

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Милена М. Јуришевић

**Утицај новосинтетисаног лиганда (*O,O'*-диетил-(*S,S*)-
етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат
дихидрохлорида) на раст и метастазирање мишјег карцинома
дојке и меланома**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор др сци. мед. Гордана Д. Радосављевић, ванредни професор

КРАГУЈЕВАЦ, 2018. године

1. Увод

Модалитети лечења тумора зависе од врсте тумора и стадијума болести. Терапијски приступи су разноврсни и укључују хирушку терапију, радиотерапију, хемотерапију, имунотерапију, генску циљану терапију, електрохемотерапију, криотерапију и криохирургију, фотодинамску и потпорну терапију. Обично се користи комбинација два или више терапијских приступа. Једна од основних системских облика лечења тумора је хемотерапија. Међутим, и даље је немогуће предвидети одговор тумора на примењене цитотоксичне лекове што понекад води до терапијског неуспеха. Овај неуспех је у последње време учестао услед неосетљивости туморских ћелија на терапију односно због развоја резистенције. Резистенција туморских ћелија се може инцијално испољити на примењену терапију услед „урођене“ неосетљивости тумора што представља *de novo* резистенцију. Поред ове врсте резистенције, често се дешава да тумор испољи осетљивост на иницијалну терапију, али током времена малигне ћелије могу да развију резистенцију на претходно примењену терапију. Последица нестабилног генотипа туморских ћелија је настанак нових фенотипских варијанти које најчешће одликује повећани метастатски потенцијал, као и неосетљивост на дејство цитотоксичних лекова са сличним механизмом дејства. Овакав вид резистенције је стечена или прилагођена резистенција. Клиничка неосетљивост тумора на цитотоксичне лекове може настати на више нивоа као што су промене на месту циљаног дејства лекова или промене у процесу интеракције лека са циљаним молекулима што индукује измене у фармакокинетичким параметрима примењених лекова. Поред изостанка жељеног ефекта ове промене углавном доприносе настанку нежељених реакција на примењене лекове. Повећана учесталост резистенције и/или нежељених дејстава лекова је основни разлог за предану посвећеност проналаску нових потенцијалних цитотоксичних лекова.

1.1. Биомедицинска примена комплекса платине

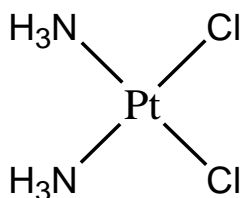
Терапијска примена метала у медицини датира скоро 5000 година уназад (1, 2). Биолошка активност лекова на бази метала лежи у њиховој способности везивања са великим бројем важних биолошких ентитета (протеина, ензима, хормона итд.) (2). То потврђује чињеница да централни метални јони, који су носиоци позитивног наелектрисања, имају тенденцију да се везују за негативно наелектрисане биомолекуле (3, 4). Управо због те чињенице различити биолошки протеини и нуклеинске киселине, или њихови саставни делови, могу бити одлични лиганди за јоне метала. То је један од разлога зашто фармацеутска употреба металних комплекса има одличан потенцијал. Развој савремене медицинске неорганске хемије, започет је открићем медицинских ефеката цисплатине (енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP) 1965. године (5, 6). Након тога уследио је период испитивања терапијске употребе широке палете комплекса метала (7-11). Разматран је велики број једињења различитих координационих стања и механизма цитотоксичног дејства у циљу открића нових антитуморских агенаса (12, 13). Међутим, главни проблем у развоју комплекса метала као потенцијалних лекова јесте акумулација јона метала у организму, што за последицу има потенцијално опасне нежељене ефекате. Због тога је неопходно размотрити дистрибуцију и путеве елиминације комплекса метала, као и његову фармаколошку специфичност. Разумевање механизма дејства којим комплекси метала постижу своју активност је један од предуслова за њихову адекватну примену, као и за дизајн нових једињења.

1.1.1. Развој и фармаколошки аспекти деривата платине

1.1.1a Комплекси платине прве генерације

Цисплатина ($cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$; енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP; Слика 1) синтетисана је у Италији 1844. године (14), међутим антитуморски ефекат овог комплекса платине(II) откривен је тек 1965. године (5, 6). Поучавајући ефекат електричних поља на раст и деобу *Escherichia-e coli*, уочено је да сунчева светлост, амонијум-хлорид и електрода платине заустављају деобу бактеријских ћелија. На почетку се сматрало да је

изостанак деобе директна последица дејства електричног поља, међутим даљим анализама утврђено је да су у процесу електролизе, формиран мали комплекси платине, *cis*-диаминодихлоридоплатине(II) која је носицал настале активности. Након овог сазнања *Rosenberg* и сарадници (15, 16) испитали су ефекат добијеног комплекса платине(II) у мишјем моделу саркома (sarcoma 180) и леукемије (L1210). Након доказане антитуморске активности, цисплатина је већ 1971. године уведена у прву фазу клиничких испитивања. Агениција за храну и лекове Сједињених америчких држава одобрила је употребу цисплатине 1978. године у лечењу карцинома тестиса и бешике (17). Познато је да се у данашње време цисплатина успешно користи у терапији тумора тестиса, јајника, материце, меланома, бешике, главе, врата, дојке и плућа (18-20).



Слика 1. Хемијска структура цисплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

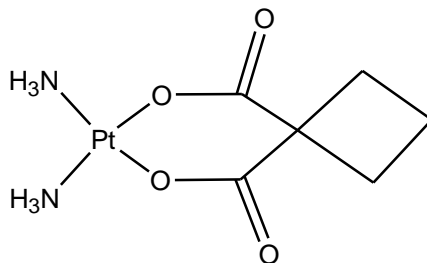
Механизми антиканцерског дејства цисплатине подразумевају низ промена на нивоу једра и цитозоле (21). Као мали молекул, који садржи два хлоридо лиганда која предствљају лако одлазеће лиганде и два чврсто везана амина лиганда, цисплатина се интрацелуларно активира низом реакција које се заснивају на измени хлоридних лиганда молекулима воде (22). Након интравенске примене цисплатине, висока концентрација хлорида у крвној плазми је одговорна за структурну неизмењеност молекула. Након што цисплатина доспе у ћелију, или простом дифузијом кроз ћелијску мембрану или активним транспортом помоћу 1. типа транспортера бакра CTR1 (енгл. *cooper transporters type 1*), мања концентрација јона хлорида у цитоплазми узрокује брзу хидролизу цисплатине. Замена хлоридо лиганда молекулима воде ствара високо реактивне катјонске комплексе платине (22, 23). Настали молекули, моно- или диаква комплекси платине, склони су да

интерагују са великим бројем цитоплазматских субстрата као што су глутатион, металотионеинин, метионин и протеини који у својој структури садрже цистеин што често индукује оксидативни стрес (24). Индукција оксидативног стреса доприноси оштећењу ДНК (дезоксирибонуклеинска киселина), али исто тако омогућава и инактивацију цисплатине цитопротективним антиоксидативним системом (25). Новонастали комплекси $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ или $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ када доспеју у једро ћелије формирају координативну ковалентну везу са атомима азота нуклеинских база ДНК, и то најчешће у позицији 7 имидазолног прстена гуанина или аденозина (26-28). Током формирања оваквих веза настају монофункционални или дифункционални комплекси. Дифункционално везивање молекула цисплатине и ДНК, може настати везивањем новонасталих комплекса цисплатине за азоте гуанина или аденозина из истог ланца ДНК или пак између суседних ланаца ДНК. У 60% случајева цисплатина се кординише за суседне ланце ДНК и формира бифункционални макрохелат (26, 27). Овакве промене у структури ДНК које су последице везивања цисплатине инхибирају даљу транскрипцију и репликацију и следствено покрећу смрт ћелије (26-28). Иако цисплатина важи за потентан хемиотерапеутик њена примена праћена је бројним ограничењима. Антитуморски ефекат је дозно зависан, али повећање дозе је углавном праћено озбиљним нежељених ефектима. Наиме, главни ограничавајући фактор у примени цисплатине је неселективност. Тако цисплатина индукује ћелијску смрт не само туморских већ и других ћелија у организму што за последицу има нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, неутропенију, тромбоцитопенију, периферну неуропатију, ембриотоксичност или мутагеност. Сагледавањем хемијске структуре цисплатине може се закључити да је овај комплекс изузетно реактиван. Интересантно је да само 5-10% од укупне примењене дозе цисплатине интерагује са молекулом ДНК, остатак примењене дозе ступа у интеракције са молекулима који у својој структури поседују тио-групе (29). Заправо цисплатина већ у крвној плазми може да интерагује са протеинима грађених од аминокиселина које садрже сумпор (метионин и цистеин), као што је на пример албумин. Поред тога, познато је да се цисплатина може везати и за фосолипиде или фосфатидил серин у ћелијској мембрани а након хидролизе у цитоплазми може реаговати са бројним хемијским врстама, углавном са протеинима и аминокиселинама које имају слободне донорске *S* и *N* атоме, као што су

јон карбоната, фосфати, глутатион или металотионеиним. Бројне интеракције смањују ефикасност и биоискористљивост овог комплекса платине(II) (28,30).

1.1.16 Комплекси платине друге и треће генерације

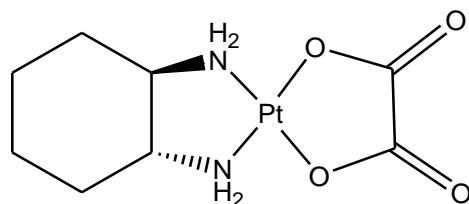
Поред тога што је ефикасност цисплатине условљена хемијском структуром и неселективношћу, убрзо је уочено да је туморицидно дејство овог хемиотерапеутика ограничена и брзом појавом резистенције туморских ћелија након поновљених доза (2). У циљу да се ови проблеми превазиђу, последњих тридесет година активно се ради на дизајну лекова на бази метала који би имали ефикасан цитотоксички потенцијал уз истовремено мањи број нежељених ефеката (30). Аналоги цисплатине друге и треће генерације синтетисани су са циљем да се смањи токсичност и/или повећа ефикасност цисплатине. Карбоплатина (1,1'-*cis*-циклобутилдикарбоксилатоминамоплатина(II)), недаплатина (*cis*-гликолатодиамин-платина(II)) и оксалиплатина (*cis*-оксалато-*trans*-1,1,2-диаминоциклохексан-платина(II)) су једини аналоги који се до данас успешно користе у пракси (30-34). Карбоплатина од 1989. године, а оксалиплатина од 2002. године се успешно користе у већини земаља, док је употреба недиплатине дозвољена само у Јапану.



Слика 2. Хемијска структура карбоплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Карбоплатина уместо хлоридо лиганда има бидентатни цикло-турандикарбоксилатни лиганд (Слика 2) (30). Ове хемијске измене учиниле су да молекул карбоплатине буде инертнији у односу на цисплатину, што узрокује мање споредних реакција, а самим тим и бољи „безбедносни профил“. Има исте индикације за примену, као и цисплатина, и може да се користи у терапији карцинома јајника, плућа, главе и врата. Од нежељених дејстава најчешће индукује мучнину и повраћање, као и

мијелосупресорне ефекте. Промене у хемијској структури анулирале су развој нефротоксичности услед примене карбоплатине, тако да она може бити толерисана у већим дозама у односу на цисплатину (2, 30). За разлику од карбоплатине, оксалиплатина има другачији опсег индикација у односу на цисплатину.



Слика 3. Хемијска структура оксалиплатине (*Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295*)

Оксалиплатина у својој структури уместо аминских лиганата има диаминоциклохексански лиганд (*dach*) што за последицу има ефикасну антитуморску активност на оним туморским ћелијама које су резистенте на цисплатину (Слика 3) (31, 32). Уз то, оксалиплатина је аналог цисплатине који може да се примењује орално и данас се успешно користи у лечењу карцинома колона. Међутим, познато је да може изазвати неуропатију, замор, неутропенију, ототоксичност, мада је учесталост ових нежељених ефеката мања у поређењу са цисплатином. Недаплатина се од 1995. године успешно користи у лечењу карцинома плућа, једњака, главе и врата, док су повољни ефекти показани и код карцинома јајника и желуца (35-37). Документовано је да недаплатина има боље ефекте од карбоплатине, бољу растворљивост у води као и мању токсичност (нефротоксичност и мијелосупресију). У покушају да се смање нежељени ефекти, развијени су нови лекови: лобаплатина и хептаплатина (38). Многи аналози платине (пикоплатин, триплатин тетранитрат (BBR3464), сатраплатин (JM118), трансплатин, пириплатин) још увек су тема испитивања клиничких студија (39). Хронична мијелоидна леукемија, метастатски карцином дојке и карцином плућа су индикације за примену лобаплатине (40). Након употребе лобаплатине забележени су следећи нежељени ефекти: тромбоцитопенија, анемија, мучнина и повраћање. Међутим, примећена је мања вероватноћа развоја алопеције, нефро-, неуро- или ототоксичног нежељеног ефекта после

интравенске примене овог лека. Предност развоја хептаплатине се огледа у снажној антитуморској активности на ћелијама које одликује резистентност на цисплатину, па се ово једињење користи у лечењу карцинома желуца (41).

1.1.2a Деривати платине у терапији карцином дојке

Цисплатина и карбоплатина, као циклус-независини хемотерапеутици на бази платине, користе се у лечењу карцинома дојке (42-44). Иако је стопа смртности оболелих смањена за око 40% у односу на деведесете године прошлог века, а што је директна последица раног откривања и напредне фармацеутске стратегије, карцином дојке је и даље водећи узорк смртности жена у свету (45). Поред хирушке интервенције и радиотерапије које су основа у лечењу карцинома дојке, хемотерапија такође игра важну улогу у терапији ове врсте тумора. Избор адекватног хемотерапеутика углавном зависи од подгрупе молекулске класификације карцинома дојке. Молекулска класификација карцинома дојке темељи се на експресионом профилу гена (46). Тако, карцином дојке је класификован у пет подгрупа на основу експресије рецептора за естроген (енгл. *Estrogene receptor, ER*) и прогестерон (енгл. *Progesterone receptor, PR*), као и Ki-67 и HER2 (енгл. *Human epidermal growth factor receptor-2*): 1) луминални тип А који карактеришу позитивна експресија ER или PR и негативна експресија Ki-67 и HER2, 2) луминални тип Б одликују или позитивна експресија ER или PR, уз позитивну експресију Ki-67 и одсуство молекула HER2, 3) карцином са прекомерном експресијом HER2 који не експримира ER и PR, 4) базални је троструко негативан карцином који не експримира нити ER и PR, нити HER2 и 5) *Normal like* подтип карцинома дојке, слично луминалном типу А, има позитивну експресију ER и PR и негативну експресију Ki-67 и HER2, али има лошију прогнозу (45-47). Луминални А тип карцинома дојке чини више од 40% свих типова карцинома дојке, обично је праћен ниским хистолошким градусом и најбољом прогнозом. Карцином луминалног типа Б обично има високи хистолошки градус и индекс пролиферације, као и лошију прогнозу у односу на луминални тип А. HER2-позитивни тип карцинома дојке карактерише висок хистолошки градус и индекс пролиферације. За овај тип карцинома карактеристична је амплификација гена за HER2 која резултује повећаном ћелијском пролиферацијом, ангиогенезом, инвазијом и метастазирањем, као и

инхибицијом апоптозе (48-52). Базалоидни тип карцинома дојке чини око 15% свих карцинома дојке. Овај тип је обично повезан са лошијом прогнозом и мутацијама гена BRCA-1 (енгл. *Breast Cancer Gene 1*). Базалоидни тип карцинома дојке одликују висок пролиферативни капацитет туморских ћелија без адекватне циљане терапије (48-52). У адјувантном лечењу карцинома дојке користе се антрациклински и не-антрациклински режими, док се у системској терапији метастатске болести користе и комбинације других цитотоксичних лекова са таксанима (53, 54). У хормонској терапији раног карцинома дојке користе се тамоксифен и инхибитори ароматазе треће генерације. Класичан терапијски режим карцинома дојке представља комбинацију циклофосамида, метотрексата и 5-флуороурацила. Код рецидивантног или метастатског карцинома дојке примењује се антрациклински комбиновани режим флуороурацила, епирубицина и циклофосамида. HER2- позитивни тип карцинома дојке добро делује на тацелизумаб, моноклонско антитело специфично за HER2, које се може комбиновати са класичним хемиотерапеутицима (55).

Деривати платине данас се најчешће користе у лечењу базалоидног типа карцинома дојке. Код пацијенткиња са метастатским карциномом дојке код којих су деривати платине самостално ординирани као прва терапијска линија њихова учинковитост је далеко већа у поређењу са њиховом применом код оболелих које су претходно биле лечене неким другим хемиотерапеутиком (56, 57). Ефикасност цислатине је била већа у поређењу са другим хемиотерапеутицима, мада је примена овог лека била праћена бројним нежељеним реакцијама (58-63). Испитиван је и учинак комбинација деривата платине са другим цитостатицима, који је био посебно бољи од самосталне терапије код оболелих којима је претходно одриниран неки други хемиотерапеутик (64). Изузетно добре резултате показала је комбинација деривата платине са таксанима (65-68). Употреба деривата платине са биљним алкалоидима (винорелбином) показала је добре резултате код оболелих особа који су претходно лечене антрациклинима и таксанима (64, 69-71). Комбинација цислатине са етопозидом имала је умерену активност, а повећану токсичност (72-75). За разлику од других лекова, комбинација карбоплатине са етопозидом показала је бољу учинковитост када је коришћена као прва терапијска линија у поређењу са употребом код претходно лечених пацијената (64, 76, 77). Сви резултати који осликавају учинковитост комбинација деривата платине са антрациклинима били су

разочаравајући и оне као такве нису препоручене код метастатског карцинома дојке. Активност је била ограничена а токсичност висока (64). Код пацијенткиња са метастатским карциномом дојке кога одликује повећана експресија HER2, комбинација деривата платине и трастузумаба је обећавајућа уколико се користи као прва терапијска линија (78-80). Чини се да су ефикасност и токсичност слични уколико се користе цисплатина или карбоплатина (64). У терапији базалоидног типа карцинома дојке комбинација таксана (доцетаксел и паклитаксел) са дериватима платине показује обећавајуће резултате. Такође, метастатски базалоидни тип карцинома дојке добро реагује на комбинацију цисплатине или карбоплатине са гемцитабином или фосфамидом. Неколико студија испитује ефекат комбинације цисплатине или карбоплатине са бевацизумабом, цетуксимабом, инипарибом или олапарибом код пацијенткиња са метастатским базалоидним типом карцинома дојке који карактеришу мутације BRCA-1/2 (81-84).

1.1.26 Деривати платине у терапији меланома

Цисплатина и карбоплатина имају скромну активност у терапији метастатског меланома (85, 86). Меланом је најагресивнија форма тумора коже који потиче од малигно трансформисаних меланоцита (87). Интраепидермална пролиферација оваквих малигну хелија карактеристична је за рани стадијум меланома који је познат као фаза радијалог раста. Сматра се да у овој фази раста меланом углавном или нема или има веома слаб метастатски потенцијал зато што малигно трансформисани меланоцити пролазе кроз базалну мембрану између епидермиса и дермиса (88-91). Фаза вертикалног раста меланома се надовезује на фазу радијалног раста када малигни меланоцити инфилтрирају у дубље поткожне структуре. У овој фази запажена је појачана митотска активност и повећани метастатски потенцијал. Системска дисеминација у финалном стадијуму прогресије омогућава метастазирање меланома у различите органе (88-91). Подаци из литературе указују на то да је десетогодишње преживљавање пацијената са метастатским меланомом мање од 10% (92). Више од три деценије након првобитног одобрења Америчке агенције за храну и лекове, дакарбазин и даље представља златни стандард у лечењу меланома (85, 86). Висока доза интерлеукина-2 (енгл. *Interleukine-2*, IL-2) која се

користи у лечењу метастатског меланома и даље у пракси показују скромне резултате (85, 86). Бројни покушаји да се побољша преживљавање пацијената са метастатским меланомом, заснивани су на модулацији постојеће терапије и показали су се неуспешним. Хемиотерапеутици који се користе у лечењу меланома су углавном алкилирајући агенси (дакарбазин, темозоломид и деривати нитрозоуреје), деривати платине и цитостатици биљног порекла (винкрестин и винбластин). У терапији метастатског меланома самостална примена цисплатине показује корисне ефекте код мање од 10% лечених пацијената. Међутим, бољи учинак је примећен уколико се примени комбинација високе дозе цисплатине и амифостина, мада ова терапијска опција нема позитивни ефекат на преживљавање пацијената (93). Са друге стране код пацијената који су били на терапији карбоплатином забележена стопа одговора на терапију је 19% (94). Такође, карбоплатина се примењује и у комбинацији са паклитакселом код пацијената са метастатским меланомом који су претходно лечени неким другим хемиотерапеутицима (95). Истовремена примена цисплатине, дакарбазина, кармустина и тамоксифена показује бољу ефикасност у односу на самосталну примену дакарбазина, али и већи број озбиљних нежељених ефеката (96-98). У последње време испитује се ефекат комбинације цисплатине, дакарбазина и винбластина (99, 100). Резултати друге фазе клиничког испитивања показују боље ефекте у поређењу са златним стандардом.

1.2. Механизми ћелијске смрти

Смрт ћелија настаје под утицајем различитих патолошких чинилаца, као што су физичке и/или хемијске ноксе, микроорганизми, али и због недостатка потребних нутриената када настаје неповрато оштећење ћелије. Међутим, поред овакве изазване, "случајне" смрти ћелија, постоји и физиолошка смрт ћелија која се запажа током ембрионалног развоја, диференцијације, као и у процесу развоја и регулације имунског система. Смрт ћелије може се класификовати на основу морфолошких промена које настају у ћелији (апоптоза, некроза и аутофагија), ензимских карактеристика (са и без укључивања нуклеаза или различитих класа протеаза, као што су каспазе, калпени, катепсина и трансглутаминазе), функционалних аспеката (програмирана или случајна,

физиолошка или патолошка смрт) или имунских карактеристика (имуногени или не-имуногени) (101). Комитет за номенклатуру ћелијске смрти је 2005. године формулисао први круг препорука и од тада је у пољу истраживања ћелијске смрти направљен значајан напредак (102). Године 2009., овај комитет дао је предлог да се ћелија може сматрати мртвом ако показује неки од следећих биохемијских или морфолошких критеријума: 1) губитак интегритета ћелијске мембране, 2) фрагментација једра и читаве ћелије и формирање дискретних (апоптотских) телашаца, и / или 3) телашце или фрагменти ћелије у *in vivo* систему су обухваћени суседном ћелијом (103).

На основу морфолошких критеријума у ћелијама сисара постоје три врсте ћелијске смрти: 1) Апоптоза (I тип ћелијске смрти), 2) Аутофагија (II Тип ћелијске смрти) и 3) Некроза (III тип ћелијске смрти). У последње време описани су и нови атипични модалитети ћелијске смрти у нади да ће нерегуларна, али униформна, номенклатура олакшати комуникацију међу научницима и на крају убрзати темпо открића (103).

1.2.1. Некроза

Некроза је тип ћелијске смрти која наступа услед немогућности ћелије да одговори на неки од нефизиолошких стимуланса, као што су механичка оштећења, токсини, вируси или хипоксија. Од апоптозе и аутофагије се разликује првенствено по веома брзом губитку потенцијала ћелијске мембране или услед оштећења или промене функције јонских пумпи и канала. Некроза ћелије се морфолошки карактерише повећањем ћелијског волумена, бубрењем органела, руптуром ћелијске мембране и накнадним губитком интрацелуларног садржаја (104). Зато се овај тип ћелијске смрти углавном дефинише као пасиван процес који је последица метаболичке "катастрофе" која се огледа у брзом губитку аденозин трифосфата (енгл. *Adenosine triphosphate, ATP*) и праћена је инфламацијом (105). Дуго времена се некроза сматрала случајним, неконтролисаним обликом смрти ћелије, али у последње време све је већи број доказа да је некротична ћелијска смрт фино регулисана низом сигналних путева и катаболичких механизма (104, 106). Наиме, запажено је да инхибиција догађаја који детерминишу и апоптозу и аутофагију за последицу има покретање некротичне ћелијске смрти. На пример, у случају примене инхибитора каспазе, показано је да рецептори смрти (TNF-R1, Fas/CD95 и TRAIL-R) и *Toll-like* рецептори

(TLR3 и TLR4) могу да покрену некрозу ћелије (107, 108). Ћелијска смрт која је посредована TNFR1, Fas/CD95, TRAILR и TLR3 наизглед зависи од киназе RIP1 (енгл. *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*, RIPK1) (109), а то је доказано блокадом и хемијском инхибицијом помоћу некростатина-1 (110-112). Неки аутори су предложили израз 'некроптоза' да би указали на регулисану некрозу. На биохемијском нивоу, некроптоза може бити дефинисана као врста ћелијске смрти која се може избећи инхибирањем RIPK1 (било путем генетичких или фармаколошких метода).

У покретање некротске смрти ћелија могу да буду укључени различити медијатори некрозе, мада је још увек нејасно како се они међусобно повезују. Овај тип ћелијске смрти може да буде узрокован инхибицијом митохондријалног респираторног ланца (113). Услед губитка трансмембранског потенцијала унутрашње стране митохондријалне мембране нестаје протонски градијент и отварају се митохондријалне поре. Отварање пора за последицу има престанак синтезе АТФ у току оксидативне фосорилације. Иако се недостатак АТФ код оних ћелија које се брзо деле може надокнадити гликолизом, повећана активација PARP1 (енгл. *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*, PARP1) протеина која се среће код одређених ћелија у некрози, резултује инхибицијом гликолизе и последично смањењем синтезе АТФ, као и потпуним енергетским колапсом који води ћелију у смрт (114). Уз то, један од централних догађаја у некрози је повећана концентрација калцијума у цитоплазми (104, 115). Овај пораст који настаје било због ослобађања калцијума из ендоплазматског ретикулума или његовог уласка кроз ћелијску мембрану, индукује преоптерећење митохондрија, стварање пора у митохондријалној мембрани, као и активацију калцијум зависних протеаза (нпр. калпена и катепсина) без каспаза што деградирањем циљаних протеина покреће некрозу (116). Реактивни медијатори кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS) могу да буду укључени у развоју некрозе. Оксидативни стрес који је посредован реактивним медијаторима кисеоника резултује деструкцијом макромолекула, укључујући ДНК, липиде и протеине (117). На оштећења ДНК, ћелија може реаговати хиперактивацијом протеина PARP1. Са друге стране, деструкција липида за последицу има губитак интегритета унутарћелијских мембрана и следствено ослобађање лизозомалних протеаза и повећање нивоа калцијума у ћелији (118). Оштећење ћелијске мембране узроковано претходно наведеним факторима прати изливање целокупног ћелијског садржаја у околно ткиво што за последицу има покретање

инфламације и ткивно оштећење. До сада не постоји консензус о биохемијским променама на основу којих се недвосмислено може идентификовати некроза.

1.2.2a Апоптоза

Термин апоптоза уведен је први пут 1972. као специфични морфолошки аспект смрти ћелије (118). Апоптоза, као 1. тип програмиране ћелијске смрти, обухвата низ молекулских догађаја који ћелију уводе у смрт, уз изостанак инфламације. Прво, дешава се губитак међућелијских веза што је праћено кондензацијом цитоплазматских протеина и смањењем волумена ћелије. Друго, хроматин се кондензује и настаје пикноза, а затим се деградира тако да једро добија изглед потковице. Треће, молекул ДНК се фрагментира, цитохром С се ослобађа из митохондрија, а ендоплазматски ретикулум постаје дилатиран. Затим следи балонирање (енгл. *blebbing*) ћелијске мембране што је праћено цепањем једра (119). Наступају и промене на мембрани апоптотске ћелије као што је транслокација фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну мембране што препознају макрофаги (120). Поред фосфатидилсерина, калретикулин је сигнал за препознавање апоптотске ћелије. Оваква ћелија се распарчава на мала, мембраном обавијена телашца са или без хроматина која се називају апоптотска тела. На крају ова апоптотска тела фагоцитишу макрофаги и неутрофили (121). Одсуство инфламације је последица развоја апоптотских тела и изостанка изливања ћелијског садржаја у међућелијски простор како што је то случај код некрозе.

Активација протеолитичког система каспаза је централни догађај у апоптози (122). Каспазе чине групу аспартат-специфичних цистеин протеаза. Присутне су у свим ћелијама у неактивној форми проензима које се називају прокаспазе. Када се активирају, цепањем у оквиру унутрашњег протеолитичког места, индукују активацију других прокаспазе што покреће иреверзибилну протеолитичку каскаду која појачава апоптотски сигнални пут и последично убрзава ћелијску смрт. Фамилија каспаза разликују се по својим физиолошким улогама. Разликују се инфламацијске (каспаза-1, -4, -5 и -13) и апоптотске (каспаза-3, -6, -7, -8, -9 и -10) (123). Апоптотске каспазе обухватају иницијаторске каспазе (каспаза-2, -8, -9 и -10) одговорне за покретање протеолитичке каскаде, и ефекторске каспазе (каспаза-3, -6 и -7) које протеолитички секу ћелијске супstrate (124).

Каспазе делују на ћелијске протеине који регулишу апоптозу као и на ензиме укључене у регулацију како ћелијског циклуса тако и поправке оштећења ДНК.

Различити стимулуси могу покренути апоптозу. Одговор ћелије на апоптотски сигнал зависи од врсте и јачине стимулуса, фазе ћелијског циклуса, као и односа про- и анти-апоптотских протеина (125). Покретање апоптозе у ћелији је условљен активацијом једног од два главна пута апоптозе, а то су спољашњи или унутрашњи пут. Ова два пута су међусобно повезана и зна се да молекули ангажовани у једном могу да покрену и други сигнални пут. Уз то, апоптозу индукују и перфорини и гранзими А или В.

Ћелијска смрт индукована рецепторима смрти (спољашњи пут апоптозе).

Спољашњи пут апоптозе се активира везивањем специфичних лиганда за одговарајуће површинске рецепторе односно за рецепторе смрти који припадају породици рецептора за TNF (енгл. *tumor necrosis factor*) (126). Овакви рецептори поседују домене смрти. Везивање лиганда за рецепторе смрти, као што су рецептори Fas (CD95), TNF и TRAIL (DR4) индукује конформационе промене у домену смрти и следствено регрутацију протеина и проензима (прокаспазе-8 и -10) при чему настаје комплекс DISC (енгл. *death inducing signalling complex*) (127-129). Настали комплекс активира каспазу-8 и -10 које затим покрећу протеолитичку каскаду и то активацијом каспазе-3, -6 и -7. За TNF рецептор 1 се везује адаптерски протеин TRADD (енгл. *TNFR1-associated death domain protein*), који је способан да веже различите протеине у активираним делу рецептора. Ако се активирани део веже за FADD (енгл. *Fas-associated death domain*) домене смрти, активираће се прокаспаза-8 и следствена каскада ефекторских каспаза. Оштећење митохондрија у сигналном путу FasL/FasR посредовано је активацијом про-апоптотског Bid протеина уз помоћ каспазе-8 и ово је један од примера укрштања спољашњег и унутрашњег пута апоптозе.

Ћелијска смрт услед губитка стимулуса за преживљавање (унутрашњи пут апоптозе). Апоптозу могу изазвати и бројни унутарћелијски сигнали а то су: недостатак фактора раста, хормона и цитокина, као оштећење ДНК, вируси, кисеонични радикали и друго. На ове сигнале су осетљиви протеини у комплексу митохондријаних пора који отварају поменуте поре, што за последицу има губитак митохондријалног трансмембранског потенцијала и ослобађање различитих проапоптотских протеина у

цитоплазму (130). Прву групу ових протеина чине цитохром С, Smac/DIABLO и серин протеаза HtrA2/Omi који активирају каспазно зависни митохондријални пут апоптозе. Цитохром С има способност да веже и активира активирајући фактор-1 апоптозе (енгл. *Apoptotic protease activating factor 1*, Araf-1) и прокаспазу-9 и на тај начин индукује формирање апоптозома који последично активира ефекторску каспазу 3. Са друге стране Smac/DIABLO и HtrA2/Omi подстичу апоптозу и то инхибицијом анти-апоптотских протеина. Другу групу ових протеина чине AIF (енгл. *apoptosis inducing factor*), ендонуклеаза G (енгл. *endonuclease G*, EndoG) и CAD (енгл. *caspase-activated denase*, CAD) и представљају касни сигнал јер се ослобађају из митохондрија тек онда када ћелија 'одлучи' да умре. Независно од каспаза, AIF и EndoG се транслоцирају у једро, док CAD пре ове транслокације се активира под дејством каспазе 3 (130, 131). Када уђу у једро, ови протеини индукују фрагментацију ДНК. У случају да сигнал са рецептора није довољно снажан, може се покренути унутрашњи, митохондријални пут апоптозе који аплификује почетни сигнал са рецептора.

Апоптотска ћелијска смрт индукована перфоринима и гранзимима. Цитотоксички CD8⁺ Т лимфоцити могу да покрену апоптозу у циљаној ћелији индуковањем спољашњег пута апоптозе након интеракције FasL/FasR (132). Уз то, ове ћелије изазивају апототску смрт ћелије помоћу перфорина и гранзима (133). Перфорини су пептиди који формирају поре у ћелијској мембрани циљане ћелије кроз које улазе други макромолекули ослобођени из цитоплазматских гранула цитотоксичких Т лимфоцита (134). Међу излученим протеинима најважније су серин протеазе, гранзим А и гранзим В (135). Гранзим А индукује апоптотску ћелијску смрт независну од каспаза (133), док гранзим В активира каспазу-3, -7, -8 и -10 и разлаже ICAD (енгл. *Inhibitor of caspase-activated DNase*) (136). Такође, гранзим В може да користи митохондријални пут за појачавање сигнала смрти тако што индукује продукцију кисеоничних слободних радикала (ROS), разлагање Bid протеина и последично ослобађање цитохрома С (137, 138). Директном активацијом каспазе-3 прескаче се целокупна каскада и директно индукује апоптоза (133).

1.2.26 Протеини фамилије Bcl-2 укључени у регулацију апоптозе

Протеини фамилије Bcl-2 (енгл. *B cell leukemia/lymphoma 2*) контролишу ћелијску смрт првенствено директним интеракцијама које регулишу пермеабилizацију митохондријалне спољашње мембране (енгл. *mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP). Отварање пора на MOMP покреће иреверзибилно ослобађање протеина интермембранског простора, што за последицу има активацију каспаза и коначно апоптозу. Неки протеини фамилије Bcl-2 имају инхибициони а други активациони ефекат на апоптозу. Активациони ефекат остварују проапоптотски протеини, као што су Вах (Вах, Вах и Вок) и ВНЗ-*only* протеини (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad), док инхибициони ефекат остварију антиапоптотски протеини (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-XS, Bag, Mcl-1, A1) (139). Баланс про- и антиапоптотских протеина у ћелији одлучује о сензитивности ћелије на апоптотски стимулус и активацију унутрашњег пута апоптозе. У физиолошким условима антиапоптотски протеини везани су за спољашњу страну митохондријалне мембране где одржавају њену стабилност и непропустљивост. Антиапоптотски протеини неутралишу проапоптотске молекуле (140). Пропустљивост митохондријалне мембране и последично апоптоза, настаје услед инхибиције антиапоптотских протеина, као и активације проапоптотских Вах и Вах протеина под дејством ВНЗ-*only* активатора. Дерепресорски ВНЗ-*only* протеини (Puma, Bad, Noxa, Bmf и Bik/Bik) инхибирају антиапоптотске Bcl-2 протеине, али немају могућност активације Вах/Вах. С друге стране, активаторски ВНЗ-*only* протеини (Bid и Bim) имају способност да чине и једно и друго (141). Услед ћелијског стреса активни облици ВНЗ-*only* активатора директном интеракцијом индукују конформационе промене, димеризацију и инсерцију Вах и Вах у митохондријалну мембрану што узрокује формирање пора и повећану пропустљивост спољашње мембране митохондрија. Кроз ове поре цитохром С се ослобађа и улази у цитоплазму, где се везује за Araf-1 и формира апоптозом што за последицу има активацију каспаза и коначно апоптозу (142). Антиапоптотски чланови Bcl-2 фамилије могу да се вежу за неке протеинске домене у саставу трансмембранских митохондријалних пора и да на тај начин спрече пропустљивост митохондријалне мембране.

1.2.3. Аутофагија

Аутофагија је катаболички механизам ћелијске деградације сопствених нефункционалних или непотребних цитоплазматских компоненти унутар лизозома. Аутофагија представља алтернативни извор енергије, као и привремени механизам преживљавања ћелије у одређеним ситуацијама (143). Разликују се три типа аутофагије а то су: микро-, макро и аутофагија посредована шеперонима (енгл. *Chaperone mediated autophagy, CMA*) (144-146). Микроаутофагија укључује неселективну пиноцитозу малих делова цитоплазме директном инвагинацијом мембране лизозома. Аутофагија посредована шеперонима је селективани процес деградације протеина који захтева присуство Hsc-70 (енгл. *Heat shock cognate protein of 70 kDa*) протеина које препознају шеперони (144, 145). Макроаутофагија подразумева испоруку цитоплазматског садржаја лизозому помоћу аутофагозома, који се спаја са лизозомом и формира структуру названу аутолизозом. Аутолизозом обавља ћелијску деградацију под утицајем киселих лизозомалних хидролаза (146). Аутофагозом настаје обухватањем ћелијског садржаја предодређеног за разлагање помоћу двоструке мембране чији се крајеви спајају. Процес аутофагије је регулисан сигналним путем PI3K/AKT/mTOR (PI3 киназа, енгл. *Phosphatidylinositol 3 kinase*; AKT- серин/треонин киназа која кад се активира PI3-киназом, активира mTOR енгл. *mammalian target of Rapamycin*) који контролише доступност храњивих састојака ћелији и ћелијски метаболизам (147). У одсуству фактора раста покренут је сигнални пут PI3K/AKT/TSC (енгл. *tuberous sclerosis complex*)/mTOR који активира аутофагију. У физиолошким условима, AKT киназа активира mTOR киназу и на тај начин инхибира аутофагију. Услед метаболичког или оксидативног стреса нарушен је однос аденозин монофосфат/аденозин три фосфат (енгл. *Adenosine monophosphate/Adenosine triphosphate, AMP/ATP*). Повећање односа AMP/ATP активира AMPK (енгл. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*). Протеин AMPK индукује аутофагију директном инхибицијом mTOR киназе. У случају хипоксије и гладовања, киназа регулисана ванћелијским сигнаlima (енгл. *extracellular signalregulated kinase, ERK*) такође индукује аутофагију тако што инхибира mTOR киназу (147).

1.2.4. Атипични модели ћелијске смрти

У последње време детерминисано је неколико атипичних модела ћелијске смрти:

Некроптоза омогућава програмирану ћелијску смрт независно од активације каспаза. Регулацију овог првоткривеног типа регулисане некрозе индукује фактор некрозе тумора α (енгл. *tumor necrosis factor α* , TNF α). Продукција TNF α стимулише TNF α рецептор 1, па након везивања TNF α за поменути рецептор активира се протеин киназе RIPK1 (енгл. *receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1*) и RIPK3 (енгл. *receptor interacting serine/threonine kinase 3*) и на тај начин се формира комплекс познат како некрозом. Некрозом затим фосфорилише про-некроптотски протеин MLKL (енгл. *mixed lineage kinase domain-like protein*) који се уграђује у липидни двослој ћелијске мембране што резултује ослобађањем ћелијског садржаја у ванћелијски простор (148).

“Митотска катастрофа” је тип смрти ћелија који се јавља или током или непосредно после дисрегулисане/неуспешне митозе и може да буде праћена морфолошким променама, укључујући микронуклеацију (хромозоми и/или хромозомски фрагменти нису равномерно распоређени између једара ћерка ћелија) и мултинуклеацију (присуство два или више једара са сличним или хетерогеним величинама, која произилазе из недовољног одвајања током цитокинезе). Овај модалитет ћелијске смрти може да води или у апоптозу или у некрозу (149).

Ентоза, првобитно описана као облик "ћелијског канибализма" код лимфобласта пацијената оболелих од Хунтингтонове болести, је нови модалитет смрти ћелије у којој једна ћелија обухвата једну од својих живих суседних ћелија, која затим умире унутар фагозома (150). Интересантно, ћелије које најчешће улазе у ентозу су ћелије хуманог карцинома дојке MCF-7, којима недостају и каспаза-3 и беклин-1, па су на тај начин релативно онеспособљене за апоптозу и аутофагију (151).

Аноикис је у суштини модалитет ћелијске смрти по принципу апоптозе која је индукована губитком везивања на супстрат или за друге ћелије. Код овог специфичног облика апоптозе, молекулски механизми ове ћелијске смрти одговарају механизмима класичне апоптозе (152).

Екситотоксичност се, у зависности од интензитета иницијалног стимулуса, наизглед преклапа са другим врстама смрти, као што су апоптоза и некроза и као критичан догађај укључује пропустљивост мембране митохондрија. Из ових разлога, а и због заједничких регулатора, као што су оксиди азота, екситотоксичност се не може сматрати посебним модалитетом ћелијске смрти. Карактеристична је за неуроне и настаје под утицајем екситаторних аминокиселина (глутамата) и праћена је повећаном концентрацијом калцијума у цитоплазмама неурона што индукује ћелијску смрт (153).

Параптоза је тип програмиране ћелијске смрти која је индукована активацијом рецептора за инсулински фактор раста 1 (енгл. *insulin growth factor 1 receptor IGF1R*). Карактерише је изражена вакуолозација цитоплазме, бубрење митохондрија и ендоплазматичног ретикулума. Процес се одвија без кондензације хроматина и деградације ДНК, који представљају морфолошке карактеристике некрозе. Међутим, овај тип ћелијске смрти карактерише транслокација једног од фосфолипида, фосфатидилсерина са цитоплазматске ка спољашњој страни ћелијске мембране што је одлика апоптотске ћелијске смрти. Манифестације параптозе не могу спречити инхибитори каспаза (154).

Пиротоза је прво описана у макрофагама које инфицирају *Salmonella typhimurium*. Настаје услед повећаног осмотског притиска због новоформираних пора у ћелијској мембрани чије формирање зависи од активне каспазе-1 али не и активне каспазе-3 (155).

Пиронекроза је некротична ћелијска смрт макрофага које инфицира *Shigella*. У ову ћелијску смрт укључен је ASC (енг. *apoptosis-associated speck-like protein*) а повезана је са повећаним ослобађањем HMGB-1 (енгл. *High mobility group box 1 protein*), каспазе-1 и IL-1 β (156).

1.3. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус обухвата низ строго регулисаних догађаја који резултује деобом ћелије. У ћелијском циклусу разликују се период интерфазе и период деобе. Интерфаза је период између две деобе и обухвата G1 (енгл. *Gap phase 1*), S (енгл. *Synthesis*), и G2 (енгл. *Gap phase 2*) фазу ћелијског циклуса. Током интерфазе ћелија расте и акумулира хранљиве материје потребне за митозу (енгл. *Mitosis*) и репликацију ДНК. Ћелије које су привремено или реверзибилно зауставиле деобу, улазе у стање мировања или G0 фазу где остатају дуже време, а неке чак и трајно. Ћелијски циклус је строго контролисан процес у чијој регулацији важну улогу играју циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа (157, 158). Циклини представљају групу протеина који имају сличну структуру и синтетишу се и деградирају циклично током различитих фаза ћелијског циклуса. Након синтезе, формирају комплекс са циклин зависним киназама (енгл. *cyclin dependent kinases*, Cdk). Циклин зависне киназе припадају фамилији серин/треонин киназа, и њихова активност, као и код циклина, расте и опада током ћелијског циклуса. Образац експресије различитих циклина варира са прогресијом ћелије кроз ћелијски циклус, а овај специфичан шаблон дефинисан је фазом ћелијског циклуса (157, 159). Идентификовано је најмање девет структурно повезаних Cdk (Cdk1- Cdk9), мада није за све дефинисана регулаторна улога у току ћелијског циклуса. До сада је идентификовано знатан број циклина (циклин А-циклин Т). Комплекси циклина и Cdk постају активни фосфорилацијом специфичних места на Cdk (160). Исоформе циклина D (циклин D1- D3) интерагују са Cdk2, -4, и -6 и омогућују напредовање кроз G1 фазу ћелијског циклуса. Асоцијација циклина E са Cdk2 је активна на прелазу G1/S и усмерава улазак у S фазу ћелијског циклуса. Прогресија кроз S фазу посредована је комплексом циклин A/Cdk2, а комплекс циклин A и Cdk1 је од кључног значаја у G2 фази. Cdk1/циклин B је неопходан за покретање митозе. Поред тога, важну улогу у регулацији ћелијског циклуса остварују и одговарајући инхибитори циклин зависних киназа (инхибитори Cdk) који функционишу као негативни регулатори ћелијског циклуса и онемогућавају ћелијама да пређу у следећу фазу ћелијског циклуса. Класа инхибитора циклин зависних киназа Ink4, p16, p15, p18 и p19, везују и инхибирају циклин D-зависне киназе (Cdk2, -4 и -6). Друга група инхибитора циклин зависних киназа CIP/Kip (енгл.

kinase inhibitor protein KIP), p21, p27 и p57, негативно регулише комплексе циклин E/Cdk2 и циклин A/Cdk2 (161, 162).

