



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Јелена Кошарић**

**ИСПИТИВАЊЕ МОЛЕКУЛАРНИХ МЕХАНИЗАМА  
ДЕЈСТВА НЕКИХ ОРГАНОСЕЛЕНСКИХ ЈЕДИЊЕЊА НА  
РЕДОКС СТАТУС ЋЕЛИЈА КАНЦЕРА КОЛОНА НСТ-116 И  
ДОЈКЕ MDA-MB-231**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2018. године**

<b>I Аутор</b>
Име и презиме: <b>Јелена В Кошарић</b>
Датум и место рођења: <b>16.12.1979. године, Крагујевац</b>
Садашње запослење: <b>Незапослена</b>
<b>II Докторска дисертација</b>
Наслов: <b>Испитивање молекуларних механизма дејства неких органоселенских једињења на редокс статус ћелија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231</b>
Број страница: 152
Број шема: 17
Број слика: 9
Број табела: 14
Број графикана: 29
Број библиографских података: 338
Установа и место где је рад израђен: <b>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</b>
Научна област (УДК): <b>Биологија, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, 577.2: 591.1</b>
Ментор: <b>Др Снежана Д. Марковић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу</b>
<b>III Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: <b>14.09.2016. године</b>
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: <b>IV-01-837/17, 14.09.2016. године</b>
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Др Снежана Марковић, доцент, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; ментор Др Марко Живановић, Научни сарадник, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, научна област: Биологија; Др Зорица Бугарчић, редовни професор, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Органска хемија; Др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник, Институт за онкологију и радиологију, Универзитет у Београду, ужа научна област: Молекуларна генетика.
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
_____
Др Бранка Огњановић, редовни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија
_____
Др Зорица Бугарчић, редовни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Органска хемија; председник Комисије
_____
Др Марко Живановић, научни сарадник ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, научна област Биологија
_____
Др Биљана Шмит, виши научни сарадник ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, научна област Хемија
_____
Др Јелена Ракобрадовић, научни сарадник Института за онкологију и радиологију Србије, научна област Молекуларна биологија, ужа научна област Молекуларна генетика.
_____
Датум одбране докторске дисертације:

## Захвалница

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и на Департману за биохемију и биофизику, Каролинска институт, Стокхолм, Шведска. Истраживање је део пројекта Министарства за просвету, науку и технолошки развој Републике Србије број III41010. Узорци органоселенских једињења синтетисани су на Институту за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу у групама проф. Зорице Бугарчић и др Биљане Шмит.

Огромну захвалност дугујем свом ментору проф. др Снежани Марковић, доценту Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на несебичној помоћи у сваком сегменту израде ове докторске дисертације, од првог концепта рада, преко увођења у лабораторијску праксу, до обраде резултата, њиховог публиковања и писања дисертације. Захваљујем се за велико разумевање и драгоцене савете који су омогућили да ова дисертација буде успешно завршена.

Захваљујем др Марку Живановићу, научном сараднику Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу на константној и несебичној помоћи у целом току израде дисертације.

Захваљујем се професору Арнер Елиасу и Катарини Јохансон са Каролинска универзитета на указаном поверењу, едукацији и несебичној помоћи у мом експерименталном раду.

Желела бих да се захвалим свим члановима комисије др Бранки Огњановић, редовном професору, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Зорици Бугарчић, редовном професору, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Марку Живановићу, научном сараднику, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Биљани Шмит, вишем научном сараднику, Природно-математичког факултета у Крагујевцу и др Јелени Ракобродовић, научном сараднику Института за онкологију и радиологију Србије на несебичној помоћи, сарадњи и драгоценим сугестијама током целокупне реализације ове докторске дисертације.

Захваљујем се својим колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу и са Каролинска института на помоћи и подршци током експерименталног рада.

На крају, захвалност дугујем својој породици на подршци и разумевању, а посебно Андреју и Уни који су унели смисао у мој живот!

Јелена

## Садржај

РЕЗИМЕ .....	VII
SUMMARY .....	IX
СПИСАК ШЕМА, СЛИКА, ТАБЕЛА И ГРАФИКОНА.....	XI
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА.....	XIV
УВОД .....	1
1. Канцер .....	1
1.1 Колоректални карцином (карцином дебелог црева).....	4
1.2 Карцином дојке .....	7
1.3 Ћелијске линије као модел системи у испитивању канцера .....	10
1.4 Миграција, инвазивност и метастаза.....	14
2. Механизми редокс равнотеже .....	17
2.1. Реактивне врсте кисеоника .....	18
2.2. Азот моноксид и реактивне врсте азота.....	20
2.3. Ефекти ROS и RNS на миграторни потенцијал канцера .....	22
2.4. Антиоксидациони заштитни систем .....	23
3. Терапија канцера - Цитостатици .....	36
3.1. Хемијски комплекси .....	37
3.2. Прооксидациони лекови.....	40
3.3. Антиканцерогена својства једињења са селеном .....	41
3.4. Антиметастатски лекови – миграција .....	42
ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....	44
Хипотезе .....	44
Специфични циљеви .....	45
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА .....	46
1. Хемикалије и реагенси .....	46
2. Испитивана ОСЈ једињења .....	47
3. Имортализоване ћелијске линије канцера .....	47
3.1. Поступак рада са ћелијским културама .....	49
4. Методе испитивања биолошких ефеката ОСЈ .....	51
4.1. Третмани хемијским супстанцама.....	51
4.2. Одређивање вијабилности ћелија и процена цитотоксичности ОСЈ.....	52
4.3. Одређивање миграторног потенцијала ћелија.....	52



