Med* **2011**, 364, 1995. Supplementary Material 3: Protocol (from Web version on PubMed Central).
44. Penov Gaši, K. M.; Đurendić-Brenesel, M. Dj.; Đurendić, E. A.; Sakač, M. N.; Čanadi, J. J.; Daljev, J. J.; Armbruster, T.; Andrić, S.; Sladić, D. M.; Božić, T. T.; Novaković, I. T.; Juranić, Z. D. *Steroids* **2007**, 72, 31.
45. Djurendić, E. A.; Ajduković, J. J.; Sakač, M. N.; Čanadi, J. J.; Kojić, V. V.; Bogdanović, G. M.; Penov Gaši, K. M. *Arkivoc* **2009**, 13, 311.

46. Minorics, R.; Szekeres, T.; Krupitza, G.; Saiko, P.; Giessrigl, B.; Wölfling, J.; Frank, E.; Zupkó, I. *Steroids* **2011**, 76, 156.
47. Abdelhalim, M. M.; Kamel, E. M.; Rabie, S. T.; Mohamed, N. R. *Steroids* **2011**, 76, 78.
48. Moreira, V. M. A.; Vasaitis, T. S.; Njar, V. C. O.; Salvador, J. A. R. *Steroids* **2007**, 72, 939.
49. Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. Nitrile-Containing Pharmaceuticals: Efficacious Roles of the Nitrile Pharmacophor. *J Med Chem* **2011**, 53, 7902.
50. Ahmad, I.; Shagufta. *Eu J Med Chem* **2015**, 102, 375.
51. Penov Gaši, K. M.; Stanković, S. M.; Csanadi, J. J.; Djurendić, E. A.; Sakač, M. N.; Medić Mijačević, Lj.; Arcson, O. N.; Stojanović, S. Z.; Andrić, S.; Molnar Gabor, D.; Kovačević, R. *Steroids*, **2001**, 66, 645.
52. Thomas, J. L.; Bucholtz, K. M.; Sun, J.; Mack, V. L.; Kacsoh B. *Mol Cell Endocrinol* **2009**, 301, 174.
53. Zhu, B. T.; Kosh, J. W.; Fu, J.; Cai M. X.; Xu, S.; Conney, A. H. *Steroids* **2000**, 65, 521.
54. Joosten, H. F. P.; van Acker, F. A. A.; van den Dobbelen, D. J.; Horbach, G. J. M. J.; Krajnc, E. I. *Toxicol Lett* **2004**, 151, 113.
55. Stopper, H.; Schmitt, E.; Kobras, K. *Mutat Res* **2005**, 574, 139.
56. Dorn, S. B.; *Assessment of chromosomal genotoxicity of steroidal hormones related to drug development*. Inaugural-Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2007.
57. Hana, H. Y.; Khalil, W. K. B.; Elmakawy, A. I.; Elmegeed, G. A. *J Steroid Biochem* **2008**, 110, 284.
58. Francois, E.; Wang, D. Y.; Fulthorpe, R.; Liss, S. N.; Edwards, E. A. *Biotechnol Adv* **2003**, 22, 17.
59. Feser, W.; Kerdar, R. S.; Baumann, A.; Korber, J.; Blode, H.; Kuhn, W. *Toxicol In Vitro* **1998**, 12, 353.
60. Baum, M. J.; Vreeburg, J. T. *Science* **1973**, 182, 283.
61. Mattioli, F.; Garbero, C.; Gosmar, M.; Manfredi, V.; Carrozzino, R.; Martelli, A.; Brambilla, G. *Mutat Res* **2004**, 564, 21.
62. Muntoni, F.; Fisher, I.; Morgan, J. E.; Abraham, D. *Neuromuscular Disorders* **2002**, 12, S162.
63. Fragkaki, A. G.; Angelis, Y. S.; Koupparis, M.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Kokotos, G.; Georgakopoulos, C. *Review. Steroids* **2009**, 74, 172.
64. Goodman, L. S.; Gilman, A. *The pharmacological basic of therapeutics*. Mc Millan Publ. Co Inc., New York, 1987.
65. Ciapetti, G.; Granchi, D.; Verri, E.; Savarino, L.; Cavedagna, D.; Pizzoferrato, A. *Biomaterials* **1996**, 17, 1259.
66. Quesada, R. A.; Garcia Gravalos, D. M.; Fernandez Puentes, L. J. *Br J Cancer* **1996**, 74, 677.
67. Stark, D. M.; Shopsis, C.; Borenfreund, E.; Babich, H. *Food Chem Toxicol* **1986**, 24, 449.
68. Wilson, A. P. *Citotoxicity and viability assays*. In: *Animal cell culture*, Freshney, R. I., ed., 1989.
69. Pavlović, S. *Jug Med Biohem* **1996**, 15, 107.
70. Hayflick, L.; Moorhead, P. S. *Exp Cell Res* **1961**, 25, 585.
71. Ekwall, B. *Ann NY Acad Sci* **1983**, 407, 64.
72. Marquardt, H.; Schafer, S. G.; McClellan, R.; Welsch, F. *Toxicology*. In: Spielmann H, Goldberg, A. M., eds. *In vitro Methods*, Academic press, 1999.
73. Varagić, M. V.; Milošević, P. M. *Farmakologija*. Beograd, **2003**.
74. Baltić, V. V. *Indukcija diferencijacije*. Medicinski fakultet, Institut za onkologiju, Sremska Kamenica, Novi Sad, 1991.