1.3a G1/S фаза ћелијског циклуса

Иако се често назива фаза мировања, G0 фаза је у ствари прилично активна и њој ћелија може да испољи одређене функције и да расте. Улазак у ћелијски циклус (G1 фазу) је регулисан тачком ограничења - тачком преласка током које прогресија кроз ћелијски циклус не зависи од спољашњих стимулуса, као што су изложеност храњивим састојцима или дејство митогена (163). За ову тачку се сматра да условљава поделу на рану и касну G1 фазу ћелијског циклуса. Протеин ретинобластома (енгл. *retinoblastoma tumor suppressor gene product*, Rb) регулише транзицију ћелије кроз G1/S фазу ћелијског циклуса. Ген Rb1 је тумор супресорски ген који је најпре идентификован у малигну тумору ретине. Фамилија Rb протеина броји три члана Rb/p105, p107 и Rb2/p130. У многим ткивима протеин Rb регулише пролиферацију ћелија, диференцијацију, као и апоптозу. Молекул pRb такође игра централну улогу у процесима диференцијације у различитим ткивима, укључујући очи, сочиво, мозак, периферни нервни систем, епидермис, меланоците, косу, мишиће и јетру. У активном стању, Rb је хипофосфорилиран и формира инхибициони комплекс са групом транскрипционих фактора познатих као E2F-DP (E2F-1, -2, и -3), чиме се контролише транзиција ћелије из G1 у S фазу. Формирање комплекса E2F-DP транскрипционих фактора са не или хипофосфорилираним „активним“ Rb онемогућава улазак у S фазу ћелијског циклуса. Активност Rb се модулише секвенцијалним фосфорилацијом помоћу Cdk4/6-Циклина D и Cdk2/Циклин E (164). Када Rb делимично фосфорилише комплекс Cdk4/6-циклин D, Rb и даље остаје везан за E2F-DP, али овај транскрипциони фактор и даље може да транскрибује неке гене као на пример оне који су неопходни за синтезу циклина E. Циклин E се затим везује за Cdk2 и затим овај активни комплекс потпуно хиперфосфорилише Rb и на тај начин ослобађа комплекс E2F-DP и потпуно активира транскрипциони фактор E2F што коначно резултује експресијом гена за бројне протеине S фазе. Поред Rb, Cdk2 фосфорилише и друге супстрате укључене у репликацију ДНК (165). Уколико нису испуњени сви услови за успешну деобу, ћелијски циклус се зауставља и активирају се

контролни механизми (*G1 checkpoint*). Током G1 фазе, ДНК се може оштетити зрачењем, хемијским, физичким ноксама или оксидативним стресом. На почетку S фазе синтетише се циклин А који затим формира комплекс са Cdk2 што омогућава даљу прогресију кроз ову фазу ћелијског циклуса уз производњу других ензима и протеина укључених у синтезу ДНК (166). Прогресија кроз S фазу захтева активацију транскрипционог фактора E2F. Комплекс циклин А-Cdk2 стабилно се везује за E2F (167-169). Током касне S и током читаве G2 фазе, ћелије се припремају за митозу тако што повећавају ниво циклина А и В. Када се ниво циклина В повећа, он формира комплекс са Cdk1 у цитоплазми, где остаје до митозе, када прелази у једро. Повећана активност транскрипционог фактора p53 може да буде узрокована оштећењем ДНК током G1 фазе ћелијског циклуса што резултује повећаном синтезом инхибитора циклин зависних киназа, p21, који следствено инхибира комплексе циклина и циклин зависних киназа у току G1 фазе ћелијског циклуса. Транскрипциони фактор p53 може и да активира систем за поправку ДНК. Међутим, уколико је оштећење неповратно, p53 активира молекуле укључене у апоптозу било покретањем сигнала са Fas рецептора или помоћу фамилије протеина Bcl-2 (170, 171).

1.3б G2/M фаза ћелијског циклуса

G2 фаза ћелијског циклуса траје до уласка ћелије у митозу. Током ове фазе такође се синтетишу протеини кључни у процесу митозе, тако да инхибиција синтезе протеина током ове фазе може да спречи отпочињање ћелијске деобе. У G2 фази је број хромозома дуплиран, као и остале компоненте ћелије. Током ове фазе синтетишу се и неопходни протеини и РНК (рибонуклеинска киселина) (172, 173). Прелазак ћелије из G2 у М фазу омогућују циклин-А2 и -В1, који се упарују са Cdk2 и Cdk1. Ови комплекси узрокују кондензацију хромозома и „распад“ једарне мембране. Верује се да Cdk1 представља есенцијални молекул, и заправо, нема података о преживелим Cdk1^{-/-} мишевима или ћелијама (174). Циклин А2 за разлику од свих других циклина, је потребан у два фазама ћелијског циклуса, на прелазу G1/S и током митозе. Циклин- В1 и- В2 се везују за Cdk1 у растућим ћелијама. Циклин В2 је повећано експримиран током сперматогенезе (175). Циклин В1 може да компензује одсуство циклина В2. У случају дефекта у хромозомима активира се G2 контролна тачка, која супримира активност циклин В/Cdk1. Познато је да

и протеин p53, активацијом p21 протеина, учествује у заустављању ћелијског циклуса у G2 фази (176). Приликом оштећења молекула ДНК, ћелија се зауставља у било којој фази ћелијског циклуса, са циљем да се исправи ово оштећење или ћелија може да активира апоптотске механизме што последично уводи ћелију у смрт (170).

1.4. Утицај хемотерапеутика на ћелијску смрт

Хемотерапија је и даље важан третман у терапији канцера, иако су још увек нејасни молекулски механизми одговорни за осетљивост или отпорност ћелија на хемотерапеутике у различитим врстама тумора. Стога је одређивање оптималног хемотерапеутског режима за одређени тип канцера комплексан и индивидуалан процес. На пример, карцином тестиса добро реагује на примену деривата платине, што резултира са око 80% излечених пацијената, док код пацијената који имају другу врсту тумора, као што је карцином плућа стопа одговора на хемотерапију базирану на цитотоксичним дериватима платине је само 30%, остављајући преосталих 70% пацијената са мало или нимало терапијске користи и са великим бројем нежељених реакција (177). Већина хемотерапеутика узрокује оштећење ДНК и активира сложену сигналну мрежу која зауставља ћелијски циклус и/или индукује апоптозу (178, 179). Када се лекови који примарно индукују оштећење ДНК користе за лечење тумора, у неким клоновима туморских ћелија мења се експресија специфичних гена укључених у регулацију ћелијског циклуса или поправци ДНК. Ове измене могу индуковати отпорност туморских ћелија на лекове. Сходно томе, ефективност хемотерапеутика зависи од разлика у одговору на оштећење ДНК здравих и малигно измењених ћелија (180, 181). Стога, проучавање специфичних механизма отпорности и развој нових терапеутских стратегија су изузетно важни у побољшању ефикасности хемотерапеутика.

Једна од баријера за настанак малигно трансформисаних ћелија је апоптоза (182). Губитак контроле апоптозе туморским ћелијама омогућава да преживе дуже и обезбеђује им више времена за акумулацију генских мутација одговорних за повећану инвазивност и ангиогенезу тумора, као и непланску пролиферацију и смањену диференцијацију ћелија (183). Постоји више начина како туморске ћелије могу да избегну апоптозу: или је

инхибирана функција каспазе или је онемогућено покретање апоптозе (184). Повећана експресија антиапоптотских протеина Bcl-2 и губитак Вах и/или Вак су најчешћи механизми избегавања апоптозе. У основи ових поремећаја је најчешће мутација тумор супресорског гена p53, која се детектује код 50% оболелих од канцера. Мутације гена за Bcl-2 такође олакшавају генезу тумора. Прекомерна експресија протеина Bcl-2 је регистрована у више од половине свих врста канцера (183, 184). Оваква експресија протеина Bcl-2 резултира повећаном отпорношћу туморских ћелија на апоптотске стимулусе индуковане цитостатицима (185).

Хемиотерапеутици делују на процес ћелијске смрти код хемосензитивних тумора. Сматра се да цитотоксични лекови који се тренутно користе у лечењу малигнома, као што су етопозид, цитарабин, циклофосфамид, доксорубицин и метотрексат, делују тако што инхибирају топоизомеразу II (етопозид), ДНК-полимеразу (цитарабин), антагонизују фолну киселину (метотрексат), инхибирају унакрсно ДНК повезивање (циклофосфамид) и ДНК интеркалацију (доксорубицин) (184). Иако су примарно мете деловања лекова прилично различите, постало је очигледно да цитотоксичност изазвана леком коначно узрокује апоптозу. Диспептид је инхибитор хистон деацетилазе који у ћелијама мултиплог мијелома смањује експресију гена за Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1 (186). Неколико истраживања указало на способност цитотоксичних лекова да активирају тумор супресорски ген p53. Исход активације протеина p53 је или апоптоза или заустављање ћелијског циклуса (187, 188). Бројне студије су указале на могућност неких лекова да изазивају апоптозу тако што подстичу синтезу CD95L, који се затим везује за CD95 рецептор (189, 190). У третману различитих тумора са цитотоксичним лековима као што су доксорубицин, цисплатина, метотрексат, цитарабин и етопозид примећено је повећање иРНК (информациона рибонуклеинска киселина) за синтезу CD95 и CD95L (191). Код леукемија или солидних тумора, укључујући неуробластом, хепатобластом, медулобластом, карцином колона и карцином дојке цитотоксични лекови индукују експресију CD95L који изазивају аутокринно и паракрино самоубиство ћелије након везивања за његов рецептор (192, 193). Неки цитостатици индукују апоптозу тако што повећавају пропустљивост мембране митохондрија и ослобађање цитохрома С у цитоплазму (193).

Уколико је претерано активирана аутофагија може да буде и механизам преживљавања ћелија након што хемиотерапеутици исказу терапијско дејство (194, 195). Антрациклини адриамицин, даунорубицин и епирубицин индукују аутофагију у туморским али и нетрансформисаним ћелијама. Индукована аутофагија у зависности од типа ћелија, али и врсте и концентрације хемиотерапеутика, може имати цитопротективну или цитотоксичну улогу (196-198).

Неки видови онколошке терапије могу да изазову смрт туморских ћелија некрозом. У ове лекове се убрајају ДНК алкализујућа једињења као што су MNNG (енгл. *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*) (199) и тамоксифен (200, 201). Ресвератрол као и неке компоненте традиционалне кинеске медицине потенцијално изазивају смрт туморских ћелија некрозом (202-204).

1.5. Модулација ћелијског циклуса хемотерапеутицима

Познато је да се цитостатици могу поделити у две групе према томе да ли је њихово дејство ограничено на одређену фазу ћелијског циклуса. Циклус-неспецифичним цитостатикима сматрамо оне лекове чији ефекат не зависи од фазе ћелијског циклуса, односно може се рећи да они испољавају свој ефекат у свим фазама ћелијског циклуса (206, 207). Такви су на пример сви алкилирајући агенси који се због поседовања алкил радикала лако везују за атоме азота у пиринским и пиримидинским базама нуклеинских киселина што за последицу има унакрсно везивање два ланца ДНК или погрешно упаривање база и коначно смрт ћелије. Поред алкилирајућих агенаса у групу циклус-неспецифичних цитостатика убрајују се и деривати платине, неки лекови из групе деривата нитрозоуре и групе антибиотика (208). Циклус- специфични цитостатици су они који своје дејство испољавају у одређеној фази ћелијског циклуса. Такви цитотоксични лекови су на пример винкрестин и винбластин који делују само на ћелије у митози. Наиме, ови алкалоиди из биљке *Vinca rosea* се директно везују за тубулин и спречавају његову уградњу у митотоско вретено (209). На ћелије у митози делују још и таксени, као и етопозид. На ћелије у G2 фази ћелијског циклуса делује блеомицин. Највећи број цитостатика делује на ћелије у S фази ћелијског циклуса а то су 5-флуороурацил,

метотрексат, хидроксиуреа, доксорубицин, гемцитабин, цитарабин и други. Карактеристика циклус-специфичних цитостатика је да после одређеног времена постижу плато, што значи да се линеарна повезаност између примењене дозе и оствареног ефекта губи. Неки од цитотоксичних лекова као што су инхибитори топоизомеразе испољавају своје дејство и на ћелије у S и G2 фази ћелијског циклуса, док таксени делују на ћелије у G2 и M фази ћелијског циклуса (210).

У последње време терапија различитих врста тумора се заснива на инхибицији Cdk што зауставља ћелијски циклус и последично може изазвати и апоптозу (211, 212). За разлику од здравих, туморске ћелије карактерише непланска пролиферација. Оваква пролиферација је последица или инактивације инхибитора циклин зависних киназа или прекомерне експресије циклина. На пример, редукција инхибитора циклин зависне киназе, p16, резултује непрекидном ћелијском пролиферацијом. Губитак функције p16 детектован је код разних малигнома, укључујући меланом, карцином плућа, дојке и колоректалне регије (213). Супротно, прекомерна експресија циклин D1 је удружена са генезом и прогресијом карцинома дојке (214, 215). Из свега наведеног развила се идеја о употреби инхибитора циклин зависних киназа као нових антитуморских лекова. Ова једињења могу инхибирати директно или индиректно циклин зависне киназе. Флавопиридол је инхибитор циклин зависних киназа који може да заустави ћелијски циклус у бројним линијама туморских ћелија (216, 217). Показано је да се везује и директно инхибира Cdk1, Cdk2, Cdk4 и Cdk6. Употреба флавопиридола повезана је и са селективном индукцијом апоптотске смрти ћелија, нарочито у линијама хематопоетских ћелија (218, 219). Уз то, инхибира антиапоптотске молекуле, укључујући Bcl-2, XIAP, Mcl-1 и фосфо-сурвивин (218, 220). R-росковитин је други инхибитор Cdk који је испитиван у клиничким студијама. Овај аналог пурина инхибира Cdk1, -2, -5, -7, -8 и -9. Инхибиција Cdk2 коју остварује овај лек је јача у односу на инхибицију Cdk1 (221). Примена овог аналога пурина инхибира раст туморских ћелија и промовише апоптозу и то активацијом p53 молекула и редукцијом експресије антиапоптотског протеина Mcl-1 (222). И поред регистрованог електролитног дисбаланса и/или гастроинтестиналних тегоба, на крају друге фазе клиничких испитивања уочено је да примена овог лека значајно побољшава преживљавање оболелих (223). Данас се испитује ефекат комбинација овог лека са другим хемиотерапеутицима, као и његов ефекат у лечењу реуматоидног артритиса. Три

инхибитора Cdk4/6, палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб, данас су у различитим фазама клиничког истраживања. Палбоциклиб је скорије препоручен за лечење ER-позитивног/HER2-негативног метастатског карцинома дојке код пацијенткиња у постменопаузи (224). Употреба овог терапеутика зауставља ћелијски циклус у G1 фази и смањује експресију Ki-67. Изазива умор, неутропенију, тромбоцитопенију и анемију. Рибоциклиб је одобрен за лечење метастатског ER-позитивног/HER2-негативног карцинома дојке код жена у постменопаузи. Овај лек подстиче дефосфорилацију молекула Rb, зауставља ћелијски циклус у G1 фази и смањује експресију Ki-67 (225). Данас се испитује његов ефекат у лечењу меланома, лимфома и неуробластома. Примена рибоциклиба праћена је појавом леукопеније, анемије, мучнине и повраћања. Абемациклиб се од својих предходника разликује по томе што има способност проласка кроз крвномождану баријеру (226). Такође, UCN-01 (7-хидроксистауроспорин) је аналог стауроспорина који се изолује из врсте *Streptomyces* и представља селективни инхибитор протеин киназе C (227). UCN-01 зауставља ћелијски циклус у G1 и S фази, тако што инхибира дефосфорилацију Cdk1 Cdk2 што резултује дефосфорилацијом молекула Rb. Нажалост, код већине испитаника у клиничким фазама испитивања овог лека забележено је присуство хипергликемије. Бриостатин 1 је нови агенс који свој анти туморски потенцијал остварује индукцијом p21 и инактивацијом Cdk2 (228).

1.6. Иmunски одговор на туморске ћелије

Иmunски систем игра важну улогу у превенцији настанка и раста тумора. Ћелије имунског система откривају и уклањају микроорганизме на два начина, директним контактом и солубилним медијаторима којима остварују интеракције са различитим ћелијама домаћина. На тај начин се спречава стварање хроничног инфламацијског окружења погодног за генезу тумора (229). Осим у одбрани од микроорганизма, имунски систем игра важну улогу и у елиминацији оштећених и малигно трансформисаних ћелија (230). Туморске ћелије исказују молекуле које имунски систем препознаје и елиминише их својим ефекторским механизмима. Ћелије имунског система препознају тумор-специфичне (молекуле јединствене за туморске ћелије), као и тумор-асоциране антигене,

односно молекуле нормалних ћелија с тим што је њихова експресија на туморским другачија у односу на нетрансформисане ћелије (231). Под имунским надзором подразумева се физиолошка способност имунског система да препозна клонове малигно трансформисаних ћелија и уклони их пре него што се успостави малигни тумор, као и да убија малигне ћелије након његовог развоја. Механизми елиминисања туморских ћелија подразумевају координисану интеракцију ефекторских механизма урођене и стечене имуности (232).

Познато је да највећи део леукоцитног инфилтрата многих тумора чине тумор-асоцирани макрофаги (енгл. *Tumor-associated macrophages*, TAMs). Макрофаги, као професионални фагоцити, део су урођене имуности, мада познато је да играју значајну улогу и у ефекторским механизмима стечене имуности. Разликују се класично активирани макрофаги (M1 макрофаги) и алтернативно активирани (M2 макрофаги) (233, 234). M1 макрофаги убијају туморске ћелије, ослобађају проинфламацијске цитокине и активирају антитуморски имунски одговор (235). M2 макрофаги уклањају мртве ћелије, индукују ангиогенезу, ремоделовање и поправку оштећеног ткива, али могу и да инхибирају функцију M1 макрофага (236, 237). Познато је да је у карциному дојке акумулација TAMs у позитивној корелацији са ангиогенезом и лошим прогностичким исходом (238).

NK ћелије (енгл. *Natural Killer cells*) заузимају важно место у елиминацији туморских ћелија и у контроли ширења тумора. Као компонента урођене имуности, ове ћелије доприносе регресији тумора и елиминацији хематогених метастаза (239). При сусрету са инфицираним или малигно трансформисаним ћелијама, NK ћелије се активирају и брзо остварују цитолитичку активност (240, 241). Ове ћелије представљају и спону између урођеног и стеченог имунитета, тако што секретују цитокине и хемокине којима могу да покрену или усмере стечени имунски одговор (242). Активност NK ћелија зависи од баланса инхибиционих и активационих рецептора. Овај баланс одређује селективност дејства NK ћелија и резултује ефикасним убијањем туморских, али не и неизмењених ћелија домаћина. Активациони и инхибициони рецептори препознају различите лиганде. Активациони рецептори NK ћелија (нпр. NKG2D, NKp30 и NKp46) препознају измењене лиганде које експримирају туморске или инфициране ћелије, док инхибициони рецептори препознају МНС молекуле I класе (243, 244). Након активације

NK ћелије индукују апоптозу која је последица испоручивања цитолитичких молекула, перфорина и гранзима B, у циљану ћелију (245). Такође, NK ћелије могу да индукују перфорин независну апоптозу помоћу лиганда смрти (246). Везивање лиганда смрти (нпр. FasL) за рецептор смрти (Fas) индукује тримеризацију рецептора. Оваква тримеризација активира адаптерске протеине FADD (енгл. *Fas- Associated- Death- Domain- Protein*) (247) који активирају каспазу-8 а затим ефекторске каспазе, као што је каспаза 3 што све заједно циљану ћелију уводи у апоптозу. NK ћелије могу да се помоћу рецептора FcγRIIIА или CD16А вежу и за ћелије карцинома дојке које су обложене IgG. Овај феномен се зове цитотоксичност зависна од антитела (248). NK ћелије експримирају и бројне *toll-like* рецепторе који служе као сензори молекулских образаца оштећених ћелија (енгл. *Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMPs) у туморској средини што подстиче ефекторску функцију ових ћелија (249). И поред инфлуksа великог броја NK ћелија у туморску потку, ове ћелије могу да буду локално или систематски супримиране. Туморицидна активност NK ћелија може да буде лимитирана физичким карактеристикама, хемијским или биолошким факторима .

NKT ћелије (енгл. *Natural Killer T cells*) играју значајну улогу како у урођеном тако и у стеченом имунском одговору. Ове ћелије препознају гликолипидне антигене презентоване у склопу молекула CD1d на површини ћелије (250). Проудукују широк сет имунорегулаторних цитокина (251). Тако секретују IFN-γ који појачава фагоцитозну способност макрофага и активира NK ћелије и CD8⁺ Т лимфоците (252, 253). Слично NK ћелијама, NKT ћелије могу директно да убију циљану ћелију тако што узрокују апоптозу која је зависна од перфорина (254). Продукција цитокина у активираним NKT ћелијама за последицу има појачану цитотоксичку активност ових ћелија, снажан антитуморски имунски одговор, као и прекид имуносупресије. Резултати предклиничких и клиничких студија указују да активација NKT ћелија егзогеним гликолипидима супримира раст тумора (нпр. карцином дојке, плућа и колоне, и меланом) (255, 256). Активно се испитују антитуморски терапијски приступи засновани на коришћењу NKT ћелија.

Налаз Т лимфоцита у потки тумора може се сматрати и добрим и лошим прогностичким знаком. Цитотоксички CD8⁺ Т лимфоцити индукују смрт туморске ћелије или помоћу перфорина и гранзима или лиганда смрти (257). Помагачки CD4⁺ Т

лимфоцити (енгл. *T helper*, Th) помажу у активацији CD8⁺ Т лимфоцита које онда ефикасно лизирају туморске ћелије. Помагачки Т лимфоцити продукују различите цитокине којима обављају различите ефекторске функције.

На цитотоксичну активност CD8⁺ Т лимфоцита утичу и регулаторни Т лимфоцити. Регулаторни Т лимфоцити помажу туморима да избегну антитуморски имунски одговор (258,259). Своју супресивну активност остварују различитим механизмима укључујући инхибицију сазревања антиген-презентујућих ћелија и секрецију инхибиционих молекула (260, 261). Уз то, смањују цитотоксичку активност НК и НКТ ћелија (262-264).

Туморске ћелије бројним механизмима избегавају механизме урођене и стечене имуности, као што су имуноселекција и имуносубверзија. Имуноселекција оставља простор мање имуногеним, толерогеним и неимуногеним варијантама туморских ћелија да наставе раст. Иmunски систем елиминише само имуногене малигне ћелије. Имуносубверзија представља бројне и разноврсне механизме избегавања активне локалне и системске супресије имунског одговора. Малигне ћелије такође ослобођањем различитих фактора утичу на диференцијацију, матурацију и функцију дендритских ћелија (265) и алтернативну активацију макрофага у и око тумора, а ове ћелије урођене имуности даљом продукцијом имуносупресивних цитокина и простагландина продубљују супресију имунског одговора (266).

1.7. Имуномодулаторни ефекти хемотерапије

Новије студије јасно показују да исход хемотерапије не зависи само од њихове способности да директно убијају туморске ћелије, већ и од способности хемотерапеутика да стимулишу имунски одговор против тумора (267).

1.7а Утицај цитостатика на ћелије урођене имуности

Забележено је да различити цитотоксични лекови мењају активност макрофага, дендритских ћелија и НК ћелија. Код оболелих од карцинома дојке употреба цитостатика

изменила је имунски одговор који зависи од НК ћелија. Недавно је показано да примена циклофосфамида у ниској дози дужи временски период стимулише антитуморски имунски одговор посредован НК ћелијама у терминалном стадијуму болести (268). У различитим туморским моделима циклофосфамид је индуковао повећан инфлукс НК ћелија, дендритских ћелија и макрофага у туморску микросредину (269, 270). У моделу карцинома панкреаса, комбинована терапија 5-флуороурацилом и IFN- α повећава број тумор-инфилтришућих цитотоксичких NKG2D⁺ НК ћелија (271). Деплеција НК ћелија помоћу циклофосфамида, антителима усмереним на NK1.1 или NK1.2 молекула значајно смањује уклањање циркулишућих туморских ћелија и повећава број метастатских колонија у плућима и јетри након интравенске апликације туморских ћелија карцинома дојке, али и других епителних ткива (272-275). Такође, циклофосфамид у ниској дози фаворизује развој M1 макрофага што за последицу има повећану продукцију кисеоничних радикала, IL-6 и IL-12 и активацију урођеног имунског одговора (276). У моделу меланома миша комбиновани третман са циклофосфамидом, викристином и доксорубицином прати акумулација тумор-асоцираних макрофага поларизованих у M1 фенотип (277). Показано је да се у кокултивацији са макрофагима сензитивност туморских ћелија на циклофосфамид и цисплатину повећава. Међутим, у кокултивацији са макрофагима сензитивност хуманих ћелија карцинома оваријума на дејство 5-флуороурацила опада (278). Паклитаксел може да директно стимулише цитотоксички ефекат TAMs и да помоћу IL-12 и TNF- α активира дендритске ћелије, НК ћелије и цитотоксичке Т лимфоците што следствено инхибира прогресију тумора (279, 280). Међутим, повећан инфлукс TAMs у микросредину карцинома дојке миша и болесница под утицајем паклитаксела ограничио је ефекте цитотоксичне терапије (281, 282).

1.76 Утицај цитостатика на ћелије стечене имуности

Третман оболелих од карцинома са интензивном хемотерапијом индукује смањење броја свих популација лимфоцита, а нарочито В лимфоцита (283). Поређењем ефеката епирубицина (епирубицин, 5-флуороурацил и циклофосфамид) и доксорубицина (едоксорубицин, 5-флуороурацил и циклофосфамид) у популацији оболелих од карцинома дојке запажен је битан пораст цитотоксичких Т лимфоцита и НК ћелија, као и драстичан

пад В лимфоцита у крви (284). Третман са поновљеним циклусима гемцитабина узроковао је супресију хуморалног али и Т ћелијског имунског одговора (285). Овај ефекат је изостао након појединачне дозе гемцитабина (286). Терапија 5-флуороурацилом код оболелих од карцинома колоне индуковала је хуморални имунски одговор (287).

Бројне студије уочиле су позитивне ефекте цитостатика на Т ћелијски имунски одговор. Повећана стопа преживљавања мишева са карциномом оваријума након терапије доксорубицином или цисплатином праћена је активацијом имунског одговора у којима централно место заузимају $CD4^+$ Т лимфоцити (288). И код оболелих од резистентног карцинома оваријума, цисплатина и паклитаксел у ниској дози остварују адекватну терапијску ефикасност захваљујући активацији $CD8^+$ Т лимфоцита и секрецији IL-2 и IFN- γ (289). 5-флуороурацил индукује пораст $CD8^+$ лимфоцита који секретују IFN- γ (290). Повећан инфлукс $CD4^+$ и $CD8^+$ Т лимфоцита у туморску микросредину езофагеалног карцинома забележен је након третмана са 5-флуороурацилом и цисплатином (291). У експерименталним моделу аденокарцинома и фибросаркома третман са доксорубицином индуковао је пролиферацију $CD8^+$ Т лимфоцита у лимфним чворовима, као и секрецију IFN- γ (292).

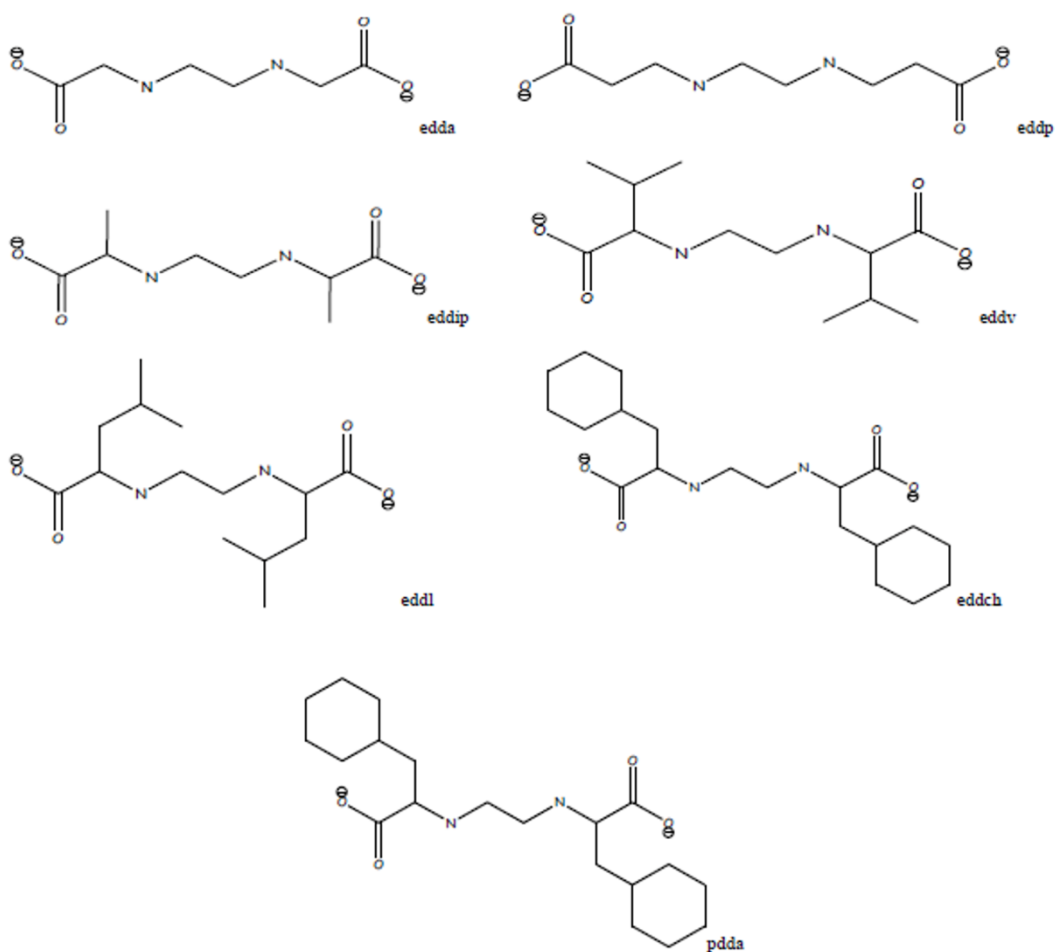
Нарушен баланс између цитокина типа Th1 и Th2 које унутар тумора продукују помагачки $CD4^+$ Т лимфоцити може да се регулише неким цитостатацима. Код оболелих од карцинома плућа, паклитаксел повећава заступљеност циркулишућих $CD8^+$ Т лимфоцита који секретују IFN- γ , као и $CD4^+$ Т лимфоцита који секретују IL-2 и на тај начин поларизује антитуморски имунски одговор у правцу Th1 лимфоцита (293). У експерименталном моделу леукемија и меланома терапија циклофосфамидом индукује секрецију Th1 цитокина (IL-2 и IFN- γ) али инхибира секрецију Th2 цитокина (IL-4 и IL-10) (294). Циклофосфамид је у овим моделима узроковао пораст Th1 и Th17 лимфоцита у слезини (295).

1.8 Лиганди EDDA (етилендиамин-*N,N'*-диацетато) типа

Због бројних нежељених дејстава цисплатине која су углавном дозно зависна још 1973. године установљена су правила која се првенствено односе на хемијску структуру комплекса, а која би требало да олакшају развој идеалног комплекса метала са истим или бољим цитотоксичним потенцијалом у поређењу са златним стандардом, као и бољом толеранцијом (2). Наиме, да би одређени комплекс метала остварио жељену цитотоксичну активност неопходно је да буде неутралан, одлазећи лиганди би требало да буду у *cis* положају, амински лиганди би требало да буду секундарни или терцијарни амини, и комплекс платине би требало да има две *cis* оријентисане амино групе (181). Хемијски гледано, у комплексима платине, разликују се лако одлазећи и стални лиганди, при чему сваки од лиганата учествује у успостављању адекватне биолошке активности. Стални лиганди су јаким везама везани за централни јон метала и остају нетакнути у комплексу који се формира при интеракцији са молекулом ДНК. Сматра се да су ови лиганди носиоци антитуморског дејства комплекса метала, али битни су и у развоју резистенције туморских ћелија на лек. Управо манипулацијом хемијске структуре сталних лиганата превазилази се резистенција туморских ћелија на комплексе метала. Класичан пример је оксалиплатина која делује на туморске ћелије карцинома колоне за које је познато да су резистентне на дејство цисплатине (32). Одлазећи лиганди су они који су слабом хемијским везама везани за централни јон метала. Неопходни су за хидролизу комплекса у цитоплазми и имају утицај на стабилност молекула, као и на развој нежељених дејстава новосинтетисаних комплекса. Пример је карбоплатина која уместо хлоридног лиганата има циклобутандикарноксилни лиганд који индукује мањи број споредних реакција у цитоплазми и не показује нефротоксичност која је карактеристична за цисплатину (30). Како обе групе лиганата утичу на ефикасност комплекса, али и на липофилност и растворљивост, као и учесталост нежељених реакција, јасно је да је последњих година хемијском манипулацијом синтетисан велики број нових лиганата.

На почетку истраживања деривата платине као антиканцерских лекова, мање пажње је посвећено комплексима аминокарбоксилатних лиганата. Године 1964. *Liu* је први показао координацију етилендиамин-*N,N'*-диацетата (енгл. *ethylenediamine- N,N'-diacetic*

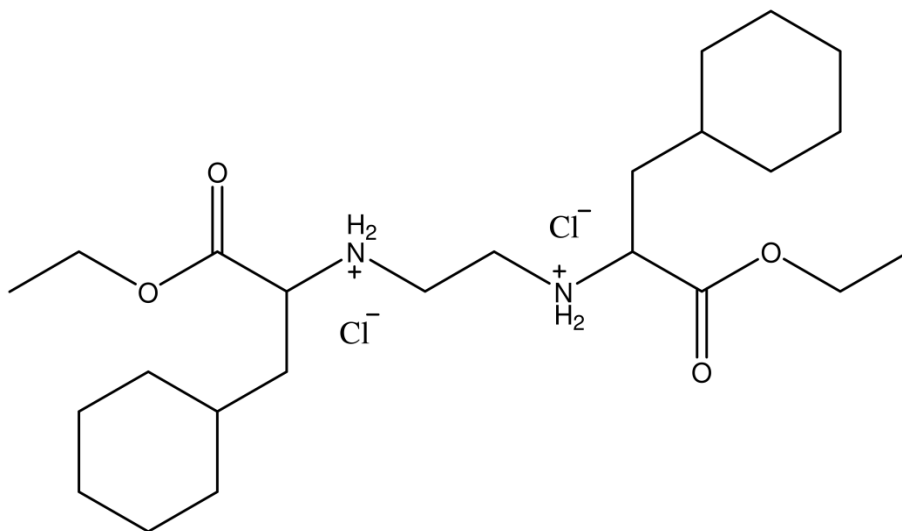
acid, edda) са платином(II) (296). Током наредних година истраживање комплекса са *edda* лигандима привукло је пажњу, углавном због способности лиганда да делују као донори електрона што може утицати на хемијске и физичке особине комплекса. Лиганди *edda* типа су етилендиамин или пропилендиамин дикарбоксилне киселине и њихови ести (Слика 4). Анализа антитуморксе активности најпре комплекса платине, а затим и комплекса рутенијума, злата, бабра, галијума са лигандима *edda* типа, указује на то да лигандни имају удео у антитуморском потенцијалу комплекса (297). Прва серија лиганата *edda* типа која је показала цитотоксички ефекат који је чак већи од комплекса тешких метала са истим лигандима јесте серија *n*-алкил естара-(*S,S*)-етилендиамин- *N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропанске киселине.



Слика 4. Хемијске структуре основних лиганата типа *edda* (Jurisevic M et al. Serb J Exp Clin Res. 2016; 17(4):285-295)

1.6a. *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид

Аминокиселина, *S*-2-амино-3-циклохексилпропанска киселина у облику хидрохлорида, била је полазна супстанца за синтезу шест нових лиганата. Након дехидрохлоровања полазне аминокиселине и неутрализације воденим раствором натријум-хидроксида, формиран је етилендиамински мост између два аминокиселинска остатка. На тај начин је добијен *S,S*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропанска киселина дихидрохлорид. Даља естерификација је урађена стандардном методом помоћу тионил-хлорида (298). Хлађењем филтрата добијен је бели талог у облику *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (Слика 5) (298, 299). Синтетисана супстанца окарактерисана је стандардним спектроскопским методама, инфрацрвеном спектроскопијом, NMR (енгл. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR, ¹H NMR, ¹³C NMR, HSQC) спектроскопијом и масеном спектрометријом (298, 299).



Слика 5. Хемијска структура DE-EDCP (енгл. *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride)

Приликом анализе цитотоксичког ефекта синтетисаних *O,O'*-диалкил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил) пропаноат платина(II)/(IV) комплекса и њихових одговарајућих лиганата *in vitro* примећено је да *O,O'*-диетил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (DE-EDCP) самостално показује значајну туморицидну активност на неколико линија туморских ћелија. (298-300).

2. Циљ истраживања

Основни циљ истраживања је да се испита утицај *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорида (DE-EDCP) на прогресију карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10) миша и да се расветле механизми његове потенцијалне антитуморске активности.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. одредити туморицидни капацитет DE-EDCP на више линија малигних ћелија: мишји карцином дојке (4T1), хумани карцином дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468) и меланом миша (B16-F10)
2. утврдити утицај DE-EDCP на прогресију тумора (4T1 и B16-F10) одређивањем времена појављивања и величине примарног тумора, као и броја и величине метастатских колонија
3. испитати молекулске механизме проапоптоске и антипролиферативне активности DE-EDCP у туморским ћелијама
4. испитати да ли и у којој мери DE-EDCP показује имуномодулаторни ефекат
5. испитати потенцијалне токсичне ефекте испитиваног једињења

3. Материјал и методе

3.1. *O, O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N, N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (DE-EDCP)

Као један од нових диаминских лиганата комплекса платине (II) и (IV) (298), диетил естар, *O, O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N, N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид (означен као DE-EDCP, енгл. *O, O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride*) синтетисан је на Хемијском факултету Универзитета у Београду.

3.2. Ћелијске линије

3.2a. Линија ћелија мишијег карцинома дојке

Линија ћелија мишијег карцинома дојке 4T1 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA, CRL-2539), добијена је од спонтано насталог карцинома дојке BALB/C миша (301). Користи се као анимални модел који одговара IV стадијуму карцинома дојке. Након имплатације ћелија директно у млечну жлезду дојке миша, 4T1 ћелије брзо расту и локално формирају тумор који има способност брзог метастатског ширења. Хематогене метастазе се најпре очекују у плућима, а касније између 3 и 6 недеље и у јетри, костима и мозгу.

Туморске ћелије 4T1 су култивисане у комплетном медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са 10% феталног говеђег серума (енгл. *Fetal Bovine Serum*, FBS.), 2mmol/l L-глутамин (енгл. *L-glutamine*), 100U/mL пеницилина, 100µg/mL стрептомицина и 1mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Малигне ћелије су узгајане у асептичним условима, у инкубатору на 37°C са 5% CO₂. У *in vivo* експериментима коришћене су ћелије у десетој пасажи.

Непосредно пре *in vivo* и *in vitro* експеримената, субконфлуентне 4Т1 ћелије (~80%), у логаритамској фази раста, одвајене су са дна флашка (BD Falcon) краткотрајним третирањем са раствором 0,25% трипсина и 0,02% EDTA (енгл. *ethylenediaminetetraacetic acid*) (РАА Laboratories GmbH) раствореног у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Salline*; РАА Laboratories GmbH) у трајању од 1 минута. Ћелије су затим опране у комплетном медијуму са додатком 10% FBS како би се инактивисао трипсин и спречило оштећење ћелија. Ћелије су онда центрифугиране на 125g, 10 минута. Њихова вијабилност је процењена помоћу виталне боје, трипан плаво (енгл. *trypan-blue*). Трипан плаво дифундује само у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док ћелије са интактном мембраном остају необојене (302). Само она ћелијска суспензија која садржи више од 95% вијабилних ћелија је коришћена у експериментима.

3.2б Линије ћелија хуманог карцинома дојке

Ћелијске линије изоловане из хуманог карцинома дојке 51-годишње особе женског пола које су коришћене у овом истраживању су MDA-MB-468 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, HTB-132, USA) и MDA-MB-231 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, HTB-26, USA). Обе ћелијске линије одговарају III стадијуму аденокарцинома дојке.

MDA-MB-468 је адхерентна ћелијска линија која је изолована из карцинома дојке жена. Троструко су негативне, што значи да не експримирају молекул HER2, као ни рецепторе за естроген и прогестерон. Са друге стране, познато је да ове ћелије исказују EGFR (енгл. *Epidermal growth factor receptor*, EGFR) и повећано експримирају маркер пролиферације, Ki-67. Немају висок метастатски потенцијал и добро реагују на терапију (303).

MDA-MB-231 је имортализована адхерентна ћелијска линија изолована из метастатског карцинома дојке жена беле расе. По морфологији ове ћелије су сличне фибробластима коже, вретенасте су и изузетно инвазивне. Одликује их брз и прогресиван раст. Троструко су негативне, што значи да не експримирају рецепторе за естроген, прогестерон и не исказују HER2. У овој хуманој линији забележена је благо смањена

експресија клаудина-3, -4 и -7, E-кадхерина и Ki-67. Одликује их изражен метастатски потенцијал (303). Стога, ова ћелијска линија представља агресивни тип карцинома дојке која је резистентна на различите модалитете терапије.

Туморске ћелије MDA-MB-468 и MDA-MB-231 су култивисане у медијуму DMEM који садржи 10% FBS и инкубиране у атмосфери 5% CO₂, засићеној воденом паром на температури 37°C.

3.2в Линија ћелија мишијег меланома

Ћелијска линија мишијег меланома B16 је добијена од спонтаног тумора коже C57BL/6 мишева. Fidler је сингеним C57BL/6 мишевима интравенски убризгао линију туморских ћелија B16 (F0) како би изоловао варијетет ћелија меланома са израженим метастатским потенцијалом (304). Након две до три недеље изловане су туморске ћелије из плућних метастаза мишева и на тај начин *in vivo* селекцијом добијена је прва генерација туморских ћелија која је означена као B16-F1 (са ниским метастатским потенцијалом). Добијена B16-F1 ћелијска линија је култивисана а затим опет убризгана мишевима соја C57BL/6. Поступак је понављан и након десет циклуса изолован је варијетет меланома B16-F10 са највећим метастатским потенцијалом. На метастатски потенцијал утиче и стопа стварања субпопулације ћелија са метастатским фенотипом која је већа код B16-F10 него код B16-F1 (305). Такође је показано да за разлику од B16-F1, B16-F10 карактерише већа продукција простагландина D₂ одговорног за агрегацију туморских ћелија са тромбоцитима (306). Поред највећег метастатског потенцијала, B16-F10 ћелијска линија одликује се и већим степеном резистанције на конвенционалну хемотерапију (307). B16-F10 најпре метастазира у плућа а касније и у јетру, мозак, лимфне чворове, јајнике и надбубрежне жлезде.

Туморске ћелије B16-F10 (American Type Culture Collection Manassas, ATCC, CRL-6475, USA) су култивисане у DMEM медијуму који садржи 10% FBS-а и инкубиране у атмосфери 5% CO₂, засићеној воденом паром на температури од 37°C. У *in vivo* експериментима коришћене су ћелије у шестој пасажи.

3.3. Испитивање цитотоксичног ефекта DE-EDCP

3.3.1. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) мекм

МТТ тест служи за индиректно одређивање вијабилности ћелија. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Sigma–Aldrich, Munich, Germany), је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама со тетразолијум бромид се редукује до љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења (МТТ) до формазана, директно пропорционална броју живих ћелија. Кристали формазана растворљиви су у DMSO (енгл. *Dimethyl sulfoxide*) што омогућава спектрофотометријску квантификацију интензитета љубичасте боје на таласној дужини од 595nm. Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци.