4.4. Испитивање параметара редокс статуса .....	53
5. Статистичка обрада резултата .....	56
6. Анализа експресије иРНК за гене важне у редокс контроли, qRT-PCR метода .....	57
7. Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$ и NF- $\kappa$ B употребом pTRAF вектора ....	60
<b>РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>63</b>
1. Цитотоксичност испитиваних органоселенских једињења .....	63
2. Ефекти ОСЈ на миграторни потенцијал ћелија канцера.....	68
3. Ефекти ОСЈ на параметре прооксидационо/антиоксидационог статуса .....	72
3.1. Концентрација супероксид ањон радикала .....	72
3.2. Концентрација нитрита .....	76
3.3. Концентрација глутатиона .....	80
3.4. Ефекти ОСЈ на протеинску експресију iNOS.....	84
4. Анализа генске експресије ензима важних за редокс контролу.....	86
4.1. Релативна експресија иРНК за гене GPX1, 2, 3, 4 и 6.....	87
4.2. Релативна експресија иРНК за GST и TXNRD гене.....	90
5. Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$ и NF- $\kappa$ B употребом pTRAF вектора и системом Oreretta .....	91
5.1. Котретман ОСЈ једињења и супстанци које активирају Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B .....	96
<b>ДИСКУСИЈА</b> .....	<b>100</b>
<i>Пролиферативни vs. цитотоксични ефекти ОСЈ</i> .....	105
<i>Ефекти ОСЈ на миграцију ћелија канцера</i> .....	106
<i>Деловање ОСЈ на редокс систем</i> .....	111
<b>ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	<b>117</b>
<i>Општи закључци</i> .....	117
<i>Специфични закључци</i> .....	117
<i>Коначан закључак</i> .....	118
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>119</b>
<b>ПРИЛОЗИ</b> .....	<b>147</b>
Прилог 1 .....	147
<i>Синтеза 2-(фенилселенометил)тетра-хидрофурана (SEL1) и</i> .....	147
<i>2-( фенилселенометил)тетра-хидропирана (SEL2)</i> .....	147
<i>Синтеза SEL3 и његовог Pd(II) комплекса SEL4</i> .....	148
Прилог 2 .....	149

Одређивање активности транскрипционих фактора <i>Nrf2</i> , <i>TNF<math>\alpha</math></i> и <i>NF-<math>\kappa</math>B</i> употребом <i>pTRAF</i> вектора и анализа <i>Opreta</i> системом.....	149
Конструкција <i>pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-<math>\kappa</math>B</sup></i> вектора .....	149
Замена гена луциферазе у <i>pGL4.luc2P<sup>Nrf2</sup></i> , <i>pGL4.luc2P<sup>HIF</sup></i> и <i>pGL4.32</i> са генима за <i>mCherry</i> и замена 4 копије са 8 копија <i>HRE</i> елемента.....	151
Конструкција <i>pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-<math>\kappa</math>B</sup></i> вектора .....	151
Третман .....	152
Анализа <i>Opreta</i> системом .....	152

## РЕЗИМЕ

### *Испитивање молекуларних механизма дејства неких органоселенских једињења на редокс статус ћелија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231*

Канцер је комплексна болест која је веома варијабилна у својој појави, развоју и исходу од једног пацијента до другог. То је сложени процес током којег ћелије подлежу дубоким метаболичким променама као што су неконтролисано размножавање, избегавање надзора од стране имуног система и инвазија до удаљених ткива уз формирање метастаза. Канцер је један од главних узрока морбидитета и морталитета у целом свету. Антиканцерогена једињења не морају испољавати цитотоксични карактер, већ је некада важније да поседују антиинвазивни и антиметастатски потенцијал. Нпр. карциноми колона и дојке (због физичке доступности) у данашњим условима лако се третирају. Међутим, метастатски потенцијал ове две врсте карцинома је изразит и сврстава их у изузетно агресивне. У том смислу, када је реч о третману карцинома дојке и колона, садашња медицина исказује потребу за новим антиметастатским лековима. Органоселенска једињења, ОСЈ позната су углавном по свом антиоксидационом дејству. Са друге стране постоје и ОСЈ са изразито прооксидационим особинама. На основу претходног искуства и литературних података, у зависности од хемијске структуре могуће је предвидети оквирно дејство одређеног селено-једињења. Претпоставка је да ће ОСЈ координовано као лиганд у комплексу са паладијумом(II) реаговати цитотоксично и прооксидационо. Редокс равнотежа је веома осетљива, како у здравим, тако и у ћелијама канцера. Најмања промена било ког од многобројних параметара утиче на целу каскаду протеина и малих молекула у ћелији померајући ову равнотежу у једном од могућа два смера, прооксидационом и антиоксидационом. Стога, промена у хемијској структури ОСЈ, као и у концентрацији третмана, може изазвати сасвим другачији одговор на молекуларном нивоу ћелије. Хемијска једињења могу бити донори и/или акцептори електрона у зависности од хемијске структуре. Уколико одређено хемијско једињење поседује потенцијал да отпусти електрон, формирајући слободне радикале, може се очекивати системски одговор ћелије у супротном смеру. (Де)активација глутатионског система на нивоу генске и протеинске експресије значајно је модулисана утицајем примењеног хемијског једињења и значајно утиче на судбину ћелије.