75. Hollosy, F.; Lorand, T.; Orfi, L.; Eros, D.; Keri, G.; *J Chrom B Analit Technol Biomed Life Sci* **2002**, 768, 361.
76. Ekwall, B. *Toxicol Lett* **1981**, 7, 359.
77. Buttke, T. M.; McCubrey, J. A.; Owen, T. C. *JIM* **1993**, 157, 233.
78. Stuffness, M.; Pezzuto, J. M. *Assays related to cancer drug discovery*. In: Dey, P. M.; Harbone, J. B., eds. *Methods in plant biochemistry. Vol 16*, Academic Press, London, 1991.
79. Berridge, M. V.; Tan, A. S.; McCoy, K. D.; Wang R. *Biochemica* **1996**, 15.
80. Vistica, D. T.; Skehan, P.; Scudiero, D.; Monks, A.; Pittman, A.; Boyd, M. R. *Cancer Res* **1991**, 51, 2515.
81. Mossman, T. *JIM* **1983**, 65, 55.
82. Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, MJ; Fine, D. L. et al. *Cancer Res* **1988**, 48, 589.
83. Jokanović, M. *Toksikologija. Elit –Medica*, Beograd, 2001.
84. Hingorani, R.; Deng, J.; Elia, J.; McIntyre, C.; Mittar, D. *Detection of apoptosis using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ system, Application Note*, BD Biosciences, 2011.
85. Lockshin, R. A.; Williams, C. M. *J Insect Physiol* **1964**, 10, 643.
86. Kerr, J. F. *J Pathol Bacteriol* **1965**, 90, 419.
87. Lockshin, R. A.; Williams, C. M. *J Insect Physiol* **1965**, 11, 123.
88. Vaux, D. L. *Toxicology* **2002**, 3, 181.
89. Galluzzi, L.; Maiuri, M. C.; Vitale, I.; Zischka, H.; Castedo, M.; Zitvogel, L. et al. *Cell Death Differ* **2007**, 14, 1237.
90. Green, D. R.; Ferguson, T.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. *Immunol* **2009**, 9, 353.
91. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Vandenabeele, P.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Baehrecke, E. H.; Blagosklonny, M. V.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Green, D. R.; Hengartner, M.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lipton, S. A.; Malorni, W.; Nuñez, G.; Peter, M. E.; Tschoop, J.; Yuan, J.; Piacentini, M.; Zhitovskiy, B.; Melino, G. *Cell Death Differ* **2009**, 16, 3.
92. Nelson, D. A.; White, E. *Genes&Dev* **2004**, 18, 1223.
93. Leist, M.; Jaattela, M. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, 2, 589.
94. Kroemer, G.; El-Deiry, W. S.; Golstein, P.; Peter, M. E.; Vaux, D.; Vandenabeele, P. et al. *Cell Death Differ* **2005**, 12 (Suppl 2), 1463.
95. Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V. *Annu Rev Biochem* **2000**, 69, 217.
96. Kaufmann, S. H.; Hengartner, M. O. *Trends Cell Biol* **2001**, 11, 526.
97. Katoch, B.; Sebastian, S.; Sahdev, S.; Padh, H.; Hasnain, S. E.; Begum, R. *Indian J Exp Biol* **2002**, 40, 513.
98. Rutledge, S. E.; Chin, J. W.; Schepartz, A. *Curr Opin Chem Biol* **2002**, 6, 479.
99. De Bruin, C. E.; Medema, P.J. *Cancer Treatment Rev* **2008**, 34, 737.
100. Galluzzi, L.; Aaronson, S. A.; Abrams, J.; Alnemri, E. S.; Andrews, D. W.; Baehrecke, E. H. et al. *Cell Death Differ* **2009**, 16, 1093.
101. Klionsky, D. J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D. K.; Aliev, G.; Askew, D. S. et al. *Autophagy* **2008**, 4, 151.
102. Chipuk, J. E.; Green, D. R. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**, 6, 268.
103. Žlender, V. *Arh Hig Rada Toksikol* **2003**, 54, 267.
104. Colin, A.; Seamus, J. M. *Bioschemistry* **2009**, 2, 62.