Малигне ћелије у експоненцијалној фази раста су прикупљене из флашка на претходно описан начин, а њихов број је одређен помоћу *Neubauer*-ове коморе и при бројању су искључене мртве ћелије тј ћелије обојене трипан плавим. Након што је припремљена ћелијска суспензија густине 3×10^4 ћелија/ml, у микротитар плоче са 96 бунара сипано је по 100 μ l ћелијске суспензије (3000 ћелија по бунару). Након инкубације од 24 часа у стандардним условима, медијум је одливен, а затим су малигне ћелије излагане DE-EDCP или цисплатини у опсегу концентрације од 0.49 μ M до 1000 μ M (укупна запремина сваког бунара била је 100 μ l) у различитом временском периоду (24 часа или 48 часова). Након третмана туморских ћелија са DE-EDCP или цисплатином сви бунари микротитар плоче су испражњени и у сваки бунар је додато по 100 μ l медијума са 20 % МТТ раствора (5mg/1ml у PBS). Плоче су инкубиране наредна 4 часа у стандардним условима. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки бунар је сипано по 150 μ l DMSO (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 μ l глицинског пуфера (pH-10.5) Оптичка густина (OD) одређена је на таласној дужини од 595nm, на *Microplate multimode detector Zenyth 3100*.

Вијабилност ћелија је израчуната помоћу формуле (308):

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = (E-B)/(K-B) \times 100$$

E-ћелије третиране испитиваним супстанцама (DE-EDCP или цисплатина) (апсорбанца); B- контрола-бленк (апсорбанца); K- нетретиране ћелије (апсорбанца).

Вредности апсорбанце фармаколошки различито третираних ћелија су поређене са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија услед дејства DE-EDCP или референтног цитостатика цисплатине. Вијабилност ћелија приликом третмана је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

3.3.2. LDH (*Lactate dehydrogenase*) тест

Лактат дехидрогеназа тест се заснива на мерењу активности ензима ослобођеног након нарушавања интегритета ћелијске мембране. LDH је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу ћелијске мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. Активност LDH ензима у супернатанту третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Принцип LDH теста заснива се на две оксидо-редукционе реакције. У првој ензимској реакцији LDH редукује NAD⁺ до NADH + H⁺ оксидацијом лактата до пирувата; а у другој реакцији наступа реоксидација NADH + H⁺ у NAD⁺ при чему се тетразолијум хлорид редукује у црвено-наранџасто обојени формазан.

Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. Количина ослобођеног LDH директно корелира са количином створеног формазана па је интензитет боје директно пропорционалан броју мртвих ћелија. Интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 450 до 500nm.

Малигне ћелије су излагане 24 часа DE-EDCP или референтном цитостатику цисплатини, а испитани су ефекти 8 различитих разблажења, при чему је свако разблажење анализирано у трипликату, у три независна експеримента. Малигне ћелије су

припремљене за LDH тест на исти начин као и за МТТ тест, разлика је само у медијуму за култивацију који садржи 1% FBS због високе активности лактат дехидрогеназе у серуму. За LDH тест коришћене су три контроле: 1) активност ензима у самом медијуму; 2) спонтано ослобађање лактат дехидрогеназе из ћелија, ћелије су излагане само медијуму; 3). максимално ослобађање лактат дехидрогеназе из одређеног ћелијског типа, ћелије су третиране 1% тритоном X који пермеабилује ћелијску мембрану.

Након 24 сата излагања малигних ћелија DE-EDCP или цисплатини, микротитар плоче су центрифугиране на 250g, 4 минута, а затим је супернатант пребачен у нове микротитар плоче. У 50 μ l пребаченог супернатанта додато је по 100 μ l радног раствора LDH кита *In Vitro Toxicology Assay Kit (Lactic Dehydrogenase based)* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Плоче су остављене 30 минута у мраку на собној температури, а затим је у сваки бунар микротитар плоче додато по 15 μ l 1N хлороводоничне киселине у циљу заустављања реакције. Оптичка густина узорака мерена је на 490nm на мултифункционалном читачу *Zenyth 3100*.

Процент мртвих ћелија је израчунат на основу формуле (309):

$$\% \text{ мртвих ћелија} = \frac{(E-B)}{((T-B)-(K-B))} \times 100$$

Е-ћелије третиране са DE-EDCP или референтним цитостатиком цисплатином (апсорбанца); Б-активност ензима у медијуму (апсорбанца); Т-ћелије третиране са тритоном X (апсорбанца); К-отвор са нетретираним ћелијама (апсорбанца).

3.3.3. Квантитативно испитивање апоптотске смрти помоћу *Annexin V-FITC* теста апоптотичности

Протеин *Annexin V* има способност везивања за фосфатидил серин у саставу ћелијске мембране. Међутим, у касној фази апоптозе и у некротичном типу ћелијске смрти нарушава се интегритет ћелијске мембране, што неким молекулима, као што је пропидијум јодид (енгл. *propidium iodide*, PI), омогућава везивање за ДНК у ћелији (310). На основу експресије *Annexin V* и PI разликују се: *Annexin V*⁻PI⁻ ћелије - живе ћелије, *Annexin V*⁺PI⁻ ћелије које су у раној фази апоптозе, *Annexin V*⁺PI⁺ ћелије које су у касној фази апоптозе а *Annexin V*⁻PI⁺ ћелије су некротичне ћелије (311).

У експоненцијалној фази раста малигне ћелије 4Т1 су пресејане у нове флашкове. Када су ћелије достигле конфлуентност од 70%, медијум је замењен медијумом са додатком DE-EDCP у концентрацији од 31.25 μ М или 62.5 μ М или са додатком цисплатине у истој концентрацији. Контролне ћелије нису фармаколошки третиране и у овим флашковима медијум је замењен свежим комплетним медијумом. Након 24 сата изложености ћелије су опране у комплетном медијуму и ресуспендоване у пуферу који омогућава везивање *Annexin-a V* (10X пуфер: 0.1М HEPES, pH 7.4; 1.4М NaCl; 25mM CaCl₂) до густине 1.000.000 ћелија/ml. У 100 μ l такве суспензије додато је по 5 μ l *Annexin-a V-FITC* (BD Pharmingen, San Diego, California, USA) и 5 μ l *PI* (50 μ g/ml PBS-a) (Sigma Aldrich, Немачка). После истека 15 минута инкубације на собној температури и у мраку, у сваки узорак је додато по 400 μ l 1X пуфера. Анализирано је 20000 догађаја на *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

3.4. Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености 4Т1 малигних ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса коришћен је кит *Vybrant® DyeCycle™ Ruby stain* (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA). Овај кит се у живим ћелијама користи за анализу ДНК. Након што поменута боја лако прође кроз ћелијску мембрану и веже се за молекуле ДНК, на основу емитовања флуоресценцентног сигнала који је пропорционалан количини ДНК ћелија одређује се проценат ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

Након постизања конфлуентности у флашковима од 70-80%, 4Т1 малигне ћелије третиране су са DE-EDCP или цисплатином, у концентрацијама од 31.25 μ М и 62.5 μ М, као и са свежим медијумом (контрола) 3 часа или 12 часова, у стандардним условима. Након истека инкубације, малигне ћелије су опране у комплетном медијуму. Ћелије су након тога ресуспендоване у густини од 5x10⁵ ћелија/ml. За даљу анализу је одмерено 0.5ml ћелијске суспензије у коју је додато 1 μ l *Ruby* боје. Узорци су након тога инкубирани 30 минута на температури од 37°C, ван домашаја светлости. За анализу ћелијског циклуса

коришћен је проточни цитометар *FACS Calibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA) а подаци су обрађени у *FlowJo* програму (Tree Star).

3.5. "Scratch" тест за анализу миграције ћелија

"Scratch" тест је коришћен за анализу миграције туморских ћелија *in vitro*. Сматра се да у одређеном проценту овај тест опонаша миграцију туморских ћелија *in vivo* (312, 313). У плоче са 6 бунара у трипликату засејане су 4T1 ћелије и гајене су до постизања конфлуентног монослоја. Стерилним наставком за микропипету направљен је ожиљак у сваком од бунара. Након тога, ћелије су опране PBS а затим је додат чист медијум, или медијум са DE-EDCP или цисплатином. Ћелије су третиране са DE-EDCP или цисплатином у ниској нетоксичкој концентрацији од 15.125 μ M. Након замене медијума уследила је инкубација у стандардним условима. Промене у ћелијском кретању су снимане у 0, 4, и 15. часу након замене медијума, помоћу инвертног микроскопа. Сlike су анализиране уз помоћ *Image J* софтвера (314).

3.6. Анализа фенотипа 4T1 туморских ћелија проточном цитометријом

Након инкубационог периода од 24 часа у присуству DE-EDCP (31.25 μ M), цисплатине(31.25 μ M) или чистог медијума (контрола), 4T1 ћелије су опране хладним PBS и ресуспендоване у комплетном медијуму тако да је густина ћелијске суспензије била 2×10^6 ћелија/ml. Малигне ћелије су затим фиксиране и пермеабиллизоване помоћу кита (*Fixation and Permeabilization Kit*, BD Bioscience). Након инкубације од 20 минута на температури од 4°C, ћелије су опране у *BD Perm/Wash™ Buffer*-у (BD Bioscience) и центрифугиране на 125g, 10 минута. Супернатан је одливен, а 4T1 ћелије су даље бојене на два начина. Како су антитела за STAT3 (IC1799G, Novus Biologicals, San Diego, USA) и Ki-67 (11-5698-82, eBioscience, San Diego, USA) примарна антитела која су већ обележена флуорохромом (FITC), претходно фармаколошки различито третиране као и нетретиране 4T1 ћелије су инкубиране са поменутиим антителима 20 минута на температури од 4°C.

Након тога ћелије су опране у *BD Perm/Wash™ Buffer*-у (BD Bioscience), центрифугиране и ресуспендоване у 250µl пуфера за бојење. Други начин бојења подразумевао је да третиране и нетретиране 4T1 ћелије буду инкубиране 20 минута на температури од 4°C уз додатак примарног антитела за циклин D3 (ab28283, Abcam Cambridge, United Kingdom), циклин E (MA5-14336, Thermo fisher scientific, USA), p16 (ab211542, Abcam Cambridge, United Kingdom), p21 (ab188224, Abcam Cambridge, United Kingdom) и p27 (ab215434, Abcam Cambridge, United Kingdom). Ћелије су након истека инкубације, „опране“ на исти начин и додатно инкубиране под истим условима са секундарним антителом (*goat anti-mouse IgG FITC* (ab6785 Abcam Cambridge, United Kingdom) или *donkey anti-rabbit IgG* (ab150073 Abcam Cambridge, United Kingdom)). Након поновног центрифугирања, ћелијски талог је ресуспендован у 250µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences, San Jose, USA). Подаци су анализирани помоћу *FlowJo* програма (Tree Star).

3.7. Имунофлуоресценца

Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских молекула флуоресцентним бојама. Техника се заснива на специфичном везивању антитела за антиген. Антитело је обележено флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије, а детектује се флуоресцентним микроскопом (315). Малигне ћелије су инкубиране са DE-EDCP, или цисплатином, у концентрацији од 31.25µM у трајању од 24 часа.

Имунофлуоресценца је рађена према поступку описаном у студији *Karimian H* и сарадника (316). У микротират плочама са 6 бунара на покривне плочице сипано је 8×10^4 4T1 ћелија у финалној запремини од 2ml, и инкубирано 72 часа у асептичним условима у инкубатору на 37°C са 5% CO₂. Након истека инкубације, медијум је аспириран из свих отвора. У бунаре са контролним (нетретираним) ћелијама додато је 2ml новог комплетног медијума а у остале бунаре 2ml комплетног медијума који садржи одговарајућу концентрацију (31.25 µM) DE-EDCP или цисплатине. Ћелије су инкубирне још 24 часа у

стандардним условима. Након истека инкубације медијум је апириран из свих бунара и ћелије су опране са PBS-ом. У асептичним условима додат је раствор за фиксирање (4% параформалдехид у PBS-у) и узорци су инкубирани 20 минута на собној температури. Ћелије су по истеку инкубације опране а затим је на ћелије нанет екстракциони раствор (хладан метанол). Након поновног прања нането је по кап примарног антитета специфично за Bcl-2 (sc-783, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA), Bax (sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc CA, USA) или активну каспазу-3 (NB100-56113, Novus Biologicals, UK). Након инкубације од 60 минута у влажној комори, на испрана и обрисана предметна стакла сипано је секундарно антителио (*goat anti-rabbit IgG FITC* (Ab6717-1, Abcam, Cambridge, United Kingdom)) и уследио је период инкубације од 45 минута у влажној комори у мраку. Вишак секундарног антитета је испран а затим су предметна стакла обрисана тако да су само исечци остали влажни. За визуализацију плаво обојених једара коришћена је DAPI боја (енгл. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI). Препарати су остављани преко ноћи да се осуше и након тога посматрани на флуоресцентном микроскопу (Olympus BX 51) на филтерима одређених таласних дужина и увећању 200X.

3.8. Анализа експресије гена методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену

3.8a Изолација рибонуклеинске киселине из 4T1 ћелијске суспензије

За изолацију укупне рибонуклеинске киселине (енгл. *Ribonucleic acid*, RNA) у суспензији туморских ћелија коришћен је тризол реагенс, који представља раствор фенола и гуанидин изотиоцианата. 4T1 ћелије култивисане су у стандардним условима. 24 часа пре почетка експеримента методом случајног избора одабране су ћелијске суспензије које су третиране са DE-EDCP или цисплатином у концентрацији од 31.25 μ M. Последњу, контролну групу чиниле су ћелије које су гајене само у комплетном медијуму. Свака испитивана група имала је по 4 независна узорка. Након култивације 4T1 туморских ћелија у комплетном медијуму, добијена ћелијска суспензија је механички хомогенизована у 1ml тризола (енгл. *TRI Reagent® Solution*, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) помоћу ручног хомогенизатора. Након механичког хомогенизовања, хомогенат

је пребачен у епрувете (Eppendorf, Hamburg, Germany) и инкубиран 5 минута на собној температури, а затим центрифугиран 10 минута на 12000rpm на 4°C. У супернатант је додато 100µl бромхлорпропана (енгл. *1-Bromo-3-chloropropane*, ВСР, Sigma Aldrich), Узорци су добро вортексовани и инкубирани 15 минута на собној температури. Након инкубације узорци су центрифугирани 20 минута на 12000rpm на 4°C. Центрифугирањем су се јасно издвојиле три фракције: горња (водена) фракција у којој је РНК, доња фракција са протеинима и липидима и интермедијарна фракција у којој је ДНК. Садржај овог воденог слоја је пребачен у нове епрувете у које је додато 500µl расхлађеног изопропил алкохола. Узорци су благо вортексовани, инкубирани 15 минута на собној температури и затим центрифугирани 8 минута на 12000rpm на 4°C. После одливања супернатанта талог у којем се налази РНК је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500g у 1ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Осушени талог је растворен у води која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease free water*, Applied Biosystems). Концентрација и пречишћеност РНК одређена је спектрофотометријски мерењем апсорбанце на 260/280nm помоћу апарата *Eppendorf® Biophotometer* (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.86 Реверзна транскрипција РНК у комплементарну ДНК

Процес реверзне транскрипције изведен је коришћењем кита *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), према упутству произвођача. Транскрипција је изведена по следећој процедури: 10µl узорка који садржи 2µg укупне РНК изоловане из 4Т1 ћелијске суспензије инкубиран је са 10µl главне мешавине (енгл. *Master mix*). *Master mix* је садржао: 2µl пуфера (енгл. *RT Buffer*), 0.8µl *dNTP Mix*-а, 2µl хексамера (енгл. *Random Hexamer Primer*), 1µl реверзне транскриптазе (енгл. *Multi Scribe™ Reverse Transcriptase*) и 3.2µl воде која не садржи нуклеазе (енгл. *Nuclease-free H₂O*). На растворени узорак РНК додат је *Master mix*, садржај је лагано промешан и инкубиран 10 минута на 25°C, затим 120 минута на 37°C. Реакција је заустављена грејањем 5 минута на 85°C, а узорци су затим охлађени на 4°C (*Mastercycler® ep realplex*, Eppendorf, Hamburg, Germany). Овако добијена комплементарна ДНК

коришћена је за квантификацију експресије гена, која је у раствору стању чувана на 4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

3.8в Квантификација експресије гена

Методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time-PCR*, qRT-PCR) мерена је експресија гена од интереса. Реакција qRT-PCR је изведена у *Mastercycler® ep realplex* апарату (Eppendorf, Hamburg, Germany) коришћењем микротитар плоча са 96 места (Twin. tec. real time PCR plates 96, Eppendorf). Реакциона смеша у волумену од 20µl по бунару садржала је: 2µl узорка комплементарне ДНК, 10µl *Master mix* (Power SYBR Green PCR Master Mix (2x), Applied Biosystems), 2µl смеше парова прајмера за ген од интереса („forward“ и „reverse“) и 6µl воде која не садржи нуклеазе. Затим су плоче прелепљене адхезивном фолијом (Masterclear real-time PCR Film, Eppendorf), центрифугиране 1 минут на 3000rpm и смештене у qRT-PCR апарат (Mastercycler® ep realplex). Реакције qRT-PCR је изведена по следећој температурној шеми: 4 минута на 95°C, затим 50 циклуса у трајању од по 15 секунди на 95°C и по минут на 62°C. Да би се одредила специфичност PCR продукта подешени су услови за извођење криве топљења (енгл. *Melting Curve*): 15 секунди на 95°C, 15 секунди на 60°C, 20 минута температурног раста и потом 95°C. Прајмери који су коришћени за амплификацију секвенце гена од интереса приказани су у Табели 1.

	Sense (5' to 3')	Antiense (5' to 3')
Bax	ACACCTGAGCTGACCTTG	AGCCCATGATGGTTCTGATC
Bcl-2	GTGGTGGAGGAACTCTTCAG	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
Caspase-3	AAATTC AAGGGACGGGTCAT	ATTGACACAATACACGGGATCTGT
STAT3	GGCATTCGGGAAGTATTGTGC	GGTAGGCGCCTCAGTCGTATC
Cyclin D3	CCGTGATTGCGCACGACTTC	TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG
NANOG	AAGCAGAAGATGCGGACTGT	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
SOX2	AAAGGGTTCTTGCTGGGTTT	AGACCACGAAAACGGTCTTG
β-actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT

Табела 1. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.

Релативна квантификација експресије циљног гена у односу на експресију референте контроле одређена је компаративном Ct (енгл. *Cycle threshold*, Ct) методом ($\Delta\Delta Ct$) (317). Просечне Ct вредности контролних триplikата (β -актин) су одузете од просечних Ct вредности триplikата гена од интереса и на тај начин је добијен ΔCt , док је релативна експресија гена изражена као $2^{-\Delta Ct}$. Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, нетретиране 4T1 малигне ћелије, која је арбитрално подешена на 1.

3.9. Методе за испитивање антитуморске активности DE-EDCP *in vivo*

3.9.1. Експерименталне животиње

Истраживања су спроведена на мишевима женског пола чистог соја BALB/C, као и мишевима оба пола C57BL/6, старости од 8 до 12 недеља. У испитивања су укључене животиње усклађене старости и телесне масе, као и пола, између експерименталних група.

Мишеви су узети из Института за медицинска истраживања Војномедицинске академије (ВМА) у Београду и одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Животиње су чуване према прописаним узгојним условима (храна и вода за пиће *ad libitum*, 12 часовни дневни ритам светла). Спроведено истраживање одобрила је Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-10873 од 22.10.2015. године.

3.9.2 Експериментални модел карцинома дојке

Мишевима соја BALB/C малигне ћелије 4T1 убризгане су субкутано у млечну жлезду у дози од 3×10^4 ћелија у 50 μ l DMEM, а која је оптимизирана у предекспериментима. Непосредно пре инокулације, вијабилност туморских ћелија је одређена помоћу трипан плавог и само ону ћелијску суспензију која садржи више од 95% вијабилних ћелија смо користити за апликацију.

Након палпирања тумора (5. дана експеримента) мишевима је интраперитонеално апликован DE-EDCP, у дози од 10mg/kg који је ресуспендован у 500µl физиолошког раствора (0,9% NaCl), по режиму пет узастопних доза, два дана паузе, а затим је апликован још један циклус од пет појединачних дневних доза. Другој експерименталној групи мишева као референтни цитостатик цисплатина (енгл. *Cisplatin*, *cis-diamminedichloroplatinum*, CDDP; Sigma–Aldrich, Munich, Germany) је интраперитонеално убризгана у дози од 3mg/kg, три пута недељно (укупно девет доза). Трећу експерименталну групу чинили су мишеви који су третирани само физиолошким раствором након појаве палпабилног тумора.

Сви мишеви су жртвовани 36. дана након убризгавања туморских ћелија, а исечци плућа и јетре обојени хематоксилином и еозином.

Одређивање величине примарног тумора

Раст тумора је палпацијом праћен свакодневно тумора, а његова величина одређивана је морфометријски, коришћењем нониуса. Запремина тумора је израчуната према формули (318):

$$V(\text{mm})^3 = (L \times W^2)/2$$

L-највећи пречник; W-најмањи пречник

3.9.3. Модел експерименталних метастаза меланома

За индукцију експерименталних метастаза меланома интравенски су убризгане малигне ћелије меланома (B16-F10) у латералну репну вену C57BL/6 мишева, и то 5×10^4 ћелија у 200µl DMEM. Мишеви су случајним узорковањем подељени у три експерименталне групе. Почевши од другог дана експеримента прва експериментална група мишева била је на DE-EDCP третману. DE-EDCP је примењиван интраперитонеално у дози од 10mg/kg, ресуспендован у 500µl физиолошког раствора, пет узастопних доза. Након паузе од два дана поновљен је циклус од пет доза. Друга експериментална група била је на третману дакарбазином почевши од другог дана експеримента у дози од

70mg/kg, сваког другог дана. Трећу експерименталну групу чинили су мишеви који су третирани само физиолошким раствором.

Четрнаестог дана после убризгавања малигнух ћелија, мишеви су жртвовани а исечци плућа и јетре обојени хематоксилином и еозином.

3.10. Израда патохистолошких препарата

Непосредно након изолације, ткива изолованих органа су фиксирана у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени препарати дебљине 5 μ m. За хистолошку анализу су коришћени ткивни пресеци са пет нивоа на међусобном растојању од 25 μ m (од сваког миша су анализирана по 5 ткивних исечка и то сваки 3. ткивни пресек). Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

3.11. Бојење хематоксилином и еозином

Уследило је бојење криостатских ткивних пресека методом хематоксилин-еозин (енгл. *hematoxylin-eosin*, H&E). На почетку су плочице са ткивним пресецима пуферисане у пуферу формалдехида 10 секунди, онда опране у текућој води а затим потопљене 2 минута у *Mayer*-ов хематоксилин (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Потом су ткивни исечци испирани минут у текућој води и најзад су бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) у трајању од 1. минута. Након бојења уследила је дехидратација исечка како би се у њима уклонила вода. Исечци су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре 1 минут у 85% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања када су исечци потпљени 50 секунди у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На на ткивне исечке нанет је Канада балзам (енгл. *Canada*

balsam, (Centrohem, Србија)) и прекривени су покровним стаклима. Препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Olympus BX51, Јапан) након 24. часовног сушења.

3.12. Верификација броја и величине метастатских колонија

Тридесетишестог дана после убризгавања туморских ћелија BALB/С мишеви, односно четрнаестог дана након убризгавања туморских ћелија С57BL/6 мишеви, су жртвовани, а исечци претходно поменутих ткива су обојени *H&E*. Метастатске колоније су верификоване у плућима и јетри BALB/С мишева. Метастазе су верификоване само у плућима С57BL/6 мишева и то као метастатске колоније са карактеристичном браон-црном пигментацијом и као метастатска "жаришта" са увећаним вишеједарним ћелијама, јасно ограничена од околног плућног ткива.

У овој студији су семиквантитативно одређивани просечан број метастаза по мишу, као и величина метастатских колонија и то одређивањем процента метастатског подручја у плућима или јетри. Процентуална заступљеност метастатских колонија одређивана је употребом *Image J* софтвера (319). Добијени резултати су приказани као средња вредност±стандардна грешка.

3.13. Експресија Ki-67 и STAT3 у туморском ткиву

Експресија Ki-67 и фосфорилисане форме STAT3 у ткиву карцинома дојке испитана је имунохистохемијски, коришћењем анти-Ki-67 анитела (*rabbit anti-mouse Ki-67 antibody* (ab66155, Abcam, Cambridge, United Kingdom)) или анти-STAT3 антитела (*(phospho Y705) antibody* (ab76315, Abcam, Cambridge, United Kingdom)). Ткиво је 24 часа фиксирано у 10%-тном неутралном, пуферизованом формалину и калуљено у парафину. Резови дебљине 4-5µм, су монтирани на високо адхерентне плочице *SuperFrost®* и сушени на температури од 56°C у току 60 минута. Како би се обавила депарафинизација и

рехидратација, као што је раније описано, ткивни пресеци „провлачени“ су кроз серију алкохола опадајућих концентрација. Фиксација ткива у формалину, као и калупљење ткивних узорака у парафину изазивају конфигурацијске промене протеина и формирање интермолекулских веза које маскирају антигене и смањују ефекат имунохистохемијског бојења. Поступком ослобађања, обнавља се примарна конфигурација антигена уклањањем нежељених интермолекулских веза. Демаскирање антигена је обављено у микроталасној пећници (Samsung MG23F301TAS, Seoul, South Korea) у 0,1 М цитратном пуферу (pH 6.0) на 96°C, у трајању од 20 минута. По обављеном „кувању“, плочице са ткивним пресецима су 5 минута испиране дестилованом водом. Како би се блокирао ефекат ендogene пероксидазе и елиминисало неспецифично бојење, плочице су постављене у кивете са 3% раствором водоник-пероксида (H₂O₂), у трајању од 10 минута. Након испирања дестилованом водом, плочице су пласиране у кивете са PBS-ом. Ткивни пресеци су инкубирани са раствором примарног антитета, у трајању од 60 минута. По истеку инкубације, плочице су испиране у PBS-у, а затим је нането секундарно антителио (*Rb-Specific HRP/AEC Detection IHC Kit*; Abcam Cambridge, United Kingdom). После испирања уследило је бојење са Mayer-овим хематоксилином.

Процент ћелија који исказују Ki-67 или фосфолирисану форму STAT3 у свим испитиваним групама одређен у пет случајно одабраних видних поља (на увећању 400X). Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација процента позитивних ћелија (320).

3.14. Евалуација апотозе заснована на детекцији фрагментације ДНК у туморском ткиву

За TUNEL (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) методу коришћени су парафински исечци мишјег карцинома дојке испитиваних група (по четири примарна тумора по групи) дебљине 5µm, којима је урађена депарафинизација и рехидратација ткива. Затим су исечци примарног карцинома потопљени у расхлађени ацетон 8 минута, а након тога испрани 2 пута по 5 минута у PBS. На сваки ткивни исечак је затим нането по 50µL мешавине за TUNEL реакцију (450µL Label solution, 50µL enzyme

solution), a zatim je usledila inkubacija od 60 minuta na 37°C u vlažnoj atmosferi u mraku. Nakon inkubacije preparati su ispirani u PBS. Na tkivne isечке нането је по 50µL POD (енгл. *anti fluorescein antibody, Fab fragment from sheep, conjugated with peroxidase*) конвертера, након чега је уследила инкубација од 30 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку. Затим су препарати испирани у PBS-у, и на сваки препарат је нането 50-100µL DAB (енгл. *3, 3'-diaminobenzidine*) супстрата. Након инкубације од 10 минута на собној температури, уследило је троструко испирање у PBS, бојење хематоксилином и еозиномом и на овако обојене ткивне је нанета по једна кап глицерола, а онда су препарати прекривени покровном љуспицом. Заступљеност туморских ћелија са TUNEL-позитивним једром квантификован је у пет случајно изабраних видних поља (на увељичању 400X), а подаци су сумирани као средња вредност процента позитивних ћелија ± стандардна девијација (четири тумора по групи) (321).

3.15. Изолација ћелија из тумора дојке

Осамнаестог дана након апликације 4T1 ћелијске суспензије густине 3×10^4 у млечну жлезду мишевима свих претходно наведених експерименталних група, BALB/C мишеви су жртвовани цервикалном дислокацијом. Након жртвовања, мишевима је изолован тумор који је затим уситњен маказама и након тога неколико пута испиран са PBS-ом. Уситњени тумори су потом ресуспендовани у 5ml медијума за дигестију који садржи 1mg/ml колагеназе тип I, 1mM EDTA у 10ml RPMI (енгл. *Roswell Park Memorial Institute medium*) коме је додато 2% FBS. Дигестија тумора се одвија у трајању од два сата на 37°C уз мешање на шејкеру. Након дигестије, ћелије су центрифугиране 5 минута на 300g, а након што је супернатант одливен пипетом на талог је додато 10 ml претходно загрејаног трипсина. Након додавања трипсина уследила је инкубација у трајању од 3 минута на 37°C. По истеку инкубације узорци су центрифугирани 10 минута на 300g. Након центрифугирања и одливања супернатанта пипетом на талог је додато 2.5ml претходно припремљене и загрејане дезоксирибонуклеазе I (енгл. *Deoxyribonuclease I, DNase*) (10µg/ml). Након инкубације од 1 минута на 37°C, у епрувете је додато 7ml комплетног медијума и садржај је центрифугиран 10 минута на 300g. Из епрувета је супернатант

одливен пипетом, а потом је додато 5ml комплетног медијума и садржај је пропуштен кроз ћелијско сито. Након што је добијени садржај центрифугиран 10 минута на 300g, ћелије су ресуспендоване у 0.5ml комплетног медијума. На овај начин добијена је суспензија појединачних тумор инфилтришућих леукоцита.

3.16. Анализа популација моноклеарних ћелија тумора помоћу проточне цитометрије

Субпопулација лимфоцита и акцесорских ћелија примарног тумора анализирани су проточном цитометријом 0. и 18. дана од апликације 4T1 туморских ћелија.

3.16.a Обележавање мембранских маркера на ћелијама

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација моноклеарних ћелија изолованих из тумора коришћена су анти-мишја моноклонска антитела (Табела 2). На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD Biosciences) додата је одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација моноклеарних ћелија.

Сва антитела за површинско бојење коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Суспензија тумор-инфилтришућих леукоцита је краткотрајно ворткована и инкубирана 20 минута у мраку на температури од 4°C. По истеку инкубације, ћелије су опране у хладном пуферу (енгл. *Staining Buffer*, BD) и онда су центрифугиране 5 минута на 400g. Након одливања супернатанта талог ћелија је ресуспендован у 250µl пуфера. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру *FACSCalibur* (BD Biosciences) помоћу *CELLQUEST* софтвера (BD). Подаци су анализирани коришћењем *FlowJo* (Tree Star) софтвера.

НАЗИВ	КЛОН	ИЗОТИП	ПРОИЗВОЂАЧ
Alexa Fluor® 488 anti-mouse CD3e	145-2C11	IgG1 κ	BD Pharmingen
PerCP anti-mouse CD49b	HMα2	Armenian Hamster IgG	Biologend
FITC anti-mouse Fas Ligand (CD178)	MFL3	Armenian hamster IgG	eBioscience
PE anti-mouse KLRG1	2F1	IgG	eBioscience
PE anti-mouse CD279	J43	IgG2 κ	BD Pharmingen
PE anti-mouse CD152	UC10-4B9	Armenian hamster IgG	eBioscience
PE anti-mouse CD314 (NKG2D)	C7	IgG	eBioscience

Табела 2. Примарно конјугована моноклонска антитета

3.17. Испитивање потенцијално токсичних ефеката DE-EDCP

Мишеви оба соја, експерименталних и контролних група су жртвовани цервикалном транслокацијом и узета им је крв из трбушне аорте која је центрифугирана 20 минута/12000rpm/4°C. Серум је издвојен за сваког појединачног миша ради одређивања концентрације трансаминаза: аспартат трансаминазе (енгл. *Aspartate transaminase, AST*) и аланин трансаминазе (енгл. *Alanine transaminase, ALT*) као и концентрације уреје и серумског креатинина. Концентрација трансаминаза, уреје и серумског креатинина су одређене помоћу специфичних колориметријских китова: *mouse AST ELISA* кит, *mouse ALT ELISA* кит (Elabscience), *Urea Assay* кит (Abcam) и *Creatinine ELISA* кит (BioSciences).

3.18. Статистичка обрада података

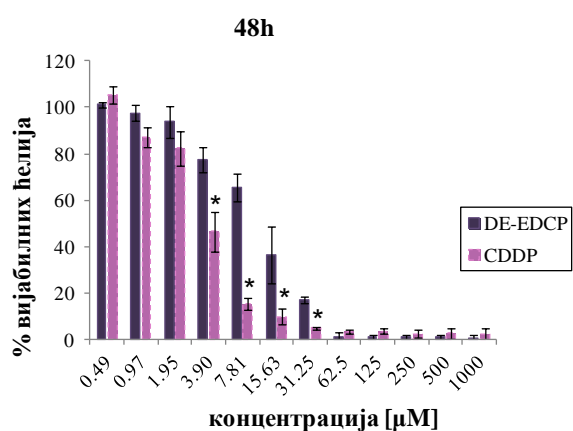
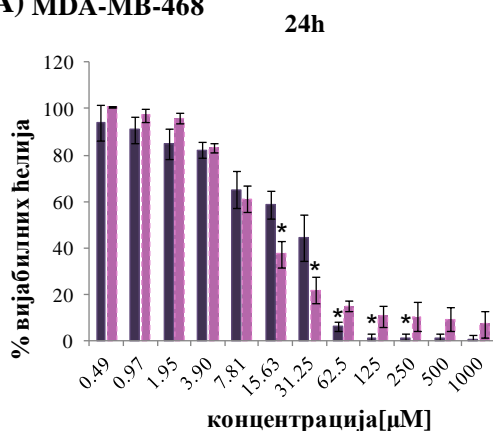
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 20. Пре статистичке обраде података, прво је испитана правилност расподеле добијених вредности коришћењем *Kolmogorov-Smirnov* или *Shapiro-Will* теста. Уколико су вредности имале правилну расподелу коришћен је параметарски *Student's t* тест, док се неправилна расподела поредила помоћу непараметарског *Mann-Whitney* теста. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (SD) или стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

4. Резултати

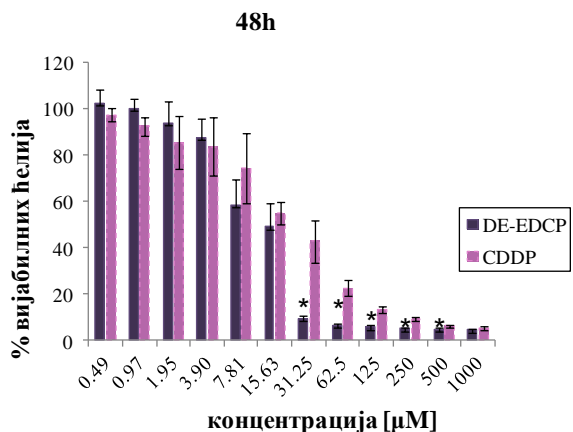
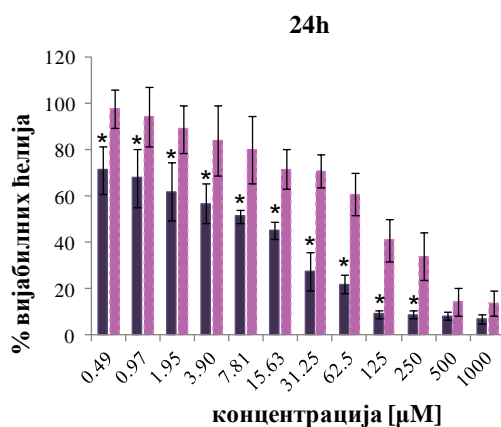
4.1. DE-EDCP је ефикасан у убијању ћелија карцинома дојке и меланома

Са циљем да се испита туморицидни потенцијал DE-EDCP, најпре је МТТ тестом анализирана вијабилност ћелија карцинома дојке хуманог и мишјег порекла, као и ћелија меланома миша након 24. и 48. часовног излагања DE-EDCP у двоструко растућој концентрацији. Како би се упоредила цитотоксичка активност испитиване супстанце као референтно једињење коришћена је цисплатина. Добијени налаз указује да DE-EDCP редукује вијабилност свих тестираних линија туморских ћелија на дозно зависан начин. Примећује се да је туморицидна активност DE-EDCP на варијанти хуманог карцинома дојке MDA-MB-468 значајно мања у односу на цисплатину у ниским концентрацијама од 15.63 μ M и 31.25 μ M (након 24 часа) и 3.90-31.25 μ M (након 48. часа), што се види на Графикону 1А. Међутим, у високим концентрацијама (62.5-1000 μ M), DE-EDCP остварује снажнији туморицидни потенцијал у поређењу са цисплатином након 24. часовног третмана ћелија (Графикон 1А). Када је реч о осетљивости друге варијанте хуманог карцинома дојке MDA-MB-231 након 24. часовног третмана јасно се види да је цитотоксичка активност DE-EDCP на ове ћелије битно већа у односу на цисплатину у опсегу концентрација 0.49-250 μ M. Уз то, уочава се да су MDA-MB-231 ћелије осетљивије на 24. часовни третман са DE-EDCP у односу на туморске ћелије MDA-MB-468. На крају, запажа се да је вијабилност ћелија MDA-MB-231 значајно мања након 48. часовног третмана са DE-EDCP него са цисплатином и то у опсегу концентрација 31.25-500 μ M (Графикон 1Б).

A) MDA-MB-468



Б) MDA-MB-231

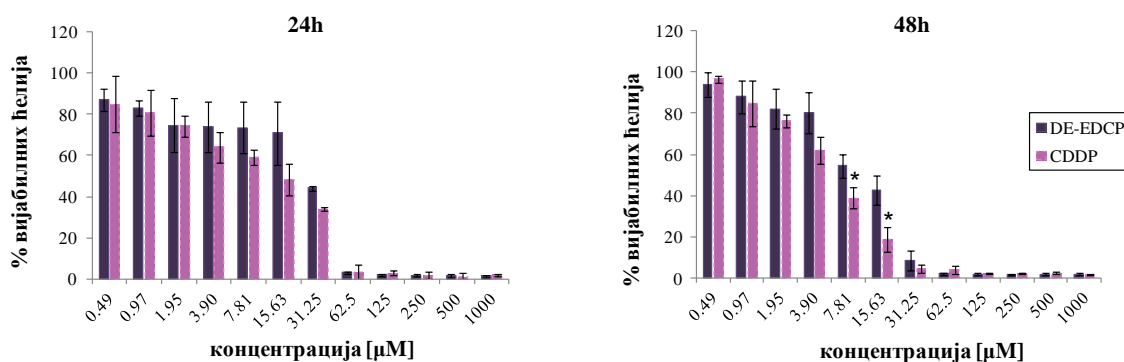


Графикон 1. Цитотоксичка активност DE-EDCP на линијама ћелија хуманог карцинома дојке је дозно зависна. Вијабилност туморских ћелија MDA-MB-468 (A) и MDA-MB-231 (Б) је одређена MTT тестом након 24. и 48. часовне инкубације са DE-EDCP и цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP). Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента \pm стандардна девијација, а сваки од експеримента је одрађен у трипликату. (*Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$)

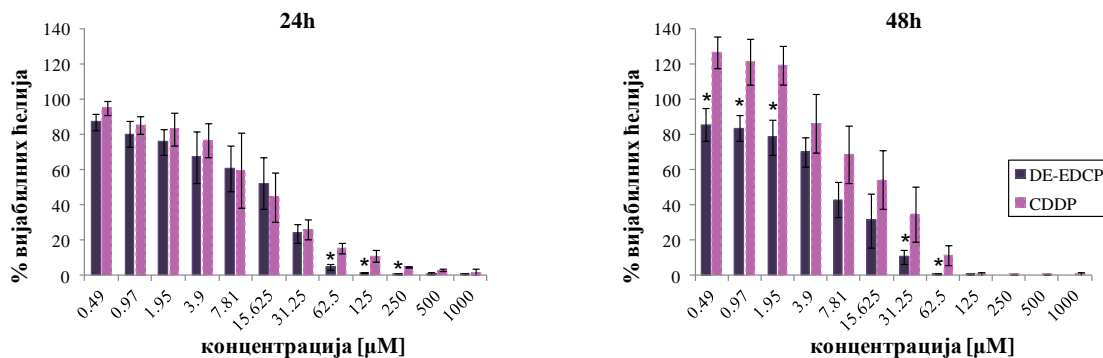
На Графикону 2 приказана је осетљивост ћелија метастатског мишјег карцинома дојке (4T1) и меланома (B16-F10) на токсично дејство DE-EDCP. После 24. часовног третмана туморских ћелија 4T1, цитотоксички ефекат DE-EDCP и цисплатине је готово идентичан у опсегу концентрација 62.5-1000µM, и штавише овакав ефекат је остварен и у нижим концентрацијама (0.49-3.9µM) (Графикон 2A). Продужавањем времена третмана на 48 часова уочава се да DE-EDCP редукује вијабилност 4T1 ћелија приближно исто као цисплатина, изузев у концентрацији од 7.8µM и 15.63µM када је цитотоксичко дејство DE-EDCP на ћелије слабије у односу на цисплатину (Графикон 2A). Када се пореди

вијабилност ћелија V16-F10 варијанте меланома након 24. часовног третмана јасно се види да је цитотоксичност DE-EDCP приближно слична цисплатини у нижим концентрацијама, док је у нешто вишим концентрацијама (62.5µM-250µM) туморицидни потенцијал DE-EDCP значајно снажнији у односу на цисплатину (Графикон 2Б). Међутим, после 48. часовног третмана ћелија, DE-EDCP показује бољи цитотоксички капацитет у односу на цисплатину у опсегу концентрација (0.49-62.5µM), док је у концентрацији од 125µM и више забележена апсолутна смртност туморских ћелија.

А) 4Т1



Б) V16-F10



Графикон 2. Цитотоксички потенцијал DE-EDCP на линији ћелија мишјег карцинома дојке и меланома. Вијабилност туморских ћелија 4Т1 (А) и V16-F10 (Б) је одређена МТТ тестом после 24. и 48. часовне инкубације са DE-EDCP и цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP). Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента ± стандардна девијација, а сваки од експеримента је одрађен у трипликату (*Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$).

Затим је одређена вредност IC₅₀ (концентрација супстанце (µM) која инхибира преживљавање циљаних ћелија за 50%) након 24. и 48. часовног деловања DE-EDCP и цисплатине на панел линија туморских ћелија коришћених у овој студији (Табела 3). У

случају третираних туморских ћелија 4T1, B16-F10 и MDA-MB-468 запажа се да су IC_{50} вредности за DE-EDCP и за цисплатину биле приближно једнаке и да се са продужавањем третмана (након 48 часова) вредност IC_{50} за DE-EDCP се мање-више не мења (Табела 3). Ако се пак пореди ефекат испитиване супстанце на MDA-MB-231 ћелијама након 24 часа, забележена IC_{50} DE-EDCP је била чак 12 пута мања од IC_{50} цисплатине што указује да је ова линија карцијома дојке хуманог порекла сензитивнија на 24. часовно дејство DE-EDCP у поређењу са референтним хемиотерапеутиком. Међутим, продужавањем времена третмана (након 48 часова) ова драстична разлика у антитуморском ефекту се губи и осетљивост туморских ћелија MDA-MB-231 на DE-EDCP се смањује и постаје приближно иста као на цисплатину.

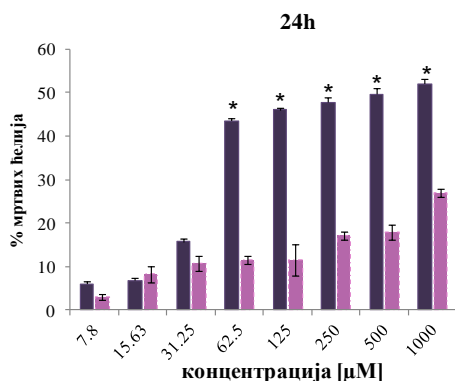
$IC_{50} \pm SD$ (μM)			
Линија туморских ћелија		Једињење	
		DE-EDCP	CDDP
MDA-MB-468	24 h	16.52±2.78	16.68±1.83
	48 h	15.58±2.94	5.01±1.03
MDA-MB-231	24 h	5.14±0.63	66.01±0.69
	48 h	17.45±3.33	20.71±0.32
4T1	24 h	12.90±0.75	10.59±0.36
	48 h	12.03±2.86	7.97±0.56
B16-F10	24 h	9.94±5.18	13.38±5.82
	48 h	6.83±1.89	16.91±8.04

Табела 3. Концентрације DE-EDCP и цисплатине (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) које инхибирају преживљавање различитих циљаних ћелија за 50% након 24. и 48. часовне инкубације. Вредности IC_{50} су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација.

