



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ИСПИТИВАЊЕ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА ЗЛАТА, ПЛАТИНЕ И РУТЕНИЈУМА НА ЋЕЛИЈАМА ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ И IN VIVO ЕФЕКТА НА МИШЈЕМ МОДЕЛУ ХРОНИЧНЕ ЛИМФОЦИТНЕ ЛЕУКЕМИЈЕ.

Кључне речи :

B-CLL, комплекси злата, платине и рутенијума, BALB/c мишеви, MEC-2 и BCL1 ћелијске линије.

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Лечење тумора цисплатином је повезано са бројним нежељеним ефектима и релативно брзим развојем резистенције. Због тога су стално актуелна истраживања нових комплекса тешких метала која би имала сличан терапеутски ефекат као цисплатина а мање нежељених дејстава и слабији развој резистенције. Резистенција на цисплатину може да буде природна или стечена и углавном је повезана са променама p53 молекула, повећањем експресије молекула са тиол групама (метилотионеин, глутатион) који инактивирају цисплатину, већом експресијом молекула укључених у поправку DNA (ERCC1). Токсичност цисплатине је углавном повезана са великом продукцијом слободних радикала у ћелијама изложеним цисплатини.

В хронична лимфоцитна леукемија (B-CLL) је најчешћа леукемија одраслих особа. Сматра се да је ова болест неизлечива јер је свака терапија праћена егзацербацијом. Јавља се резистенција туморских ћелија на до сада сваки примењивани хемиотерапеутик.

Ово истраживање има за циљ да испита цитотоксичност нових комплекса злата, платине и рутенијума на парентералним CLL ћелијским линијама MEC-2 и BCL1 и линијама са развијеном резистенцијом на цисплатину (добијеним од парентералних линија). Уколико неки комплекси покажу знатну цитотоксичност и на линијама резистентним на цисплатину, циљ је да се детаљније испита механизам дејства комплекса и да се утврде разлике у механизму изазивања смрти ћелија у односу на цисплатину. На анималном моделу за CLL провериће се који комплекси изазивају смрт туморских ћелија и in vivo и који би комплекс могао даље да се испита као потенцијални терапеутик.

Циљ истраживања

Да се испитају механизми којима комплекси злата, платине и рутенијума изазивају смрт ћелија хроничне лимфоцитне леукемије (ћелијске линије MEC-2 и BCL1).



Да се утврди да ли ови комплекси делују цитотоксично на ћелије резистентне на дејство цисплатине.

Да се испита дејство комплекса *in vivo* на анималном моделу хроничне лимфоцитне леукемије изазвне код BALB/c мишева интравенском апликацијом BCL1 ћелијске линије.

Актуелност истраживања

Цисплатина, неутрални неоргански комплекс, користи се за лечење појединих тумора, али је примена овог лека повезана са релативно брзим развојем резистенције. Цисплатина пролази ћелијску мембрану, у ћелији се активира и остварује интеракцију са DNA и са протеинима. Оштећену DNA препознају протеини који се активирају и могу симултано да индукују различите про- и анти- апоптотске путеве. Од релативног интензитета и/или дужине сваког од ових сигнала који се нисходно укрштају зависи коначна судбина ћелије (1,2). Механизми поправке DNA повезани су са активацијом контролних тачака ћелијског циклуса и процесом апоптозе, а сва три процеса повезује p53 протеин (2,3). Цисплатина изазива посредну активацију p53 молекула, тек после низа усходних догађаја. Активирају се ATM/ATR и MAPK (ERK, JNK, p35) киназе које катализују фосфорилацију p53 молекула, који изазива транслокацију Вах из цитосола у митохондрије, ослобађа се Сут с, активирају се каспазе 9 и 3 и резултат је апоптоза (4,5). Цисплатина, такође може да индукује апоптозу активацијом Fas/FasL и каспазе-8, са или без помоћи p53 (6). Активација MAPK киназа може да антагонизује апоптозу што све зависи од типа ћелије, величине оштећења DNA и сигнала из екстрацелуларне средине. Активирани p53 молекул делује на p21 и продужава се G2/M контролна тачка ћелијског циклуса када је могућа поправка DNA. Са друге стране ако ћелија предуго остане у G2 фази ћелијског циклуса могућа је смрт ћелија механизмом аутофагије (8). Cdk1-cyclin В комплекс има кључну улогу у прелазу G2 у М фазу ћелијског циклуса. *Roscovitine* инактивира Cdk1-cyclin В комплекс и изазива G2 *arrest* ћелијског циклуса и смрт ћелија аутофагијом (7). Резистенција неких ћелија на цисплатину може, између осталог, да буде последица изражене репарације DNA, дисфункције p53, повећане експресије bcl-2 молекула. Према томе, уколико потенцијални лек у ћелијама може да појача аутофагију, или доминатно активира p53 независне путеве апоптозе, могао би да покаже знатну цитотоксичност и у ћелијама резистентним на дејство цисплатине.