105. Kristoffer, V.; Lawrence, F. P. *Oncogene* **2003**, 22, 5792.
106. Wickman, G.; Julian, L.; Olson, M. F. *Cell Death Differ* **2012**, 19, 735.
107. Vermes, I. H. C.; Reutelingsperger, C. *J Immunol Methods* **2000**, 243, 167.
108. Davis, A. M.; Ryan, H. D. *Toxicol Pathol* **1998**, 26, 810.
109. Lee, H. C.; Wei, Y. H. *J Biomed Sci* **2000**, 7, 2.
110. Wei, M. Z.; Zong, W. X.; Gewirtz, E. H. et al. *Science* **2001**, 292, 727.
111. Reed, J. C. *Am J Pathol* **2000**, 157, 1415.
112. Thornberry, N.; Lazebnik, Y. *Science* **1998**, 281, 1312.
113. Hengarter, M. *Nature* **2000**, 11, 526.
114. Elmore, S. *Toxicol Pathol* **2007**, 35, 495.
115. Daniel, P. T.; Koert, U.; Schuppan, J. *Angew. Chem Int Ed* **2006**, 45, 872.
116. Peter, M. E. *Biochem J* **2004**, 382, e1.
117. Chang, D.W. Xing, Z., Pen, Y., et al. *EMBO J*, **2002**, 21, 3704.
118. Micheau, O., Thome, M., et al. *J Biol Chem* **2002**, 277, 45162.
119. Sharp, D. A.; Lawrence, D. A.; Ashkenazi, A. *J Biol Chem* **2005**, 280, 19401.
120. Wilson, T. R.; McLaughlin, K. M.; McEwan, M. et al. *Cancer Res* **2007**, 67, 5754.
121. Hengartner MO. *Nature* **2000**, 407, 770.
122. Irmeler, M, Thome, M., Hahne, M., et al. *Nature* **1997**, 388, 190.
123. Burns, T. F., El Deiry W. S. *J Biol Chem* **2001**, 276, 37879.
124. Hyer, M. L., Samuel, T., Reed, J. C. *Clin Cancer Res* **2006**, 12, 5929.
125. Cör, A.; Pižem, J.; Gale, N. *Virchows Arch* **2004**, 444, 439.
126. Krakstad, C.; Chekenya, M. *Moleculr Cancer* **2010**, 9, 135.
127. Wajan, H. *Science* **2002**, 296, 1635.
128. Schutze, S.; Tchikov, V.; Schneider-Brachert, W. *Nat Rev Cell Biol* **2008**, 9, 655.
129. Mehlen, P., Bredesen, D. E. *Sci Signal* **2011**, 4, mr2.
130. Chinnaiyan A.M.; O'Rourke K.; Tewari M.; Dixit V. M. *Cell* **1995**, 81, 505. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M. et al. *Cell Death Differ* **2011**, 1.
131. Vaux, D. L. *Toxicology* **2002**, 181, 3.
132. Faubion, W.; Gores, G. *Hepatology* **1999**, 29, 1.
133. Muzio, M.; Chinnaiyan, A.M.; Kischkel, F.C.; O'Rourke, K.; Shevchenko, A. et al. *Cell* **1996**, 85, 817.
134. Meler, P.; Vousden, K. H. *Moll Cell* **2007**, 28, 746.
135. Lavrik, I.; Golks, A.; Krammer, P. H. *J Cell Sci* **2005**, 118, 25.
136. Wang, J.; Chun, H. J.; Wong, W.; Spencer, D. M.; Lenardo, M. J. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98, 13884.
137. Reed, J. C. *Am J Pathol* **2000**, 157, 1415.
138. Irmeler, M, Thome, M., Hahne, M., et al. *Nature* **1997**, 388, 190.
139. Burns, T. F., El Deiry W. S. *J Biol Chem* **2001**, 276, 37879.
140. Hyer, M. L., Samuel, T., Reed, J. C. *Clin Cancer Res* **2006**, 12, 5929.
141. Zimmermn, K. C.; Douglas, R. G. *J Allergy Clin Immuno* **2001**, 108, 99.

142. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinvasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S. et al. *Cell* **1997**, 91, 479.
143. Zhang, Y.; Herman B. *Mech Aeing Dev* **2002**, 123, 245.
144. Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. *Neoplasia*. In: Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease. 7th ed.*: Elsevier Saunders, Philadelphia, **2005**
145. Labar B. *Medicus* **2001**, 10, 141.
146. Rust, C.; Gores, G. J. *Am J Med* **2000**, 108, 567.
147. Chipuk, E. J.; Green, R. D. *Cell* **2008**, 18, 157.
148. Joza, N.; Susin, S.A.; Daugas, E.; Stanford, W.L.; Cho, S. K.; Li C.Y. et al. *Nature* **2001**, 410, 549.
149. Widlak, P.; Li, Y. L.; Wang, X.; Garrard, T. W. *J Biol Chem* **2001**, 276, 48404.
150. Susin A.S., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M. et al. *J Exp Med* **2000**, 192, 571.
151. Salvesen, G. S.; Duckett, C. S. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2002**, 3, 401.
152. Clarke, A. R.; Purdie, C. A.; Harrison, D. J.; Morris, R. G.; Bird, C. C.; Hooper, M. L. et al. *Nature* **1993**, 362, 849.
153. Boulares, A. H.; Yakovlev, A. G.; Ivanova, V.; Stoica, B.; Wang, A. G.; Iyer, S. Smulson, M. *J Biol Chem* **1999**, 274, 22932.
154. Komarova, A. E.; Gudkov, V. A. *Biochem Pharmacol* **2001**, 62, 657.
155. Castedo, M.; Ferri, K.; Roumier, T.; Me'tivier, D.; Zamzami, N.; Kroemer, G. J. *Immunol Methods* **2002**, 265, 39.
156. Lowe, W. S.; Lin, A.W. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 485.
157. Makin, G.; Hickman, J. A. *Cell Tissue Res* **2000**, 301, 143.
158. Smith, L.; Nagar, S.; Kim, G.; Morgan, W. *Health Physics* **2003**, 85, Suppl. 1, 23.
159. Little, J. B. *Carcinogenesis* **2000**, 21, 397.
160. Mrđanović J.; Bogdanović G.; Cvetković D.; Velićanski A.; Četojević-Simin D. *Archive of Oncology* **2007**, 15, 85.
161. Bogdanović V.; Turšijan S.; Đorđević M.; Nikolić A.; Mrđanović J.; Jakimov D.; Trajković V.; Bogdanović G.; Ivković-Kapriel T.; Dugandžija T. *Archive of Oncology* **2008**, 16, 39.
162. Mrđanović, J.; Jungić, S.; Šolajić, S.; Bogdanović, V.; Jurišić V. *Food Chem Toxicol* **2012**, 50, 2937.
163. Mrđanović, J. *Magistarski rad*, Biološki fakultet, Beograd, **2007**.
164. Radmilović, V. *Kancerogeni u radnoj i životnoj sredini, Drugo, dopunjeno izdanje*. Velarta, **2002**.
165. DeVita V. T.; Hellman S.; Rosenberg S. A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia 2008.
166. Vilenchik, M. M.; Knudson, A. G. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, 100, 12871.
167. Mitelman, F.; Heim, S. *General Effects of Strucutural and Numerical Abnormalities*. Cancer Cytogenetics 2nd edition, Wiley-Liss Inc., 1995.
168. Sarasin, A. *Mutat Res* **2003**, 544, 99.
169. Bonassi, S.; Znaor, A.; Norppa, H.; Hagmar, L. *Cytogenet Genome Res* **2004**, 104, 376.
170. Ayan, D.; Maltais, R.; Hospital, A.; Poirier, D. Chemical synthesis, cytotoxicity, selectivity and bioavailability of 5a-androstane-3a,17b-diol derivatives. *Bioorg Med Chem* **2014**, 22, 5847.
171. *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment - A Manual*. IAEA - International Atomic Energy Agency, Technical reports series No. 405, Vienna, 2001.

172. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*; IAEA: Vienna, 2011.
173. Fenech, M.; Morley, A. *Mutat Res* **1985**, 147, 29.
174. Fenech, M. *Mutat Res* **1998**, 404, 155.
175. Fenech, M.; Chang, W. P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. *Mutat Res* **2003**, 534, 65.
176. Fenech, M. *Toxicology* **2002**, 181, 411.
177. Taylor, J. H.; Woods, P. S.; Hughes, M. L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1957, 43, 122.
178. Perry, P.; Wollf, S. *Nature* **1974**, 261, 156.
179. Perry, P. E.; Thomson, E. J. *The methodology of sister chromatid exchanges*. In: Kilbey, B. J.; Legator, M.; Nichols, W.; Ramel, C. (editors), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, 24, pp. 495–529. Elsevier Scientific, Amsterdam, The Netherlands, 1984.
180. Tucker, J. D.; Ashworth, L. K.; Johnston, GR.; Allen, N. A.; Carrano, A. V. *Mutat Res* **1988**, 204, 435.
181. Tucker, J. D.; Preston, R. J. *Mutat Res* **1996**, 365, 147.
182. Bender, M. A.; Preston, R. J.; Leonard, R. C.; Pyatt, B. E.; Gooch, P. C.; Shelby, M. D. *Mutat Res* **1988**, 204, 421.
183. Reidy, J. A.; Annest, J. L.; Chen, A. T. L.; Welty, T. K. *Environ Mol Mutagen* **1988**, 12, 311.
184. Sarto, F.; Faccioli, M. C.; Cominato, I.; Levis, A. G. *Mutat Res* **1985**, 144, 183.
185. Zimonjić, D. B.; Savković, N.; Anđelković, M. *Genotoksični agensi, efekti, principi i metodologija detekcije*. Naučna knjiga, Beograd, **1990**.
186. Wolff, S.; Bodycote, J.; Painter, R. B. *Mutat Res* 1974, 25, 73.
187. Verma, R. S.; Babu, A. (Eds.), *Human Chromosomes: Principles and Techniques*, 2nd ed., McGraw-Hill, Inc., Health Professions Division, New York 1995.
188. Latt, S. *Ann Rev Genet* 1981, 15, 11.
189. Schubert, I. *Biol Zentbl* **1990**, 109, 7.
190. Evans, H. J. *Chromosomes Today* 1977, 6, 315.
191. Shafer, D. A. *Hum Genet* **1977**, 39, 177.
192. Cleaver, J. E. *Exp Cell Res* **1981**, 13, 627.
193. Cleaver, J. E.; Mitchell, D. A.; Feeney, L.; Afzal, V. *Mutagenesis* **1996**, 11, 183.
194. Natarajan, A.T.; Boei, J. J.; Darroudi, W. A. F.; Van Diemen, P. C. M.; Dulount, F.; Hande, P. M. at al. *Environ Health Persp* **1996**, 104, 445.
195. Natarajan, A. T. *Mutat Res* **2002**, 504, 3.
196. McGregor, D. B.; Rice, J. M.; Venitt, S., editors. *The Use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*. WHO, IARC Scientific Publications No. 146, **1999**.
197. Minton, S. *Cancer Control* **1999**, 6, 247.
198. Zilembo, N.; Bajetta, E.; Bichisao, E.; Martinetti, A.; La Torre, I.; Bidoli, P.; Longarini, R.; Portale, T.; Seregni, E.; Bombardieri, E. *Biomed Pharmacother* **2004**, 58, 255.
199. Lønning, P. E. *Breast Cancer Res Treat* **1998**, 49, S45.
200. Park, E. J.; Kwon, H. K.; Choi, Y. M.; Shin, H. J.; Choi, S. *PLoS One* **2012**, 7, 44990.
201. Chou T. C.; Talalay P. *Adv Enzyme Regul* **1984**, 22, 27.

202. Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res* **1988**, *48*, 4827.
203. Kojić, V. *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, **2012**.
204. *BD CellQuest Pro Software*; Becton, Dickinson and Company: San Jose, USA, 2002.
205. Zhang, G.; Gurtu, V.; Kain, S. R.; Yan, G. *BioTechniques* **1997**, *23*, 525.
206. Bender, A.; Opel, D.; Naumann, I.; Kappler, R.; Friedman, L.; von Scheinitz, D.; Debatin, K.-M.; Fulda, S. *Oncogene* **2011**, *30*, 494.
207. Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248.
208. *In vitro mammalian cell micronucleus test*, OECD Guideline For The Testing Of Chemicals 487, Adopted: 22 July 2010.
209. Henry, C. M.; Hollville, E.; Martin, S. J. *Methods* **2013**, *61*, 90.
210. Archer, P. G.; Bender, M.; Bloom A. D. et al., in: Bloom, A. D. (Ed.), *Guidelines for Studies of Human Populations Exposed to Mutagenic and Reproductive Hazards*, March of Dimes Birth Defects Foundation, Report of Panel 1, White Plains, New York, 1981.
211. Aitio, A.; Becking, G.; Berlin A. et al. (Eds), *Indicators for Assessing Exposure and Biological Effects of Genotoxic Chemicals*, CEC, EUR 11642 EN, Luxembourg, 1988.
212. Forni, A. *Sci Total Environ* **1992**, *120*, 149.
213. Merk, O.; Speit, G. *Environ Mol Mutagen* **1998**, *32*, 260.
214. Fulda, S.; Debatin, K.M. *Oncogene* **2006**, *25*, 4798.
215. Merino, D.; Lok, S. W.; Visvader, J. E.; Lindeman, G. J. *Oncogene* **2016**, *35*, 1877.
216. Brauns, C. S., Dealtry, G., Milne, P., Naude, R., Van de Venter, M. *Anticancer Res* **2005**, *25*, 4197.
217. Oures, A. H., Yakovlev, G. A., Ivanova, V., Stoica, B. A. , Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 33, 22932.
218. Kromer, G., Martin, S. J. *Nat Med* **2005**, *11*, 725.
219. Bogdanović, G.; Jakimov, D.; Mrđanović, J.; Šolajić, S. *Biomarkeri genotoksičnosti kod osoba profesionalno izloženih nafti i naftnim derivatima*. U: Pejin, D. i Popović, S. (urednici): *ŽIVOT SA KANCEROGENIMA*. Ortomedics, Novi Sad, 2010.
220. Perry, P.; Evans, H. J. *Nature* **1975**, *258*, 121.
221. Fenech, M. *Drug Discov Today* **2002**, *7* 1128.
222. *Method: Preparation of Alcohol-Fixed Whole Cells From Suspensions For DNA Analysis*. Source Book Section 1.1 1, 7/89 23-1838-00, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 2350 Qume Drive, San Jose, California 95131-1807, 2002.
223. *ImageJ*, kompjuterski program. NIH Image, <http://imagej.nih.gov>
224. *Microsoft Office Excel*, kompjuterski program. Microsoft, <https://products.office.com/en-us/excel>
225. *CometScore* kompjuterski program. AutoComet, <http://autocomet.com/index.php?id=cometscore>
226. *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, OECD Guideline For The Testing Of Chemicals 473 Adopted: 21st July 1997.
227. *The ACT Cytogenetic Laboratory Manual – 2nd Edition*. J.M. Barch (Ed), Raven Press, New York, 1991.
228. *Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals*. Prepared for the International Programme on Chemical Safety (IPCS) by the International Commission for Protection Against Mutagens and Carcinogens, World Health Organisation, Geneva, 1985.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dimitar Jakimov je rođen 24. februara 1969. godine u Skopju, Republika Makedonija.

Živi u Novom Sadu, gde je završio osnovnu i srednju medicinsku školu.

Diplomirao je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu (odsek za biologiju, obrazovni profil „Diplomirani biolog“, izborna oblast genetika) 1996. godine.