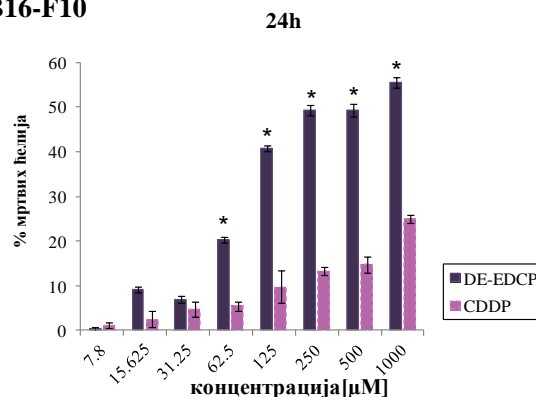
У наредним експериментима је додатно потврђена дозно зависна цитотоксичка активност DE-EDCP на 4T1 и B16-F10 ћелијама помоћу LDH теста. LDH тест се заснива на мерењу активности цитоплазматског ензима лактат дехидрогеназе који се ослобађа из ћелија у супернатант само када је интегритет ћелијске мембране нарушен. Као што се види на Графикону 3А под утицајем DE-EDCP у опсегу концентрације од 62.5 до 1000 μ М, после 24 часа забележен је драстичан пораст са 15.67% на 52.02% мртвих 4T1 ћелија које су ослободиле LDH након 24. часовног третмана ћелија. С друге стране, излагање туморских ћелија цисплатином у истом опсегу концентрација резултовао је мањим порастом процента мртвих ћелија, са 10.73% на 26.89%, у односу на испитивано једињење. Слично резултатима добијеним МТТ тестом, анализа цитототоксичког капацитета DE-EDCP помоћу LDH теста имплицира да је B16-F10 варијанта меланома релативно осетљивија на DE-EDCP у поређењу са 4T1 ћелијама карцинома дојке. Резултати јасно показују да DE-EDCP у концентрацији почев од 31.25 до 1000 μ М индукује битно већи пораст са 6.95% на 55.53% мртвих ћелија, док је третман цисплатином у истим концентрацијама резултовао мањим порастом процента мртвих ћелија B16-F10 (са 4.87% на 24.9%) у односу на DE-EDCP Графикону 3Б.

Познато је да ћелије са дезинтегрисаном ћелијском мембраном улазе у некрозу и/или у касну фазу апоптозе и да се углавном детектују помоћу LDH теста, док се МТТ тестом региструју промене у активности митохондријалних ензима што се дешава рано у процесу апоптозе. У складу са тим, на основу налаза значајне туморицидне активности испитиваног једињења добијеног помоћу МТТ и LDH теста може се констатовати да DE-EDCP највероватније узрокује како апоптотску тако и неапоптотску/некротску смрт 4T1 и B16-F10 малигних ћелија.

A) 4T1



Б) В16-Ф10



Графикон 3. DE-EDCP повећава проценат мртвих ћелија мишијег карцинома дојке и меланома на дозно зависан начин. А) Резултати LDH теста након култивације 4T1 туморских ћелија у присуству DE-EDCP и дисплатине (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у временском периоду од 24 часа Б) Резултати LDH теста након култивације B16-F10 туморских ћелија у присуству DE-EDCP и дисплатине (CDDP) у временском периоду од 24 часа. Сви резултати су приказани као средња вредност 3 поновљена експеримента, а сваки од експеримента је рађен у трипликату. (*Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$)

4.2. Антитуморска активност DE-EDCP у моделу мишијег карцинома дојке и меланома

Након што је показано да DE-EDCP поседује изражен цитотоксички капацитет на малигним ћелијама 4T1 и B16-F10, следећи корак у истраживању је био да се испита да ли и у којој мери DE-EDCP утиче на прогресију карцинома дојке и меланома миша.

4.2.1. DE-EDCP редукује раст и метастазирање карцинома дојке

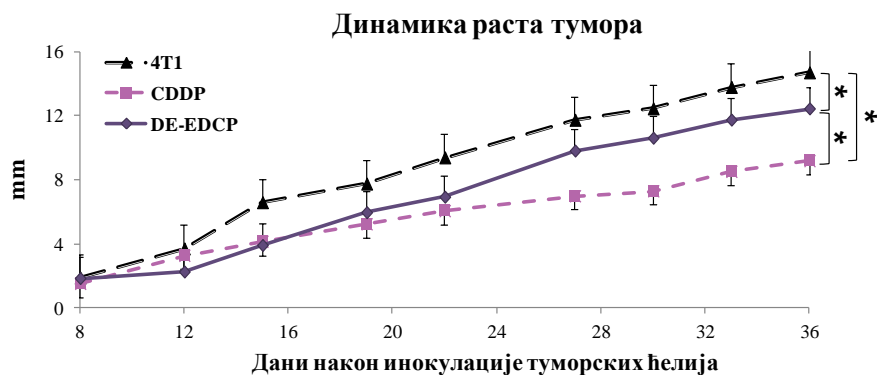
Мишевима чистог соја BALB/C имплатиран је карцином дојке тако што је 3×10^4 4T1 ћелија инокулисано ортотопски у млечну жлезду. Палпабилни тумор код свих мишева регистрован је 5. дана након убризгавања малигнућих ћелија, када је једна група мишева подвргнута краткотрајном третману DE-EDCP (у трајању од 12 дана) на следећи начин: испитивано једињење је интраперитонеално апликовано у дози од 10mg/kg телесне масе узастопно 5 дана, након чега су уследила 2 дана паузе, а затим у наредних 5 дана је уследио други терапијски циклус. Друга група мишева је третирана дисплатином који је

део стандардних терапијских протокола за лечење солидних тумора, укључујући и карцином дојке, и то у дози од 3mg/kg телесне масе, 3 пута недељно (укупно 9 доза). Следећу групу су чинили мишеви са карциномом дојке који нису потврднути фармаколошком третману.

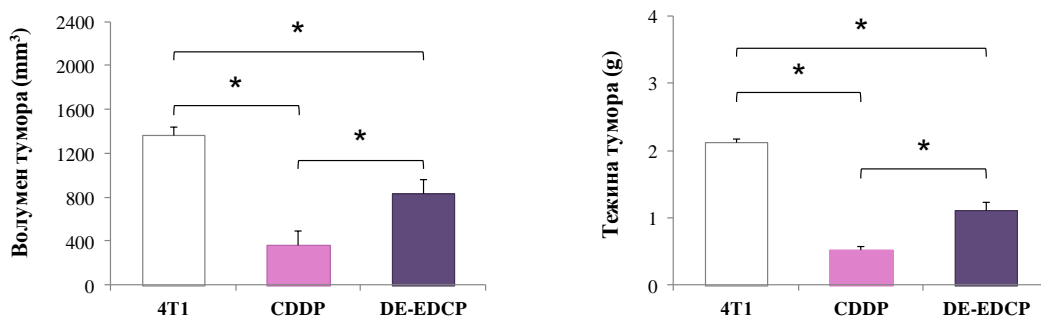
На Гарфикону 4А приказана је динамика раста карцинома дојке током 36 дана од убризгавања туморских ћелија и уочава се да је код мишева који су третирани DE-EDCP средња вредност пречника тумора значајно мања него у групи нетретираних мишева. Ако се пореде ефекти деловања испитиване супстанце и цисплатине као стандардног цитостатика, запажа се да до 22. дана након убризгавања туморских ћелија DE-EDCP је имао сличан ефекат на раст карцинома дојке као и цисплатина. Од тог дана и поред бољег ефекта цисплатине, јасно се уочава да се претходно забележена разлика у дијаметру тумора одржава све до краја експеримента између групе мишева третираних са DE-EDCP и нетретираних мишева.

Сви мишеви су жртвовани 36. дана након апликације 4Т1 ћелија када су измерени укупан волумен и тежина тумора. Региструје се статистички значајно смањење волумена и тежине тумора у мишева третираних DE-EDCP у односу на нетретирану групу (Графикон 4Б). Уз то, резултати показују и да је цисплатина била најефикаснија у редукцији волумена и тежине тумора.

А)



Б)

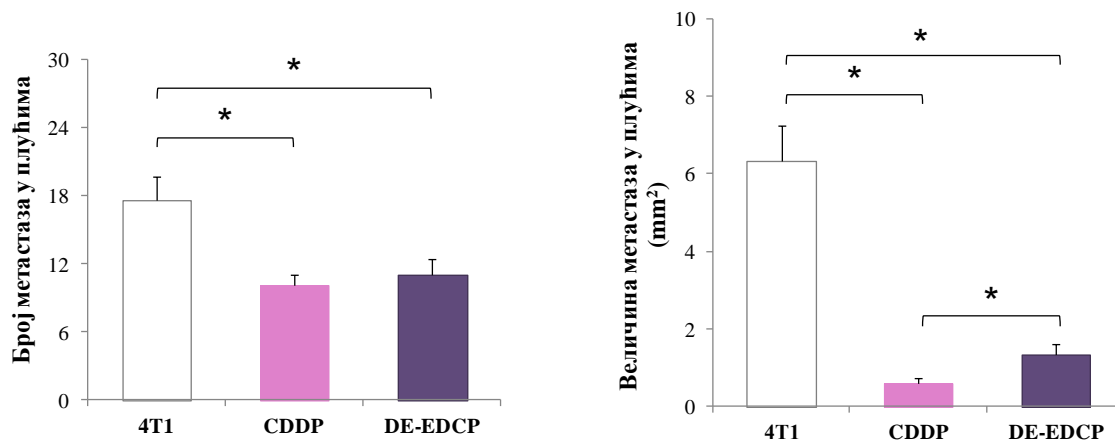


Графикон 4. DE-EDCP успорава раст карцинома дојке. А) Динамика раста карцинома дојке у мишева третираних са DE-EDCP, цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) и фармаколошки нетретираних мишева. Б) Волумен и тежина карцинома дојке у мишева третираних са DE-EDCP, цисплатином (CDDP) и фармаколошки нетретираних мишева (8 мишева по групи, *Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$)

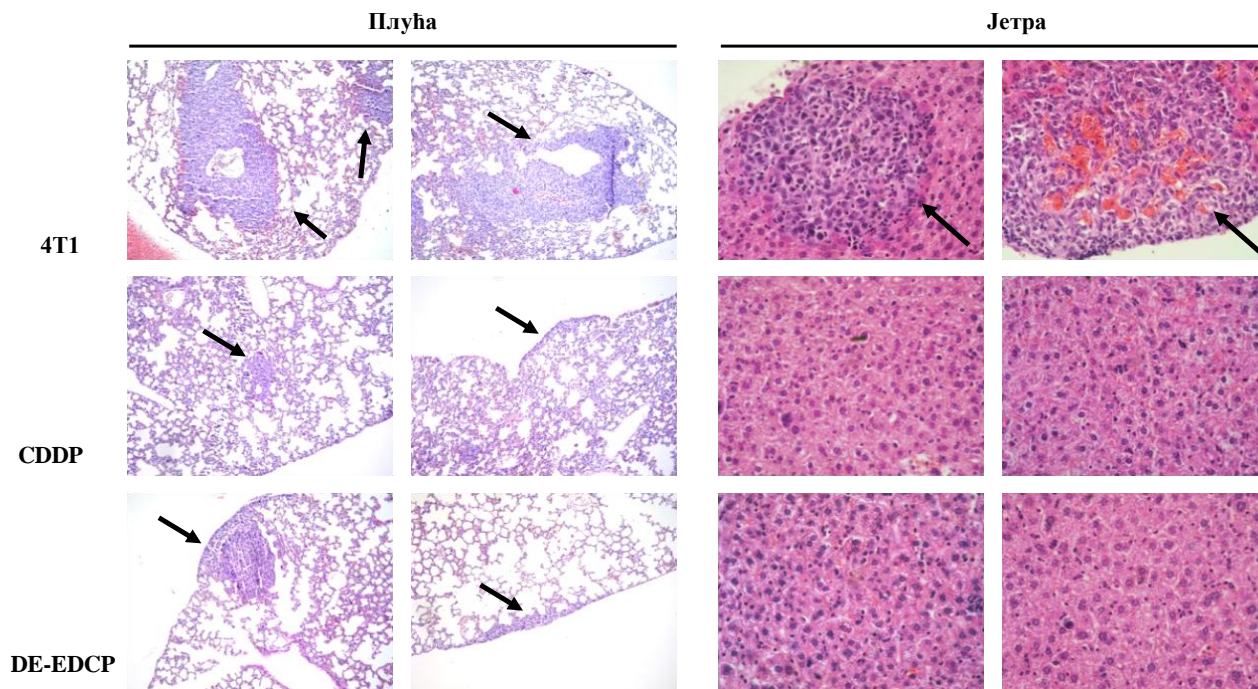
У циљу верификације метастаза анализирани су исечци ткива плућа и јетре који су обојени хематоксилином и еозином. Тридесетишестог дана експеримента, у свим испитиваним групама мишева, регистрована су спонтано успостављена метастатска жаришта у плућима. Међутим, број метастаза у мишева третираних са DE-EDCP је био око 1.6 пута, односно 1.7 пута мањи у групи мишева третираних са цисплатином, у односу на нетретирану групу што се види на Графикону 5. Није забележена статистички значајна разлика у броју метастатских колонија у плућима мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином. Даља анализа величине метастатских жаришта указала је да DE-EDCP значајно редукује величину метастаза у плућима (Графикон 5). Другим речима, у плућима мишева третираних DE-EDCP величина метастатских колонија је око 4.8 пута мања у поређењу са метастазама нетретираних мишева. С друге стране, у групи мишева

третираних цисплатином величина метастаза је 10.55 пута мања него у нетретираној групи. Иако цисплатина значајно не утиче на број метастаза у поређењу DE-EDCP, примећује се је да овај цитостатик ефикаснији у редукцији величине метастатских колонија у плућима.

Када је реч о појави метастаза у јетри, рефрактерност на успостављање метастатских жаришта је битно израженија у групи мишева третираних како са DE-EDCP тако и са цисплатином. Другим речима, у групи мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином нису регистроване метастатске колоније, док су у чак 42% (3/7) нетретираних мишева детектоване метастазе у јетри (Слика 6).



Графикон 5. DE-EDCP редукује број и величину метастатских колонија карцинома дојке у плућима. Број и величина спонтано развијених метастатских колонија карцинома дојке у плућима мишева третираних DE-EDCP, цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) и фармаколошки нетретираних мишева (8 мишева по групи, *Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$)



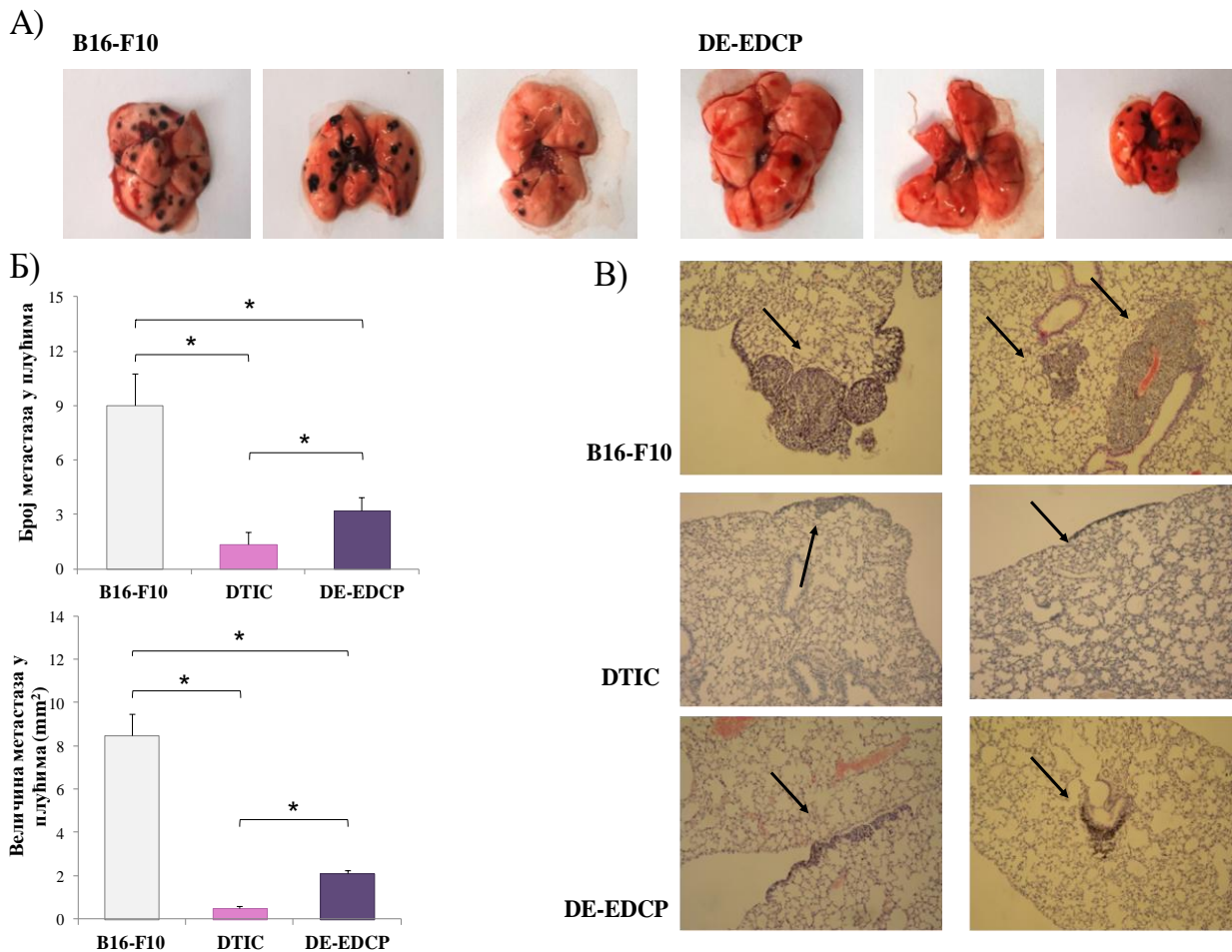
Слика 6. DE-EDCP омета спонтани развој метастатских колонија у плућима и јетри. Представљени су репрезентативни хистолошки исечци ткива плућа и јетре нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева (оригинално увећање 100X и 400X).

4.2.2. DE-EDCP редукује метастазирање меланома у плућа

Следећи корак је био да се утврди да ли DE-EDCP утиче и на успостављање хематогених метастаза меланома. У ту сврху, 5×10^4 туморских ћелија B16-F10 је убризгано у латералну репну вену сингених мишева соја C57BL/6. Другог дана након апликације малигних меланоцита мишеви су методом случајног избора подељени у три групе. Једну групу су чинили мишеви третирани DE-EDCP на исти начин као што је претходно описано. У другој групи мишеви су подвргнути третману референтним цитостатиком у лечењу меланома односно дакарбазином у дози од 70mg/kg телесне масе, сваког другог дана (укупно 5 доза). Следећу групу су представљали нетретирани мишеви са меланомом.

Мишеви су жртвовани 14. дана након апликације B16-F10 туморских ћелија када је и утврђивано постојање, број и величина хематогених метастаза. Као што се види на Графикону 6А, у плућима мишева који су подвргнути третману DE-EDCP регистровано је мање видљивих метастатских жаришта карактеристичне браон-црне пигментације него у

плућима нетретираних мишева. Такође, утврђено је да су се код свих нетретираних мишева развиле хематогене метастазе у плућима, док је инциденца метастазирања меланома у групи мишева третираних DE-EDCP износила 76.92% (10/13), односно 53.84% (7/13) у групи мишева третираних дакарбазином. Мада је референтни цитостатик остварио бољи антимастијатски ефекат, на Графикону 6Б и 6В се јасно види да су број и величина метастаза били значајно мањи у групи третираној са DE-EDCP у поређењу са нетретираним мишевима.



Графикон 6. DE-EDCP значајно редукује број и величину метастаза меланома у плућима. А) Макроскопски приказ плућа испитиваних група мишева 14. дана од апликације ћелија B16-F10 варијанте меланома; **Б)** Број и величина метастатских колонија у плућима мишева третираних DE-EDCP, дакарбазином (енгл. *Dacarbazine*, DTIC) и фармаколошки нетретираних мишева (13 мишева по групи, *Mann–Whitney U* тест; $*p < 0.05$); **В)** Репрезентативни хистолошки исечци ткива плућа нетретираних и различито фармаколошки третираних мишева (оригинално увећање 100X).

На крају, поред плућа изолована је јетра и патохистолошком анализом ткивних исечака је утврђено да је у свим испитиваним групама изостала колонизација метастатских меланоцита у овом органу.

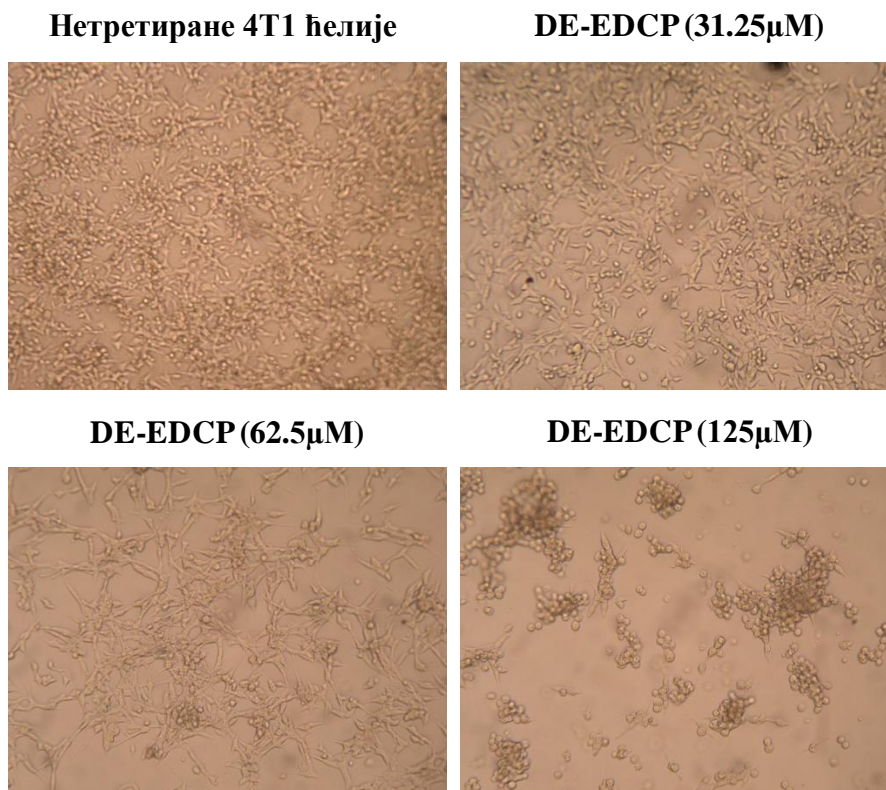
На основу свих добијених налаза може се закључити да је код мишева који су третирани DE-EDCP значајно успорен како раст тако и метастазирање тумора.

4.3. Утицај DE-EDCP на апоптозу туморских ћелија

Следећи циљ ове студије је био да се дефинишу механизми укључени у инхибицију прогресије тумора под утицајем DE-EDCP. Да би се утврдило на који начин испитивано једињење остварује антитуморску активност сви наредни експерименти спроведени су на 4T1 малигним ћелијама. Најпре је анализиран утицај DE-EDCP на индукцију апоптозе, као и на експресију кључних молекула који регулишу овај процес.

4.3.1. DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу

Под инвертним светлосним микроскопом прво је регистровано да је DE-EDCP изазвао значајне морфолошке промене у 4T1 ћелијама, нарочито у већим концентрацијама (62.5 μ M и 125 μ M) што се види на Слици 7. За разлику од нетретираних туморских ћелија које су имале типичан облик и формирале конфлуентна огњишта, ћелије третиране са DE-EDCP су биле упадљиво мање густине и са измењеном морфологијом, односно заокругљене и неадхерентне. Уз то, јасно се уочава да је овакав ефекат DE-EDCP на туморске ћелије дозно зависан. Добијени налаз морфолошких промена у туморским ћелијама које су последица деловања DE-EDCP је подстакао да се детаљније дефинише тип ћелијске смрти.



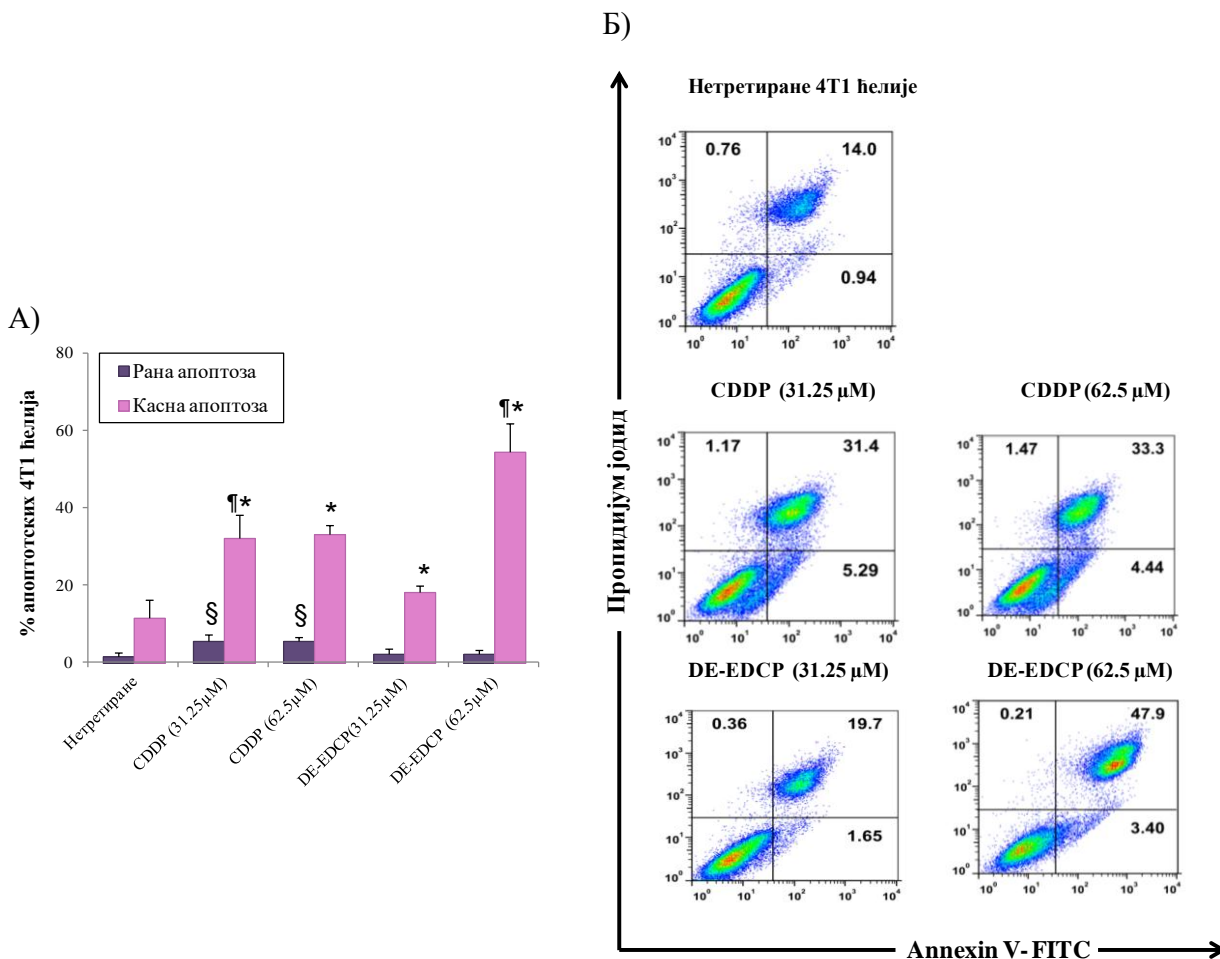
Слика 7. Туморске 4T1 ћелије изложене DE-EDCP подлежу морфолошким променама. Туморске ћелије мишјег карцинома дојке које су 24 часа изложене DE-EDCP у двоструко растућим концентрацијама се морфолошки разликују у односу на нетретиране ћелије. Промене у ћелијској морфологији су посматране под инвертним микроскопом.

С обзиром на чињеницу да је индукција апоптозе у туморским ћелијама најчешћи механизам деловања за већину лекова примењивих у терапији малигнома, било је од интереса да се детерминише способност DE-EDCP у индукцији апоптозе. У ту сврху, туморске ћелије су 24 сата изложене DE-EDCP или цисплатини у концентрацији од 31.25 μ M и 62.5 μ M. Обележавањем овако третираних ћелија уз помоћ анексина V конјугованог флуоресцентном бојом и пропидијум јодида, анализирана је њихова процентуална заступљеност у различитим фазама апоптозе.

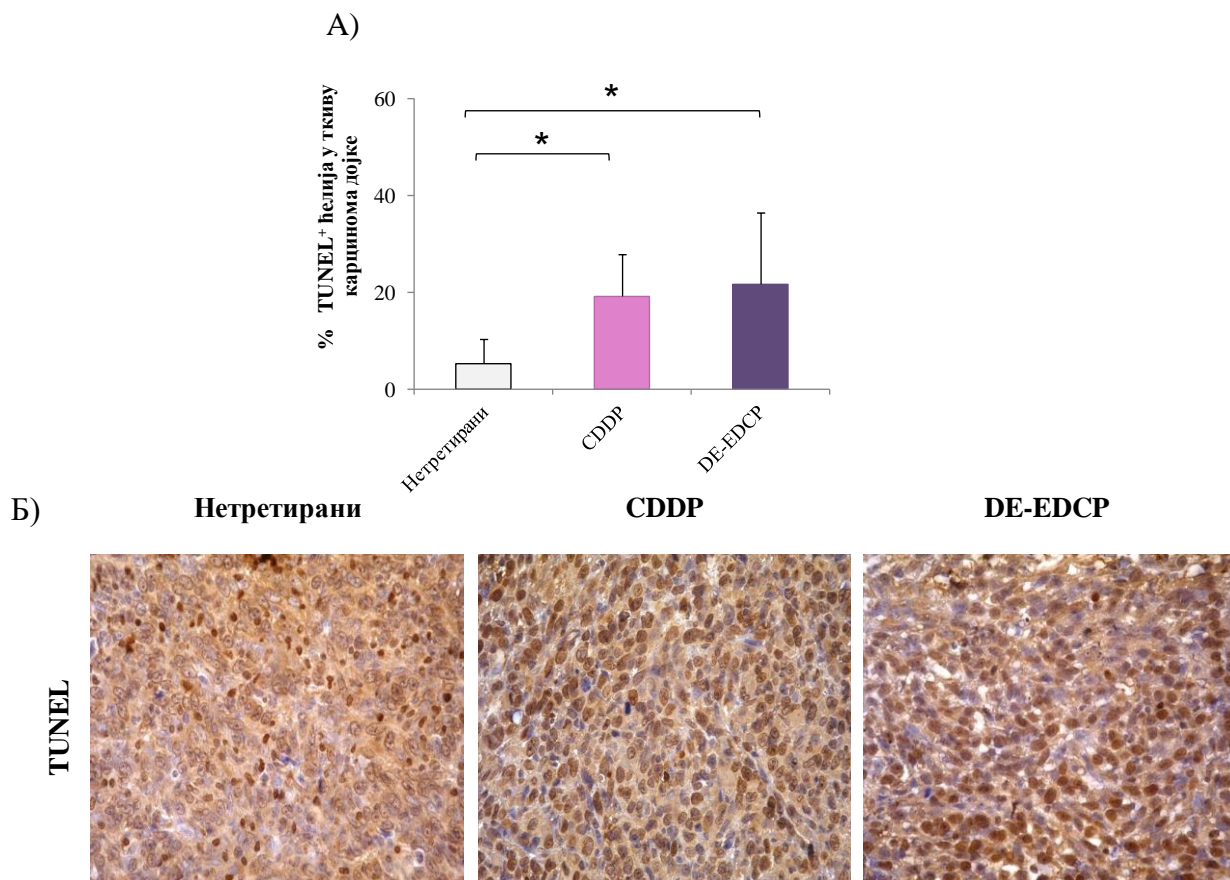
Резултати јасно показују да DE-EDCP, као и цисплатина, индукује значајно повећање процента апоптотских ћелија и то у касној фази апоптозе у односу на нетретиране ћелије (Графикон 7). С друге стране, највећи проценат ћелија у раној апоптози детектован је након њиховог излагања цисплатини. Региструје се да је у нижој концентрацији (31.25 μ M) цисплатина ефикаснија у индукцији касне апоптозе у поређењу

са DE-EDCP. Међутим, највећи проценат ћелија у касној апоптози забележен је управо након њиховог излагања DE-EDCP у вишој концентрацији од 62.5 μ M. Другим речима, DE-EDCP је у концентрацији од 62.5 μ M индуковао пораст процента касно апоптотских 4T1 ћелија који је био приближно двоструко већи у односу на ћелије изложене цисплатини у истој концентрацији (Графикон 7).

Проапоптотски капацитет DE-EDCP је потврђен и TUNEL методом којом је детектована фрагментација ДНК изазвана апоптозом у самој туморској потки карцинома дојке. При томе је коришћен семиквантитативни скор систем базиран на проценту малигних ћелија са јасно обојеним браон једром (означене као TUNEL⁺ ћелије). У складу са претходним налазом, уочен је битан пораст процента апоптотских малигних ћелија у ткиву карцинома дојке мишева третираних DE-EDCP, као и цисплатином, а који је био чак 4 пута већи у поређењу са нетретираном групом. Добијени резултати су приказани и илустровани на Графикону 8А и Б.



Графикон 7. DE-EDCP изазива апоптотску смрт ћелија карцинома дојке миша (4Т1). А) Проточном цитометријом је анализирана заступљеност 4Т1 ћелија у различитим фазама апоптозе. Након што су 4Т1 ћелије 24 часа третирани са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) (у концентрацији од 31.25µM и 62.25µM) детектован је поцентат ћелија у раној и касној фази апоптозе помоћу *Annexin*-а V и пропидијум јодида. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; $p < 0.05$ *нетретирани vs. DE-EDCP или CDDP третирани 4Т1 ћелије; [¶]DE-EDCP vs. CDDP третирани ћелије; [§]CDDP vs. нетретирани или DE-EDCP третирани ћелије); Б) Репрезентативни дот плотови 4Т1 туморских ћелија после 24. часовног излагања DE-EDCP или цисплатини (CDDP) у концентрацији од 31.25µM и 62.5µM. Туморске ћелије су обележене *Annexin*-ом V (Ann V) и пропидијум јодидом (енгл. Propidium iodide, PI) (Ann V⁺ PI⁻ туморске ћелије су у раној фази апоптозе, Ann V⁺ PI⁺ ћелије су у касној фази апоптозе, Ann V⁻ PI⁺ су некротске ћелије).



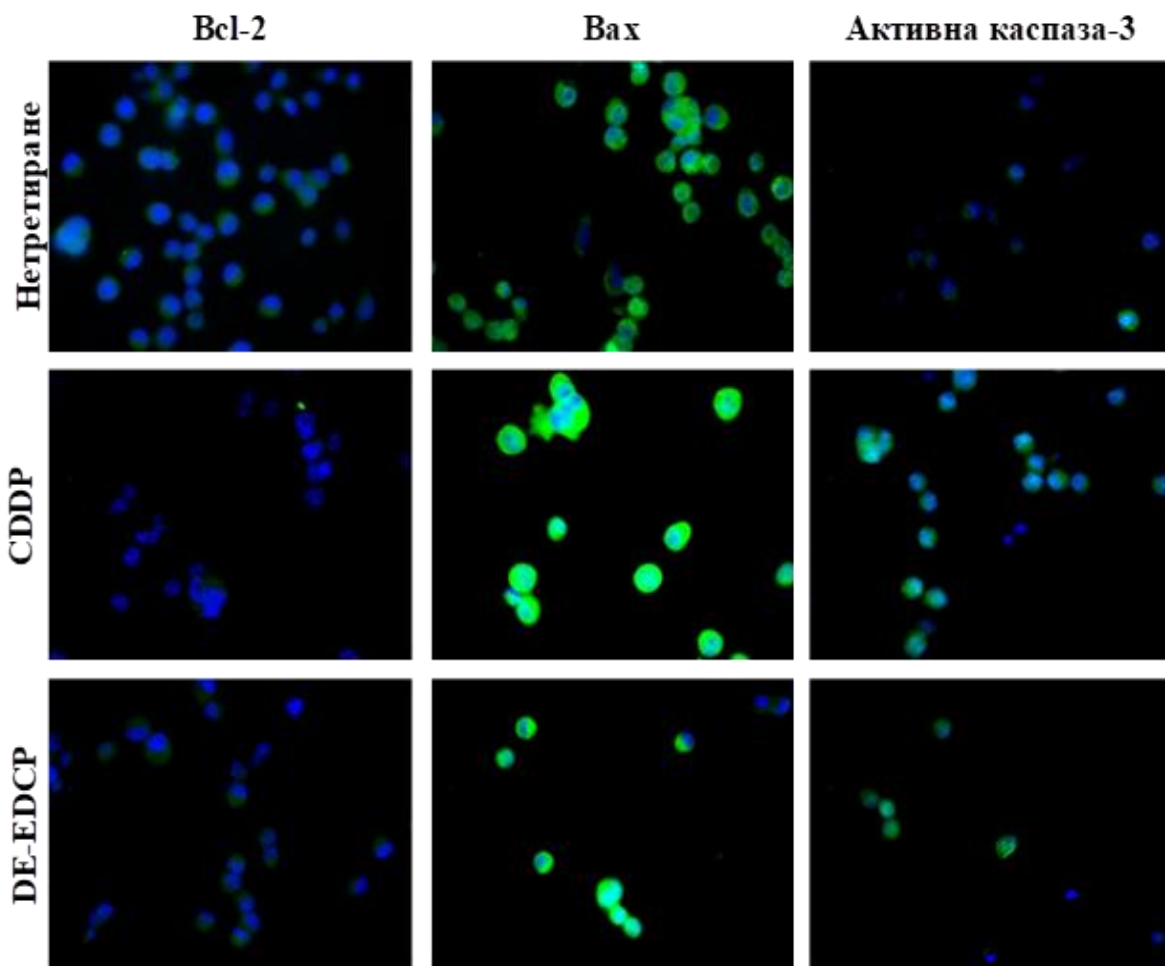
Графикон 8. DE-EDCP фаворизује апоптозу туморских ћелија. А) Након жртвовања мишева 36. дана од убризгавања 4Т1 малигнућ ћелија детектована је фрагментација ДНК туморских ћелија изазвана апоптозом у карциному дојке помоћу TUNEL методе. Одређен је проценат TUNEL-позитивних ћелија у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$); Б) Репрезентативни исечци ткива тумора у којима се уочавају TUNEL-позитивне ћелије при чему су узете у обзир само ћелије чија су једра јасно браон обојена (оригинално увеличање 400X).

4.3.2. У туморским ћелијама DE-EDCP смањује експресију Bcl-2 и истовремено повећава експресију Вах и каспазе-3

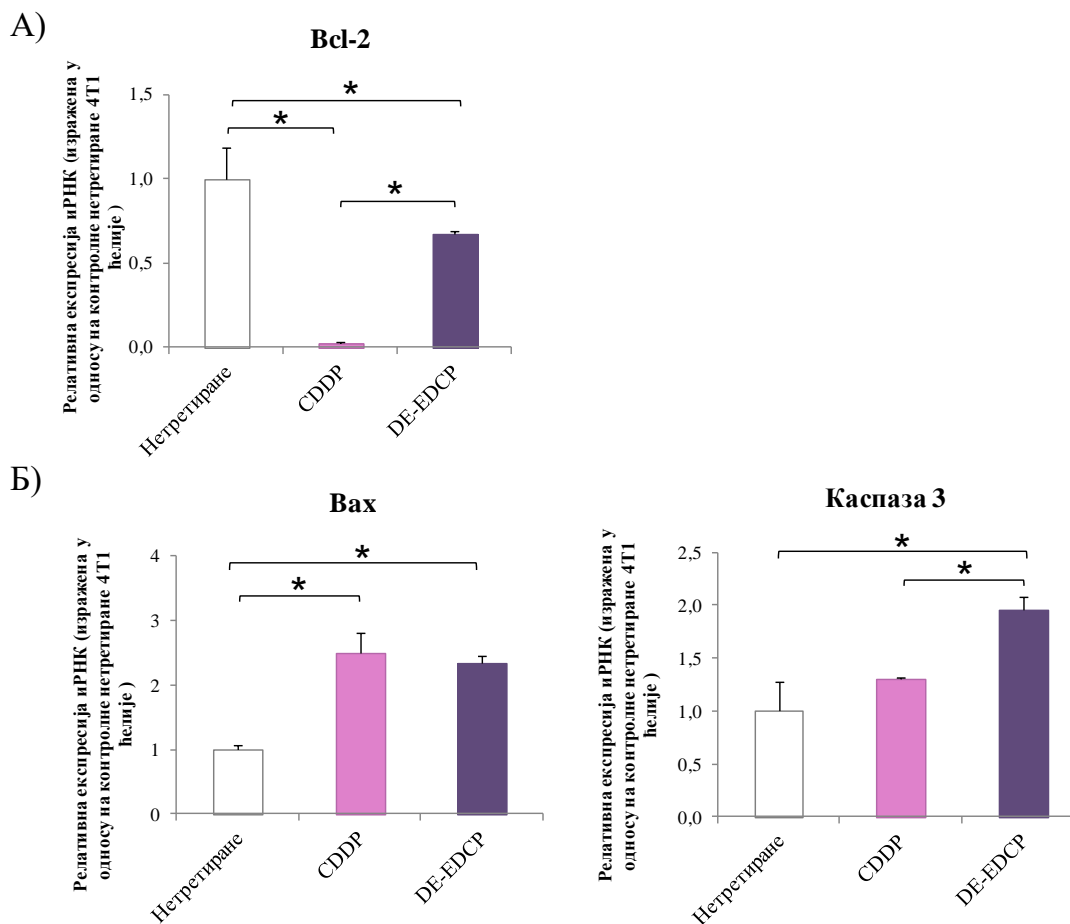
У циљу ближег дефинисања механизма апоптозе тертираних туморских ћелија, анализиран је утицај DE-EDCP на експресију кључних молекула који регулишу процес апоптозе, као што су Bcl-2, Вах и активна форма каспазе-3.

Најпре је методом имунофлуоресценције регистрована умерено смањена експресија антиапоптотског протеина Bcl-2 у туморским ћелијама 4T1 које су 24 часа изложене дејству DE-EDCP у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 8), док је најнижа експресија овог протеина забележена у ћелијама третираним цисплатином. Супротно, када је посматрана експресија проапоптотског Вах молекула и активне форме ефекторске каспазе-3, јасно се види да је експресија ових молекула у туморским ћелијама битно виша након излагања DE-EDCP или цисплатини у односу на нетретиране 4T1 ћелије.

Квантитативна анализа експресије информационе РНК (иРНК) за Bcl-2, Вах и каспазу-3 помоћу RT-PCR методе је у складу са претходним налазом експресије ових молекула на нивоу протеина. На Графикону 9 се јасно види да је третман са DE-EDCP, као и са цисплатином, узроковао значајно повећање експресије иРНК за Вах у 4T1 ћелијама у односу на нетретиране ћелије. Додатно значајни пораст експресије иРНК за каспазу-3 је забележен након примене DE-EDCP, али не и цисплатине, у поређењу са нетретираним малигним ћелијама. Примећује се и да је експресија иРНК за каспазу-3 била виша у ћелијама након третмана са DE-EDCP него после третмана са цисплатином. С друге стране, експресија иРНК за Bcl-2 је битно смањена под утицајем DE-EDCP, а нарочито под утицајем цисплатине (Графикон 9А).



Слика 8. Анализа експресије про- и анти-апоптоских протеина у туморским ћелијама 4Т1 методом имунофлуоресценције. У туморским ћелијама након 24. часовног третмана са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 μ М, анализирана је експресија Bcl-2, Bax и активне форме каспазе-3 коришћењем специфичних антитела обележених флуоресцентном бојом (зелено) док су једра обележена помоћу DAPI (плаво) (оригинално увећање 200X).