Циљ докторске дисертације је да се у *in vitro* условима испитају молекуларни механизми утицаја неких ОСЈ на редокс статус имортализованих ћелијских линија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231. Евалуација утицаја ОСЈ на вијабилност ћелија карцинома урађена је помоћу МТТ теста, а испитивање антимигрантног потенцијала ОСЈ помоћу *Transwell* теста за миграцију. Испитивање ефеката ОСЈ на концентрацију супероксид анјон радикала (NBT тест), нитрита (Griess тест), глутатиона (GSH тест) извршено је колориметријским методама, док је протеинска експресија индуцибилне азот моноксид синтетазе (iNOS) детектована имунофлуоресцентном микроскопском методом. Помоћу квантитативне PCR (qPCR) методе одређивани су ефекти ОСЈ на експресију иРНК циљаних гена за селено-ензиме глутатионског и тиоредоксин система - глутатион пероксидазе (*GPX1*, 2, 3, 4, 6), глутатион-S-трансферазе (*GST*) и тиоредоксин редуктазе (*TXNRD*) у НСТ-116 ћелијама. У истим ћелијама, испитивани су ефекти ОСЈ на активност

Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора и њихове међусобне повезаности, флуоресцентном методологијом трансфекцијом pTRAF вектора у резолуцији једне ћелије и анализом *Operetta* системом.

Резултати показују да једињења SEL1 и SEL2 стимулишу пролиферацију испитиваних ћелија, док SEL3 и SEL4 делују цитотоксично. ОСЈ углавном повећавају миграторни потенцијал испитиваних HCT-116 ћелија, док на метастатским MDA-MB-231 ћелијама делују антимиграторно. Резултати параметара оксидационог стреса показују да једињења SEL1 и SEL2 делују антиоксидационо, док SEL3 и SEL4 делују прооксидационо. Експресија иРНК за *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4* и *GPX6* гене у HCT-116 ћелијама значајно се мења у третману са ОСЈ. SEL1 и SEL2 индукују вишу експресију ових gena у поређењу са SEL3 и SEL4. Експресија иРНК за *GST* ген у HCT-116 ћелијама се мења у зависности од врсте испитиваног ОСЈ - SEL1 повећава, SEL2 инхибира, док SEL3 и SEL4 у зависности од дозе стимулишу или супримирају експресију овог gena у односу на контролне ћелије. Експресија иРНК за *TXNRD* ген је супримирана у свим третманима ОСЈ. Анализа утицаја испитиваних ОСЈ на активност транскрипционих фактора у HCT-116 ћелијама показује да SEL1-4 утичу на значајно повећање активности Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора.

У закључку, тестирана ОСЈ, у зависности од хемијске структуре, дозе и времена третмана, испољавају цитотоксични и антимиграторни потенцијал на ћелијским линијама карцинома колона HCT-116 и дојке MDA-MB-231. Параметри оксидационог стреса карактеришу промене редокс статуса испитиваних ћелијских линија канцера у третману изабраним ОСЈ. qRT-PCR анализа генске експресије ензима важних у редокс контроли омогућила је детаљанији увид у механизам деловања ОСЈ на експресију датих gena, посебно имајући у виду њихов значај у антиоксидационој заштити ћелије. Флуоресцентна микроскопија у резолуцији појединачне ћелије на изучаваним ћелијским линијама карцинома, омогућила је детаљну анализу активности Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора укључених у антиоксидациони одговор ћелије.

Значај резултата дисертације. Употреба ОСЈ у третману канцера, у зависности од хемијске структуре једињења, не мора увек да испољи само цитотоксично дејство, већ се значајан напор улаже у креирање лекова са антиметастатским дејством. Испитивана ОСЈ показују антимиграторни, самим тим и антиметастатски потенцијал. Редокс равнотежа је од круцијалне важности за функционисање сваке ћелије. Обзиром да се ћелије канцера налазе константно под већим оксидационим стресом од здравих ћелија, употреба ОСЈ (посебно SEL3 и SEL4) са значајним прооксидационим ефектом могу утицати на елиминисање ћелија канцера. Утицај ОСЈ на активност транскрипционих фактора и gena укључених у антиоксидациону заштиту ћелије веома је важан, али у исто време може представљати мач са две оштрице. У Дисертацији, на основу добијених резултата, детаљно је продискутована проблематика како употребом лека повећати оксидациони стрес код ћелија канцера и здравих ћелија у мери у којој ће штетити само ћелијама канцера.

## SUMMARY

### *Molecular Mechanisms Study of Action of Some Organoselenium Compounds on Redox Status in Colon HCT-116 and Breast MDA-MB-231 Cancer Cells*

Cancer is a complex disease that is very variable in its appearance, development and outcome from one patient to another. Cancer is a complex process in which cells are subjected to deep metabolic changes such as uncontrolled reproduction, avoidance of control by the immune system, and invasion of distant tissues by the formation of metastases. Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Anticancer compounds do not need to exhibit a cytotoxic character, but it is sometimes more important to have anti-invasive and anti-metastatic potential. For example, colon and breast carcinoma (due to their physical availability) are easily treated in today's conditions. However, the metastatic potential of these two types of cancer is remarkable and places them in extremely aggressive. In that sense, when it comes to treatment of breast and colon cancer, current medicine is showing the need for new anti-metastatic drugs. Organoselenium compounds, OSCs are known mainly for their antioxidant activity. On the other hand, there are also OSCs with highly prooxidative features. Based on previous experience and literature data, depending on the chemical structure, it is possible to predict the indicative effect of a particular selenium compound. The assumption is that the OSC coordinated as a ligand in the complex with palladium(II) will react cytotoxic and prooxidative. Redox balance is very sensitive in both healthy and cancer cells. The smallest change in any of the many parameters affects the whole cascade of proteins and small molecules in the cell by shifting this balance in one of the possible two directions, prooxidative or antioxidative. Therefore, the change in the chemical structure of the OSCs, as well as in the concentration of treatment, may give rise to a completely different response to the molecular level of the cell. Chemical compounds can be donors and/or acceptors of electrons depending on the chemical structure. If a chemical substance has the potential to release the electron, by forming free radicals, the systemic response of the cell may be expected in the opposite direction. (De)activation of the glutathione system at the level of gene and protein expression is significantly modulated by the influence of the applied chemical compound and significantly affects the fate of the cell.