Хронична В лимфоцитна леукемија, CLL-В је најчешћа хронична леукемија одраслих у земљама Европе и Северне Америке. Карактерише се акумулацијом на изглед зрелих В лимфоцита (IgM, IgD, CD23, CD19, CD20, CD5) у крви, лимфним чворовима, костној сржи, што је праћено леукоцитозом, лимфаденопатијом, хепатоспленомегалијом дисфункцијом костне сржи, рекурентним инфекцијама и често аутоимунским поремећајима (16 ревијски приказ). Око 80% CLL је удружено са карактеристичним хромозомским аберацијама (13q14 који садрже 2 miRNA mir-15a mir16-1; 11q23 који кодира ATM; 17p13 који кодира p53. Такође присутне су епигенетске промене: хипометилација BCL-2; метилација промотора за DAPK1, молекула који у случају стреса ћелије, недостатка фактора раста изазива апоптозу или аутофагију у зависности од ћелије и окружења (9).



Свака терапијска мера CLL праћена је развојем резистенције. Резистенција CLL ћелија је за сада најбоље повезана са делецијом или аберацијом p53, пацијенти који имају мутације у овом гену су резистентни на терапију и имају лошу прогнозу(10). Резистенцији доприноси и целуларно микроокружење, CLL ћелије по изолацији из пацијента врло брзо улазе у апоптозу. CLL интерреагују са ћелијама и солубилним факторима у лимфном чвору и тако добијају пролиферативне и антиапоптозне сигнале. Показано је да је интеракција CD40:CD40L поред сигнала са BCR-а важна за пролиферацију CLL ћелија. 2 In vitro се развија 100 пута јача резистенција на Bcl-2 инхибиторе ако се CLL ћелије култивишу са ћелијама које имитирају њихово природно микроокружење (11, 12).

**Предмет и опис истраживања,
задачи, методологија, очекивани резултати:**

Испитиваће се ефекти комплекса платине, злата и рутенијума.

Као контрола за наведене супстанце користиће се цисплатина [PtCl₂(NH₃)₂].

Добијање линије резистентне на цисплатину: парентералне линије B16F1, MEC-2 и BCL1 се култивишу у растућим концентрацијама цисплатине од 20 nM до 1 μM кроз 15 пасажа. Одржавање резистенције се постиже континуираним култивисањем у присуству 0.9 μM цисплатине (14).

Испитивање вијабилности ћелија третираних комплексима МТТ тестом и клоногеним тестом.

Квалитативно испитивање типа ћелијске смрти флуоресцентном микроскопијом ћелија бојених акридин оранжом и етидијум бромидом DNA *laddering*-ом.

Квантитативно испитивање некротичне смрти LDH тестом.

Доказивање апоптотске смрти инкубацијом ћелија са панинхибитором каспаза пре излагања испитиваним супстанцама и одређивањем процента вијабилних ћелија МТТ тестом и поеређењем са процентом вијабилних ћелија које нису биле третиране инхибиторима каспаза.

Испитивање доминатног пута индукције апоптозе: инкубација ћелија са инхибиторима каспазе 8 и 9 пре излагања испитиваним комплексима; одређивање процента вијабилних ћелија МТТ тестом и поређење са процентом вијабилних ћелија третираних само комплексима.

Квантитативно испитивање апоптотске смрти ћелија *flow* цитометријском анализом третираних ћелија бојених *Annexin*-ом V и пропиридијум јодидом.

Утврђивање постојања аутофагије као доминатног типа ћелијског умирања *flow* цитометријском анализом третираних ћелија бојених акридин оранжом.

Доказивање да аутофагија има утицаја у ћелијској смрти: култивација ћелија са специфичним инхибиторима аутофагије бафиломицином А (инхибитор вакуоларне H⁺ АТФ-азе



и блокира фузија аутофагозома и лизозома) 3-метиладенином (инхибитор секвестрације аутофагне везикуле инхибицијом фосфатидилинозитол-3 киназе) пре излагања комплексима и одређивањем вијабилности ћелија.

Анализа ћелијског циклуса у третираним ћелијама *flow* цитометријом након бојења пропидијум јодидом

Western blot анализа експресије следећих протеина у лизатима третираних ћелија: p53, фосфорилисани p53, Bcl-2, ATM/ATR, ERK, JNK, p35, ERCC1, GSH.

Испитивање продукције слободних радикала (O^2- и H_2O_2) у ћелијама излаганим комплексима.

In vivo испитивање:

Да би се испитало да ли постоји корелација између резултата добијених у култури ћелија и ефеката у живом систему и да би се испитао ефекат микроокружења на индукцију апоптозе испитиваним комплексима урадиће се *in vivo* испитивање на анималном моделу за хроничну лимфоцитну леукемију. Као анимални модел користићемо BALB/c мишеве којима ће се интравенски апликовати BCL1 ћелијска линија (лимфома/леукемија)

Експерименталне животиње: 130 BALB/c мишева.