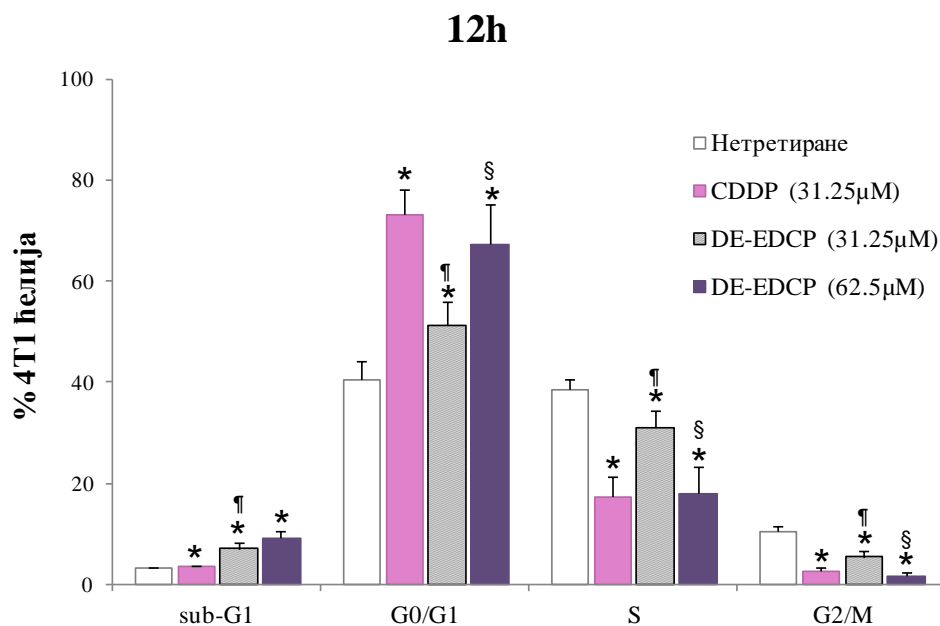
Графикон 9. DE-EDCP мења експресију информационе РНК за синтезу про- и анти-апоптотских молекула у туморским ћелијама 4Т1. А) Експресија иРНК за Bcl-2 је значајно смањена у 4Т1 ћелијама након излагања DE-EDCP; Б) Третман са DE-EDCP значајно повећава експресију иРНК за Вах и каспазу-3 у туморским ћелијама. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm стандардна девијација и изражени у односу на контролу (нетретирание 4Т1 ћелије) која је арбитрално сведена на јединичну вредност. (*Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$).

4.4. DE-EDCP инхибира пролиферацију туморских ћелија

Непланска пролиферација је једна од главних одлика малигнух ћелија, тако да је заустављање ћелијског циклуса још једна важна стратегија у борби против тумора. Након што је утврђен проапоптотски потенцијал DE-EDCP, у наредним експериментима испитан је и његов утицај на прогресију ћелијског циклуса у туморским ћелијама.

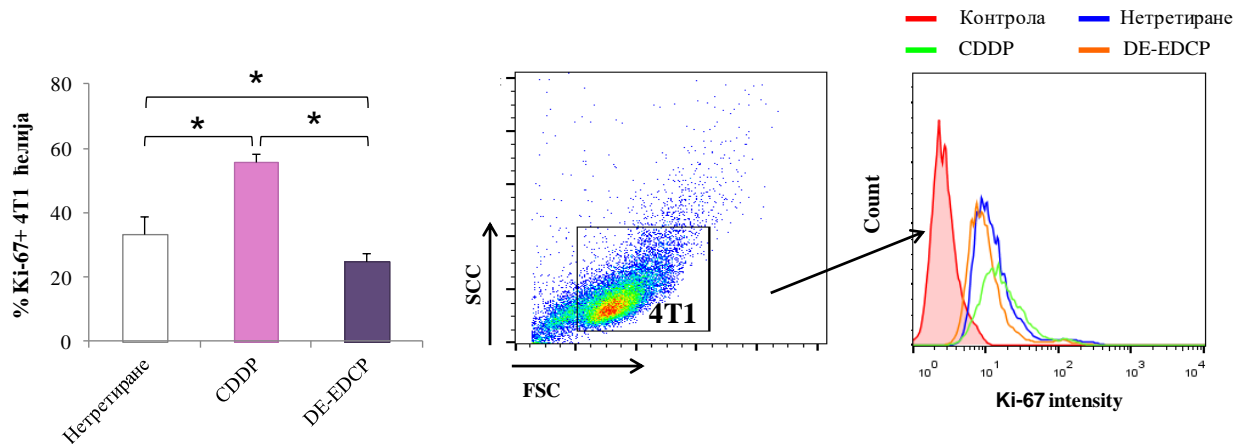
4.4.1. У туморским ћелијама DE-EDCP индукује застој у G0/G1 фази ћелијског циклуса

Проточном цитометријом детерминисан је профил ћелијског циклуса односно анализирана је процентуална заступљеност малигних ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса након њиховог 12. часовног излагања DE-EDCP у концентрацији од 31.25 μ M и 62.5 μ M, и цисплатини у концентрацији од 31.25 μ M. Слично цисплатини, третман са DE-EDCP нарочито у вишој концентрацији индукује значајну акумулацију 4T1 ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса у односу на нетретиране ћелије (Графикон 10). Уз то, забележено је значајно смањење процента ћелија у S и у G2/M фази након оба фармаколошка третмана. С друге стране, уочава се и да је третман са DE-EDCP у обе концентрације индуковао битан пораст процента ћелија у суб-G1 фази, а која представља фракцију апоптотских ћелија.



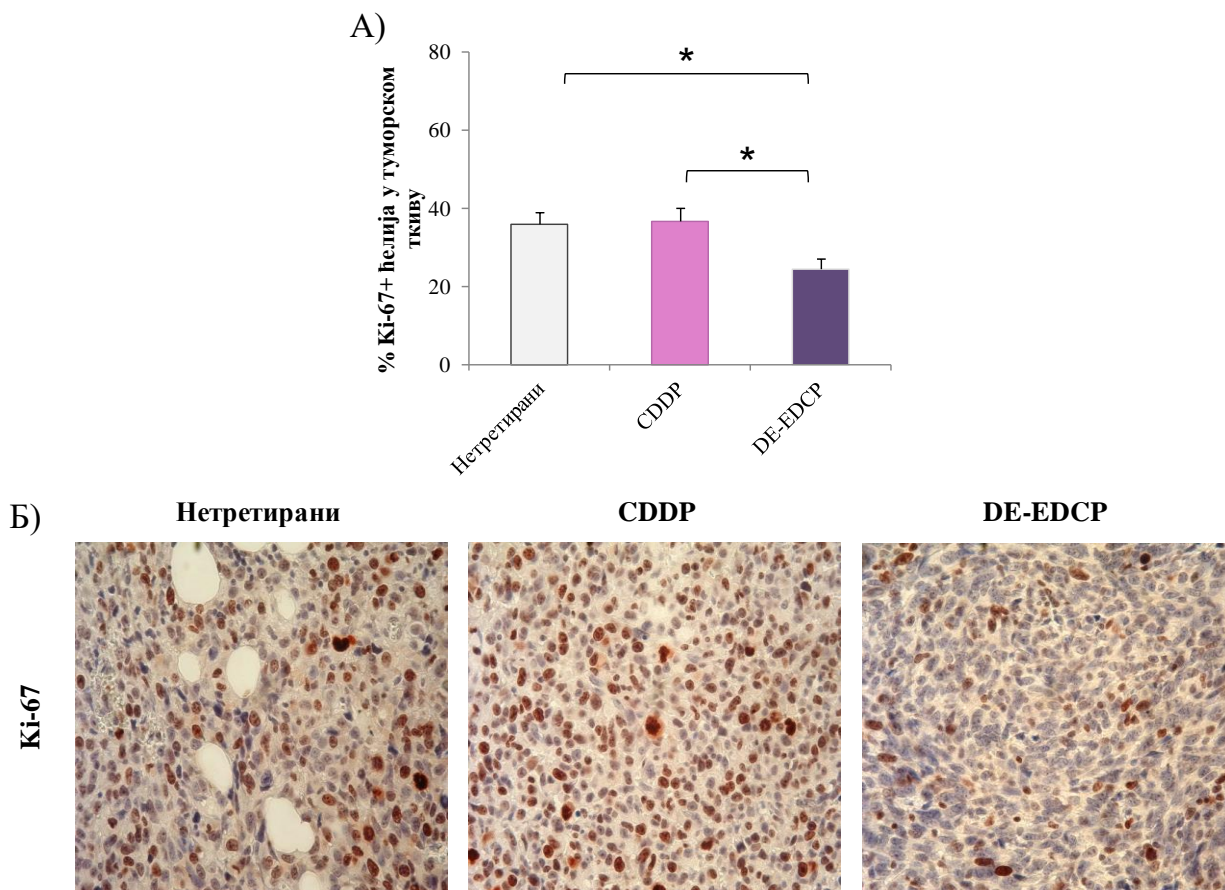
Графикон 10. DE-EDCP зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази. Туморске ћелије 4T1 су 12 часова третиране са DE-EDCP у концентрацији од 31.25 μ M и 62.25 μ M или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 μ M, а затим су обојене *Ruby* бојом. Проточном цитометријом је анализирана заступљеност туморских ћелија у одређеним фазама ћелијског циклуса. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; $p < 0.05$: *нетретиране ћелије vs. ћелије третиране са DE-EDCP или CDDP; [¶]ћелије третиране са DE-EDCP vs. CDDP; [§] ћелије третиране са DE-EDCP у нижој vs. вишој концентрацији)

Подаци добијени проточном цитометријом указују на значајно мањи проценат 4T1 ћелија које исказују маркер пролиферације Ki-67 после 24. часовног третмана са DE-EDCP ($24.97\% \pm 2.42$) у односу на нетретирание ћелије ($33.43\% \pm 5.28$), а нарочито ћелије које су биле изложене цисплатини ($55.77\% \pm 2.70$) (Графикон 11). Уз то, регистрован је драстичан пораст експресије овог маркера неочекивано на ћелијама које су третиране са цисплатином.



Графикон 11. DE-EDCP смањује проценат малигних ћелија које експримирају Ki-67. Туморске ћелије 4T1 ћелије су 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од $31.25\mu\text{M}$, а затим је проточном цитометријом одређиван проценат 4T1 ћелија које експримирају Ki-67. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$). Репрезентативни хистограм показује експресију Ki-67 на малигним ћелијама.

У даљем истраживању анализирана је експресија Ki-67 и у ткиву карцинома дојке мишева имунохистохемијском методом. Уочава се да је у ткиву карцинома дојке мишева третираних DE-EDCP проценат малигних ћелија које исказују Ki-67 значајно смањен у односу на групу нетретираних, као и цисплатином третираних мишева (Графикон 12). Није забележена статистички значајна разлика у процентуалној заступљености малигних ћелија који експримирају Ki-67 у туморском ткиву нетретираних и цисплатином третираних мишева.



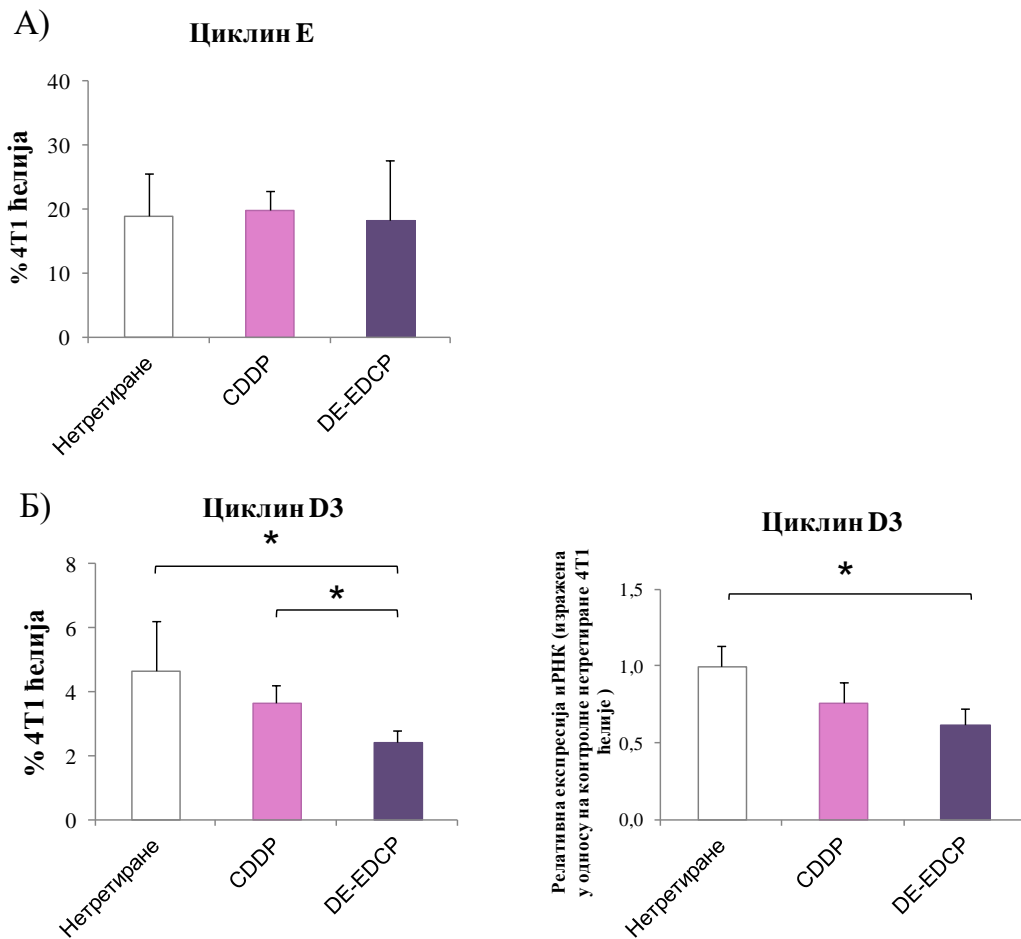
Графикон 12. DE-EDCP смањује експресију Ki-67 у ткиву карцинома дојке. А) Тридесетишестог дана експеримента, BALB/C мишеви који су фармаколошки различито третирани су жртвовани а онда је имунохистохемијском методом анализирана експресија Ki-67 у ткиву карциному дојке. Одређен је проценат малигнућ ћелија које исказују Ki-67 у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$). Б) Репрезентативни исечци ткива тумора у којима се уочавају туморске ћелије које експримирају Ki-67 при чему су узете у обзир само оне ћелије чија су једра црвено обојена (оригинално увећанање 400X).

Овакав налаз упућује на то да у малигним ћелијама DE-EDCP инхибира прогресију ћелијског циклуса и то заустављањем у G0/G1 фази што последично може да додатно фацитира апоптозу ових ћелија.

4.4.2. DE-EDCP смањује експресију циклина D3, а повећава експресију p16, p21 и p27

Са циљем детаљнијег расветљавања улоге у прогресији ћелијског циклуса испитиван је утицај DE-EDCP на експресију циклина- E и -D, као и инхибитора циклин зависних киназа (p16, p21 и p27) који су сви заједно укључени у регулацију овог процеса.

Након 24. часовног третмана ћелија са DE-EDCP или цисплатином у концентрацији од 31.25 μ М није забележена промена у експресији циклина Е у туморским ћелијама (Графикон 13).



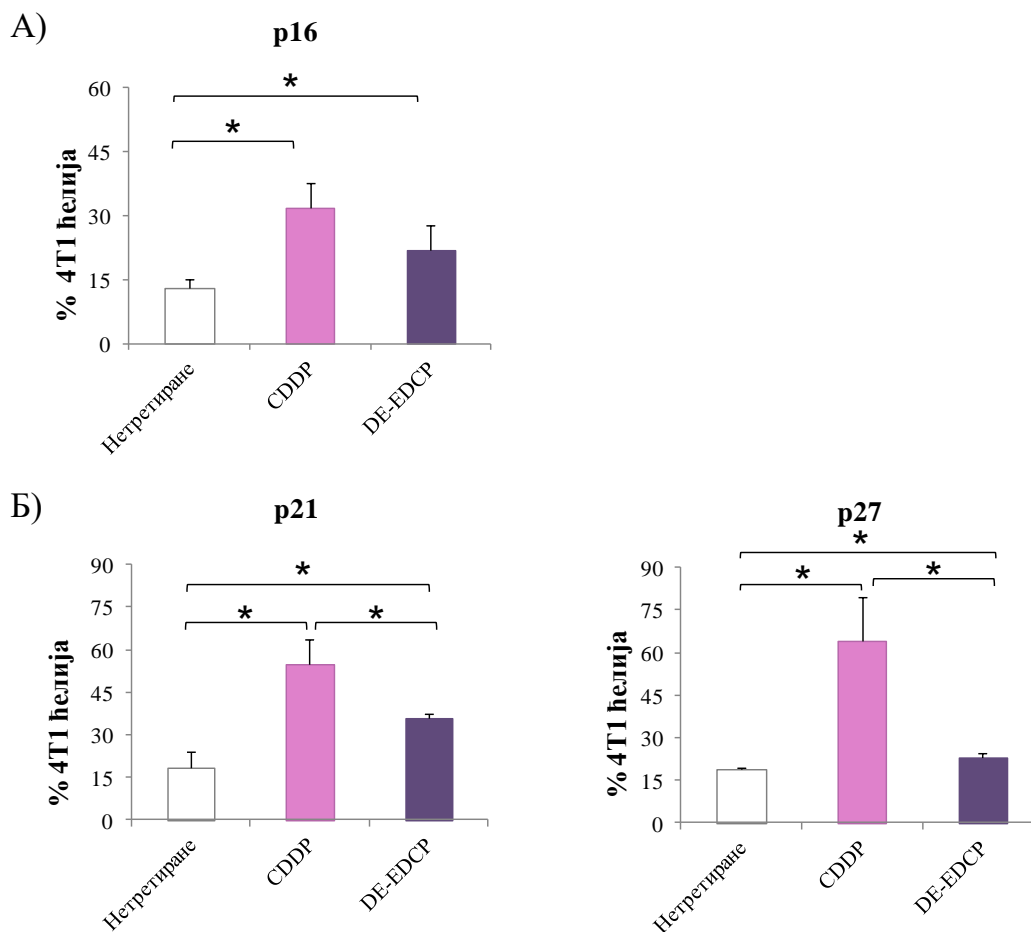
Графикон 13. DE-EDCP смањује експресију циклина D3 на нивоу протеина и информационе РНК. Након што су 4Т1 ћелије 24 часа третирани са DE-EDCP или са цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 μ М, проточном цитометријом је анализиран проценат 4Т1 ћелија са експресијом молекула који подстичу прогресију ћелијског циклуса. А) DE-EDCP не утиче на експресију циклина Е на 4Т1 ћелијама. Б) Третман са DE-EDCP смањује проценат 4Т1 ћелија које експримирају протеин циклин D3 (леви панел). RT-PCR методом је анализарана експресија циклина D3 на нивоу информационе РНК. Третман ћелија са DE-EDCP битно смањује експресију иРНК за синтезу циклина D3 (десни панел). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација, на основу три независна експеримента (Mann–Whitney U тест; * $p < 0.05$).

Ако се пореди експресија циклина D3, јасно се види да је DE-EDCP значајно смањило проценат 4Т1 ћелија које експримирају овај циклин (2.4% \pm 0.37) у поређењу са ћелијама третираних са цисплатином (3.64% \pm 0.56), а нарочито у односу на популацију

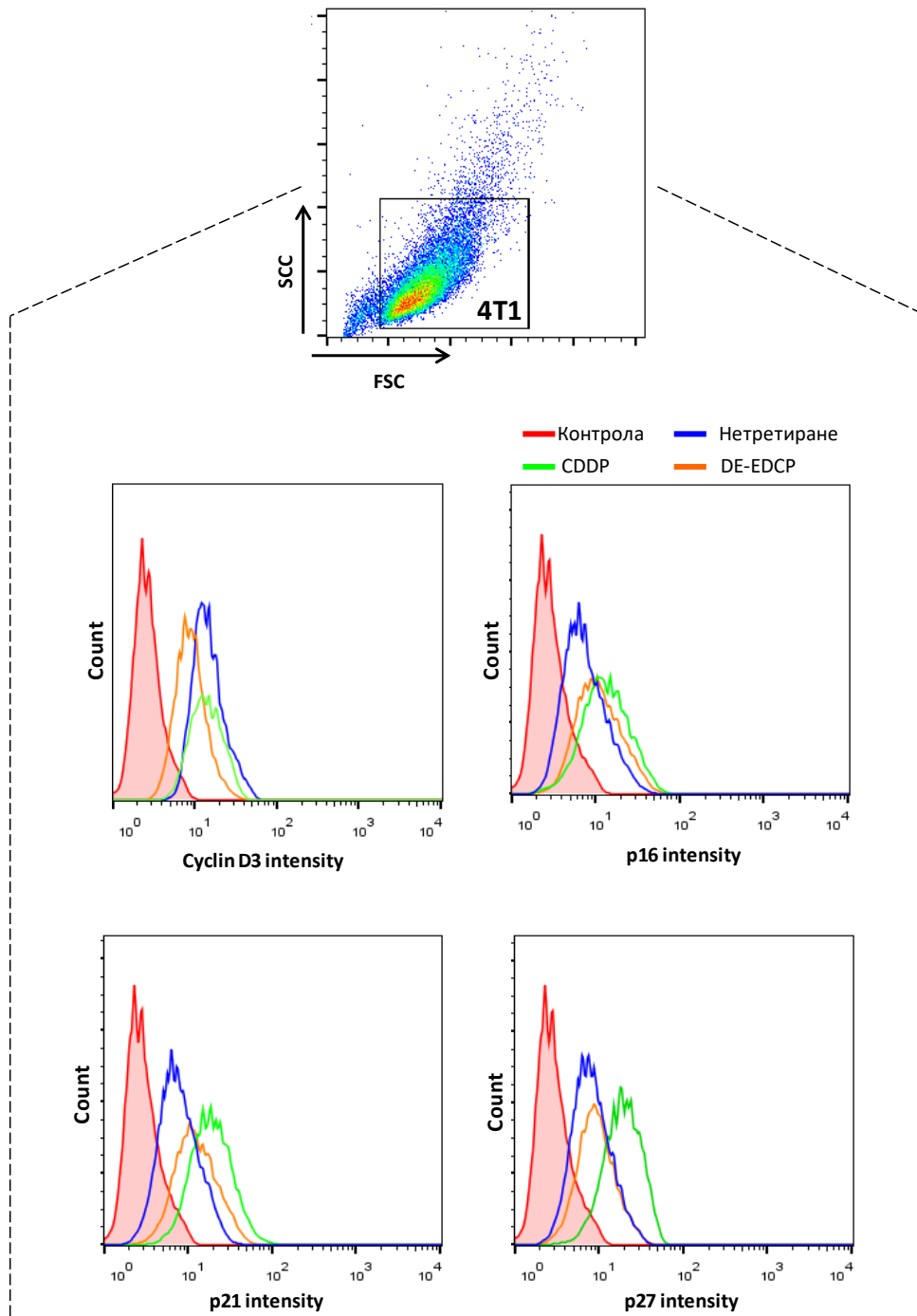
нетретираних ћелија ($4.64\% \pm 1.59$) (Графикон 13Б). Додатно, за разлику од цисплатине која није утицала на експресију овог молекула на нивоу иРНК, јасно се уочава значајно смањење експресије иРНК за синтезу циклина D3 после третмана са DE-EDCP у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 13Б).

На Графикону 14А уочава се да је проценат ћелија које експримирају p16 био значајно повећан након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним 4T1 ћелијама. Уз то, примећује се и да третман са DE-EDCP, али и са цисплатином, битно повећава експресију p21 и p27 у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 14Б). Ако се пореди ефекат DE-EDCP и цисплатине на експресију ова два инхибитора ћелијског циклуса, уочава се да цисплатина индукује значајно већи пораст процента ћелија који експримирају p21 и p27 него DE-EDCP.

Приказани резултати указују да DE-EDCP остварује и антипролиферативну активност на туморске ћелије тако што у њима инхибира прогресију ћелијског циклуса у G0/G1 фази што је вероватно последица смањења експресије циклина D3 и повећања експресије инхибитора циклин зависних киназа, p16, p21 и p27.



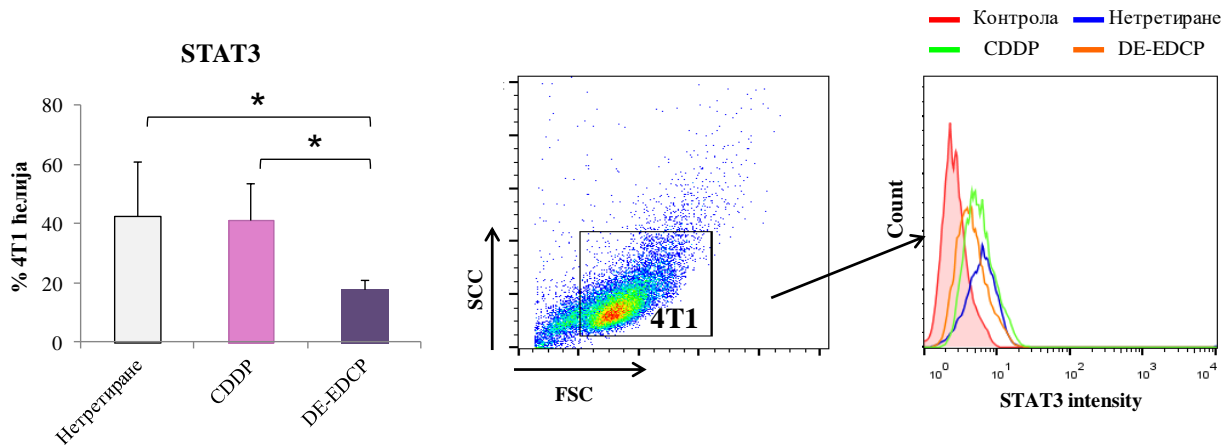
Графикон 14. DE-EDCP повећава проценат 4T1 ћелија које експримирају инхибиторе циклин зависних киназа. Након што су 4T1 ћелије 24 часа третиране DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP) у концентрацији од 31.25 μ M, проточном цитометријом је анализирана заступљеност 4T1 ћелија које експримирају p16, p21 и p27; А) DE-EDCP повећава проценат 4T1 малигних ћелија које експримирају p16 (А) p21 и p27 (Б); Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација на основу три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; $*p<0.05$).



Слика 9. Репрезентативни хистограми експресије цикллина D3 и инхибитора цикллин зависних киназа (p16, p21 и p27) у 4Т1 малигним ћелијама.

4.5. DE-EDCP редукује експресију STAT3, NANOG и SOX2 у малигним ћелијама

Узимајући у обзир да STAT3 игра важну улогу у различитим процесима прогресије тумора, у студији је анализиран и утицај DE-EDCP на експресију овог транскрипционог фактора у малигним ћелијама. Подаци добијени проточном цитометријом указују на драстично смањен проценат 4T1 ћелија које експримирају STAT3 након 24. часовног излагања DE-EDCP у поређењу са популацијом нетретираних ћелија, као и ћелија третираних цисплатином што се види на Графикону 15.



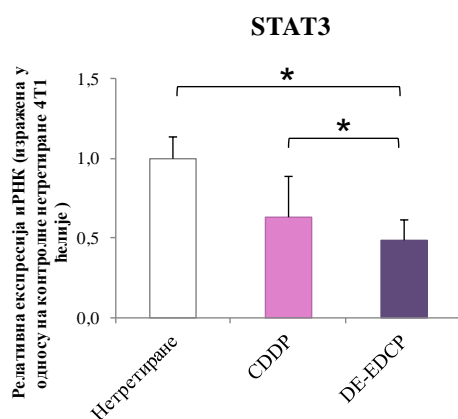
Графикон 15. DE-EDCP смањује проценат малигнућелија које експримирају STAT3. Туморске ћелије 4T1 ћелије су 24 часа изложене DE-EDCP или цисплатини (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 μ M и проточном цитометријом је одређиван проценат туморских ћелија које експримирају STAT3. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann–Whitney U* тест; * $p < 0.05$). Репрезентативни хистограма показује експресију STAT3 на селектованим малигним ћелијама.

У складу са претходним налазом, детектовано је битно смањење експресије иРНК за синтезу STAT3 у туморским ћелијама након третмана са DE-EDCP у односу на нетретиране ћелије, као и ћелије третиране са цисплатином (Графикон 16А).

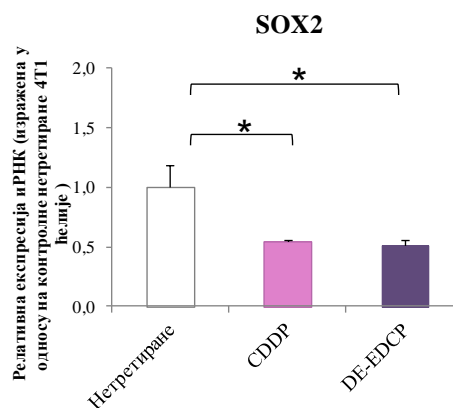
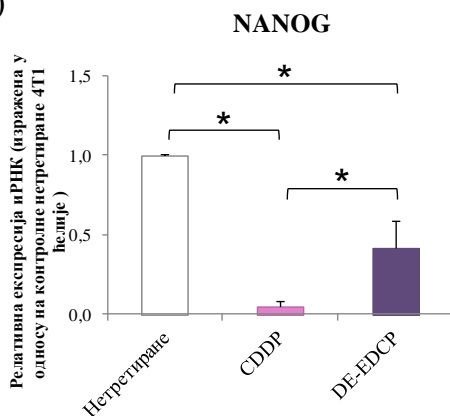
На основу ових налаза очигледно је да DE-EDCP има способност да у туморским ћелијама редукује експресију транскрипцијског фактора STAT3, како на нивоу протеина тако и на нивоу информационе РНК, што је подстакло да се детаљније анализира нисходна регулација сигналног пута STAT3.

На Графикону 16Б приказана је експресија иРНК за синтезу NANOG и SOX2 који су један од нисходних мета STAT3. Уочава се да DE-EDCP, а нарочито цисплатина значајно смањује експресију иРНК за NANOG у малигним ћелијама. Експресија иРНК за SOX2 је такође била битно снижена у ћелијама након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним ћелијама, и примећује се да је њихов ефекат био приближно исти (Графикон 16Б).

А)

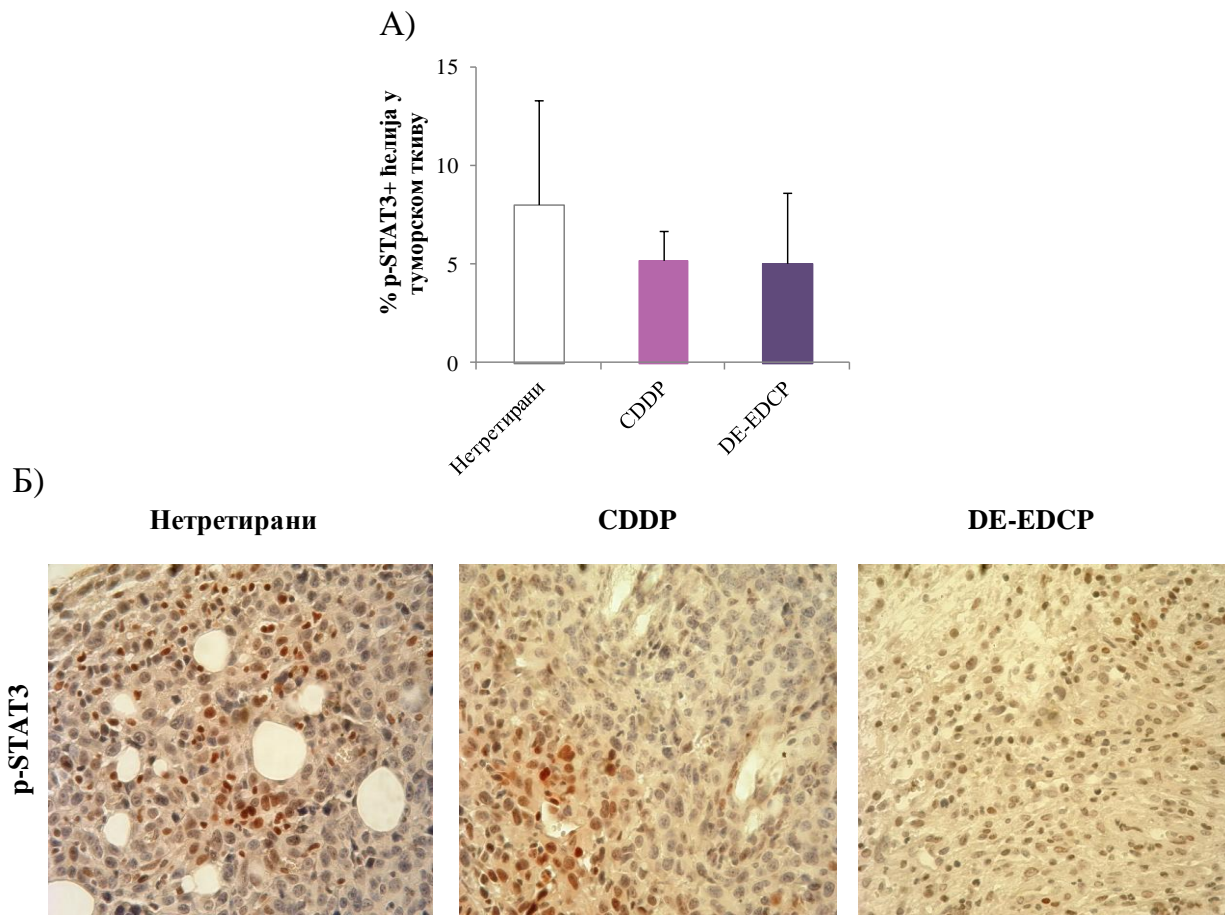


Б)



Графикон 16. DE-EDCP смањује експресију иРНК за синтезу STAT3, NANOG и SOX2 у малигним ћелијама. Малигне ћелије 4Т1 су 24 часа третиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis*-diamminedichloridoplatinum(II), CDDP) у концентрацији од 31.25 μ М. RT-PCR методом анализирана је експресија иРНК за синтезу STAT3, NANOG и SOX2 у ћелијама свих испитиваних група. А) Експресија иРНК за синтезу STAT3 у малигним 4Т1 ћелијама је снижена након третмана са DE-EDCP; Б) DE-EDCP смањује експресију иРНК за синтезу NANOG и SOX2 у малигним ћелијама. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација и изражени су у односу на контролу (нетретиране 4Т1 ћелије) која је арбитрално сведена на јединичну вредност (*Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$).

На крају је у ткиву карцинома дојке анализирана експресија фосфорилисане форме STAT3 (енгл. *Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3*, pSTAT3) имунохистохемијском методом. Примећује се да је процентуална заступљеност малигнух ћелија које исказују pSTAT3 у туморском ткиву мишева третираних са DE-EDCP или цисплатином смањена у односу на нетретирану групу, али ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 17).



Графикон 17. DE-EDCP значајно не мења процентуалну заступљеност малигнух ћелија које исказују фосфорилисану форму STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева. А) Након жртвовања фармаколошки различито третираних BALB/С мишева, 36. дана експеримента имунохистохемијском методом је процењена експресија фосфорилисане форме STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева. Одређен је проценат малигнух ћелија које исказују pSTAT3 у туморском ткиву у пет видних поља изабраних методом случајног избора. Подаци су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (4 тумора по групи; *Mann-Whitney U* тест; $*p < 0.05$). Б) Репрезентативни пресеци ткива карцинома дојке у којима се запажају туморске ћелије са црвено обојеним једром (оригинално увеличање 400X).

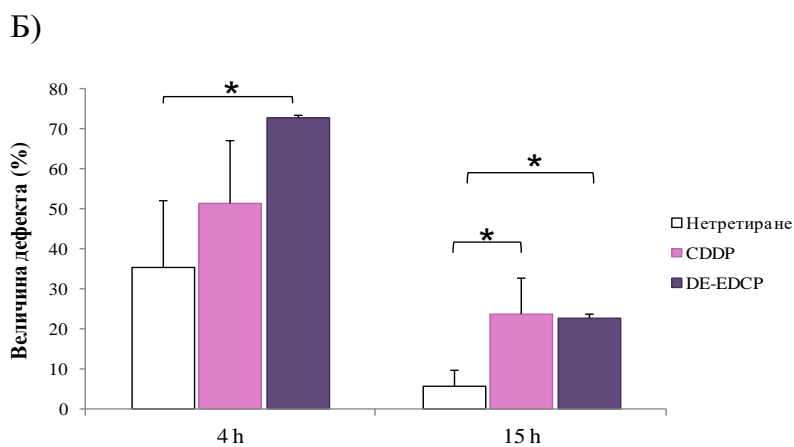
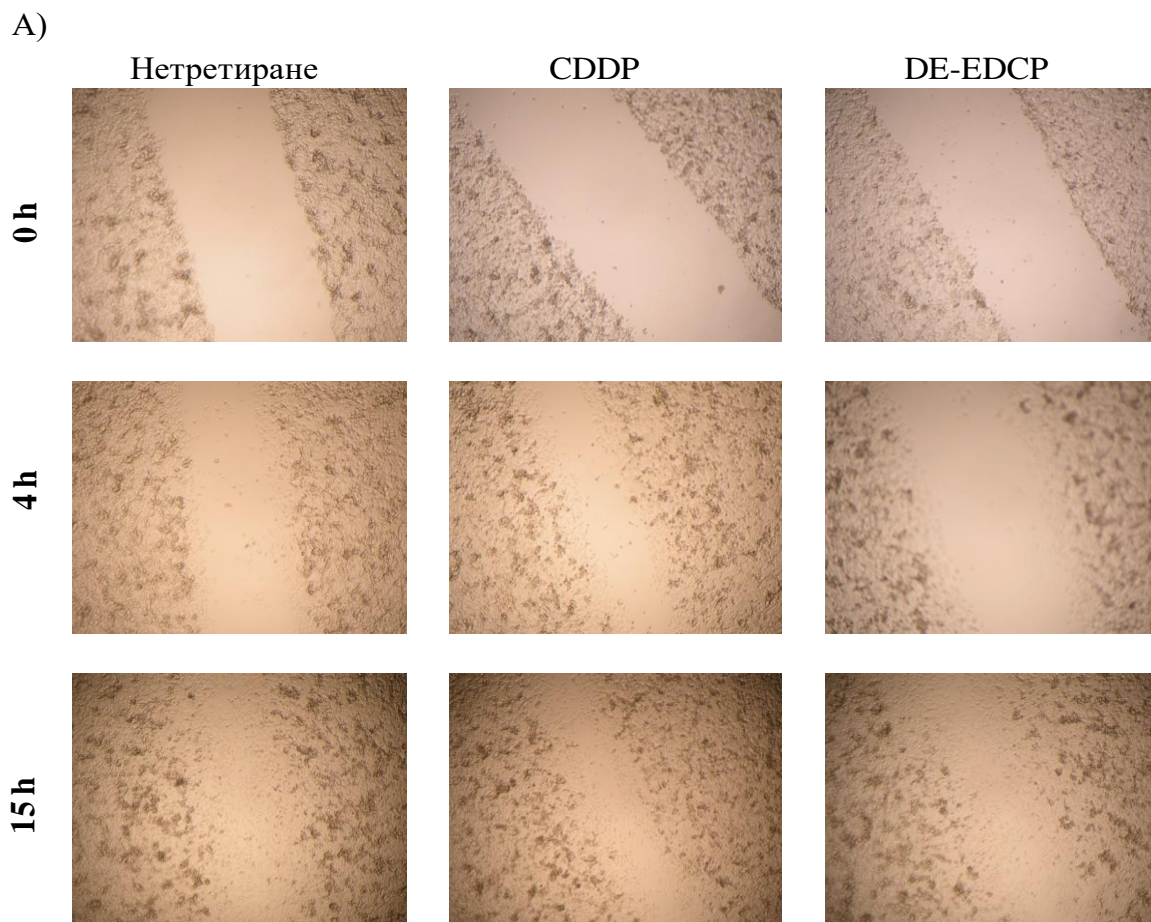
На основу приказаних резултата може се констатовати да DE-EDCP редукује експресију STAT3 у малигним ћелијама што резултује смањеном експресијом NANOG и SOX2 и да тако на још један начин инхибира прогресију тумора.

4.6. DE-EDCP инхибира миграцију туморских ћелија

С обзиром на чињеницу да миграција туморских ћелија представља први корак у инвазивно-метастатској каскади (322), у даљем току истраживања је процењен ефекат DE-EDCP на миграциони потенцијал туморских ћелија 4T1 помоћу "wound healing" теста при чему је коришћена нетоксична концентрација (15.63 μ M).

На Графоку 18А јасно се види да су контролне нетретиране 4T1 ћелије несметано мигрирале. Ова њихова миграторна способност је видљива већ након 4 часа, док су ћелије након 15 часова готово у потпуности прекриле претходно фомирану повреду односно празан регион. Међутим, уочава се да је DE-EDCP битно редуковао миграцију туморских ћелија већ након 4 часа, у односу на нетретиране ћелије, и овај инхибициони ефекат на миграцију се одржао и после 15 часова инкубације. За разлику од испитиване супстанце, третман са цисплатином је статистички значајно инхибирао миграцију циљаних ћелија тек након 15 часова у поређењу са нетретираним ћелијама. Добијени резултати су приказани и илустровани на Графику 18А и Б.

На основу добијеног налаза може се констатовати да DE-EDCP у нетоксичној концентрацији ефикасно смањује миграцију туморских ћелија што вероватно представља алтернативни антиметастатски механизам.



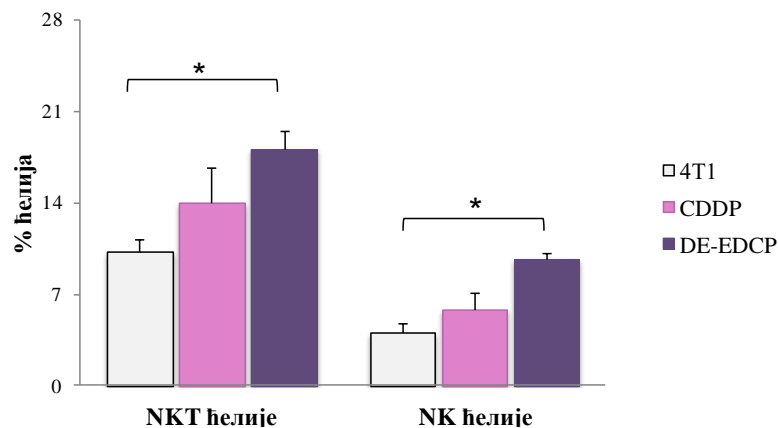
Графикон 18. DE-EDCP инхибира миграцију туморских ћелија. Малигне ћелије 4T1 засејане су у плоче са 6 бунара и када је формиран конфлуентни слој ћелија дно бунара је загребано стерилним наставком микропипете. Након тога ћелије су 4 и 15 часа инкубиране са DE-EDCP или цисплатином (енгл. *cis-diamminedichloridoplatinum(II)*, CDDP) у концентрацији од $15.63\mu\text{M}$; А) Миграција нетретираних и третираних ћелија DE-EDCP или цисплатином (CDDP) је посматрана под инверним микроскопом; Б) Величина индуковане повреде или празног простора анализирана је и изражена у односу на 100% дефекта у тренутку формирања повреде. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација из три независна експеримента (*Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$).

4.7. DE-EDCP индукује акумулацију NKT и NK ћелија у туморску микросредину и мења њихов функционални фенотип

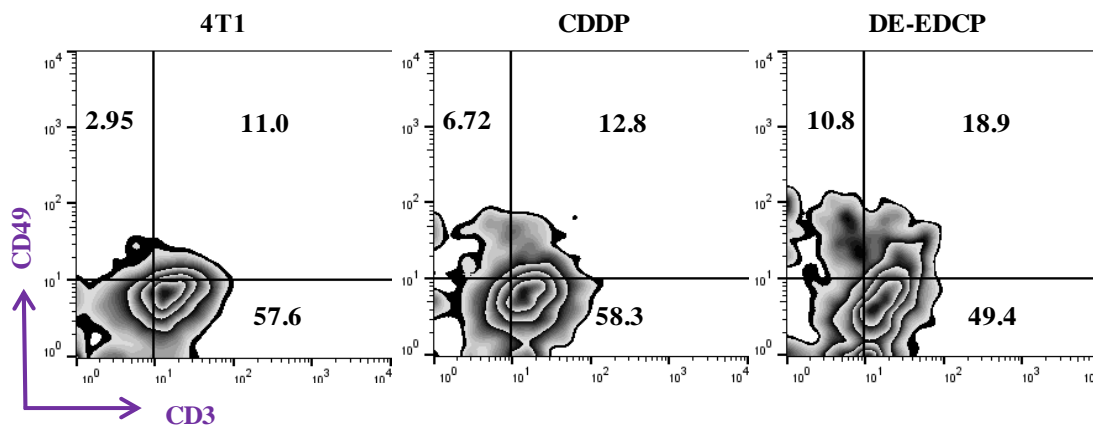
Већ дуже време постоје покушаји да се имунски систем, "финим подешавањем", искористи као "моћно оружје" у борби против тумора. Узимајући у обзир да ћелије урођене имуности, а нарочито NK ћелије, заузимају централно место у контроли раста и метастазирања карцинома дојке (323, 324), у даљем току истраживања анализиран је утицај DE-EDCP на функционални статус NKT и NK ћелија у туморској микросредини.