The aim of this doctoral thesis is to investigate molecular mechanisms of the action of some OSCs on the redox status of immortalized colon cancer HCT-116 and breast cancer MDA-MB-231 cells, in *in vitro* conditions. An assessment of the effect of OSCs on the viability of cancer cells was done using the MTT test, while testing the antimigratory potential of OSCs were performed using the Transwell migration test. Examination of the OSCs effects on the concentration of superoxide anion radical (NBT test), nitrite (Griess test), glutathione (GSH test) was performed by colorimetric methods, while protein expression of inducible nitrogen monoxide synthetase (iNOS) was detected by an immunofluorescence microscopic method. Using the quantitative PCR (qPCR) method, the effects of OSCs on the expression of messenger RNA (mRNA) of target genes for the selenium-containing enzymes of the glutathione and thioredoxin system - glutathione peroxidase (*GPX1, 2, 3, 4, 6*), glutathione-S-transferase (*GST*) and thioredoxin reductase (*TXNRD*) in HCT-116 cells was performed. In the same cells, the effects of OSCs on the activity of Nrf2, HIF and NF- $\kappa$ B transcription factors and their interconnectedness, the fluorescence methodology by transfection of the pTRAF vector in the resolution of one cell and the analysis by the Operetta system were examined.

The results show that the compounds SEL1 and SEL2 stimulate the proliferation of the tested cells, while SEL3 and SEL4 act cytotoxic. Generally, OSCs increase the migratory potential of the examined HCT-116 cells, while on the metastatic MDA-MB-231 cells they act mainly antimigratory. Data for oxidative stress parameters show that compounds SEL1 and SEL2 act as antioxidants, while SEL3 and SEL4 act as prooxidants. The mRNA expression for *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4* and *GPX6* genes in HCT-116 cells is significantly changed in treatment with OSCs. SEL1 and SEL2 induce higher expression of these genes compared to SEL3 and SEL4. The mRNA expression for the *GST* gene in HCT-116 cells changes depending on the type of tested OSCs: SEL1 increases, SEL2 inhibits, and SEL3 and SEL4 stimulate or suppress the expression of this gene depending on the applied dose. The mRNA expression for *TXNRD* gene is suppressed in all OSCs treatments. An analysis of the effect of examined OSCs on the transcription factors in HCT-116 cells shows that SEL1-4 influenced a significant increase in the activity of Nrf2, HIF and NF- $\kappa$ B.

In conclusion, depending on the chemical structure, dosage and time of treatment, tested OSCs, exhibit cytotoxic and anti-invasive potential on the HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. Oxidative stress parameters are characterized by changes in the redox status of the investigated cancer cell lines in the treatment of the selected OSCs. The qRT-PCR analysis of genetic expression of enzymes important in redox control enabled a more detailed insight into the mechanism of action of OSCs in the expression of given genes, especially having in mind their importance in antioxidant cell protection. Fluorescence microscopy in the resolution of an individual cell in the studied cell lines of the cancer enabled us to provide a detailed analysis of the activity of the Nrf2, HIF and NF- $\kappa$ B transcription factors involved in the antioxidant response of the cell.

The significance of the results. The use of OSCs in the treatment of cancer, depending on the chemical structure of the compound, does not always have to cytotoxic effect only, but a significant effort is invested in creating drugs with an antimetastatic effect. The examined OSCs show an antimigratory, and therefore an antimetastatic potential. Redox balance is crucial for the functioning of each cell. Since cancer cells are constantly under high oxidative stress in comparison to healthy cells, the use of OSCs (especially SEL3 and SEL4) with a significant prooxidative effect can affect the elimination of cancer cells. The effect of OSCs on the activity of transcription factors and genes involved in antioxidative cell protection is very important, but at the same time it can represent a two-edged sword. In this dissertation, based on the obtained results, it is discussed in detail how to use the drug to increase oxidative stress in cancer and healthy cells to the extent that it will only harm the cancer cells.