Индукција тумора: интравенска апликација 106 до 107 BCL1 ћелија BALB/c мишевима старости 6-10 недеља. Од 10. дана експеримента мишевима ће се на 3 дана узимати периферна венска крв за одређивање броја мононуклера. Када број лимфоцита пређе $5 \times 10^6/ml$ мишеви ће бити подељени у 12 експерименталних група које ће примити испитиване комплексе субкутано од 15. дана експеримента 3 пута недељно и 2 контролне групе од којих ће једна група да прима цисплатину (интравенски), а друга физиолошки раствор. Дозе комплекса које ће се користити за *in vivo* примену израчунаће се на основу *in vitro* испитивања цитотоксичности на BCL1 ћелијској линији.

Пратиће се преживљавање по групама. Мишеви ће се жртвовати 60. дана експеримента (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измењено понашање).

Одредиће се и број лимфоцита у периферној крви издвојеној по жртвовању.

Хистолошка анализа:

Након жртвовања мишевима ће се извадити јетра, слезина, лимфни чворови и костна срж од којих ће се правити парафински исечци и бојити хематоксилин/еозином. Одређиваће се присуство и број малигнућ ћелија у исечцима и упоређиваће се број малигнућ ћелија по групама (*Kruskal Wallis* тест SPSS).

Процена апоптозе *in vivo*:

TUNEL *assay* за детекцију апоптозе у ткивним исечцима.



Значај истраживања

С обзиром да је хронична лимфоцитна леукемија неизлечиво обољење и да је свака терапијска мера праћена пре или касније појавом резистенције, постоји стална потреба за налажењем нових терапеутских мера. Испитивањем новосинтетисаних комплекса на анималном моделу хроничне лимфоцитне леукемије може да се утврди да ли неки од комплекса утиче на ток болести код мишева. Такав комплекс би могао даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за лечење хроничне лимфоцитне леукемије.

Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.

Литература

1. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand crosslinks of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II), Steven F. Bellon, Julia H. Coleman, Stephen J. Lippard, *Biochemistry*, 1991, 30 (32), pp 8026–8035.
2. Jordan P, Carmo-Fonseca M. (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.*, 57(8-9):1229-35.
3. p53 mutations and resistance to chemotherapy: A stab in the back for p73, Thierry Soussi, *Cancer Cell*, Volume 3, Issue 4, 303-305, 1 April 2003.
4. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation, Yeh Pei Yen; Chuang Shuang-En; Yeh Kun-Huei; Song Ying Chyi; Ea Chee-Kwee; Cheng Ann-Lii, *Biochemical pharmacology* 2002;63(8):1423-30.
5. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells, Del Bello B; Valentini M A; Zunino F; Comporti M; Maellaro E, *Oncogene* 2001;20(33):4591-5.
6. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2033–2045.
7. Autophagy: A Novel Mechanism of Synergistic Cytotoxicity between Doxorubicin and Roscovitine in a Sarcoma Model Laura A. Lambert, Na Qiao, Kelly K. Hunt, Donald H. Lambert, Gordon B. Mills, Laurent Meijer, and Khandan Keyomarsi. *Cancer Res* 2008; 68: (19). October 1, 2008.
8. Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide in vitro and in vivo, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, Lj. Harhaji, Dj. Miljkovic, D. Dabideen, K. Cheng, K. Mangano, G. Malaponte, Y. Al-Abed, M. Libra, G. Garotta, F. Nicoletti, and S. Stosic-Grujicic. *Mol Cancer Ther* 2008;7(3). March 2008.
9. Bialik, S. & Kimchi, A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 189–210 (2006).



10. Döhner, H. et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* 85, 1580–1589 (1995).
11. Granziero, L. et al. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97, 2777–2783 (2001).
12. Vogler, M. et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 113, 4403–4413 (2009).
13. Dasatinib sensitizes primary chronic lymphocytic leukaemia lymphocytes to chlorambucil and fludarabine in vitro, Lilian Amrein, Tiffany A. Hernandez, Cristiano Ferrario, James Johnston, Spencer B. Gibson, Lawrence Panasci and Raquel Aloyz, *British Journal of Haematology*, 143, 698–706.
14. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, ()-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL, Joshua A. Bauer, Douglas K. Trask, Bhavna Kumar, Gerrit Los, Jason Castro, Julia Shin-Jung Lee, Jianyong Chen, Shaomeng Wang, Carol R. Bradford and Thomas E. Carey, *Mol Cancer Ther* 2005;4(7). July 2005.
15. BCL1, a Murine Model for Chronic Lymphocytic Leukemia: Use of the Surface Immunoglobulin Idiotype for the Detection and Treatment of Tumor, Keith A. Krolick, Peter C. Isakson, Jonathan W. Uhr & Ellen S. Vitetta, *Immunological Reviews*, Volume 48 Issue 1, Pages 81 – 106 (2006).
16. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia, Thorsten Zenz, Daniel Mertens, Ralf Küppers, Hartmut Döhner and Stephan Stilgenbauer, *Nature Reviews Cancer*, published online 3 December 2009; doi:10.1038/nrc2764

Руководилац пројекта:

Проф. др Небојша Арсенијевић

Главни истраживач:

Проф. др Небојша Арсенијевић

Ангажовани истраживачи:

Проф. др Миодраг Лукић

Марија Миловановић, сарадник

Сузана Поповић, истраживач сарадник

Владислав Воларевић, сарадник