У оквиру популације мононуклеарних ћелија, изолованих из ткива тумора дојке мишева 18. дана од инокулације 4T1 ћелија, проточном цитометријом је анализирана заступљеност, као и фенотип NKT и NK ћелија.

Апликација DE-EDCP је узроковала значајно повећање процента $CD3^+CD49^+$ NKT и $CD3^-CD49^+$ NK ћелија у туморској микросредини мишева третираних DE-EDCP у односу на нетретиране мишеве, што се види на Графикону 19. Примећује се и да третман са цисплатином није битно изменио заступљеност тумор-инфилтришућих NKT и NK ћелија.



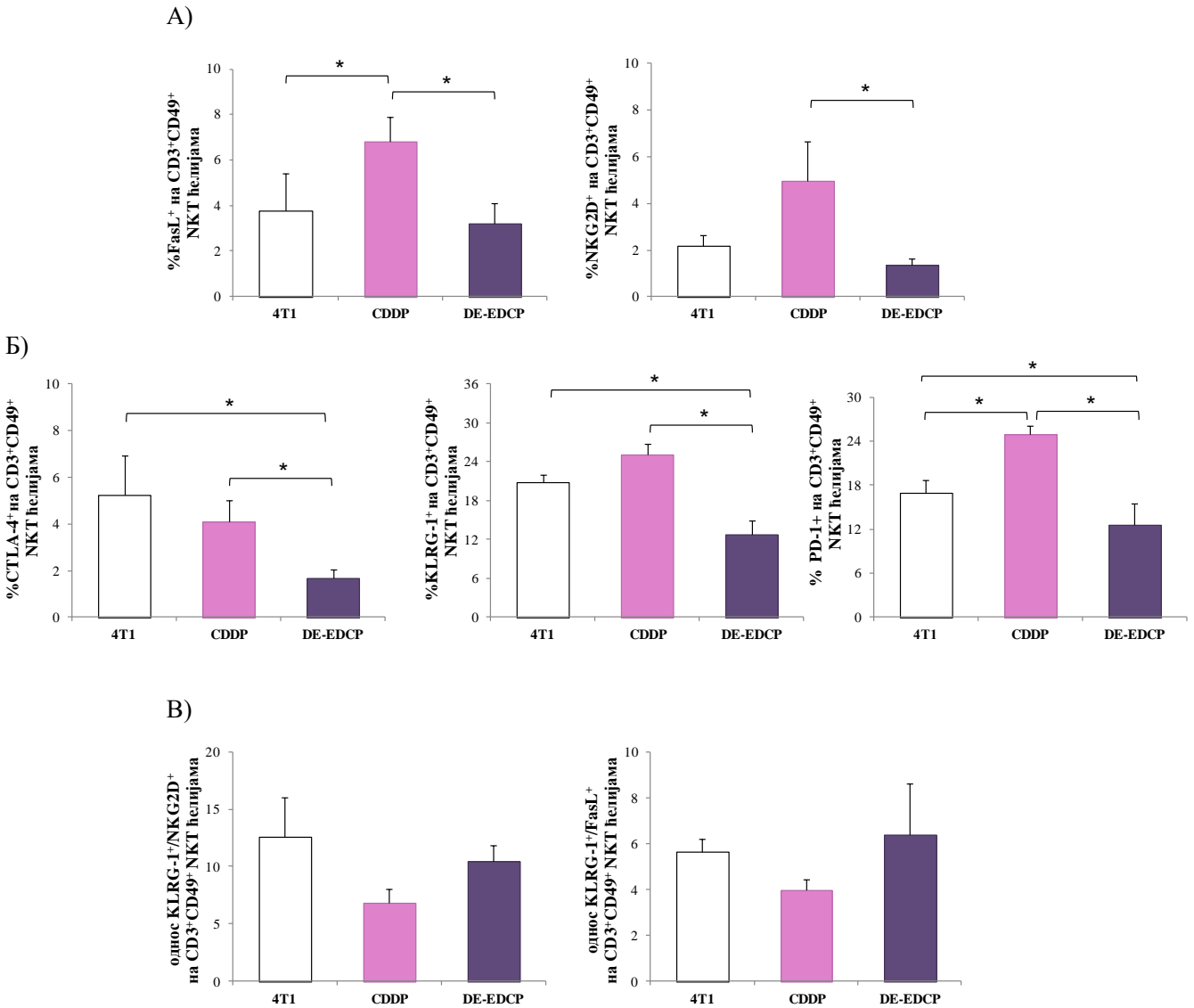
Графикон 19. DE-EDCP подстиче инфлукс NKT и NK ћелија у туморску микросредину карцинома дојке. Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат $CD3^+CD49^+$ NKT и $CD3^-CD49^+$ NK ћелија изолованих из туморског ткива нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева. Код мишева третираних DE-EDCP забележено је повећање процента тумор-инфилтришућих NKT и NK ћелија у односу на нетретиране мишеве. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка (Mann–Whitney U тест; $*p<0.05$).



Слика 10. Реперезентативни *FACS*-плотови $CD3^+CD49^+$ NKT ћелија и $CD3^-CD49^+$ NK ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

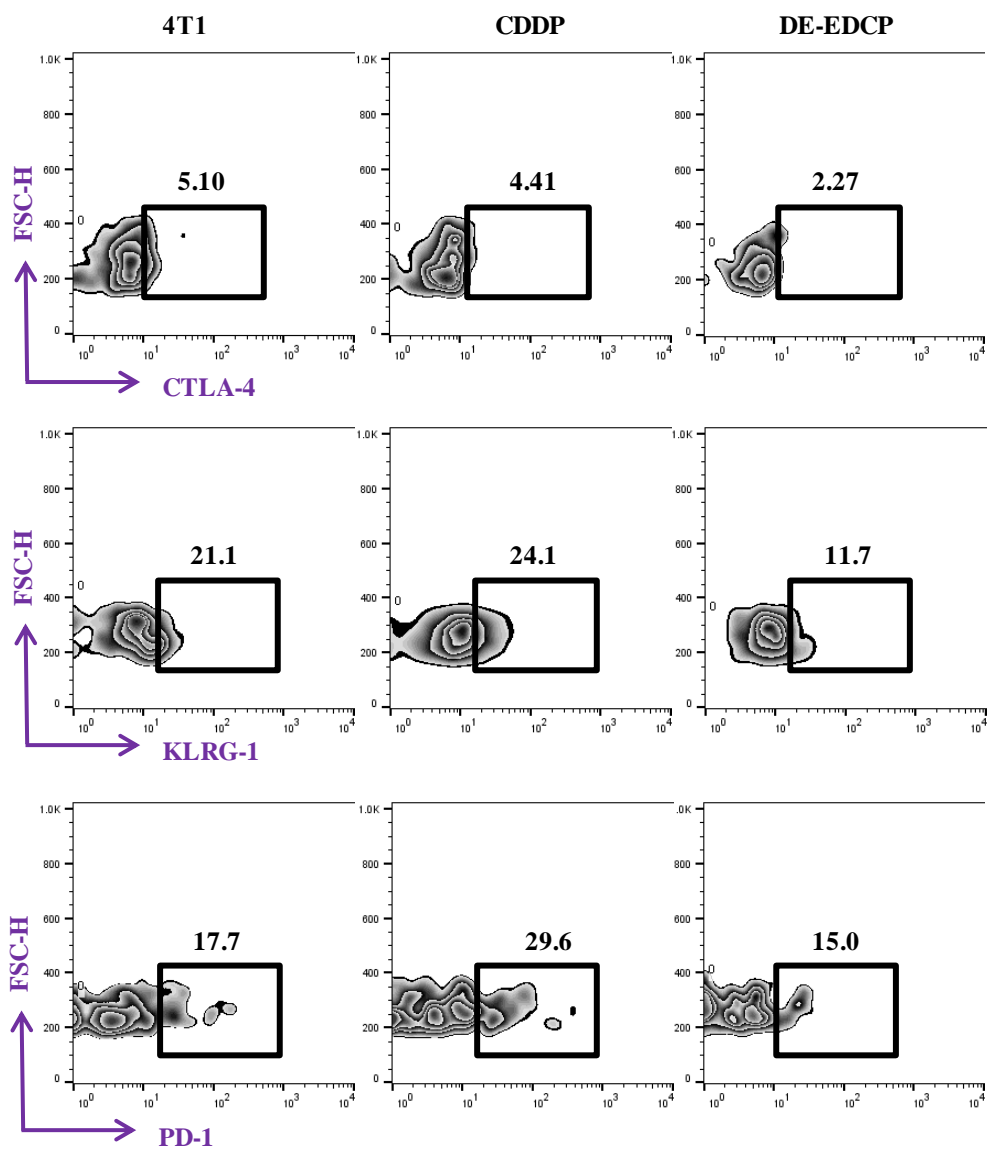
Анализом фенотипа NKT ћелија утврђено је незнатно или благо смањење експресије активационих рецептора FasL и NKG2D на NKT ћелијама у туморској микросредини мишева третираних DE-EDCP у поређењу са нетретираним мишевима (Графикон 20A). Међутим, у групи мишева која је третирана са цисплатином запажа се пораст процента $FasL^+NKT$ и $NKG2D^+NKT$ ћелија који достиже статистички значајност у односу на мишеве третираних са DE-EDCP (Графикон 20A). С друге стране, када се пореди експресија инхибиционих рецептора CTLA-4, KLRG-1 и PD-1 уочава се да је проценат $CTLA-4^+NKT$, $KLRG-1^+NKT$ и $PD-1^+NKT$ у тумору мишева подвргнутих третману са DE-EDCP значајно мањи него у групи нетретираних, као и са цисплатином третираних мишева. Овакав налаз сугерише на то да DE-EDCP утиче само на инхибиционе рецепторе на NKT ћелијама тако што спречава њихову експресију, и на тај начин инхибира "анергију" ових ћелија.

Даља анализа функционалног фенотипа NKT ћелија показује да не постоји статистички значајна разлика у односу инхибициони наспрам активационим рецепторима на овим ћелијама (Графикон 20B).



Графикон 20. DE-EDCP третман смањује заступљеност анергичних NKT ћелија у туморској микросредини карцинома дојке. Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат тумор-инфилтришућих NKT ћелија које експримирају активационе (A) и инхибиционе (B) рецепторе. Код мишева третираних DE-EDCP забележен је значајно мањи проценат CTLA-4⁺, KLRG-1⁺ и PD-1⁺NKT ћелија у односу на нетретиране мишеве. B) Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на NKT ћелијама у карциномима дојке мишева. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка (*Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$).

CD3+CD49+ NKT ћелије

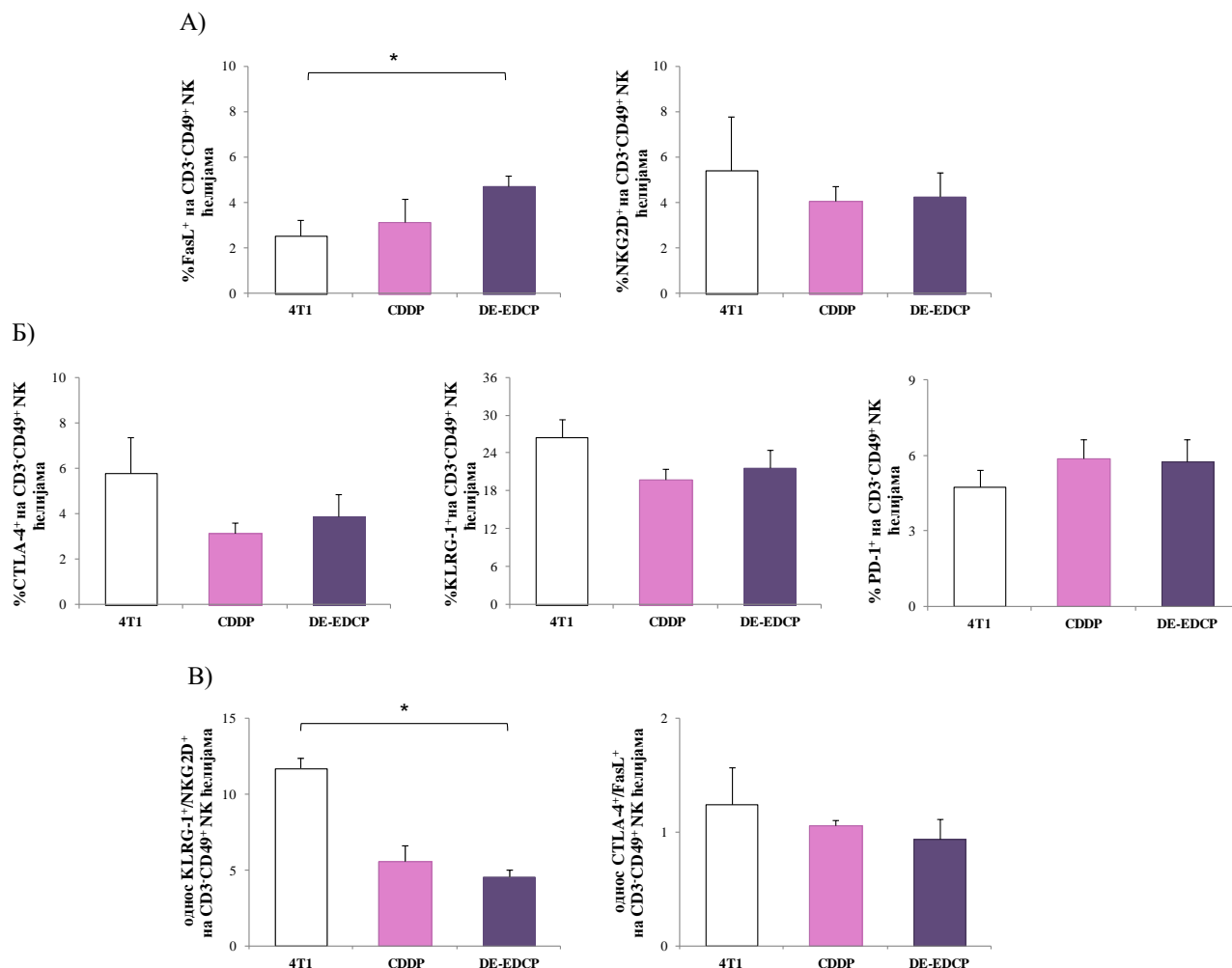


Слика 11. Репрезентативни *FACS*-плотови CTLA-4⁺, KLRG-1⁺ и PD-1⁺ NKT ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

На Графикону 21А уочава се да је на НК ћелијама експресија неких активационих рецептора измењена под утицајем DE-EDCP: проценат FasL⁺ НК ћелија у тумору мишева третираних DE-EDCP је битно повећан у односу на нетретиране мишеве, док је процентуална заступљеност NKG2D⁺ НК ћелија неизмењена. Уз то, примећује се смањење експресије инхибиционих рецептора CTLA-4 и KLRG-1 на тумор- инфилтришућим НК ћелијама у мишева третираних DE-EDCP, али ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 21Б). Процент PD-1⁺ НК ћелија у тумору мишева третираних DE-EDCP је незнатно повећан у односу на нетретиране мишеве.

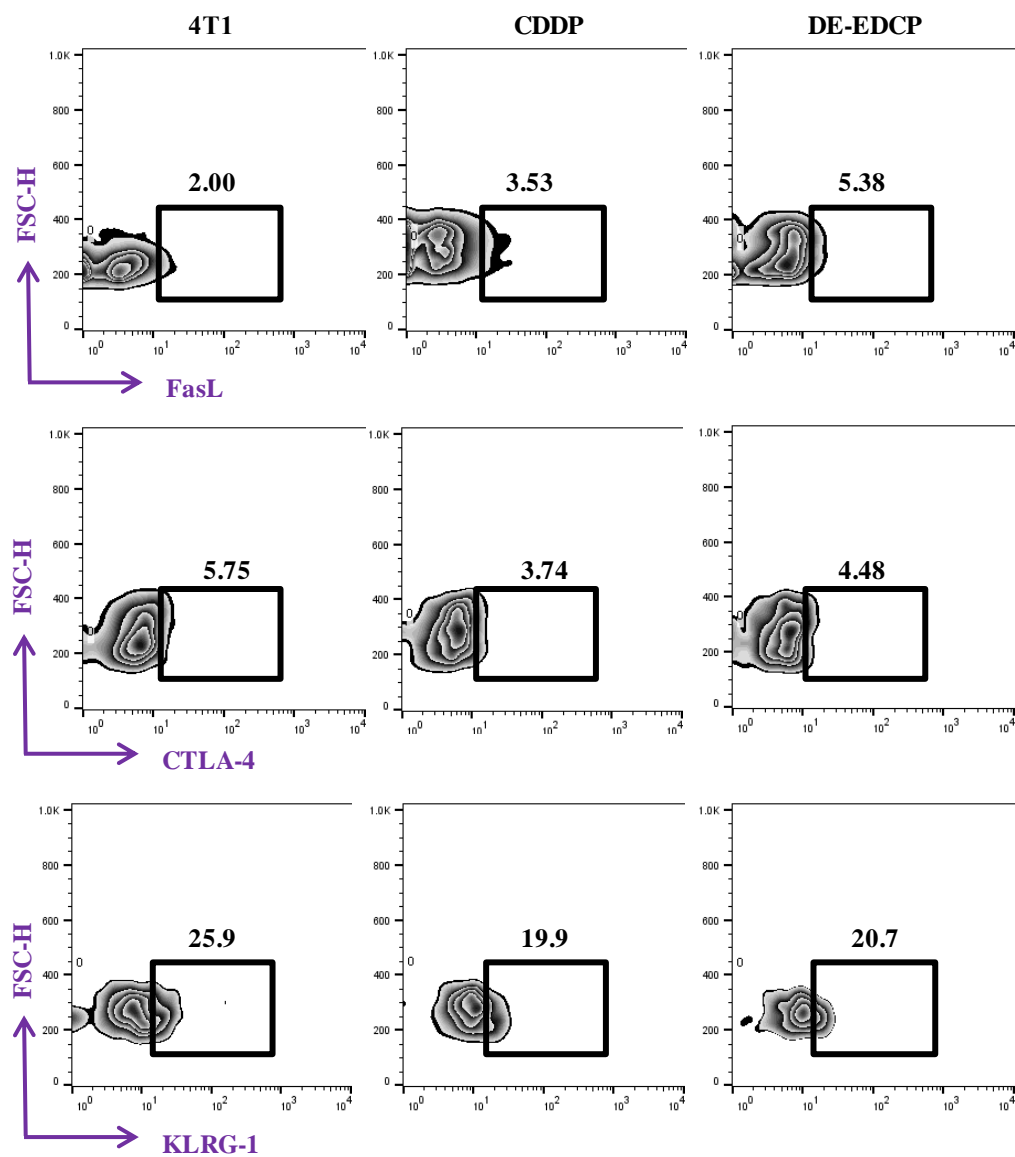
Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на НК ћелијама указује да је однос KLRG-1⁺/NKG2D⁺ на НК ћелијама у тумору мишева третираних DE-EDCP значајно мањи у односу на нетретиране мишеве (Графикон 21В). Није забележена разлика у односу друга два контрарегулаторна молекула, CTLA-4/FasL, на НК ћелијама између испитиваних група (Графикон 21). За разлику од ефекта на НКТ ћелијама, цисплатина није утицала на фенотип НК ћелија.

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP појачано регрутује ефективне НКТ и НК ћелије у туморску микросредину.



Графикон 21. DE-EDCP третман повећава заступљеност FasL⁺ NK ћелија у туморској микросредини карцинома дојке. Осамнаестог дана после убризгавања туморских ћелија проточном цитометријом је одређен проценат тумор-инфилтришућих NK ћелија које експримирају активационе (A) и инхибиционе (B) рецепторе. Код DE-EDCP третираних мишева забележен је значајно већи проценат FasL⁺ NK ћелија у односу на нетретиране мишеве. B) Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на NK ћелијама у карциномима дојке мишева. Вредности су приказане као средње вредности процената ± стандардна грешка (*Mann–Whitney U* тест; * $p < 0.05$).

CD3-CD49+ NK ћелије

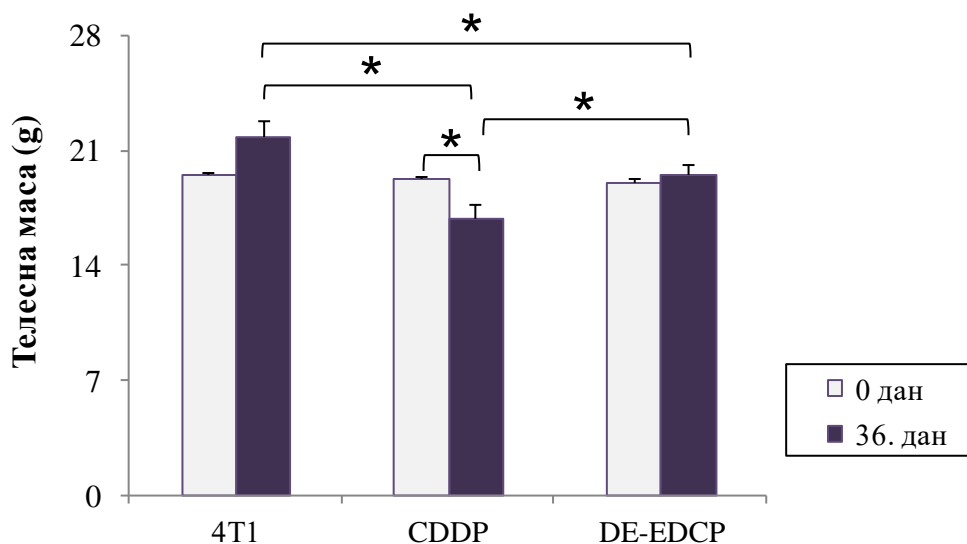


Слика 12. Репрезентативни *FACS*-плотови FasL^+ , CTLA-4^+ и KLRG-1^+ НК ћелија нетретираних и фармаколошки различито третираних мишева

4.8. Системска примена DE-EDCP показује мању токсичност у односу на цисплатину

Потенцијални токсични ефекат системске примене DE-EDCP је процењен на основу следећих параметара: телесне масе, серумске концентрације урее, креатинина и трансаминаза, као и патохистолошке анализе ткивних исечака органа третираних мишева.

Телесна маса мишева свих испитиваних група је анализирана 0. и 36. дана након инокулације туморских ћелија 4T1, што је приказано на Графикону 22. Примећује се да системска примена DE-EDCP значајно редукује телесну масу мишева 36. дана од инокулације туморских ћелија. Међутим, овакав губитак телесне масе је био јасно мањи него током третмана цисплатином. Другим речима, мишеви који су били подвргнути третману са цисплатином изгубили су око 22% своје телесне масе, за разлику од мишева третираних DE-EDCP код којих је губитак износио око 10% у поређењу са групом нетретираних мишева. Уз то, у групи мишева третираних цисплатином уочава се значајно смањење телесне масе 36. дана у односу 0. дан експеримента и овај губитак је износио 12.4%.

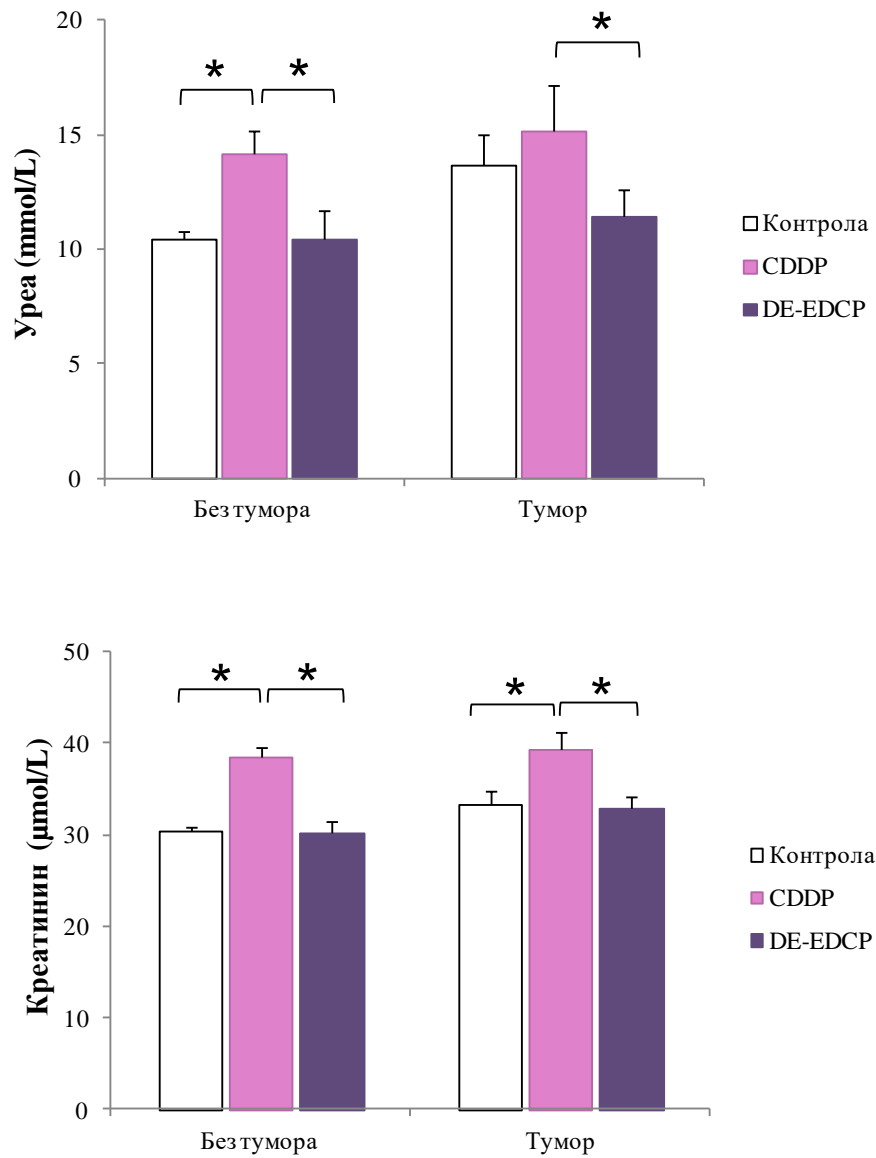


Графикон 22. Промене у телесној маси третираних мишева 0. и 36. дана након инокулације 4T1 туморских ћелија. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (12-14 мишева по групи). (Mann-Whitney U тест; * $p < 0.05$).

На Графикону 23 приказана је концентрација урее и креатинина, као параметара бубрежне функције, у серуму мишева са и без тумора након третмана са DE-EDCP или цисплатином. За разлику од цисплатине која је узроковала значајан пораст, уочава се да је концентрација урее и креатинина неизмењена у серуму мишева без тумора након третмана са DE-EDCP. Додатно, региструје се да је у групи мишева са тумором након третмана са DE-EDCP, концентрација урее значајно нижа у односу на мишеве који су третирани цисплатином, док је концентрација креатинина неизмењена у односу на нетретиране мишеве. Овакав налаз упућује на то да DE-EDCP нема токсични ефекат на бубреге.

Није регистрована значајна разлика у концентрацији трансминаза, ALT (енгл. *Alanine transaminase*) и AST (енг. *Aspartate transaminase*) (подаци нису приказани) што имплицира на то да испитивано једињење не делује хепатотоксично. Хистолошке промене нису примећене у органима мишева који су били третирани DE-EDCP, укључујући јетру, бубреге, плућа, црева, слезину и желудац (подаци нису приказани).

Добијени подаци указују на то да DE-EDCP има релативно мање нежељене ефекте у односу на цисплатину.



Графикон 23. DE-EDCP не делује нефротоксично. Серумска концентрација урее и креатинина у различито третираним групама мишева са и без тумора одређена је 36. дана експеримента. Резултати су представљени као средња вредност ± стандардна девијација (8-12 мишева по групи; *Mann-Whitney U* тест; * $p < 0.05$).

5. Дискусија

Последњих деценија главно ограничење у лечењу карцинома је првенствено повећана учесталост озбиљних нежељених реакција, као и све чешћи развој резистенције на хемиотерапеутике. Управо ова ограничења наметнула су потребу за развојем нових терапијских једињења која показују већу ефикасност а мању токсичност.

У овој докторској дисертацији су испитивани антитуморски ефекти диетилестра DE-EDCP у моделу мишијег карцинома дојке и меланома, као и потенцијални механизми његовог деловања.

5.1. Цитотоксичко дејство DE-EDCP на ћелије карцинома дојке и меланома

У новијим истраживањима посебно место заузимају комплекси метала са диам(м)инским лигандима. Успешно је синтетисан велики број лиганада типа *edda* (етилендиамин-*N,N'*-диацетат), као и њихови одговарајући комплекси метала (325-331). Лиганди *edda* типа су етилендиамин или пропилендиамин дикарбоксилне киселине и њихови естри (332, 333). Приликом анализе биолошке активности синтетисаних *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил) пропаноат платина(II)/(IV) комплекса и њихових одговарајућих лиганада, уочено је да један од лиганада показује значајну антитуморску активност (298, 299). Испитиван је цитотоксички ефекат *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорид лиганада (R= H, метил, етил, *n*-пропил, *n*-бутил), као и њихових одговарајућих комплекса платине(IV), при чему је забележена значајна цитотоксичка активност *O,O'*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил) пропаноат дихидрохлорида (DE-EDCP) и његовог одговарајућег комплекса платине(IV) на линијама малигнућег ћелија глиома (U251 глиом људи и С6 глиом пацова), фибросаркома L929 и меланома миша В16 (298). Генерално, ова антитуморска активност DE-EDCP била је приближно једнака или чак ефикаснија у односу на цисплатину. Када се пореди осетљивост свих наведених линија туморских ћелија, запажа се да је меланом миша В16 најосетљивији на дејство DE-EDCP. Уз то, на основу добијених IC₅₀ вредности уочено је да су ови малигни меланоцити чак четири пута осетљивији на DE-EDCP него на дејство цисплатине. Анализа механизма ћелијске смрти, упућује на то да како одговарајући комплекс платине(IV) тако и његов

лиганд узрокује смрт туморских ћелија која не одговара у потпуности ниједном типу ћелијске смрти, мада је најсличнија некрози (298). Такође, испитиван је и токсички ефекат *O,O'*-диалкил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат лиганата ($R = H$, метил, етил, *n*-пропил, *n*-бутил) на бројне линије ћелија леукемије (HL-60, REN, MOLT-4, KG-1, JVM-2 и K-562) (299, 300). Највећи токсички ефекат показао је диетилестар DE-EDCP (299, 300). Уочено је да је DE-EDCP ефикаснији у индукцији ћелијске смрти акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) (299, 300), док на осталим линијама леукемија његов туморицидни капацитет био је незнатно мањи у поређењу са референтним цитостатиком цисплатином. Миљковић и сарадници (334) су забележили да лиганд ди-*n*-пропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-амино-(3-циклохексил)пропаноат дихидрохлорид, сличне хемијске структуре као и DE-EDCP, у комплексу са платином(IV) поседује изражену цитотоксичку активност на туморске ћелије, а на моноклеарним ћелијама показује мањи ефекат.

У актуелној студији је по први пут детерминисан туморицидни потенцијал DE-EDCP на различитим линијама ћелија карцинома дојке. Регистровано је да DE-EDCP остварује значајну цитотоксичку активност ћелијама карцинома дојке миша (4T1), као и људи (MDA-MB-468 и MDA-MB-231) која је дозно зависна (Графикон 1 и 2). На основу добијених IC_{50} вредности након 24. и 48 часовног третмана може се закључити да је туморицидни ефекат DE-EDCP на мишијим малигним ћелијама 4T1 приближно једнак ефекту цисплатине (Табела 3). Добијени резултати су у складу са налазом друге студије који указује да су туморске ћелије мишијег фибросаркома L929 подједнако осетљиве на DE-EDCP и цисплатину (298). Уз то, уочава се и да су након 24. часовног третмана линије ћелија карцинома дојке хуманог порекла осетљивије на DE-EDCP него на референти хемиотерапеутик, цисплатину (Графикон 1 и Табела 3). Мада варијанте аденокарцинома дојке људи, MDA-MB-468 и MDA-MB-231, представљају јединствен подтип метастатског тумора које не експримирају рецепторе ER, PR и HER2, туморске ћелије MDA-MB-231 додатно одликује већи метастатски потенцијал, као и слабија осетљивост на хемиотерапеутике, а нарочито на цисплатину (303). Након 24. часовног третмана туморских ћелија MDA-MB-468 забележено је DE-EDCP има исти цитотоксички ефекат као и цисплатина, а који се са продужавањем времена третмана (након 48 часова) смањује у односу на цисплатину. Додатно, на основу добијених IC_{50} вредности испитиване

супстанце регистровано је да је цитотоксички потенцијал DE-EDCP након 24. часовног излагања варијанте карцинома дојке MDA-MB-231 са високим метастатским капацитетом чак око 12 пута већи у поређењу са референтним цитостатиком (Табела 3). Међутим, продужавањем времена третмана (након 48 часова) ова осетљивост туморских ћелија MDA-MB-231 на DE-EDCP се смањује и постаје приближно иста као на цисплатину. У другим студијама у којима је анализиран утицај комплекса платине(IV) и њихових одговарајућих лиганада, укључујући и DE-EDCP, на вијабилност различитих линија туморских ћелија хуманог порекла забележени су слични резултати, мада дозно зависни ефекат није испитиван. Тако, на основу IC₅₀ вредности констатовано је да су ћелије глиома (298) и леукемија (KG-1, JVM-2 и K-562) људи подједнако осетљиве на DE-EDCP и на цисплатину након 24. часовног третмана (300). Документовано је да је хумана линија акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) чак двоструко осетљивија на дејство DE-EDCP у поређењу са цисплатином (299, 300). Супротно, запажено је да су ћелије карцинома плућа људи (H460) отпорније на дејство DE-EDCP у односу на цисплатину (299). Другим речима, на основу IC₅₀ вредности закључено је да је туморицидна активност DE-EDCP четири пута мања у односу на цисплатину. Слично, регистрована је и смањена осетљивост хумане линије акутне лимфобластне леукемије (MOLT-4) на дејство DE-EDCP, при чему је IC₅₀ вредност за DE-EDCP била двоструко већа у односу на цисплатину (300).

С обзиром да су малигни меланоцити значајно резистентни на конвенционалне хемиотерапеутике (335), испитан је и утицај DE-EDCP на вијабилност B16-F10 варијанте мишјег меланома. Уочава се да је цитотоксичка активност DE-EDCP дозно зависна не само на туморске ћелије карцинома дојке, већ и на B16-F10 варијанту меланома. Поређењем IC₅₀ вредности DE-EDCP и конвенционалног хемиотерапеутика, региструје се да је туморицидни потенцијал DE-EDCP приближно идентичан цисплатини након 24. часовног третмана ћелија. Међутим, при продужавању ћелијског третмана (од 48 часова), вредност IC₅₀ за DE-EDCP је смањена и чак је око 2.5 пута мања у поређењу са цисплатином. У другој студији у којој је испитан утицај новосинтетисаних комплекса платине(IV) и њихових одговарајућих лиганада (298), забележена вредност IC₅₀ након 24. часовне инкубације B16 туморских ћелија са DE-EDCP је слична IC₅₀ вредности која је добијена у актуелном истраживању. Недавно су Исаковић и сарадници (336), испитивали утицај DE-EDCP на вијабилност B16-F10 варијанте меланома миша након 24. часовног

третмана. Вредности IC_{50} за DE-EDCP добијене коришћењем различитих тестова цитотоксичности, као што су АсР, МТТ и SRB тест, су такође у складу са налазом ове студије.

У овој студији цитотоксички потенцијал DE-EDCP на ћелијама 4T1 и B16-F10 додатно је потврђен LDH тестом. LDH тест мери активност лактат дехидрогеназе у супернатанту. Овај ензим је присутан у цитоплазми и ослобађа се из ћелија тек након лизе ћелијске мембране што одговара или некротичној смрти ћелија или касној фази апоптозе (337, 338). У актуелном истраживању запажено је значајно ослобађање лактат дехидрогеназе из обе линије туморских ћелија након 24. часовног третмана са DE-EDCP у опсегу концентрација 31.25-1000 μ M (Фигура 3). Овај пораст процента мртвих малигних меланоцита миша које су ослободиле лактат дехидрогеназу након излагања DE-EDCP компатибилан је са налазом друге студије (336). Мање ослобађање лактат дехидрогеназе из туморских ћелија након третмана са цисплатином у ниским концентрацијама је у складу са претпоставком да цисплатина доминантно индукује апоптозу односно тип ћелијске смрти коју одликује очуван интегритет ћелијске мембране (339). С друге стране, повећан проценат мртвих ћелија које ослобађају лактат дехидрогеназу након третмана са цисплатином у већим концентрацијама је у складу са резултатима ранијег истраживања (340-342) и сугеришу на могућност да цисплатина у вишој дози од 31.25 μ M индукује промене које су карактеристичне за некрозу. Наиме, у зависности од степена ћелијског оштећења индукованог цисплатином, некроза се може десити или директно или као последица недовршеног апоптотског програма (339). Уколико добијени ефекат испитиваног једињења поредимо са цисплатином, може се уочити да је ослобађање лактат дехидрогеназе након третмана са DE-EDCP два пута веће у ћелијама карцинома дојке миша, односно три пута веће у ћелијама мишјег меланома у односу на цисплатину (Графикон 3). Ови резултати имплицирају да DE-EDCP свој цитотоксички ефекат вероватно остварује и директним нарушавањем интегритета ћелијске мембране. Постоји могућност да је присуство ћелија са нарушеним интегритетом ћелијске мембране последица тзв. секундарне некрозе, сходно томе да у *in vitro* условима не постоје фагоцити, ћелије у којима је покренут апоптотски процес због немогућности уклањања подлежу секундарној некрози. Показано је да комплекс платине(IV) и DE-EDCP узрокује некротичну смрт ћелија солидних тумора (глиома) а која је последица повећане

продукције слободних кисеоничних радикала и нарушавање интегритета ћелијске мембране (298). Изгледа да DE-EDCP у комплексу са платином(II) или платином(IV) може покренути најмање два типа смрти у малигним ћелијама, апоптозу или некрозу.

Добро је познато да ћелије са дезинтегрисаном ћелијском мембраном улазе у некрозу и/или у касну фазу апоптозе и да се углавном детектују помоћу LDH теста, док се МТТ тестом региструју промене у активности митохондријалних ензима што се дешава рано у процесу апоптозе. У складу са тим, у овој студији, на основу налаза значајне туморицидне активности испитиваног једињења добијеног помоћу МТТ и LDH теста, може се констатовати да DE-EDCP највероватније узрокује како апоптотску тако и неапоптотску/некротску смрт 4Т1 и В16-Ф10 малигних ћелија.

5.2. Утицај DE-EDCP на прогресију карцинома дојке и меланома миша

Налази новијих епидемиолошких студија указују на то да канцер постаје један од "главних убица" широм света (343). Узимајући у обзир ову чињеницу, данас се спроводе бројна истраживања у циљу проналажења нових антитуморских лекова који ће спречити раст и метастазирање канцера уз минималне нежељене последице. Претходно изнети налази актуелне студије јасно упућују на то да DE-EDCP поседује изражен туморицидни потенцијал, што је подстакло да се даље испита да ли је DE-EDCP значајни кандидат у експерименталној терапији различитих врста солидних тумора.

Користећи ортотопски сингени модел мишјег карцинома дојке, анализиран је утицај DE-EDCP на раст и метастазирање тумора. Важан налаз ове студије сугерише на то да DE-EDCP има способност да значајно успори прогресију карцинома дојке код оних мишева који су подвргнути "терапеутском" режиму и то тек након што су развили палпабилни тумор. Уочава се да DE-EDCP има потенцијални терапијски учинак у карциному дојке узимајући као параметар волумен и масу тумора (Графикон 4), као и број и величину метастатских колонија (Графикон 5 и Слика 6). Резултати новијег истраживања такође указују на то да DE-EDCP значајно редукује раст В16-Ф10 варијанте мишјег меланома (336). Наиме, забележено је значајно смањење масе (за око 25%) и

величине (за око 50%) меланома у мишева који су третирани са DE-EDCP у поређењу са нетретираном групом (336). У актуелној студији уочено је да је до 22. дана од убризгавања 4T1 туморских ћелија DE-EDCP имао сличне ефекте на раст тумора као и референто једињење, цисплатина (Графикон 4A). Од тог дана и поред бољег ефекта цисплатине, уочава се да претходно регистрована разлика у дијаметру тумора се одржава све до краја експеримента између групе мишева третираних са DE-EDCP и нетретиране групе. Овакав релативно бољи ефекат цисплатине у односу на DE-EDCP може бити последица евентуалних разлика у фармакокинетичким параметрима ова два једињења. За цисплатину се добро зна да постиже дуготрајније ефекте услед дужег задржава у организму (344-348), док фармакокинетичка својства DE-EDCP још увек нису расветљена. Претпоставља се да је то један од разлога дуготрајнијег антитуморског потенцијала цисплатине у односу на DE-EDCP. Мишеви обе групе фармаколошки су третирани до 18. дана од инокулације 4T1 туморских ћелија, а жртвовање је уследило 36. дана експеримента. Тог дана, мерењем масе и волумена тумора региструје се да DE-EDCP значајно редукује раст карцинома дојке у поређењу са нетретираном групом, али је тај ефекат значајно мањи у односу на цисплатину (Графикон 4). Међутим, DE-EDCP и цисплатина су остварили готово идентичан ефекат у редукцији броја спонтано успостављених метастатских жаришта у плућима (Графикон 5). Интересантно је запажање да је код мишева третираних са DE-EDCP или са цисплатином битно изражена рефрактерност на успостављање метастаза у јетри. Другим речима, у третираним мишевима нису детектоване метастатске колоније, док у групи нетретираних чак код 42.1% мишева су забележене метастазе у јетри.

Познато је да меланом у узнапредованом стадијуму има изузетно варијабилан и непредвидив ток и да може да метастазира готово у сваки орган и ткиво. Прогноза пацијената са метастатским меланомом је лоша, са 5-годишњом стопом преживљавања између 5-19%. На ову стопу преживљавања оболелих утичу локација и број метастаза (249). Користећи модел мишијег метастатског меланома, анализиран је ефекат примене DE-EDCP на прогресију меланома и то у узнапредованој фази болести. При томе, мишеви су подвргнути "терапеутском" третману другог дана од интравенске апликације B16-F10 туморских ћелија. Мада није уочена статистички значајна разлика у инциденци метастазирања у плућима у односу на нетретирану групу мишева, DE-EDCP је смањило учесталост метастазирања за око 30%. Међутим, забележено је да DE-EDCP значајно

редукује број и величину хематогених метастаза у плућима у поређењу са нетретираним мишевима (Графикон 6). Метастатске промене у јетри нису забележене ни у једној од испитиваних група. Примећује се и да је антиметастатски потенцијал DE-EDCP слабији од ефекта дакарбазина, златног стандарда, који се користи у лечењу ове врсте тумора (Графикон 6).

На основу претходно изнетих налаза студије може се закључити да DE-EDCP показује јасан туморицидни капацитет који је одговоран за успорен раст и метастазирање тумора. Даљим испитивањима у моделу карцинома дојке покушано је да се расветле механизми којима DE-EDCP успорава прогресију тумора.

5.3. DE-EDCP индукује апоптотску смрт малигних ћелија

Зна се да су дисрегулација апоптозе и пролиферације ћелија кључни догађаји у развоју канцера. Поремећај у регулацији апоптозе је одговоран не само за раст и метастазирање тумора, већ је у блиској вези и са резистенцијом малигних ћелија на цитостатике (350-352).

Након регистрованих морфолошких промена 4T1 туморских ћелија које су уследиле после излагања DE-EDCP (Слика 7), испитивани су унутарћелијски догађаји који су карактеристични за апоптозу. Апоптоза, као тип ћелијске смрти која је потенцијално индукована DE-EDCP, најпре је процењена на основу екстернизације фосфатидил серина на површини ћелијске мембране туморских ћелија. Другим речима, типична промена карактеристична за апоптотску смрт ћелије је траслокација фосфатидил серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. У актуелној студији је анализирана процентуална заступљеност 4T1 ћелија у различитим фазама апоптозе тако што су туморске ћелије обележене са анексином V и пропидијум јодидом. Регистровано је да DE-EDCP значајно повећава проценат апоптотских ћелија и то у касној фази апоптозе и овај ефекат је дозно зависан (Графикон 7). С друге стране, највећи проценат ћелија у раној апоптози детектован је након њиховог излагања цисплатини. Са повећавањем концентрације уочено је да DE-EDCP индукује двоструко већи проценат туморских ћелија

у касној фази апоптозе у поређењу са цисплатином. Подаци из литературе сугеришу да комплекс кога граде платина(IV) и DE-EDCP индукује некрозу, док комплекс платине(II) и DE-EDCP узрокује рану и касну апоптозу у ћелијама хумане линије акутне промијелоцитне леукемије (299).