Od avgusta 1997. godine zaposlen je na Institutu za onkologiju Vojvodine, u Zavodu za eksperimentalnu onkologiju, na radnom mestu diplomiranog biologa.

Specijalizaciju iz medicinske genetike, na Medicinskom fakultetu u Novom Sadu završio je juna 2003. godine i stekao zvanje Specijaliste medicinske genetike.

U toku svog profesionalnog rada završio je više stručnih kurseva: Osnovni kurs za rad sa izvorima jonizujućeg zračenja na Institutu za nuklearne nauke Vinča (1999.); Kurs za praktičnu primenu DNA microarray tehnologija u Briselu (2006.); Kurs molekularne patologije u Klužu (2012.). Obučen je za rad na autonomnim laboratorijskim analizatorima (Roche, Bayer i drugi).

Upisao je doktorske studije biohemije 2010. godine, položio sve ispite sa prosečnom ocenom 9,83.

Tokom svog rada u više laboratorija uveo je mnoge laboratorijske analitičke metode među kojima su: ispitivanje DNK sinteze inkorporacijom radioaktivnog analoga ^3H -timidina, ELISA testovi, citogenetski i genotoksikološki testovi kariotipizacije, analize hromozomskih aberacija, test izmena sestrinskih hromatida (SCE), test mikronukleusa, fluorescentna in situ hibridizacija (FISH), „Komet“ esej, zatim ispitivanje ekspresije specifičnih proteina *Western Blot* metodom, detekcija genskih mutacija pomoći PCR i Real-Time PCR metoda sa hibridizacijom ili gel elektroforezom DNK, kao i mikroskopske tehnike imunohistohemijskih i drugih bojenja i morfološke analize ćelija.

2010. godine uspešno je izvršio međunarodnu validaciju metode detekcije mutacija na KRAS genu kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, što je omogućilo kliničku dijagnostiku na Institutu za onkologiju Vojvodine u cilju efikasnije terapije ovih pacijenata.

Autor je i koautor 75 naučnih radova objavljena u stranim i domaćim časopisima, od kojih su 22 objavljena u vodećim internacionalnim časopisima (ukupni impakt faktor 81,94) i dva poglavlja u monografiji. Učestvovao je na većem broju međunarodnih naučnih skupova.

Član je nekoliko međunarodnih i domaćih profesionalnih organizacija: EACR - *European Association of Cancer Research*; BUON – *Balkan Union of Oncology*, Srpsko biohemijsko društvo i Udruženje genetičara Srbije.

Učestvovao je do sada u 5 naučno-istraživačkih projekata, od toga 3 projekta koje je finansiralo Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, jedan pod pokroviteljstvom sekretarijata za zdravlje i zaštitu životne sredine grada Novog Sada i jedan međunarodni projekat iz IPA HU-SRB Programa pogranične saradnje koji je finansirala Evropska Unija.

Pomogao je do sada u izradi više desetina studentskih, diplomskih, master i doktorskih radova svojih kolega, od kojih su neki i nagrađivani u inostranstvu.

Održao je veliki broj stručnih predavanja za studente, pacijente, radnike izložene profesionalnom riziku, i dr.

Već nekoliko godina drži predavanja i demonstracije laboratorijskih metoda u okviru vežbi studentima prirodno-matematičkog i medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Novi Sad, 10. VIII 2016.

Dimitar Jakimov

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani material

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Autor:

Dimitar Jakimov

AU

Mentor:

Dr Suzana Jovanović-Šanta, vanr. prof. PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada:

Uticaj modifikovanih steroidnih jedinjenja na ćelijski ciklus, indukciju apoptoze i nastanak genetskih oštećenja u humanim tumorskim ćelijama

NR

Jezik publikacije:

Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda:

s / e

JI

Zemlja publikovanja:

Republika Srbija

ZP

Uže geog. područje:

Vojvodina

UGP

Godina:

2016.

GO

Izdavač:

Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa:

Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

MA

Fizički opis rada:

Broj poglavlja: 6 (+1). Strana: 146 (+48). Lit. citata: 228. Tabela: 4 (+7). Shema 0. Slika: 58 (+5).