## Списак шема, слика, табела и графикона

- Шема 1.** Процес формирања супероксид анјон радикала и његова дисмутација.
- Шема 2.** Синтеза NO и пероксинитрита, као и њихова дисмутација *in vivo*.
- Шема 3.** Стварање и неутрализација водоник пероксида у условима ћелијског одговора на промене у редокс равнотежи.
- Шема 4.** Трипептид глутатион:  $\gamma$ -глутамил-цистеин-глицин.
- Шема 5.** Глутатионски систем.
- Шема 6.** Функције Nrf2.
- Шема 7.** Сумарни дијаграм стимулације Nrf2 и HIF1 током оксидационог стреса.
- Шема 8.** Механизам интеракције NF- $\kappa$ B и Nrf2 сигналних путева.
- Шема 9.** Спектроскопски потврђено везивање цисплатине за ДНК.
- Шема 10.** Морфолошки приказ НСТ-116 ћелија фотографисаних електронским микроскопом.
- Шема 11.** Морфолошки приказ MDA-MB-231 ћелија фотографисаних електронским микроскопом.
- Шема 12.** рTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF- $\kappa$ B</sup> плазмид омогућава симултану детекцију активације Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B.
- Шема 13.** Умерено повећање ROS може промовисати пролиферацију ћелија и преживљавање. Међутим, када пораст ROS достигне одређену концентрацију (токсични праг), може доћи до исцрпљивања антиоксидационог капацитета ћелије и изазвати смрт ћелије.
- Шема 14.** Фенилселеноетерификација пент-4-ен-1-ол и хекс-5-ен-1-ола.
- Шема 15.** Синтеза SEL3 и SEL4.
- Шема 16.** рGL4.32 вектор (Promega) кодира ген за NF- $\kappa$ B, луциферазу (*luc2P*) и хигромицин.
- Шема 17.** Шема плаزمида коришћеног у креирању рTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF- $\kappa$ B</sup> вектора.
- Слика 1.** Протеинска експресија iNOS у НСТ-116 ћелијама третираним испитиваним ОСЈ.
- Слика 2.** Протеинска експресија iNOS у MDA-MB-231 ћелијама третираним испитиваним ОСЈ.
- Слика 3.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Третмани SEL1 (А) и SEL2 (Б), концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu$ M након 24 сата.
- Слика 4.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Третман SEL3 (А) и SEL4 (Б), концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu$ M након 24 сата.
- Слика 5.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Третман SEL1-4, концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu$ M након 24 сата.
- Слика 6.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Третман ауранофином (1  $\mu$ M), DMOG (250  $\mu$ M) и TNF $\alpha$  (5 ng/ml), након 24 сата
- Слика 7.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са ауранофином (1  $\mu$ M).

**Слика 8.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рТРАФ вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са DMOG (250  $\mu$ M).

**Слика 9.** Панели флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рТРАФ вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са TNF $\alpha$  (5 ng/ml).

**Табела 1.** Преглед најчешће коришћених тестова за одређивање пролиферације, ћелијске вијабилности, цитотоксичности и апоптозе.

**Табела 2.** Цитостатски механизми деловања одабраних активних супстанци.

**Табела 3.** Преглед секвенци прајмера коришћених у експериментима испитивања утицаја ОСЈ на релативну генску експресију одабраних гена.

**Табела 4.** Ефекти SEL1 и SEL2 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.

**Табела 5.** Ефекти SEL3 и SEL4 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.

**Табела 6.** Цитотоксичност - IC<sub>50</sub> вредности испитиваних ОСЈ и цисплатине (CisPt, позитивна контрола) на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама.

**Табела 7.** Утицај SEL1, SEL2, SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија, 24 сата након третмана.

**Табела 8.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију O<sub>2</sub><sup>•-</sup> у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 9.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију O<sub>2</sub><sup>•-</sup> у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 10.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 11.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 12.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 13.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

**Табела 14.** Класификација једињења селена на основу хемијске структуре.

**Графикон 1.** Ефекти SEL1 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија, 24 и 72 сата након третмана.

**Графикон 2.** Ефекти SEL2 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 сата након третмана.

**Графикон 3.** Ефекти SEL3 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 сата након третмана.

**Графикон 4.** Ефекти SEL4 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 h након третмана.

**Графикон 5.** Утицај SEL1 и SEL2 на миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија након 24 сата од третмана. Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија.

**Графикон 6.** Утицај SEL1 и SEL2 на миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија након 24 сата од третмана. Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија.

**Графикон 7.** Утицај SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија након 24 сата од третмана. Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија.

**Графикон 8.** Утицај SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија након 24 сата од третмана. Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија.

**Графикон 9.** Ефекти SEL1 на концентрацију O<sub>2</sub><sup>•-</sup> у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



- Графикон 10.** Ефекти SEL2 на концентрацију  $O_2^{\cdot -}$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 11.** Ефекти SEL3 на концентрацију  $O_2^{\cdot -}$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 12.** Ефекти SEL4 на концентрацију  $O_2^{\cdot -}$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 13.** Ефекти SEL1 на концентрацију  $NO_2^-$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 14.** Ефекти SEL2 на концентрацију  $NO_2^-$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 15.** Ефекти утицаја SEL3 на концентрацију  $NO_2^-$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 16.** Ефекти утицаја SEL4 на концентрацију  $NO_2^-$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 17.** Ефекти SEL1 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 18.** Ефекти SEL2 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 19.** Ефекти SEL3 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 20.** Ефекти SEL4 на концентрацију GSH у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.
- Графикон 21.** Експресија иРНК за  $\beta$ -актин у третману SEL1-4 једињењима на НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 22.** Релативна експресија иРНК за *GPX1* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 23.** Релативна експресија иРНК за *GPX2* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 24.** Релативна експресија иРНК за *GPX3* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 25.** Релативна експресија иРНК за *GPX4* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 26.** Релативна експресија иРНК за *GPX6* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 27.** Релативна експресија иРНК за *GST* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 28.** Релативна експресија иРНК за *TXNRD* ген у НСТ-116 ћелијама.
- Графикон 29.** Специфична индукција Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B у НСТ-116 ћелијама трансфектованих помоћу рТРАF<sup>Nrf2/HIF/NF- $\kappa$ B</sup> и анализираних системом Operetta у високој резолуцији.