Прекиди дволанчане ДНК и њена следствена фрагментација су једна од одлика апоптозе. Како би се проценио ефекат DE-EDCP на апоптотску смрт туморских ћелија и у самом ткиву карцинома дојке, примењена је TUNEL метода којом се откривају прекинути ланци ДНК у једру апоптотских ћелија. Уочава се да је DE-EDCP узроковао значајан пораст апоптотских односно TUNEL-позитивних малигних ћелија у самој туморској потки. Уз то, примењено је да је овакав проапоптотски ефекат испитиваног једињења био сличан цисплатини (Графикон 8).

Ћелија поседује софистициран систем који строго регулише апоптозу. Овај систем укључује породицу протеина Bcl-2 која обухвата бројне анти- и про-апоптотске молекуле, и благе промене у њиховој динамичкој равнотежи резултују или инхибицијом или покретањем "суицидалног" програма у ћелији (353, 354). Тако на пример, Вах служи као фацилитатор апоптозе, док с друге стране Bcl-2 је антиапоптотски протеин који неутралише функцију Вах у иницијацији ћелијске смрти (355). Повећана експресија Bcl-2 је документована у многим солидним туморима, укључујући карцином дојке, простате, плућа, желуца и јајника што сугерише на онкогени потенцијал овог протеина (356). С обзиром да естрогени повећавају експресију Bcl-2 у карциному дојке (357), позитивна експресија овог протеина може да укаже на функционалну активност рецептора за естроген код ове врсте тумора (356, 358). С друге стране, смањена експресија проапоптотског молекула Вах у колоректалном карциному, као и у метастаском карциному дојке је удружена са краћим преживљавањем оболелих (359, 360). Супротно, повећање експресије Вах резултује успореним растом карцинома дојке (361). Осим што су укључени у канцерогенезу различитих врста тумора, повећана експресија молекула Bcl-2 и Вах утиче и на ефикасност хемотерапије код карцинома дојке. Сматра се да Bcl-2 индукује повећану хеморезистенцију туморских ћелија, док проапоптотски протеин Вах повећава осетљивост ћелија на антитуморску терапију (359, 362). У актуелној студији је регистровано да у третираним туморским ћелијама 4T1, DE-EDCP значајно смањује

експресију антиапоптоског Bcl-2 и истовремено повећава експресију проапоптоског Вах, како на нивоу протеина тако и на нивоу иРНК (Слика 8 и Графикон 9).

Активација каспаза је финални корак у процесу апоптозе (363). У оквиру породице каспаза, од посебног интереса је активација каспазе-3 која катализује специфичну разградњу многих кључних целуларних протеина што за последицу има ћелијску аутодеструкцију (363). Примећена је повећана експресија активне форме каспазе-3 у третираним туморским ћелијама (Слика 8). Ако се пак пореди експресија овог молекула на нивоу иРНК у туморским ћелијама након излагања са DE-EDCP или цисплатином, учава се да је само DE-EDCP индуковао битан пораст експресије иРНК за каспазу-3. Штавише, експресија иРНК за каспазу-3 је била значајно виша у ћелијама третираним са DE-EDCP него после третмана са цисплатином (Графикон 9). Сматра се да у апоптотској машинерији каспаза-3 представља једну од главних "егзекутора" ћелије (364). Активацијом каспазе-3 покреће се читав сет догађаја који за последицу има "самоубиство" ћелије укључујући активацију ендонуклеаза које разграђују ДНК, и иницирају кондензацију хроматина. Коначан исход свих наведених догађаја је руптура ћелије и формирање апоптотских тела (365). Резултати другог истраживања такође потврђују апоптотски ефекат DE-EDCP на леукемијским ћелијама HL-60 што се огледа у деполаризацији унутрашње мембране митохондрија, екстернализацији фосфатидил серина и фрагментацији ДНК (300). Додатно, показано је да комплекс платине(II) и DE-EDCP покреће апоптозу у овим ћелијама и то тако што активира иницијаторске каспазе, каспазу-8 и каспазу-9 (299).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP повећава осетљивост туморских ћелија на апоптозу што се огледа у способности да смањује експресију антиапоптоског Bcl-2 и повећава експресију проапоптоског протеина Вах. Коначни исход измењеног баланса између ових молекула је повећана пропустљивост митохондријалне мембране што следствено узрокује апоптозу која зависи од каспазе-3.

5.4. DE-EDCP зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази

Заустављање машинерије у G0/G1, S или у G2/M фази ћелијског циклуса, које не само што омета пролиферацију туморских ћелија већ их уводи и у апоптозу, представља заједнички механизам цитотоксичности за многе конвенционалне антиканцерске лекове (366, 367). У актуелној студији је забележено да DE-EDCP повећава заступљеност 4T1 ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса и овај антипролиферативни ефекат је дозно зависан (Графикон 10). Ова акумулација ћелија у G0/G1 фази праћена је смањењем процента туморских ћелија у S и у G2/M фази ћелијског циклуса. Уочава се и да цисплатина у нижој концентрацији остварује сличан ефекат као и DE-EDCP у вишој концентрацији. Добијени налаз сугерише на то да DE-EDCP индукује застој туморских ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса и следствено зауставља припремање енергије и материјала за репликацију ДНК. Другим речима, овакав прекид ћелијског циклуса у G0/G1 фази вероватно је разлог драстичног смањења процента 4T1 ћелија у S и у G2/M фази након третмана са DE-EDCP. Прекид ћелијског циклуса у G0/G1 фази може да иницира повећану осетљивост туморских ћелија на апоптозу (368). Уочено је да је DE-EDCP узроковао повећану заступљеност и ћелија које се налазе у суб-G1 фази, а које представљају фракцију апоптотских ћелија. Ово је интересантно запажање јер је добро познато да су регулација ћелијског циклуса и апоптотоске машинерије кључни у прогресији тумора (369, 370). Познато је да неки антиканцерски лекови као што су цефалохромин или еуфон инхибирају пролиферацију туморских ћелија тако што у њима заустављају ћелијски циклус у G0/G1 фази (371, 372), док палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб функционишу као инхибитори Cdk4/6 и у последњих пар година успешно се користе у лечењу метастатског карцинома дојке код пацијенткиња у постменопаузи (224-226).

Ki-67, као широко коришћени маркер пролиферације ћелија, тесно је повезан са регулацијом ћелијског циклуса али његова улога у овом процесу и даље није довољно расветљена (373). Овај нуклеарни протеин је експримиран у свим активним фазама ћелијског циклуса, изузев у G0 и раној G1 фази (373, 374). Из тог разлога, Ki-67 се користи као прогностички биомаркер и метастатски предиктор у различитим врстама

малигнома људи (375-377). Повећана експресија Ki-67 у ткиву која се региструје након спроведене неоадјувантне терапијске процедуре доводи се у везу са лошијом прогнозом болести, као и са потребом за измену терапијског протокола (378). У овој студији је детектован мањи проценат 4T1 ћелија који исказују Ki-67 након излагања DE-EDCP у односу на нетретиране ћелије, као и на ћелије третиране са цисплатином (Графикон 11). Ова смањена експресија Ki-67 у 4T1 ћелијама које су третиране са DE-EDCP вероватно је резултат заустављања ћелијског циклуса у G0/G1 фази и повећане експресије протеина p16, инхибитора комплекса CDK4/CDK6, што је и претходно забележено у немалигним и малигним ћелијама (379). Уз то, резултати недавно публиковане студије указују да је Ki-67 одговоран за резистенцију малигних ћелија на дејство хемотерапеутике што је последица одржавања нише туморских матичних ћелија (380). Ова сазнања имплицирају да Ki-67 може да буде атрактивна мета у лечењу канцера. Неочекивано, регистрован је и драстичан пораст експресије Ki-67 на туморским ћелијама након третмана са цисплатином (Графикон 11). У складу са претходним налазом, уочено је да DE-EDCP битно редукује експресију Ki-67 и у ткиву карцинома дојке, али није забележена разлика у експресији Ki-67 у туморском ткиву цисплатином третираних и нетретираних мишева (Графикон 12). Налаз повећане процентуалне заступљености туморских ћелија које исказују Ki-67 након третмана са цисплатином *in vitro* је вероватно резултат компензаторне пролиферације која је индукована апоптозом (381). Ову претпоставку подржавају претходно приказани резултати актуелног истраживања који упућују да цисплатина у нижој концентрацији од 31.25 μ M је ефикасна у индукцији апоптозе 4T1 туморских ћелија

Прогресију ћелијског циклуса регулишу три групе протеина: циклини, циклин зависне киназе и инхибитори циклин зависних киназа (382). У наредним експериментима испитиван је механизам задржавања туморских ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса након излагања DE-EDCP. Постоје 2 главне врсте циклина у G1 фази, а то су циклин- D и -E (176). Ови циклини омогућују прогресију ћелијског циклуса кроз G1 фазу и то тако што циклин D интерагује са CDK4 или CDK6 и укључен је у регулацију ране G1 фазе, док циклин E формира комплекс са CDK2 који је неопходан за завршетак G1 и иницирање S фазе (176, 383-385). Повећана експресија циклина E скраћује транзицију туморских ћелија из G1 у S фазу што убрзава ћелијски циклус и резултује непланском ћелијском пролиферацијом, и коначно убрзаним растом тумора (386, 387). Претходно је показано да

су циклин-D1 и -D3 повећано исказани у линијама ћелија карцинома дојке људи, као и у примарним лезијама инвазивног карцинома дојке (388). Уз наведено, у карциному дојке који исказује ErbB2 регистровано је да је експресија циклина D3 много већа у односу на циклин D1, као и да циклин D3 може да компензује губитак циклина D1 код ове врсте тумора (388). Транскрипциони фактор E1AF подстиче прогресију ћелијског циклуса у карциному дојке тако што повећава транскрипцију циклина D3 (389). Показано је да рапамицин индукује прекид ћелијског циклуса у карциному дојке који исказује HER2 у G1 фази и то тако што дестабилизује и последично редукује експресију протеина циклина D3 (390). Након третмана са DE-EDCP или са цисплатином није забележена промена у експресији циклина E у туморским ћелијама 4T1 (Графикон 13А). Међутим, DE-EDCP је значајно смањио проценат туморских ћелија које исказују циклин D3 у поређењу са ћелијама третираним са цисплатином, а нарочито са нетретираним ћелијама (Графикон 13Б). Додатно, за разлику од цисплатине која није утицала на експресију овог молекула на нивоу иРНК, забележено је значајно смањење експресије иРНК за синтезу циклина D3 после третмана са DE-EDCP у односу на нетретиране ћелије (Графикон 13).

С обзиром да редукција активности инхибитора циклин зависних киназа је један од фактора који доприноси непланској пролиферацији, још једна могућа стратегија у инхибицији пролиферације туморске ћелије је индукција експресије ових молекула која би могла да стопа ћелијски циклус у G0/G1 фази и следствено раст тумора (391). Разликују се две породице инхибитора циклин зависних киназа, а то су: 1) породица INK4a специфичних инхибитора CDK (p16, p15, p18 и p19) и 2) породица молекула Cip/Kip коју чине p21, p27, и p57 (370, 392). У актуелном истраживању уочено је да третман са DE-EDCP узрокује значајан пораст процента ћелија које експримирају p16, p21 и p27 (Графикон 14). Ако се пореди ефекат DE-EDCP и цисплатине на експресију инхибитора ћелијског циклуса, запажа се да је способност DE-EDCP да повећа експресију p21 и p27 мања у односу на цисплатину. Познато је да p16 специфично инхибира комплексе које граде CDK4 или CDK6 са циклином D у раној G1 фази ћелијског циклуса (161). За разлику од p16, p21 функционише као универзални инхибитор циклин зависних киназа (393), док p27 блокира формирање или активност комплекса које чине циклин A са CDK2, циклин E са CDK2 или циклин D са CDK4 (161, 394).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP смањује експресију циклина D3 и повећава експресију p16, p21 и p27 што резултује задржавањем ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса, а тиме не само да инхибира пролиферацију туморских ћелија, већ вероватно додатно фацилитира њихову осетљивост на апоптозу.

5.5. DE-EDCP инхибира нисходну каскаду сигналног пута STAT3 у тумору

Молекул STAT3 (енгл. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) припада породици транскрипционих фактора (381, 395). Овај молекул је конститутивно активан у свим подтипovima карцинома дојке, а најчешће код троструко негативних карцинома дојке, односно оних карцинома који не експримирају молекул HER2, као ни рецепторе за естроген и прогестерон (396, 397). Студије које су засноване на генетској и фармаколошкој модулаци активности STAT3 пружиле су убедљив доказ о значајној улози STAT3 у бројним процесима који су критични у прогресији карцинома дојке, укључујући ћелијску пролиферацију, апоптозу, ангиогенезу, антитуморски имунски одговор и метастазирање тумора (398). Из тог разлога, сматра се да је STAT3 један од значајних циљаних мета у терапији канцера. Тако, показано је да смањена активност STAT3 резултује заустављањем ћелијског циклуса у G0/G1 фази и индукцијом апоптозе (399). У актуелном истраживању уочено је да DE-EDCP у 4T1 туморским ћелијама значајно смањује експресију STAT3, на нивоу протеина и информационе РНК, у поређењу са нетретираним или цисплатином третираним ћелијама (Графикон 15 и 16). Резултати ранијег истраживања указују да је посттранскрипцијско "утишавање" протеина STAT3 у 4T1 ћелијама помоћу мале интерферирајуће РНК (енг. *small interfering RNA, siRNA*) за последицу има комплетну блокаду експресије *Twist* протеина и онкопротеина c-Мус, што коначно инхибира раст тумора и успостављање метастаза (400). Сходно томе, чини се да DE-EDCP своју антитуморску активност у карциному дојке остварује између осталог и смањењем експресије STAT3 и то на нивоу протеина и гена.

Претпоставља се да су SOX2 и NANOG кључни протеини нисходне регулације сигналног пута STAT3 у канцеру (401). Молекули SOX2 и NANOG представљају транскрипционе факторе и служе као маркери туморских матичних ћелија (енгл. *cancer*

stem cells, CSCs) (402-405). Такође, сматра се да су SOX2 и NANOG критични фактори у одржавању карактеристика CSCs, као што су способност самообнављања, метастазирања и резистенције на хемиотерапеутике (405, 406). Аберантна експресија протеина NANOG је документована у различитим врстама тумора (407), укључујући карцином дојке (404) и обично је удружена са смањеним преживљавањем оболелих, као и са чешћом појавом рецидива (405, 406). Повећана експресија SOX2 је забележена код лоше диферентованог карцинома дојке и удружена је са лошим исходом болести (408, 409). Уз наведено, експресија SOX2 је инверзној вези са експресијом рецептора за хормоне, естроген и прогестерон код ове врсте тумора. У спроведеној студији уочава се да DE-EDCP, а нарочито цисплатина значајно редукују експресију иРНК за NANOG у 4Т1 малигним ћелијама (Графикон 16). Уз то, експресија иРНК за SOX2 битно снижена у туморским ћелијама након третмана са DE-EDCP или цисплатином у поређењу са нетретираним ћелијама, и примећује се да је њихов ефекат био приближно исти. Редукована експресија гена за ова два транскрипциона фактора неопходних за очување "матичности" ћелија је праћена смањеном експресијом Ki-67 у 4Т1 ћелијама третираним са DE-EDCP што је у сагласности са резултатима претходног истраживања која сугеришу на то да Ki-67 игра значајну улогу у одржавању туморских матичних ћелија (380). *Chen* и сарадници (410) показали су да инхибиција експресије NANOG у ембрионалним матичним ћелијама миша за последицу има повећање процентуалне заступљености како ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса тако и апоптотских ћелија. Недавно је показано да NANOG повећава и пролиферацију фибробласта тако што регулише транскрипцију гена за p27 (411). Редукција експресије SOX2 у ћелијама карцинома панкреаса узрокује инхибицију ћелијског раста тако што зауставља ћелијски циклус у G0/G1 фази и повећава експресију инхибитора циклин зависних киназа, p21 и p27 (412).

Активација транскрипционог фактора STAT3 углавном зависи од фосфорилације ЈАК киназама (енгл. *Janus kinase*). Тако фосфорилисани молекули STAT3 формирају активне димере који се затим концентришу у једру где регулишу транскрипцију циљаних гена (413-415). У складу са претходним налазом да DE-EDCP значајно смањује експресију STAT3 на нивоу протеина и иРНК у туморским ћелијама *in vitro*, забележен је сличан тренд смањења процента туморских ћелија које експримирају фосфорилисану форму STAT3 у ткиву карцинома дојке мишева третираних са DE-EDCP у поређењу са

нетретираним мишевима, мада ово смањење није достигло статистичку значајност (Графикон 17). Резултати скоријег истраживања упућују на то да постранскрипцијско "утишавање" протеина STAT3 у линији ћелија карцинома грлића материце помоћу siRNA резултује смањеном експресијом иРНК за SOX2 и NANOG (401). У складу са свим изнетим, може се констатовати да DE-EDCP инхибира прогресију тумора тако што редукује експресију STAT3 у малигним ћелијама што резултује смањеном експресијом критичних протеина нисходне регулације овог сигналног пута, NANOG и SOX2.

Ћелијска миграција је предуслов за инвазију и метастазирање малигних ћелија (416) и самим тим може бити још једна потенцијална мета у терапији тумора. У складу са тим, у спроведеном истраживању испитиван је и ефекат DE-EDCP на миграциони капацитет туморских ћелија 4Т1 за које је добро познато да имају висок метастатски потенцијал (417). Регистровано је да DE-EDCP, у ниској односно нетоксичној концентрацији (15.63 μ М), ефикасно инхибира миграцију туморских ћелија (Графикон 18). Овакав ефекат на миграторну способност 4Т1 ћелија може се посматрати и у светлу смањене експресије сигналног пута STAT3 под утицајем DE-EDCP. Наиме, подаци из литературе упућују на то да STAT3 игра значајну улогу у инвазији и покретљивости ћелија (418). На пример, комплетна инхибиција експресије STAT3 ограничила је пролифераторну и миграторну способност ћелија карцинома дојке људи MCF-7 (419). Показано је да експресија NANOG и SOX2 такође може утицати на миграцију туморских ћелија. Тако, прекомерна експресија NANOG подстиче миграцију и инвазију MCF-7 ћелија (420). Слично, NANOG регулише миграцију ћелија карцинома јајника (421). Регистровано је да постранскрипцијско "утишавање" протеина SOX2 помоћу siRNA спречава миграцију ћелија карцинома дојке људи MDA-MB-231 (422). Из свега наведеног, може се закључити да DE-EDCP редукује миграцију туморских и то инхибицијом сигналног пута STAT3 који укључује NANOG и SOX2 што представља још један додатни механизам којим DE-EDCP успорава прогресију карцинома дојке.

5.6. DE-EDCP подстиче инфлукс ефективних NKT и NK ћелија у туморску микросредину

Подаци из литературе указују на то да конвенционална хемотерапија, не само што индукује смрт туморских ћелија и/или спречава њихову пролиферацију, већ и успешно кооперира са имунским системом у ерадикацији тумора (423). Генерално, сматра се да хемиотерапеутици могу стимулисати одбрамбене механизме домаћина на два начина, Прво, неки лекови изазивају оне специфичне промене које умирујуће туморске ћелије чине видљивим имунском систему. Друго, неки хемиотерапеутици изазивају пролазну деплецију лимфоцита што је праћено обнављањем пула имунских ћелија, прекидају имуносупресију индуковану тумором и директно или индиректно активирају ефикасне механизме антитуморског имунског одговора (424). Показано је да цисплатина може да подстакне снажан имунски одговор против мишијег меланома тако што повећава заступљеност имунопотентних дендритских ћелија с једне стране и елиминише мијелоидне супресорске ћелије с друге стране (425). У моделу експерименталног карцинома јајника уочено је да примена доксорубицина или цисплатине значајно продужава преживљавање мишева што у великој мери зависи од повећане активности $CD4^+$ Т лимфоцита (426). Цисплатина и паклитаксел у ниској дози синергистички делују и оптимално активирају тумор-специфичне $CD8^+$ Т лимфоцитие на тај начин што индукују секрецију IL-2 и IFN- γ (289). Код мишева који су третирани са цисплатином и 5-флуороурацилом регистрован је повећан инфлукс и помагачких и цитотоксичких Т лимфоцита у туморску микросредину езофагеалног карцинома (291). Деривати платине и дакарбазин стимулишу антитуморску активност NK ћелија тако што на туморским ћелијама повећавају експресију лиганда за активациони рецептор NKG2D што последично појачава туморицидни потенцијал NK ћелија, а повећавају и синтезу IFN- γ (427).

Резултати ранијег истраживања сугеришу да DE-EDCP инхибира продукцију IFN- γ и IL-17 у мононуклеарним ћелијама мишева и пацова *in vitro* (298). Међутим, до сада није испитана улога DE-EDCP у "обликовању" антитуморског имунског одговора. У актуелној студији је показано да DE-EDCP индукује повећан инфлукс ћелија урођене имуности, $CD3^-CD49^+$ NK и $CD3^+CD49^+$ NKT ћелија, у туморску микросредину мишијег карцинома дојке за који је добро познато да је слабо имуногени тумор (Графикон 19). С друге стране,

цисплатина је узроковала умерену акумулацију ових ћелија у туморску микросредину која није достигла статистичку значајност. што не искључује могућност да цисплатина у овом моделу остварује антитуморски ефекат другим (не)имунским механизмима. NK ћелије су ефекторски лимфоцити урођене имуности који заузимају важно место у одбрани од тумора. NK ћелије инфилтришу солидни тумор и тако доприносе повољној прогнози оболелих особа (428). Поред NK ћелија, активирание NKT ћелије су такође укључене у елиминацију туморских ћелија било директно или индиректно ангажовањем других ћелија имунског система (429-431). Недавно је откривена веза између броја тумор-инфилтришућих NKT ћелија и бољег клиничког исхода код оболелих од карцинома главе и врата (432). NKT ћелије брзо реагују на стимулусе и представљају важан извор бројних цитокина и хемокина којима модулира механизме како урођене тако и стечене имуности (433).

Поред тога што повећава инфлукс NKT и NK ћелија у туморску микросредину, добијени подаци указују на то да DE-EDCP утиче и на њихов функционални фенотип. Добро је познато да ове ћелије, а нарочито NK ћелије, директно елиминишу циљане туморске ћелије на најмање два начина, помоћу перфорина и гранзима и ангажовањем рецептора смрти. Рецептор смрти Fas интерагује са својим лигандом, FasL, и ова интеракција индукује тримеризацију рецептора што каскадно активира најпре протеин FADD (енг. *Fas-associated death domain protein*) а затим каспазу-8 која је укључена у покретању апоптозе у циљаној туморској ћелији (434, 435). У спроведеном истраживавању DE-EDCP повећа експресију FasL на NK, али не и на NKT ћелијама, и вероватно на тај начин појачава туморицидни капацитет NK ћелија (Графикон 20 и 21). У прилог овој претпоставци је претходни налаз да третман са DE-EDCP повећава заступљеност апоптотских (TUNEL⁺) туморских ћелија у ткиву карцинома дојке (Графикон 8). Познато је да NKT ћелије могу да директно елиминишу оне туморске ћелије које експримирају молекул CD1d (436). Међутим, постоје налази да 4T1 ћелије минимално експримирају овај молекул (437). Стога, у овом моделу тумора NKT ћелије највероватније нису директно укључене у елиминацију 4T1 ћелија. Међутим, резултати ранијег истраживања сугеришу да NKT ћелије продукују IL-2 којим могу додатно да стимулишу NK ћелије да ефикасно убију и оне туморске ћелије које су резистентне на директну елиминацију NKT ћелијама (438). Када је реч о улози цитотоксичких Т лимфоцита у 4T1

варијанти мишјег карцинома дојке, подаци из литературе су опречни. Док неки аутори описују да су CD8⁺ Т лимфоцити и IFN- γ кључни у ерадикацији 4Т1 ћелија (437), други сматрају да у овом моделу карцинома дојке цитотоксички CD8⁺ Т лимфоцити нису од кључног значаја у антиуморском имунском одговору (323, 439). Ћелије урођене имуности, а нарочито NK ћелије, заузимају централно место у контроли раста и метастазирања слабо имуногене 4Т1 варијанте мишјег карцинома дојке (323, 439). На основу свега наведеног може се констатовати да је ефикасна антитуморска активност DE-EDCP делом последица и значајне стимулације механизма урођене имуности. Другим речима, повећана акумулација тумор-инфилтришућих NK ћелија, као и повећана експресија FasL на NK ћелијама под утицајем DE-EDCP омогућава интеракцију Fas-FasL што следствено узрокује апоптотску смрт туморских ћелија. Иако на основу анализе експресије активационих рецептора није потврђен туморицидни фенотип NKT ћелија, претпоставља се да DE-EDCP подстиче продукцију циктокина у овим ћелијама што вероватно додатно појачава туморицидни капацитет NK ћелија. Све наведено заједно би могло да буде додатни механизам којим DE-EDCP инхибира прогресију карцинома дојке.

Рецептор KLRG1 (енгл. *Killer Cell Lectin-like Receptor G1*) је трансмембрански молекул који припада породици С-типа лектинских рецептора. Овај инхибициони рецептор углавном експримирају NK ћелије, цитотоксички Т лимфоцити и дуго живуће ефеторске NKT ћелије (440, 441). Сматра се да овај молекул регулише хомеостазу и сазревање NK ћелија (442). Регистровано је да је повећана експресија рецептора KLRG1 у корелацији са смањеним пролиферативним капацитетом NK ћелија (442, 443), као и са њиховом повећаном апоптозом (444). У овој студији је забележено да DE-EDCP значајно смањује проценат KLRG1⁺ NKT ћелија, али не и KLRG1⁺ NK ћелија у туморској микросредини (Графикон 20 и 21). Анализа односа инхибициони наспрам активационим рецепторима на NK ћелијама указује да је однос KLRG-1⁺/NKG2D⁺ на NK ћелијама у тумору мишева третираних са DE-EDCP значајно смањен (Графикон 21В) што вероватно сугерише на очуваност цитотоксичног потенцијала NK ћелија код ових мишева. Инхибициони рецептор PD-1 (енгл. *Programmed cell death protein 1*, PD-1) је контролни молекул који регулише и ограничава имунски одговор, а исказан је на површини ефеторских ћелија, укључујући Т лимфоците, NK и NKT ћелије (445-447). Стимулација NKT ћелија α - галактоцерамидом (енгл. *alpha-galactosylceramide*, α -GalCer) индукује

повећану експресију PD-1 на NKT ћелијама што за последицу има анергију оваквих ћелија (448, 449). Забележено је да примена DE-EDCP спречава експресију PD-1 на NKT ћелијама у туморској микросредини и на тај начин задржава респонзивност ових ћелија (Графикон 20). Површински протеин CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*, CTLA-4) је други контролни молекул који игра кључну улогу у "гашењу" имунског одговора и у одржавању имунске хомеостазе (450-453). Експримиран је на тумор-инфилтришућим NK ћелијама мишева и важан је за успостављање толеранције на туморске ћелије (452) У овом истраживању уочава се да је DE-EDCP такође смањио проценат анергичних тумор-инфилтришућих CTLA-4⁺ NKT ћелија (Графикон 20). У експерименталном моделу меланома и неких карцинома дојке показано је да блокада и PD-1 и CTLA-4, као и комбинована блокада оба молекула, је у великој мери ефикасна у терапији тумора (454-456).

На основу добијених резултата може се констатовати да DE-EDCP инхибира прогресију мишјег карцинома дојке што је последица како директних ефеката испитиване супстанце на туморске ћелије тако и појачаног антитуморског имунског одговора. Дакле, DE-EDCP осим што повећава инфлукс, подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност NK и NKT ћелија у туморској микросредини.

5.7. DE-EDCP индукује мање системско оштећење у односу на цисплатину

Цисплатина, као први примењен антуморски лек на бази метала, има широку примену у пракси која је нажалост праћена честим озбиљним нежељеним дејствима, а то су нефротоксичност, хепатотоксичност, ототоксичност, кардиотоксичност и губитак телесне тежине (346). Углавном се излучује урином, а има тенденцију и да се акумулира у бубрезима. Тако, концентрација цисплатине у тубулима бубрега је чак 5 пута већа у односу на њену концентрацију у крви (348, 457). Један од најчешћих нежељених реакција цисплатине је оштећење бубрега. Цисплатина изазива нефротоксичност на дозно зависан начин, и разликују се акутна и хронична нефротоксичност. Ово нежељено дејство не зависи само од дозе примењеног лека, већ и од других фактора као што су пол, старост и хипоалбуминемија (458). Резултати епидемиолошке студије указују на то да инциденца

нефротоксичности изазване цисплатином износи око 20-30% (459). Иако је ово нежељено дејство цисплатине добро познато, механизми нефротоксичности и даље нису у потпуности расветљени (347, 460, 461). Сматра се да цисплатина узрокује оштећења бубрега различитим механизмима, који укључују оксидативни стрес, апоптозу, инфламацију и фибриногенезу. Познато је да цисплатина у високој дози узрокује некрозу ћелија проксималних тубула, док у ниској дози изазива апоптотску смрт ћелија (462). Повећано стварање ROS (енгл. *Reactive oxygen species*) индуковано цисплатином за последицу има директно оштећење структуре тубула. Ово повећано стварање ROS под утицајем цисплатине је резултат активације глукозо-6-фосфат-дехидрогеназе (463), повећане интрацелуларне концентрације калцијума (464) и инхибиције активности ензима антиоксидационе заштите SOD (енгл. *superoxide dismutase*) и глутатион-пероксидазе (465, 466). Коначни исход оштећења тубула је бубрежна инсуфицијенција која се обично манифестује током друге недеље од примене лека. Уз то, висока или понављане ниске дозе цисплатине могу погоршати или узроковати ирверзибилну бубрежну инсуфицијенцију (467,468).

Поред тога што је забележен очигледан антитуморски ефекат, уочава се да се DE-EDCP у терапијској дози од 10 mg/kg (укупно 10 доза) добро толерише *in vivo* у односу на цисплатину која је примењена у дози од 3 mg/kg (укупно 9 доза) (Графикон 22 и 23). Регистровано је да DE-EDCP индукује значајно мањи губитак телесне масе у односу на цисплатину. Другим речима, мишеви који су били подвргнути третману са цисплатином изгубили су око 22% своје телесне масе, за разлику од мишева третираних DE-EDCP код којих је губитак износио око 10% у поређењу са групом нетретираних мишева (Графикон 22). Нефротоксичност ефективне терапијске дозе DE-EDCP је процењена одређивањем концентрације урее и креатинина у серуму. За разлику од цисплатине која је индуковала битан пораст, концентрација креатинина и урее је неизмењена након примене DE-EDCP у поређењу са нетретираним животињама (Графикон 23) што упућује на то да испитивано једињење не изазива оштећење бубрега. Овакво одсуство нефротоксичности може бити последица хемијске структуре DE-EDCP. Познато је да цисплатина, хемиотерапеутик на бази метала, има ниску стопу излучивања и следствено се дуже задржава у организму, чиме постиже дуготрајне ефекте, а између осталог може да изазове и нефротоксичност (344-348). Међутим, фармакокинетичка својства DE-EDCP и даље нису позната.

Претпоставља се да DE-EDCP, због своје органске хемијске структуре, прогресивно се не акумулира у ћелијама што резултује потенцијално мањим нежељеним ефектима. На основу добијених резултата може се закључити да DE-EDCP не индукује оштећење бубрега и да изазива мањи губитак телесне масе у односу на цисплатину што имплицира да је испитивано једињење релативно безбедно за системску примену.

6. Закључци

На основу анализе добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. DE-EDCP показује туморицидни потенцијал на све тестиране линије туморских ћелија: хуманог карцинома дојке (MDA-MB-231 и MDA-MB-468), мишјег карцинома дојке (4T1) и мишјег меланома (B16-F10) и овакав потенцијал је сличан референтном хемиотерапутику
2. Мишеви третирани са DE-EDCP су релативно отпорни на прогресију карцинома дојке и меланома
3. Директно дејство DE-EDCP на туморске ћелије има највећи удео у антитуморској активности испитиване супстанце и огледа се у способности да индукује апоптозу и да инхибира прогресију ћелијског циклуса
4. DE-EDCP у туморским ћелијама смањује експресију антиапоптотског Bcl-2 и повећава експресију проапоптотског протеина Вах што следствено узрокује активацију ефекторске каспазе-3 и апоптозу
5. DE-EDCP повећава експресију p16, p21 и p27 и истовремено редукује експресију циклина D3 и Ki-67 у малигним ћелијама што за крајњу последицу има заустављање ћелијског циклуса у G0/G1 фази
6. DE-EDCP редукује малигни потенцијал туморских ћелија тако што инхибира нисходну каскаду сигналног пута STAT3 која укључује SOX2 и NANOG
7. DE-EDCP успорава миграцију метастатских туморских ћелија
8. DE-EDCP стимулише механизме урођене имуности тако што подстиче туморицидни фенотип и задржава респонзивност НК и NKT ћелија у туморској микросредини
9. DE-EDCP показује мању токсичност у односу на цисплатину

7. Литература

1. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev* 1999; 99: 2201-3.
2. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2006; 1(1): 1-22.
3. Sadler PJ, Li H, Sun H. Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. *Coord Chem Rev* 1999; 185-186: 689-709.
4. Kaim, W, Schwederski, B. *Bioinorganic chemistry: Inorganic element in the chemistry of life*, Wiley: Stuttgart, 1993; 363-384.
5. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965; 205: 698-699.
6. Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds - a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222: 385-386.
7. Sakurai H, Kojima Y, Yoshikawa Y, Kawabe K, Yasui H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord Chem Rev.* 2002; 226: 187-198.
8. Li H, Sun H. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16(1-2): 74-83.
9. Ali H, van Lier JE. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev.* 1999; 99: 2379-2450.
10. Louie AY, Meade TJ. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem Rev.* 1999; 99: 2711-2734.
11. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* 1999; 99: 2269-2292.
12. Grunicke H, Doppler W, Helliger W, Hermann BJ, Hofmann J, Lindner H, Puschendorf B. Tumor biochemistry as basis for advances in tumor chemotherapy. *Arch Geschwulstforsch.* 1986; 56(3): 193-201.
13. Zhukova OS, Dobrynin IaV. Current results and perspectives of the use of human tumor cell lines for antitumor drug screening. *Vopr Onkol.* 2001; 47: 706-9.
14. Kauffman G. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev.* 2010; 54(4): 250.

15. Rosenberg B, Van Camp L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res.* 1970; 30: 1799-1802.
16. Kociba R, Sleight SD, Rosenberg B. Inhibition of Dunning ascitic leukemia and Walker 256 carcinosarcoma with cisdiamminedichloroplatinum (NSC-119875). *Cancer Chemother. Rep.* 1970; 54: 325-328.
17. Galanski M. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006; 1: 285-295.
18. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008; 6(1): 1-18.
19. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park).* 2009; 23(6): 488-496.
20. Ali I, Wani W, Saleem K, Haque A. Platinum Compounds: A Hope for Future Cancer Chemotherapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2013; 13: 296-306.
21. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7265-7279.
22. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2467-98.
23. Yang XL, Wang AH. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther.* 1999; 83(3): 181-215.
24. Timerbaev AR, Hartinger CG, Aleksenko SS, Keppler BK. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology. *Chem Rev.* 2006; 106: 2224-2248
25. Koberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1806: 172-182.
26. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry.* 1985; 24(3): 707-713.
27. Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]⁽²⁺⁾-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(25): 5846-5851.

28. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 645-662.
29. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4): 307-2.
30. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52(12): 1855-1865.
31. Armand JP, Bolgie V, Raymond E, Fizazi K, Faivre S, Ducreux, M. Oxaliplatin in colorectal cancer: an overview. *Semin.Oncol.* 2000; 27: 96-104.
32. Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin. Oncol.* 2002; 29: 11-20.
33. Alberto EM, Lucas MFA, Pavelka M, Russo N. The secondgeneration anticancer drug nedaplatin: a theoretical investigation on the hydrolysis mechanism. *J Phys Chem B.* 2009; 113: 14473-14479.
34. Van Meerten E, Eskens FA, van Gameren EC, Doorn L, van der Gaast A. First-line treatment with oxaliplatin and capecitabine in patients with advanced or metastatic oesophageal cancer: a phase II study. *Br J Cancer.* 2007; 96: 1348–1352.
35. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: Novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 2075-2094.
36. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010; 39:8113-8127.
37. Nafees M, Zijian G. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Current opinion in chemical biology.* 2014; 19: 144-153.
38. Hamilton G, Olszewski U. Picoplatin pharmacokinetics and chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Drug Evaluations.* 2013; 9 (10): 1381-1390.
39. Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues, Satraplatin and picoplatin. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2007; 16: 1009-1021.

40. Welink J, Boven E, Ver morken JB, Gall HE, Vijgh WJF. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lobaplatin (D-19466) in patients with advanced solid tumors, including patients with impaired renal or liver function. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 2349-2358.
41. Lee JW, Park JK, Lee SH, Kim SY, Cho YB, Kuh HJ. Antitumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs.* 2006; 17: 377-384.
42. Petrelli F, Barni S, Bregni G, de Braud F, Di Cosimo S. Platinum salts in advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 160(3): 425-437.
43. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev.* 2004; 30(1): 53-81.
44. Chen X, Lu P, Wu Y, Wang DD, Zhou S, Yang SJ, Shen HY, Zhang XH, Zhao JH, Tang JH. MiRNAs-mediated cisplatin resistance in breast cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37(10): 12905-12913.
45. McCutcheon S, Cardoso F. Challenges in optimizing care in advanced BC patients: results of an international survey linked to the ABC1 consensus conference. *Breast.* 2015; 24: 623-629.
46. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist.* 2011; 16(Suppl 1): 61-70.
47. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011; 5(1): 5-23.
48. Schnitt J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol.* 2010; 23: 6-4.
49. Geyer C, Rodrigues N, Weigelt B, Reis-Filho S. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol.* 2012; 19: 39-53.
50. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009; 11: S11.
51. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360: 790-800.

52. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol.* 2008; 61(5): 553-60.
53. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(8): 1275-81.
54. Harris EER. Precision Medicine for Breast Cancer: The Paths to Truly Individualized Diagnosis and Treatment. *Int J Breast Cancer.* 2018; 2018: 4809183.
55. Porter K, Rosenzweig MQ. Current and Emerging Therapies for HER2-Positive Women With Metastatic Breast Cancer. *J Adv Pract Oncol.* 2017; 8(2):164-168.
56. Kolaric K, Roth A. Phase II clinical trial of cis-dichlorodiammine platinum (cis-DDP) for antitumorogenic activity in previously untreated patients with metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1983; 11: 108-112.
57. Sledge Jr GW, Loehrer PJ, Sr BJ, Roth LH. Cisplatin as firstline therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1988; 6: 1811-1814.
58. Yap HY, Salem P, Hortobagyi GN, Bodey GP Sr, Buzdar AU, Tashima CK, Blumenschein GR. Phase II study of cis-dichlorodi - a mineplatinum(ii) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rep.* 1978; 62: 405-408.
59. Ostrow S, Egorin M, Aisner J, Bachur N, Wiernik PH. High-dose cis-diamminedichloro-platinum therapy in patients with advanced breast cancer: pharmacokinetics, toxicity, and therapeutic efficacy. *Cancer Clin Trials.* 1980; 3: 23-27.
60. Forastiere AA, Hakes TB, Wittes JT, Wittes RE. Cisplatin in the treatment of metastatic breast carcinoma: a prospective randomized trial of two dosage schedules. *Am J Clin Oncol* 1982; 5: 243-247.
61. Martino S, Samal BA, Singhakowinta A, Yoshida S, Mackenzie M, Jain J, Vaitkevicius VK: A phase II study of cis-diamminedichloroplatinum II for advanced breast cancer. Two dose schedules. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1984; 108: 354-356.
62. Bajorin D, Bosl GJ, Fein R. Phase I trial of escalating doses of cisplatin in hypertonic saline. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 1589-1593.

63. Ramnath N, LoRusso P, Simon M, Martino S. Phase II evaluation of cisplatin and WR2721 for refractory metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1997; 20: 368-372.
64. Shamseddine AI, Farhat FS. Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer. *Chemotherapy*. 2011; 57(6): 468-487.
65. Frasci G, Comella P, D'Aiuto G, Budillon A, Barbarulo D, Thomas R, Capasso I, Casaretti R, Daponte A, Caponigro F, Gravina A, Maiorino L, Carateni G, Gentile A, Comella G. Weekly paclitaxel-cisplatin administration with G-CSF support in advanced breast cancer. A phase II study. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 49: 13-26.
66. Hsu C, Huang CS, Chao TY, Lu YS, Bu CF, Chen MM, Chang KJ, Cheng AL. Phase II trial combining paclitaxel with 24-hour infusion cisplatin for chemotherapy-naive patients with locally advanced or metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2002; 95: 2044-2050.
67. Maiche AG, Jekunen AP, Kaleva-Kerola J, Blanco Sequeiros G. High response rate with a lower dose of paclitaxel in combination with cisplatin in heavily pretreated patients with advanced breast carcinoma. *Cancer*. 2000; 88: 1863-1868.
68. Rosati G, Riccardi F, Tucci A, De Rosa P, Pacilio G. A phase II study of paclitaxel/cisplatin combination in patients with metastatic breast cancer refractory to anthracyclinebased chemotherapy. *Tumori*. 2000; 86: 207-210.
69. Ray-Coquard I, Biron P, Bachelot T, Guastalla JP, Catimel G, Merrouche Y, Droz JP, Chauvin F, Blay JY. Vinorelbine and cisplatin (CIVIC regimen) for the treatment of metastatic breast carcinoma after failure of anthracycline- and/or paclitaxel-containing regimens. *Cancer*. 1998; 82: 134-140.
70. Shamseddine AI, Taher A, Dabaja B, Dandashi A, Salem Z, El Saghir NS. Combination cisplatin-vinorelbine for relapsed and chemotherapy-pretreated metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1999; 22: 298-302.
71. Gunel N, Akcali Z, Yamac D, Onuk E, Yilmaz E, Bayram O, Tekin E, Coskun U. Cisplatin plus vinorelbine as a salvage regimen in refractory breast cancer. *Tumori*. 2000; 86: 283-285.
72. Remick SC, Chmura M, Bromberg C, Sporn J, Healey B, Hilstro J, DeConti RC, Horton J, Ruckdeschel JC, Harper GR: Concurrent 72- hour continuous infusion of etoposide and cisplatin in metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*. 1996; 19: 125-131.

73. Fried G, Stein ME, Haim N. Clinical activity of cisplatin and prolonged oral administration of etoposide in previously treated, anthracycline-resistant, metastatic breast cancer patients: a phase II study. *Med Pediatr Oncol.* 2000; 34: 10-13.
74. Braybrooke JP, Levitt NC, Joel S, Davis T, Madhusudan S, Turley H, Wilner S, Harris AL, Talbot DC. Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase II α expression. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4682-4688.
75. Icli F, Akbulut H, Uner A, Yalcin B, Baltali E, Altinbas M, Coskun S, Komurcu S, Erkisi M, Demirkazik A, Senler FC, Sencan O, Buyukcelik A, Boruban C, Onur H, Zengin N, Sak SD. Cisplatin plus oral etoposide (EoP) combination is more effective than paclitaxel in patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines: a randomized phase III trial of Turkish Oncology Group. *Br J Cancer.* 2005; 92: 639-644.
76. Deltetto F, Durando A, Camanni M, Pesola D, Sberveglieri M, Arese P, Massobrio M. Carboplatin plus etoposide regimen in advanced breast cancer. A phase II study. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1997; 18: 185-187.
77. van der Gaast A, Bontenbal M, Planting AS, Kok TC, Splinter TA. Phase II study of carboplatin and etoposide as a first line regimen in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 1994; 5: 858-860.
78. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene.* 1994; 9: 1829-1838.
79. Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC, Lopez-Larraza DM, Shawver LK, Hurd SD, Stewart SJ. p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: Association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res.* 1994; 54: 3758-3765.
80. Nabholz JM, Slamon D. New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (herceptin). *Semin Oncol.* 2001; 28: 1-12.
81. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, Koo IC, Sherman BM, Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2011; 364: 205-214.

82. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN, Friedlander M, Arun B, Loman N, Schmutzler RK, Wardley A, Mitchell G, Earl H, Wickens M, Carmichael J. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010; 376: 235-244.
83. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P, Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 17079–17084.
84. Evers B, Drost R, Schut E, de Bruin M, van der Burg E, Derksen PW, Holstege H, Liu X, van Drunen E, Beverloo HB, Smith GC, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Jonkers J. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 3916-3925.
85. Yang J, Manson DK, Marr BP, Carvajal RD. Treatment of uveal melanoma: where are we now? *Ther Adv Med Oncol*. 2018; 10: 1758834018757175.
86. Singh S, Zafar A, Khan S, Naseem I. Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. *Life Sci*. 2017; 174: 50-58.
87. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010; 23: 746-759.
88. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969; 29(3):705-727.
89. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(31): 8048-8056.
90. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model Predicting Survival in Stage I Melanoma Based on Tumor Progression. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81(24): 1893-1904.