FO

Naučna oblast:

Biohemija

NO

Naučna disciplina:

Biohemija

ND

Predmetna odrednica/

Modifikovani steroidi, 17-supstutuisani steroidi, 16,17-sekosteroidi, citotoksičnost, genotoksičnost, apoptoza, ćelijski ciklus, morfoloģija ćelije

Ključne reči:

PO

UDK

Čuva se:

Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 3, PMF, Novi Sad

ČU

Važna napomena:

Nema

VN

Izvod:
IZ

U radu je ispitan uticaj odabranih modifikovanih steroida na proliferaciju ćelija humanih malignih tumora i zdravih ćelija, a zatim njihov uticaj na modifikaciju ćelijskog ciklusa, indukovanje apoptoze i genetskih oštećenja u tumorskim ćelijama najsenzitivnijim na ova jedinjenja (MDA-MB-231 ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke, ER-). Ispitana je *in vitro* citotoksičnost odabranih steroidnih derivata prema ćelijskim linijama MCF-7, MDA-MB-231, PC3, HeLa, HT-29, MRC-5, K562 i A549, i proučavan ćelijski mehanizam koji je u osnovi uočenog antiproliferativnog efekta svakog od ispitivanih derivata. Sva ispitivana jedinjenja indukuju apoptozu MDA-MB-231 ćelija, na različite načine i sa različitim potencijalom. Genotoksikološka studija upotpunjuje rezultate proučavanja efekta ispitivanih steroidnih jedinjenja na biološke sisteme, ukazujući na izostanak genotoksičnosti ovih jedinjenja i njihov biomedicinski potencijal.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:
DP

27. 03. 2014.

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)
KO

Predsednik:

dr Svetlana Trivić, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, predsednik

Mentor:

dr Suzana Jovanović-Šanta, vanredni profesor PMF-a u Novom Sadu, mentor

Član:

dr Marija Sakač, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu, član

Član:

dr Vesna Kojić, naučni saradnik Instituta za onkologiju Vojvodine Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, član

Član:

dr Slavica Knežević-Ušaj, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Content code: Doctoral thesis
CC

Author: Dimitar Jakimov
AU

Mentor/comentor: Dr Suzana Jovanović-Šanta, Professor
MN

Title: Effect of modified steroid compounds on cell cycle,
TI apoptosis induction and occurrence of genetic defects in human tumor cells.

Language of text: Serbian (Latin alphabet)
LT

Language of abstract: English
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2016
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental
PP Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

Physical description: Number of chapters: 6 (+1). Pages: 146 (+48). References:
PD 228. Tables: 4 (+7). Shemas: 0. Figures: 58 (+5).

Scientific field: Biochemistry
SF

Scientific discipline: Biochemistry
SD

Subject/ Key words: Modified steroids, 17-Substituted steroids, 16,17-
SKW Secosteroids, Cytotoxicity, Genotoxicity, Apoptosis, Cell
UC cycle, Cell morphology

Holding data: Library of Department of Chemistry, Biochemistry and
HD Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad

*Note:***N**

None

Abstract:

AB

In this work the effect of selected modified steroids on proliferation of human malignant tumor and healthy cells, as well as their impact on the modification of cell cycle arrest, induction of apoptosis and genetic defects in tumor cells most sensitive to these compounds (MDA-MB-231 cell line of human breast adenocarcinoma, ER-) were examined. We examined the *in vitro* cytotoxicity of selected steroidal derivatives towards MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, HeLa, HT-29, MRC-5, K562 and A549 cell lines, and studied the cellular mechanism that is underlying the antiproliferative activity expressed by these steroidal derivatives. All tested compounds induced apoptosis of MDA-MB-231 cells, in different ways and with different potential. Genotoxicological study complements the results of the study of the effect of tested steroidal compounds on biological systems, pointing out the lack of genotoxicity of these compounds and therefore their biomedical potential.

Accepted by the Scientific

Board:

ASB

27th March 2014

Defended on:

DE

*Thesis defend board:***DB**

President:

Dr Svetlana Trivić, Full Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Mentor:

Dr Suzana Jovanović-Šanta, Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Member:

Dr Marija Sakač, Full Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Member:

Dr Vesna Kojić, Research Associate, Oncology
Institute of Vojvodina, Medical Faculty, University of Novi
Sad

Member:

dr Slavica Knežević-Ušaj, Full Professor, Medical Faculty,
University of Novi Sad