## Листа скраћеница

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина  
 ЕЦМ – екстрацелуларни матрикс  
 иРНК – информациона РНК  
 ММП – металопротеиназа матрикса  
 ОСЈ – органоселенска једињења  
 РНК – рибонуклеинска киселина  
 цДНК – комплементарна ДНК  
 5-FU – 5-флуороурацил  
 APC – *Adenomatous Polyposis Coli*  
 ARE – *Antioxidant Response Element*  
 АТР – аденозин трифосфат  
 BRCA1 – *Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein*  
 BSA – *Bovine Serum Albumin*  
 САТ – каталаза  
 СЕА – карциноембриогени антиген  
 CO<sub>2</sub> – угљен диоксид  
 DAPI – диамидино-2-фенилиндол  
 DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
 DMOG – диметилноксалглицин  
 DMSO – диметил-сулфоксид  
 DTNB – 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина)  
 EDTA – етилендиамин тетрасирћетна киселина  
 EGF – *Epidermal Growth Factor*  
 ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent assay*  
 ЕРО – еритропоетин  
 FAP – *Familial Adenomatous Polyposus*  
 FBS – *Fetal Bovine Serum*  
 FHC – *Ferritin Heavy Chain*  
 FOLFOX – 5-FU, leucovorin и oxaliplatin  
 GLC – гасно-течна хроматографија  
 GR – глутатион редуктаза  
 Grx – глутаредоксин  
 GS- – тиолатни анјон  
 GSH – глутатион  
 GST – глутатион S-трансфераза  
 GSSG – оксидовани глутатион  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид

HER-2 – *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*  
 HIF – *Hypoxia-Inducible Factor*  
 HNPCC – *Hereditary, Non-Polypous Colorectal Cancer*  
 HRE – *hypoxia Response Elements*  
 ICAM-1 – интерцелуларни адхезиони протеин-1  
 IL – интерлеукин  
 iNOS – индуцибилна азот моноксид синтаза  
 IR – инфрацрвено  
 JNK – *c-Jun N-terminal Kinase*  
 Keap1 – *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*  
 KRAS – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*  
 luc2P – луцифераза  
 MeSeCys – метилселеноцистеин  
 Mn-SOD – манган-супероксид дисмутаза  
 MT3 – Металотионеин-3  
 МТТ – 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид  
 NADH – никотинамид аденин динуклеотид  
 NADPH – никотинамид аденин динуклеотид фосфат  
 NaNO<sub>3</sub> – натријум нитрит  
 NBT – *Nitro Blue Tetrazolium*  
 NF-κB – *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*  
 NMR – нуклеарна магнетна резонанца  
 NO – азот моноксид  
 NOS – азот моноксид синтаза  
 NQO1 – хинон оксидоредуктаза 1  
 Nrf2 – *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor*  
 O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксид анјон радикал  
 OD – оптичка густина  
 •OH – хидроксил радикал  
 OONO<sup>-</sup> – пероксинитрит  
 ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нитрозо пероксокарбоксилат

p16 – циклин зависни инхибитор киназе 2А  
p21 – циклин зависни инхибитор киназе 1  
p53 – тумор супресор протеин p53  
PBS – *Phosphate Buffer Saline*  
PRX – пероксиредоксин  
pTRAF – *Plasmid for Transcription Factor Reporter Activation Based on Fluorescence*  
qPCR – полимеризациона реакција у реалном времену  
RNS – *Reactive Nitrogen Species*  
ROS – *Reactive Oxygen Species*  
rRNA – рибозомална РНК  
Se – селен  
SeCys – селеноцистеин

SEL1 – 2-(фенилселенометил)тетрахидрофуран  
SEL2 – 2-(фенилселенометил)тетрахидропиран  
SEL3 – селено-хидантоин (лиганд)  
SEL4 – паладијум(II) комплекс селено-хидантоина  
SeMet – селенометионин  
SOD – супероксид дисмутаза  
TGF- $\alpha$  – *Transforming Growth Factor Alpha*  
TNB – 5'-тио-2-нитробензоева киселина  
TNF – *Tumor Necrosis Factor*  
Trx – тиоредоксин  
TrxR – тиоредоксин редуктаза  
UV – ултраљубичасто зрачење

## УВОД

### 1. Канцер

Канцер је комплексна болест која је веома варијабилна у својој појави, развоју и исходу од једног пацијента до другог. Сличан ниво хетерогености и варијабилности постоји како на ћелијском, тако и на молекуларном нивоу. Канцерогенеза је сложени процес током којег ћелије подлежу дубоким метаболичким променама као што су неконтролисано размножавање, избегавање надзора од стране имуног система и инвазија до удаљених ткива уз формирање метастаза (Merlo и сар., 2006). Ове промене настају акумулацијом модификација и мутација у генетичком материјалу. Посебно су значајне модификације које утичу на систем контроле пролиферације и дуговечности ћелија, односе са суседним ћелијама и способности да успешно избегну одговор имуног система. Овај процес резултира формирањем масе дерегулисаних ћелија. Својим неконтролисаним растом, канцер ремети основне физиолошке функције, дајући више специфичних симптома у зависности од локације и величине туморске масе.