91. Abramova L, Slingluff CL Jr, Patterson JW. Problems in the interpretation of apparent "radial growth phase" malignant melanomas that metastasize. *J Cutan Pathol.* 2002; 29(7): 407-414.
92. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635-3648.
93. Glover D, Glick JH, Weiler C, Fox K, Guerry D. WR-2721 and high-dose cisplatin: An active combination in the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 574-578.
94. Evans LM, Casper ES, Rosenbluth R. Phase II trial of carboplatin in advanced malignant melanoma. *Cancer Treat Rep.* 1987; 71: 171-172.
95. Rao RD, Holtan SG, Ingle JN, Croghan GA, Kottschade LA, Creagan ET, Kaur JS, Pitot HC, Markovic SN. Combination of paclitaxel and carboplatin as second-line therapy for patients with metastatic melanoma. *Cancer.* 2006; 106: 375-382.
96. Del Prete SA, Maurer LH, O'Donnell J, Forcier RJ, LeMarbre P. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat Rep.* 1984; 68: 1403-1405.
97. Lattanzi SC, Tosteson T, Chertoff J, Maurer LH, O'Donnell J, LeMarbre PJ, Mott L, DelPrete SA, Forcier RJ, Ernstoff MS. Dacarbazine, cisplatin and carmustine, with or without tamoxifen, for metastatic melanoma: 5-year follow-up. *Melanoma Res.* 1995; 5: 365-369.
98. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2745-2751.
99. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer.* 1989; 64:2024-2029.

100. Legha SS, Ring S, Bedikian A, Plager C, Eton O, Buzaid AC, Papadopoulos N. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. *Ann Oncol.* 1996; 7: 827-835.
101. Melino G. The Sirens' song. *Nature.* 2001; 412(6842): 23.
102. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005; 12 (Suppl 2): 1463-1467.
103. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differ.* 2009; 16(1): 3-11.
104. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 37-4.
105. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006; 20(1): 1-15.
106. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1757: 1371-1387.
107. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Mocarski ES. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem.* 2013; 288(43): 31268-31279.
108. He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(50):20054-20059.
109. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000; 1: 489-495.
110. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005; 1: 112-119.

111. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 2008; 4: 313-321.
112. Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, Vandenabeele P. Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ.* 2002; 9: 981-994.
113. Ohgoh M, Shimizu H, Ogura H, Nishizawa Y. Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem.* 2000; 75(3): 925-933.
114. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 931-933.
115. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* 2005; 579(15): 3287-3296.
116. Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med.* 2008; 8: 207-220.
117. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 99-163.
118. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257.
119. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3-11.
120. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 1995; 5(1): 21-26.
121. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death & Differentiation.* 2012; 19(5): 735-742.
122. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000; 157(5): 1415-1430.

123. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009; 284(33): 21777-21781.
124. Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36(Pt 1): 1-9.
125. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012; 45(6): 487-498
126. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
127. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995; 82(3): 349-352.
128. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005; 54(7): 1024-1033.
129. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology.* 2013; 87(7): 1157-1180.
130. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology.* 2013; 14(1): 32.
131. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 2015; 1219: 1-9.
132. Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol.* 2003; 15(3): 167-176.
133. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495–516.
134. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10): 735-747.
135. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004; 167(3): 457-468.

136. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998; 391(6662): 96-99.
137. Jacquemin G, Margiotta D, Kasahara A, Bassoy EY, Walch M, Thiery J, Lieberman J, Martinvalet D. Granzyme B-induced mitochondrial ROS are required for apoptosis. *Cell Death Differ*. 2015; 22(5): 862-874.
138. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(6): 401-409.
139. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26(9): 1324-1337.
140. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(1): C45-51.
141. Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem*. 2014; 115: 632-640.
142. Yoshihide T, Shigeomi S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 2007; 12: 835-840.
143. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007; 21(22): 2861-2873.
144. Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 1): 7-18.
145. Massey A, Kiffin R, Cuervo AM. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(12): 2420-2434.
146. Saftig P, Beertsen W, Eskelinen EL. LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation. *Autophagy*. 2008; 4(4): 510-512.
147. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793(9): 1516-1523.
148. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008; 4: 313-332.
149. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*. 2008; 15: 1153-1162.

150. Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*. 2007; 131: 966-979.
151. Le Bot N. Entosis: cell death by invasion. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 1346.
152. Grossmann J. Molecular mechanisms of 'detachment-induced apoptosis Anoikis' Apoptosis. 2002; 7: 247-260.
153. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4: 552–556.
154. Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 14376-14381.
155. Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*. 2000; 38: 31-40.
156. Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe*. 2007; 2: 147-159.
157. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1999; 39: 295-312.
158. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transition. *Journal of Cell Science*. 2012; 125: 4703-4711.
159. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 1995; 11: 211-219.
160. Kaldis P, Russo AA, Chou HS, Pavletich NP, Solomon MJ. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol Biol Cell*. 1998; 9(9): 2545-2560.
161. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12):1501-1512,
162. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005; 23(36): 9408-9421.

163. Pardee AB. A restriction point control for normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71: 1286-1290.
164. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1: 222-231.
165. Elledge SJ, Harper JW. The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1377: M61-M70.
166. Ford HL, Pardee AB. The S-phase: Beginning, middle, and end—A perspective. *J Cell Biochem*. 1998; 30(suppl 31): 1-7.
167. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG Jr, Livingston DM. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*. 1994; 78(1):161-172.
168. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnicka-Worms H. Cyclin A/Cdk2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 8420-8431.
169. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks SK, Taya Y, Nishimura S, Okuyama A. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene*. 1995; 10(2): 229-236.
170. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003; 36(3): 165-175.
171. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggresome accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(46): 27986-28000.
172. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013; 14(5): 297-306.
173. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(11): 785-797.
174. Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*. 2005; 16(3): 311-321.
175. Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, Kirk J, Gannon J, Hunt T. Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 4344-4349.

176. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Gelman IH, Sudol M, eds. *Genes & Cancer*. 2010; 1(11): 1124-1131.
177. Socinski MA. Cytotoxic chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: A review of standard treatment paradigms. *Clin. Cancer Res*. 2004; 10: 4210-4214.
178. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006; 444: 633-637.
179. Alimbetov D, Askarova S, Umbayev B, Davis T, Kipling D. Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6): pii: E1690.
180. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461: 1071-1078.
181. Silverman AP, Bu W, Cohen SM, Lippard SJ. 2.4-Å crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(amine)(cyclohexylamine)]²⁺ bound to a dodecamer DNA duplex. *J Biol Chem*. 2002; 277(51): 49743-49749.
182. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 150845.
183. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015; 112: 957-962.
184. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55(3):178-194.
185. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(6): 401-410.
186. Rosato RR, Almenara JA, Kolla SS, Maggio SC, Coe S, Giménez MS, Dent P, Grant S. Mechanism and functional role of XIAP and Mcl-1 down-regulation in flavopiridol/vorinostat antileukemic interaction. *Molecular Cancer Therapy* 2007; 6: 692-702.

187. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 20): 4077-4085.
188. Hoe KK, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 217-236.
189. Wang P, Zhuang L, Zhang J, Fan J, Luo J, Chen H, Wang K, Liu L, Chen Z, Meng Z. The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Mol Oncol.* 2013; 7(3): 334-345.
190. Huang G, Nishimoto K, Zhou Z, Hughes D, Kleinerman ES. miR-20a encoded by the miR-17-92 cluster increases the metastatic potential of osteosarcoma cells by regulating Fas expression. *Cancer Res.* 2012; 72: 908-916.
191. Li Z, Huang H, Chen P, He M, Li Y, Arnovitz S, Jiang X, He C, Hyjek E, Zhang J. miR-196b directly targets both HOXA9/MEIS1 oncogenes and FAS tumour suppressor in MLL-rearranged leukaemia. *Nat Commun.* 2012; 2: 688.
192. Shaffiey F, Cross E, Sathyanarayana P. Mir-590 is a novel STAT5 regulated oncogenic miRNA and targets FasL in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013; 122: 3811-3811.
193. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016; 8(4): 603-619.
194. Banerji V, Gibson SB. Targeting metabolism and autophagy in the context of haematologic malignancies. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012: 595976.
195. Ishdorj G, Li L, Gibson SB. Regulation of autophagy in hematological malignancies: role of reactive oxygen species. *Leuk Lymphoma.* 2012; 53: 26-33.
196. Sishi BJ, Bester DJ, Wergeland A, Loos B, Jonassen AK, van Rooyen J, Engelbrecht AM. Daunorubicin therapy is associated with upregulation of E3 ubiquitin ligases in the heart. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237: 219-226.
197. Sun WL, Chen J, Wang YP, Zheng H. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy.* 2011; 7: 1035-1044.

198. Di X, Shiu RP, Newsham IF, Gewirtz DA. Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin. *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 1139-1150.
199. Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004; 18(11): 1272-1282.
200. Kallio A, Zheng A, Dahllund J, Heiskanen KM, Harkonen P. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis.* 2005; 10(6): 1395-1410.
201. Zheng A, Kallio A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signalregulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology.* 2007; 148(6): 2764-2777.
202. Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of noncanonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008; 15(8): 1318-1329.
203. Li L, Han W, Gu Y, Qiu S, Lu Q, Jin J, Luo J, Hu X. Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res.* 2007; 67(10): 4894-4903.
204. Han W, Li L, Qiu S, Lu Q, Pan Q, Gu Y, Luo J, Hu X. Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(5): 1641-1649.
205. Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(5): 1552-1564.
206. Malhotra V, Perry MC. Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biol Ther.* 2003; 2(4 Suppl 1) :S2-4.
207. Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM. Cell cycle control and cancer chemotherapy. *J Cell Biochem.* 1994; 54(4): 440-452.
208. Oronsky BT, Reid T, Knox SJ, Scicinski JJ. The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology.* 2012; 5(4): 226-229.

209. Martino E, Casamassima G, Castiglione S, Cellupica E, Pantalone S, Papagni F, Rui M, Siciliano AM, Collina S. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018; 28(17): 2816-2826.
210. Zehnder A, Graham J, Antonissen G. Update on Cancer Treatment in Exotics. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2018; 21(2): 465-509.
211. Hartwell LH, Kastan MB: Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994; 266: 1821-1828.
212. Harper J, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 1996; 6: 56-64.
213. Shahjehan WA, Laird P, DeMeester T. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Ann Surg*. 2001; 234:10-20.
214. Sutherland R, Musgrove E. Cyclin D1 and mammary carcinoma: New insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res*. 2002; 4:14-17.
215. Buckley M, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove EA, Sutherland RL. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*. 1993; 8: 2127-2133.
216. Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, Worland PJ. Potent inhibition of cdc2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 201: 589-595.
217. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56 (13): 2973-2978.
218. Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia cell lines. *Blood*. 1997; 90:4307-4312.
219. Byrd JC, Shinn C, Waselenko JK, Fuchs EJ, Lehman TA, Nguyen PL, Flinn IW, Diehl LF, Sausville E, Grever MR. Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence of functional p53. *Blood*. 1998; 92(10): 3804-3816.
220. Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, Albanese C, Sausville EA, Senderowicz AM. Down-regulation of cyclin D1 by transcriptional

- repression in MCF-7 human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Res.* 1999; 59(18): 4634-4641.
221. Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C.. A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitin), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer.* 2007; 96(1): 29-37.
222. Kim EH, Kim SU, Shin DY, Choi KS. Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene.* 2004; 23(2): 446-456.
223. Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. Phase I evaluation of seliciclib (*R*-roscovitin), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer.* 2010; 46(18): 3243-3250.
224. Dhillon S. Palbociclib: first global approval. *Drugs.* 2015; 75(5): 543-551.
225. Infante JR, Cassier PA, Gerecitano JF, Witteveen PO, Chugh R, Ribrag V, Chakraborty A, Matano A, Dobson JR, Crystal AS, Parasuraman S, Shapiro GI. A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(23) :5696-5705.
226. Sanchez-Martinez C, Gelbert LM, Shannon H, De Dios A, Staton BA, Ajamie RT, Sawada G, Wishart G, Raub T. Abstract B234: LY2835219, A potent oral inhibitor of the cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) that crosses the blood-brain barrier and demonstrates *in vivo* activity against intracranial human brain tumor xenografts. International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics; 2011 Nov 12-16; San Francisco, CA. Philadelphia (PA): AACR; *Mol Cancer Ther* 2011; 10(11 Suppl): Abstract nr B234.
227. Takahashi I, Saitoh Y, Yoshida M. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C: Purification, physico-chemical properties, structural determination and biological activities. *J Antibiot.* 1989; 42(4): 571-576.

228. Asiedu C, Biggs J, Lilly M, Kraft AS. Inhibition of leukemic cell growth by the protein kinase C activator bryostatin-1 correlates with the dephosphorylation of cyclin-dependent kinase 2. *Cancer Res.* 1995; 55(17): 3716-3720.
229. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6(1): 24-37.
230. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007; 117(5): 1137-1146.
231. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3(11): 991-998.
232. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-Driven Evolution of Immunosuppressive Networks during Malignant Progression. *Cancer Res.* 2006; 66(11): 5527-5536.
233. Hanahan, D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012; 21(3): 309-322.
234. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23(11): 549-555.
235. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 451-483.
236. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5): 1065-1073.
237. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(5): 1105-1109.
238. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56(20): 4625-4629.
239. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7(5): 704-710.

240. Vujanovic NL, Basse P, Herberman RB and Whiteside TL. Antitumor Functions of Natural Killer Cells and Control of Metastases. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 1996; 9: 394-408.
241. Cooper, MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22(11): 633-640.
242. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol.* 2002; 32(2): 1205-1211.
243. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 2008; 9(5): 495-502.
244. Cheent K, Khakoo SI. Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology.* 2009; 126(4): 449-457.
245. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo A, Fremont D, Yokoyama W. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *PNAS.* 2002; 99(13): 8826-8831.
246. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994; 265(5171): 528-530.
247. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicitydependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J.* 1995; 14(22): 5579-5588.
248. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol.* 2003; 195(3): 346-355.
249. Roda JM, Parihar R, Carson WE, III. CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells. *J Immunol.* 2005; 175(3):1619-1627.
250. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Science.* 1995; 268(5212): 863-865.

251. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 297-336.
252. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol.* 1999; 163(9): 4647-4650.
253. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- γ Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol.* 2007; 178(9): 5899-5911.
254. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, Bossi G, Salio M, Denkberg G, Reddington F, Tarlton A, Reddy BG, Schmidt RR, Reiter Y, Griffiths GM, van der Merwe PA, Besra GS, Jones EY, Batista FD, Cerundolo V. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med.* 2007; 204(5): 1131-1144.
255. Teng MWL, Westwood JA, Darcy PK, Sharkey J, Tsuji M, Franck RW, Porcelli SA, Besra GS, Takeda K, Yagita H, Kershaw MH, Smyth MJ. Combined natural killer T-cell based immunotherapy eradicates established tumors in mice. *Cancer Res.* 2007; 67(15): 7495-7504.
256. Hayakawa Y, Rovero S, Forni G, Smyth MJ. α -galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis. *PNAS.* 2003; 100(16): 9464-9469.
257. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest.* 2006; 86(3): 231-245.
258. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008; 133(5): 775-787.
259. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. Foxp3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(7): 490-500.
260. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016; 28(8): 401-409.

261. Togashi Y, Nishikawa H. Regulatory T cells: molecular and cellular basis for immunoregulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017; 410: 3-27.
262. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N. TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004; 172(2): 834-842.
263. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 2003; 63(15): 4516-4520.
264. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 172(8): 4676-4680.
265. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer.* 2005; 5(4): 263-274.
266. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo MP. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res.* 2005; 65(8): 3437-3446.
267. Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2018; 1417(1): 104-115.
268. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, Solary E, Le Cesne A, Zitvogel L, Chauffert B. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T-cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(5): 641-648.
269. Liu P, Jaffar J, Hellstrom I, Hellstrom KE. Administration of cyclophosphamide changes the immune profile of tumor-bearing mice. *J Immunother.* 2010; 33(1): 53-59.
270. Doloff JC, Waxman DJ. VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res.* 2012; 72(5): 1103-1115.
271. Khallouf H, Marten A, Serba S, Teichgraber V, Buchler MW, Jager D, Schmidt J. 5-Fluorouracil and interferon-alpha immunochemotherapy enhances immunogenicity of murine pancreatic cancer through upregulation of NKG2D ligands and MHC class I. *J Immunother.* 2012; 35(3): 245-253.

272. Riccardi C, Santoni A, Barliozzari T, Pucceti P, Herberman RB. In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int. J. Cancer* 1980; 25(4): 475-486.
273. Wiltrout RH, Herberman RB, Zhang SR, Chirigos MA, Ortaldo JR, Green KM Jr, Talmadge JE. Role of organ-associated NK cells in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. *J Immunol.* 1985; 134(6): 4267-4275.
274. Gorelik E, Wiltrout RH, Okumura K, Habu S, Herberman RB. Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* 1982; 30(1): 107-112.
275. Hanna N, Burton RC. Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo. *J Immunol.* 1981; 127(5): 1754-1758.
276. Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Zemelka M, Ptak W. Influence of cyclophosphamide and its metabolic products on the activity of peritoneal macrophages in mice. *Pharmacol Rep.* 2009; 61(3): 550-557.
277. Buhtoiarov IN, Sondel PM, Wigginton JM, Buhtoiarova TN, Yanke EM, Mahvi DA, Rakhmievich AL. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. *Immunology.* 2011; 132(2): 226-239.
278. Potapov SL, Korman DB, Shamaev VI, Ershova RB, Makarov OV. Sensitivity of clonogenic cells of human ovarian ascitic cancer to antitumor drugs. *Arch Geschwulstforsch.* 1988; 58(2): 99-104.
279. Park S, Kang S, Chen X, Kim EJ, Kim J, Kim N, Kim J, Jin MM. Tumor suppression via paclitaxel-loaded drug carriers that target inflammation marker upregulated in tumor vasculature and macrophages. *Biomaterials.* 2013; 34(2): 598-605.
280. Javeed A, Ashraf M, Riaz A, Ghafoor A, Afzal S, Mukhtar MM. Paclitaxel and immune system. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 38(4): 283-290.
281. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher W, Wadhvani N, Keil S, Junaid S, Rugo H, Hwang ES, Jirström K, West B, Coussens L. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011; 1: 54-67.

282. Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, Bell-McGuinn KM, Zabor EC, Brogi E, Joyce JA. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev.* 2011; 25(23): 2465-2479.
283. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL, Gress RE. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood.* 1994; 84(7): 2221-2228.
284. Wijayahadi N, Haron MR, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *J Chemother.* 2007; 19(6): 716-723.
285. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 2002; 62(8): 2353-2358.
286. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(18): 6713-6721.
287. Shebzukhov YV, Koroleva EP, Khlgatian SV, Lagarkova MA, Meshcheryakov AA, Lichinitser MR, Karbach J, Jager E, Kuprash DV, Nedospasov SA. Humoral immune response to thymidylate synthase in colon cancer patients after 5-FU chemotherapy. *Immunol Lett.* 2005; 100(1): 88-93.
288. Kim JE, Jang MJ, Lee JI, Chung YH, Jeong JH, Hung CF, Kim D.. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4+ T-cells in peritoneal space. *J Immunother.* 2012; 35(1): 1-13.
289. Chang CL, Hsu YT, Wu CC, Lai YZ, Wang C, Yang YC, Wu TC, Hung CF. Dose-dense chemotherapy improves mechanisms of antitumor immune response. *Cancer Res.* 2013; 73(1): 119-127.
290. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T-cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010; 70(8): 3052-3061.
291. Predina JD, Judy B, Aliperti LA, Fridlender ZG, Blouin A, Kapoor V, Laguna B, Nakagawa H, Rustgi AK, Aguilar L, Aguilar-Cordova E, Albelda SM, Singhal S.

- Neoadjuvant *in situ* gene-mediated cytotoxic immunotherapy improves postoperative outcomes in novel syngeneic esophageal carcinoma models. *Cancer Gene Ther.* 2011; 18(12): 871-883.
292. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res.* 2011; 71(14): 4809-4820.
293. Zhang L, Dermawan K, Jin M, Liu R, Zheng H, Xu L, Zhang Y, Cai Y, Chu Y, Xiong S. Differential impairment of regulatory T-cells rather than effector T-cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin Immunol.* 2008; 129(2): 219-229.
294. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I, Baccarini S, Maccari S, Ramoni C, Belardelli F, Proietti E. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clin Cancer Res.* 2007;13 (2 Pt 1):644-653.
295. Moschella F, Valentini M, Arico E, Macchia I, Sestili P, D'Urso MT, Alessandri C, Belardelli F, Proietti E. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide. *Cancer Res.* 2011; 71(10): 3528-3539.
296. Liu CH. Some Homo- and Heteropolynuclear Chelates. *Inorg. Chem.* 1964; 3(5): 678-680
297. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of $[PtL_4Cl_2] \cdot H_2O$ where L4 is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem.* 2001; 83(2-3): 91-100.
298. Lazic JM, Vucicevic L, Grguric-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem.* 2010; 5(6): 881-889.
299. Misirlić Denčić S, Poljarević J, Isakovic AM, Marković I, Sabo TJ, Grgurić-Šipka S. Antileukemic action of novel diamine Pt(II) halogenido complexes: Comparison of the

- representative novel Pt(II) with corresponding Pt(IV) complex. *Chem Biol Drug Des.* 2017; 90(2): 262-271.
300. Misirlic-Dencic S, Poljarevic J, Vilimanovic U, Bogdanovic A, Isakovic AJ, Kravic Stevovic T, Dulovic M, Zogovic N, Isakovic AM, Grguric-Sipka S, Bumbasirevic V, Sabo T, Trajkovic V, Markovic I. Cyclohexyl Analogues of Ethylenediamine Dipropanoic Acid Induce Caspase-Independent Mitochondrial Apoptosis in Human Leukemic Cells. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(4): 931-939.
301. Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K, Yashiro T, Tominaga S. Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 285(5): 1377-1383.
302. Carlsson G, Ekelund E, Stigsson L, Hafstrom L. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann Chir Gynaecol.* 1983; 72(4): 187-191.
303. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011; 13(4): 215.
304. Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol.* 1973; 242(118): 148-149.
305. Hill RP, Ling V. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science.* 1984; 224(4652):998-1001.
306. Fitzpatrick FA, Stringfellow DA. Prostaglandin D2 formation by malignant melanoma cells correlates inversely with cellular metastatic potential. *PNAS.* 1979; 76(4): 1765-1769.
307. Cillo C, Dick JE, Ling V, Hill RP. Generation of drug-resistant variants in metastatic B16 mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.* 1987; 47(10): 2604-2626.
308. Nikolic M, Mijajlovic M, Jevtic V, Ratković Z, Novakovic S, Bogdanovic G, Milovanovic J, Arsenijevic A, Stojanovic B, Trifunovic S, Radic G. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure.* 2016; 1116: 264-271.
309. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, Arsenijevic N, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic V. In vitro and in vivo anti-tumor effects of selected platinum(IV) and

- dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2017; 22(6): 807-817.
310. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016; 2016(7): pdb.prot087163.
311. Shounan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1998; 217(1-2): 61-70.
312. Jiang Q, Pan Y, Cheng Y, Li H, Liu D, Li H. Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- κ B signaling pathways. *Oncol Rep*. 2016; 36(1): 253-262.
313. Xu L, Deng X. Protein kinase Ciota promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of micro- and m-calpains. *J Biol Chem*. 2006; 281(7): 4457-4466.
314. Valaee S, Yaghoobi MM, Shamsara M. Metformin inhibits gastric cancer cells metastatic traits through suppression of epithelial-mesenchymal transition in a glucose-independent manner. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174486
315. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276: 38610-38618.
316. Karimian H, Mohan S, Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Razavi M, Arya A, Kamalidehghan B, Ali HM, Noordin MI. *Tanacetum polycephalum* (L.) schultz-bip. Induces mitochondrial-mediated apoptosis and inhibits migration and invasion in MCF7 cells. *Molecules*. 2014; 19:9478-950.
317. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.
318. Milosavljevic MZ, Jovanovic IP, Pejnovic NN, Mitrovic SL, Arsenijevic NN, Simovic Markovic BJ, Lukic ML. Deletion of IL-33R attenuates VEGF expression and enhances necrosis in mammary carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(14): 18106-18115.
319. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, Muratore A, Bartolini A, Barone V, Ribero D, Monti M, Bovino P, Sun J, Giavazzi R, Asioli S, Cassoni P, Capussotti L, Pucci P, Bugatti A,

- Rusnati M, Pasqualini R, Arap W, Bussolino F. A complex of $\alpha 6$ integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. *EMBO Mol Med*. 2012; 4(11): 1156-1175.
320. Sznajder JI. Retraction: Inhibition of nonneuronal $\alpha 7$ -nicotinic receptor for lung cancer treatment. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(11): 1456.
321. Xue M, Ge Y, Zhang J, Wang Q, Hou L, Liu Y, Sun L, Li Q. Anticancer properties and mechanisms of fucoidan on mouse breast cancer in vitro and in vivo. *PLoS One* 2012; 7(8): e43483.
322. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem*. 2006; 108: 327-334.
323. Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, Juranic VL, McKenzie AN, Arsenijevic N, Jonjic S, Lukic ML. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. *Eur J Immunol*. 2011; 41(7): 1902-1912.
324. Dewan MZ, Terunuma H, Ahmed S, Ohba K, Takada M, Tanaka Y, Toi M, Yamamoto N. Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother*. 2005; 59 (Suppl 2): S375-379.
325. Sabo T, Grguric-Sipka S, Trifunovic S. Transition metal complexes with edda-type ligands-a review. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry*. 2002; 32: 1661-1717.
326. Pantelić N, Stanojković TP, Zmejkovski BB, Sabo T, Kaludjerovic G. In vitro anticancer activity of gold(III) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid. *Eur J Med Chem*. 2015; 90: 766-774.
327. Pantelić N, Zmejkovski BB, Trifunović-Macedoljan J, Savić A, Stanković D, Damjanović A, Juranić Z, Kaluđerović GN, Sabo TJ. Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem*. 2013; 128: 146-153.
328. Kaluđerović GN, Mijatović SA, Zmejkovski BB, Bulatović MZ, Gómez-Ruiz S, Mojić MK, Steinborn D, Miljković DM, Schmidt H, Stošić-Grujičić SD, Sabo TJ, Maksimović-Ivanić DD. Platinum(II/IV) complexes containing ethylenediamine-N,N'-di-2/3-propionate ester ligands induced caspase-dependent apoptosis in cisplatin-resistant colon cancer cells. *Metallomics*. 2012; 4(9): 979-987.

329. Vujić JM, Cvijović M, Kaluderović GN, Milovanović M, Zmejkovski BB, Volarević V, Arsenijević N, Sabo TJ, Trifunović SR. Palladium(II) complexes with R(2)edda derived ligands. Part IV. O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(9): 3601-3606.
330. Mojić M, Savić A, Arion V, Bulatovic M, Poljarevic J, Miljkovic Dj, Sabo T, Mijatovic S, Maksimovic D, Grguric Sipka S. Synthesis, X-ray structure and strong in vitro cytotoxicity of novel organoruthenium complexes. *J Organomet. Chem.* 2014; 749: 142-149.
331. Savic A, Filipovic L, Arandjelovic S, Dojcinovic B, Radulovic S, Sabo TJ, Grguric-Sipka S. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes. *Eur J Med Chem.* 2014; 82: 372-384.
332. Romero-Canelón I, Sadler PJ. Next generation metal anticancer complexes: Multi-targeting via redox modulation. *Inorg Chem.* 2013; 5(2): 12276-12291.
333. Mihajlović Lj, Savić A, Poljarević J, Vučković I, Mojić M, Bulatović M, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluđerović GN, Stošić-Grujičić S, Miljković Đ, Grgurić-Šipka S, Sabo TJ. Novel methylene modified cyclohexyl ethylenediamine-N,N'-diacetate ligands and their platinum(IV) complexes. Influence on biological activity. *J Inorg Biochem.* 2012; 109: 40-48.
334. Miljković Dj, Poljarević J, Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Nikolić I, Saksida T, Stošić-Grujičić S, Grgurić-Šipka S, Sabo TJ. Novel octahedral Pt(IV) complex with di-n-propyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoato ligand exerts potent immunomodulatory effects. *Eur J Med Chem.* 2011; 47(1): 194-201.
335. Grossman D, Altieri DC. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev.* 2001; 20(1-2): 3-11.
336. Isakovic AM, Petricevic SM, Ristic SM, Popadic DM, Kravic-Stevovic TK, Zogovic NS, Poljarevic JM, Zivanovic Radnic TV, Sabo TJ, Isakovic AJ, Markovic ID, Trajkovic VS, Misirlic-Dencic ST. In vitro and in vivo antimelanoma effect of ethyl ester cyclohexyl analog of ethylenediamine dipropanoic acid. *Melanoma Res.* 2018; 28(1): 8-20.

337. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006; 160(2): 171-177.
338. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol.* 2008; 8: 8.
339. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001; 59(4): 657-663.
340. Del Bello B, Toscano M, Moretti D, Maellaro E. Cisplatin-induced apoptosis inhibits autophagy, which acts as a pro-survival mechanism in human melanoma cells. *PLoS One.* 2013; 8(2):e57236.
341. Chen J, Zhang L, Zhou H, Wang W, Luo Y, Yang H, Yi H. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells. *Mol Med Rep.* 2018; 17(5): 6859-6865.
342. Pérez JM, Montero EI, González AM, Alvarez-Valdés A, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Apoptosis induction and inhibition of H-ras overexpression by novel trans-[PtCl₂(isopropylamine)(amine')] complexes. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1-2): 37-42.
343. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 87-108.
344. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(8-9): 1229-1235.
345. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep.* 2003; 10(6): 1663-1682.
346. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364-378.
347. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel).* 2010; 2(11): 2490-2518.
348. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003; 23(5): 460-464.
349. Sandru A, Voinea S, Panaitescu E, Blidaru A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J Med Life.* 2014; 7(4): 572-576.
350. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(4): 277-288.

351. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(10): 714-726.
352. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005; 205(2): 275-292.
353. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37(3): 299-310.
354. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2011; 351(1-2) :41-58.
355. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2850-2860.
356. Bouchalova K, Kharraishvili G, Bouchal J, Vrbkova J, Megova M, Hlobilkova A. Triple negative breast cancer: BCL2 in prognosis and prediction. Review. *Curr Drug Targets* 2014; 15: 1166-1175.
357. Leung LK, Wang TT. Paradoxical regulation of Bcl-2 family proteins by 17beta-oestradiol in human breast cancer cells MCF-7. *Br J Cancer*. 1999; 81: 387-392.
358. Choi JE, Kang SH, Lee SJ, Bae YK. Prognostic significance of Bcl-2 expression in non-basal triple-negative breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *Tumour Biol*. 2014; 35: 12255-12263.
359. Sturm I, Kohne CH, Wolff G, Petrowsky H, Petrowsky H, Hillebrand T, Hauptmann S, Lorenz M, Dörken B, Daniel PT.. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1364-1374.
360. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1995; 55(19): 4471-4478.
361. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, Mapara MY, Daniel PT, Arnold W, Dietel M, Guski H, Feller A, Royer HD, Dörken B. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest*. 1996; 97(11): 2651-2659.

362. Tiwari P, Khan MJ. Molecular and Computational Studies on Apoptotic Pathway Regulator, Bcl-2 Gene from Breast Cancer Cell Line MCF-7. *Indian J Pharm Sci.* 2016; 78(1): 87-93.
363. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015; 22(4): 526-539.
364. Zhao Y, Jing Z, Li Y, Mao W. Berberine in combination with cisplatin suppresses breast cancer cell growth through induction of DNA breaks and caspase-3-dependent apoptosis. *Oncol Rep.* 2016; 36(1): 567-572.
365. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6(2): 99-104.
366. Sun D, Urrabaz R, Buzello C, Nguyen M. Effects of cisplatin on expression of DNA ligases in MiaPaCa human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 298: 537-544.
367. Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res.* 2001; 61(3): 1029-1037.
368. Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24(3): 139-145.
369. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 2001; 98(9): 2603-2614.
370. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995; 9(10): 1149-1163.
371. Hsiao CJ, Hsiao G, Chen WL, Wang SW, Chiang CP, Liu LY, Guh JH, Lee TH, Chung CL. Cephalochromin induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small-cell lung cancer cells by inflicting mitochondrial disruption. *J Nat Prod.* 2014; 77(4): 758-765.
372. Wang L, Wang G, Yang D, Guo X, Xu Y, Feng B, Kang J. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. *Mol Med Rep.* 2013; 8(4): 279-285.

373. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-322.
374. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4): 1710-1715.
375. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med* 2016; 13(4): 496-504.
376. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol Med Rep.* 2015; 11(3): 1566-1572.
377. Green WJ, Ball G, Hulman G, Johnson C, Van Schalwyk G, Ratan HL, Soria D, Garibaldi JM, Parkinson R, Hulman J, Rees R, Powe DG. KI67 and DLX2 predict increased risk of metastasis formation in prostate cancer-a targeted molecular approach. *Br J Cancer.* 2016; 115(2): 236-242.
378. Cabrera-Galeana P, Muñoz-Montaña W, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, Pérez-Sánchez V, Villarreal-Garza C, Quintero RM, Porrás-Reyes F, Bargallo-Rocha E, Del Carmen I, Mohar A, Arrieta O. Ki67 Changes Identify Worse Outcomes in Residual Breast Cancer Tumors After Neoadjuvant Chemotherapy. *Oncologist.* 2018 Feb 28. pii: theoncologist.2017-0396.
379. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, Dulic V, Fisher D. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* 2017; 77(10): 2722-2734.
380. Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, Rasheed ZA, Hicks J, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, Mohseni M, Beaver JA, Chu D, Cravero K, Christenson ES, Medford A, Mattox A, De Marzo AM, Argani P, Chawla A, Hurley PJ, Lauring J, Park BH. Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget.* 2016; 7(5): 6281-6293.
381. Friedman R. Drug resistance in cancer: molecular evolution and compensatory proliferation. *Oncotarget.* 2016; 7(11): 11746-11755.
382. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014; 15(6): 122.
383. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 1993; 7(5): 812-821

384. Tsai LH, Lees E, Faha B, Harlow E, Riabowol K. The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene*. 1993; 8: 1593-1602.
385. Owa T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem*. 2001; 8: 1487-1503.
386. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(5): 2612-2624.
387. Resnitzky D, Reed SI. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(7): 3463-3469.
388. Zhang Q, Sakamoto K, Liu C, Triplett AA, Lin WC, Rui H, Wagner KU. Cyclin D3 compensates for the loss of cyclin D1 during ErbB2-induced mammary tumor initiation and progression. *Cancer Res*. 2011; 71(24): 7513-7524.
389. Jiang J, Wei Y, Liu D, Zhou J, Shen J, Chen X, Zhang S, Kong X, Gu J. E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 358(1): 53-58.
390. García-Morales P, Hernando E, Carrasco-García E, Menéndez-Gutierrez MP, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Cyclin D3 is down-regulated by rapamycin in HER-2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(9): 2172-2181.
391. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tazemetastin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2002; 23(10): 1677-1684.
392. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1378: F115-F177.
393. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. 1993; 366(6456): 701-704.
394. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 2003; 13(2): 65-70.
395. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(11): 798-809.

396. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(9): 651-662.
397. Walker SR, Xiang M, Frank DA. Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology.* 2014; 382(1): 616-621.
398. Yue P, Turkson J. Targeting STAT3 in cancer: how successful are we? *Expert opinion on investigational drugs.* 2009; 18(1): 45-56.
399. Turkson J, Zhang S, Mora LB, Burns A, Sebti S, Jove R. A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *J Biol Chem.* 2005; 280(38): 32979-32988.
400. Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005; 65(7): 2532-2536.
401. Wang H, Deng J, Ren H-Y, Jia P, Zhang W, Li M-Q, Li S-W, Zhou Q-H. STAT3 influences the characteristics of stem cells in cervical carcinoma. *Oncol Lett* 2017; 14(2): 2131-2136.
402. Liao WY, Liaw CC, Huang YC, Han HY, Hsu HW, Hwang SM, Kuo SC, Shen CN. Cyclohexylmethyl Flavonoids Suppress Propagation of Breast Cancer Stem Cells via Downregulation of NANOG. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013 ;2013: 170261.
403. Singh S, Trevino J, Bora-Singhal N, Coppola D, Haura E, Altiock S, Chellappan SP. EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2012; 11: 73.
404. Song WS, Yang YP, Huang CS, Lu KH, Liu WH, Wu WW, Lee YY, Lo WL, Lee SD, Chen YW, Huang PI, Chen MT. Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells. *J Chin Med Assoc* 2016; 79(10): 538-545.
405. Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG, Liu B. Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog* 2015; 54(9): 679-687.

406. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer*. 2014; 21(1) :96-101.
407. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG. Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells*. 2015; 33(8) :2381-2390.
408. Liu P, Tang H, Song C, Wang J, Chen B, Huang X, Pei X, Liu L. SOX2 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 942.
409. Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology*. 2014; 64:494-503.
410. Chen T, Du J, Lu G. Cell growth arrest and apoptosis induced by Oct4 or Nanog knockdown in mouse embryonic stem cells: a possible role of Trp53. *Mol Biol Rep*. 2012; 39:1855-1861.
411. Müntz B, Thier MC, Winnemöller D, Helfen M, Thummer RP, Edenhofer F. Nanog induces suppression of senescence through downregulation of p27KIP1 expression. *J Cell Sci*. 2016; 129(5): 912-920.
412. Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajás AA, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*. 2013; 2: e61.
413. Avalle L, Camporeale A, Camperi A, Poli V. STAT3 in cancer: A double edged sword. *Cytokine*. 2017; 98: 42-50.
414. Yeh JE, Frank DA. STAT3-Interacting Proteins as Modulators of Transcription Factor Function: Implications to Targeted Cancer Therapy. *ChemMedChem*. 2016; 11(8): 795-780.
415. Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chem Biol*. 2016; 11(2): 308-318.
416. Oppenheimer SB. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem*. 2006; 108: 327-334.

417. Kaur P, Nagaraja GM, Zheng H, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, Asea A. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC Cancer*. 2012; 12: 120.
418. Teng Y, Ross JL, Cowell JK. The involvement of JAK-STAT3 in cell motility, invasion, and metastasis. *JAKSTAT*. 2014; 3(1): e28086.
419. You J, Shi X, Liang H, Ye J, Wang L, Han H, Fang H, Kang W, Wang T. Cystathionine- γ -lyase promotes process of breast cancer in association with STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017; (39): 65677-65686.
420. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2014; 33(20): 2655-2664.
421. Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, Lam EW, Chan KK, Ngan HY, Le XF, Cheung AN. Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of outcome in ovarian cancers. *Oncogene*. 2013; 32(30): 3500-3509.
422. Mukherjee P, Gupta A, Chattopadhyay D, Chatterji U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 9170.
423. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007; 13(9): 1050-1059.
424. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014; 21(1): 15-25.
425. Chen J, Huang X, Huang G, Chen Y, Chen L, Song H. Preconditioning chemotherapy with cisplatin enhances the antitumor activity of cytokine-induced killer cells in a murine melanoma model. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012; 27(3): 210-220.

426. Kim JE, Jang MJ, Lee JI, Chung YH, Jeong JH, Hung CF, Kim D. Cancer cells containing nanoscale chemotherapeutic drugs generate antiovarian cancer-specific CD4+ T-cells in peritoneal space. *J Immunother.* 2012; 35: 1-1.
427. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature.* 2005; 436(7054): 1186-1190.
428. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002; 35: 23-28.
429. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, Saiki I. IFN- γ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, α -galactosylceramide. *Blood.* 2002; 100: 1728-1733.
430. Gebremeskel S, Clattenburg DR, Slauenwhite D, Lobert L, Johnston B. Natural killer T cell activation overcomes immunosuppression to enhance clearance of post-surgical breast cancer metastasis in mice. *Oncoimmunology.* 2015; 4: e995562.
431. Gebremeskel S, Slauenwhite D, Johnston B. Reconstitution models to evaluate natural killer T cell function in tumor control. *Immunol Cell Biol.* 2016; 94: 90-100.
432. Schneiders FL, de Bruin RC, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, Langendijk JA, Verheul HM, de Gruijl TD, Molling JW, van der Vliet HJ. Circulating invariant natural killer T-cell numbers predict outcome in head and neck squamous cell carcinoma: updated analysis with 10-year follow-up. *J Clin Oncol.* 2012; 30(5):567-570.
433. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004; 114(10): 1379-1388.
434. Ioachim HL, Decuseara R, Giancotti F, Dorsett BH. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol Res Pract.* 2005; 200(11-12):v743-751.
435. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296: 1635-1636.
436. Haraguchi K, Takahashi T, Nakahara F, Matsumoto A, Kurokawa M, Ogawa S, Oda H, Hirai H, Chiba S. CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for

- anti-tumor immunity by natural killer T cells. *Leuk Lymphoma*. 2006; 47(10): 2218-2223.
437. Teng MW, Sharkey J, McLaughlin NM, Exley MA, Smyth MJ. CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol*. 2009; 183(3): 1911-1920.
438. Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, Kronenberg M, Seeger RC.. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol*. 2001; 167(6): 3114-3122.
439. Jovanovic IP, Pejnovic NN, Radosavljevic GD, Pantic JM, Milovanovic MZ, Arsenijevic NN, Lukic ML. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int J Cancer*. 2014; 134(7): 1669-1682.
440. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med*. 2006; 203(2): 289-295.
441. Shimizu K, Sato Y, Shinga J, Watanabe T, Endo T, Asakura M, et al. KLRG+ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(34): 12474-12479.
442. Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli-Esposti MA, Smyth MJ, Tarlinton DM, Nutt SL. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol*. 2007; 178(8): 4764-4770.
443. Müller-Durovic B, Lanna A, Covre LP, Mills RS, Henson SM, Akbar AN. Killer Cell Lectin-like Receptor G1 Inhibits NK Cell Function through Activation of Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase. *J Immunol*. 2016; 197(7): 2891-2899.
444. Robbins SH, Nguyen KB, Takahashi N, Mikayama T, Biron CA, Brossay L. Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *Journal of immunology*. 2002; 168: 2585–2589.
445. Nair S, Dhodapkar MV. Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017; 8: 1178.

446. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 2004; 574(1–3): 37–41.
447. Dong Y, Sun Q, Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(2): 2171-2186.
448. Chang WS, Kim JY, Kim YJ, Kim YS, Lee JM, Azuma M, Yagita H, Kang CY. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol.* 2008; 181(10): 6707-6710.
449. Parekh VV, Lalani S, Kim S, Halder R, Azuma M, Yagita H, Kumar V, Wu L, Kaer LV. PD-1/PD-L blockade prevents anergy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol.* 2009; 182(5): 2816-2826.
450. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016; 39(1): 98-106.
451. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009; 229(1): 12-26.
452. Beldi-Ferchiou A, Caillat-Zucman S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10). pii: E2129.
453. an Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med.* 1999; 190: 355-366.
454. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med.* 2014; 211: 715-725.
455. Kim K, Skora AD, Li Z, Liu Q, Tam AJ, Blosser RL, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhou S. Eradication of metastatic mouse cancers resistant to

- immune checkpoint blockade by suppression of myeloid-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:11774-11779.
456. Pentcheva-Hoang T, Simpson TR, Montalvo-Ortiz W, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade enhances antitumor immunity by stimulating melanoma-specific T-cell motility. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2: 970-980.
457. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12(12): 2478-2480.
458. de Jongh FE, van Veen RN, Veltman SJ, de Wit R, van der Burg ME, van den Bent MJ, Planting AS, Graveland WJ, Stoter G, Verweij J. Weekly high-dose cisplatin is a feasible treatment option: Analysis on prognostic factors for toxicity in 400 patients. *Br J Cancer*. 2003; 88(8): 1199-1206.
459. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother*. 2003; 4(6): 889-901.
460. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003; 1: 47-61.
461. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies.. *Kidney Int*. 2008; 73(9): 994-1007.
462. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*. 1996; 270: 700-708.
463. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*. 2006; 100(1): 65-72.
464. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004; 50(3): 287-290.
465. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*. 2005; 76(18): 2125-2135.

466. Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol.* 2002; 25(1): 1-8.
467. Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol.* 2005; 148:107-121.
468. Hayati F, Hossainzadeh M, Shayanpour S, Abedi-Gheshlaghi Z, Beladi Mousavi SS. Prevention of cisplatin nephrotoxicity. *J Nephroarmacol.* 2015; 5(1): 57-60.