На основу података који су добијени у оквиру пројекта секвенционирања хуманог генома, процењује се да људски геном садржи око 23.000 гена (Venter и сар., 2001). Неколико хиљада ових гена (3.000-5.000) кодирају протеине укључене у генетичким програмима који су дерегулисани код канцера (Boyle и Levin, 2008). Нефункционалан ген може резултирати продукцијом физиолошки абнормалне количине мутираног протеина (супра-или субфизиолошке количине), или продукцијом аберантних протеина са измењеном функцијом, чиме се мења нормално функционисање ћелије, ткива и организма. На пример, мутација у гену *KRAS* (продукт протеин p21 GTPаза) значајно појачава процес сигнализације у процесу регулације деобе ћелије (Eser и сар., 2014). Овај протеин нормално функционише као сигнални интермедијер између рецептора за факторе раста на површини ћелије и молекуларних система који шаљу ове сигнале. Када је *KRAS* ген мутиран, одговарајући протеин се понаша као укључени прекидач који генерише сигнале за сталну деобу ћелија и када нема спољашњег сигнала, тј. и када фактор раста није везан за рецептор на површини ћелије. Мутације *KRAS* су уобичајене код многих канцера, као

што су карцином дебелог црева (у 30-40% случајева) (Phipps и сар., 2013), или аденокарцином плућа (у 20-30% случајева) (Meng и сар., 2013). Такав активирани ген се назива „онкоген“ јер промовише неконтролисану пролиферацију ћелија и развој канцера.

Насупрот томе, неки гени доприносе развоју канцера када су инактивирани. Ово је, на пример, случај *P53* гена. Овај ген кодира протеин који природно делује као инхибитор деобе ћелија. Мутација овог гена резултује дисфункционалним протеином, који не може да заустави пролиферацију ћелија када је то потребно. Мутације у *P53* могу се наћи у скоро свакој врсти канцера. Такав ген који доприноси развоју канцера кроз губитак његове функције назива се „тумор супресор“, јер у нормалним условима његови активни производи функционишу као регулатори и супресори раста канцера (Olivier и сар., 2009).

Многи канцери настају из само једне ћелије (или од малог броја ћелија) (Nowell и сар., 1976). Да би постала канцерска, у овој ћелији мора доћи до неколико промена у онкогенима и тумор супресор генима који ће учинити дату ћелију способном за пролиферацију далеко изван својих нормалних граница. Овај процес ће резултирати формирањем клона ћелија канцера. Ако организам толерише настали клон и дозвољава да остане незапажен, може лако доћи до даљег размножавања ових ћелија. Са сваком деобом ћелије канцера стичу додатне мутације (јер су им мутирани/нефункционални и системи за поправку оштећења на ДНК) и тиме стичу нове особине. Оне ћелије које стекну особине које им омогућавају да боље преживе у датим условима (нпр. буду отпорне на примењену терапију или се брже деле или боље избегавају реакцију имуног система) ће преживети и даље се умножавати. Уз то, стичу и могућност инвазије у околно ткиво и метастазирање и тиме попримају агресивнији фенотип. Такође, ово је један од кључних разлога зашто се канцер тешко лечи. Способност ћелија канцера да се брзо и ефикасно прилагоде новим околностима често може бити испољена у повећаној резистентности ка терапији (Nowell и сар., 1976; Weinberg, 2014).

Канцер је најбоље описати као скуп прогресивних промена које изазивају делимичну или тоталну дисфункцију дела или целог органа, те на крају организма у целини (Weinberg, 2014). Почињу као мале, неупадљиве лезије које углавном остају ограничене у свом примарном ткиву и сматрају се клинички бенигним. Када се открију у раној фази, могу се комплетно оперисати и ретко могу узроковати смрт пацијента. Понекад, ове мале лезије се појављују унутар подручја ткива које је погођено хроничним инфламаторним обољењем,

као цироза у јетри, гастритис у желуцу или цревне метаплазије у доњем једњаку (Баретов једњак). Дакле, постојање хроничне инфламаторне болести представља повољан терен за појаву канцера. Када је непримећен у раној, бенигној фази, канцер има шансу за развој и напредак не само у величини већ и у способности да ремети структуру околног ткива. Када стекну малигни фенотип, такве малигне ћелије неће више бити спутаване, већ ће се проширити у оквиру органа на који утичу, а затим ће се ширити и у суседне органе. Наиме, оне улазе у лимфне судове ширећи се у лимфне чворове. Кроз лимфу или крвоток, могу да путују до удаљених органа и формирају нове колоније које су означене као метастазе, лоциране најчешће у костима, плућима, јетри или мозгу. Раст и ширење канцера често је олакшано чињеницом да ћелије канцера промовишу ангиогенезу, односно синтезу нових крвних судова, чиме се побољшава снабдевање канцера кисеоником и хранљивим материјама (Hanahan и Weinberg, 2000; Weinberg, 2014). Свеукупно, канцер се развија кроз три фазе, почев од иницијације (током које канцероген ствара мутације у ДНК нормалних ћелија), преко промоције (у којој се инициране ћелије деле и развијају), до прогресије (током које канцери постају агресивнији кроз акумулацију допунских генетичких или епигенетичких модификација) (Weinberg, 2014).

Метастазе је много теже лечити. Поред локализованог циљања терапијом канцерогеног жаришта (хирургија, радиотерапија) потребне су и системске терапије уз употребу цитотоксичних лекова (хемиотерапија). Хемиотерапија се заснива на коришћењу токсичних материја које ометају функционисање дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) и деобу ћелије, тако да преференцијално убијају ћелије канцера, уколико је то могуће (Weinberg, 2014). Овај приступ се заснива на хипотези да ћелије канцера могу бити осетљивије од нормалних ћелија, јер чешће реплицирају своју ДНК током деобе, чиме се постижу веће могућности за убијање ћелија путем оштећења ДНК. Од недавно, постоје нове методе које користе молекуле који циљају само једну посебну врсту канцера (Baselga, 2006). Оне обухватају, на пример, антитела са специфичним афинитетом према молекулима на површини ћелија канцера, као што су *trastuzumab*, антитело које инхибира површински рецептор назван HER-2 (енгл. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), који је често прекомерно експримиран у карциному дојке, или лекови који блокирају активност ензима активираних у ћелијама канцера, као што је *imatinib* који блокира бројне ензиме тирозин киназе у многим канцерима гастроинтестиналног тракта, или *erlotinib* који

блокира рецептор епидермалног фактора раста (енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR).

Показано је да се развој канцера код мишева или пацова изложених канцерогенима спроводи у више корака, почев од иницијације, преко промоције до прогресије. Као резултат тога, велики број онкогена и тумор супресорних гена је промењен независно од локације органа или узрока болести. Продукти ових гена су сви део мреже фактора који заједно контролишу ћелијску пролиферацију, диференцијацију и преживљавање (Јуришић и Џиванчевић-Simonović, 2002; Weinberg, 2014).

### 1.1 Колоректални карцином (карцином дебелог црева)

Канцер је један од главних узрока морбидитета и морталитета у целом свету (Ferlay и сар., 2012). Колоректални карцином (карцином колона и ректума, или карцином дебелог црева) чини код мушкараца 10.0% и код жена 9.2% свих канцера и представља трећи најчешћи канцер свету и четврти најчешћи узрок смрти (Ferlay и сар., 2012). Карцином дебелог црева је углавном болест развијених земаља западне хемисфере. Земље са највишим стопама инциденце су Аустралија, Нови Зеланд, Канада, САД и делови Западне Европе. Интересантно је да развијени свет чини скоро 55% свих случајева. Земље са најнижим ризиком укључују Кину, Индију, као и делове Африке и Јужне Америке. Већина случајева карцинома дебелог црева развија се спонтано, што значи да у овим случајевима не постоји позната наследна (генетичка) предиспозиција за развој, већ се ови тзв. спорадични карциноми јављају услед накупљања соматских мутација. У малом проценту случајева постоји наследна предиспозиција за развој карцинома дебелог црева услед постојања мутација у герминативним ћелијама која се преноси у породици кроз генерације. Код особа које су наследиле ове мутације, значајно је повећан ризик за обољевање од различитих врста канцера, па је и појава раног обољевања код ових особа (у ранијој животној доби у односу на општу популацију) веома честа.

Примери синдрома са наследном предиспозицијом за развој карцинома дебелог црева су:

- *Lynch syndrome*, HNPCC (енгл. *Hereditary, Non-Polypous Colorectal Cancer*) налази се у око 3% свих канцера колона и подразумева генетску промену неколико гена. Ова генетичка аберација повећава ризик за развој канцера у материци

(ендометријум) и јајницима, панкреасу, желуцу, танком цреву и бубрегу (Lynch и сар., 2009).

- *Familial adenomatous polyposis* (FAP) чине око 1% карцинома дебелог црева (Bishop и Thomas, 1990). Код FAP синдрома долази до мутације у *APC* гену (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli*), који кодира тумор супресор APC протеин укључен у *wnt* сигнални пут (Bienz, 2003).

Фактори ризика за настанак колоректалног карцинома (Haggar и Boushey, 2009) су:

- Животна средина и начин живота - висок унос масти, пржена храна, честа употреба дувана и алкохола, гојазност и неактивност.
- Инфламаторна болест црева (улцерозни колитис - Кророва болест) повећава ризик од колоректалног карцинома.
- Претходна зрачења.

Колоректални карцином се одликује спорим растом, потребно је да прође и 5-10 година до фазе испољавања симптома. Испољавање симптома и њихов развој зависе од локализације и степена развоја карцинома (Роровић, 2003). Аденоми (жлездани канцери) су најчешће без симптома и откривају се узгредно. Код симптоматских се јавља крварење, промене у навикама цревног пражњења, бол у трбуху, губитак телесне масе, малокрвност, а ређе перфорација и илеус који су показатељи лоше прогнозе. Клиничка слика често има притајен и подмукао ток, па је рано откривање болести од кључног је значаја у погледу лечења ових болесника и њиховог преживљавања. За исход је важан стадијум болести у моменту откривања. Просечно преживљавање болесника са удаљеним метастазама износи 6-8 месеци (Роровић, 2003).

Основни начин напредовања канцера јесте ширење у околна ткива и органе. Метастатско ширење обезбеђује добро развијена мрежа лимфних путева, као и крвних судова у које овај канцер може да продре (Роровић, 2003; Weinberg, 2014).

У крвној плазми болесника са канцером колоне (епителни канцер колоне) може се открити присуство тумор маркера, специфичних молекула које канцер секретује у крв. За колоректални канцер постоји неколико туморских маркера који пружају корисне прогностичке информације: карциноембриогени антиген (CEA), канцер антигени (CA 19-9, CA 50, CA 242), серумски гастрин, катепсин Б, CD 26, као и ниво експресије гена *p16*, *p21* и *p53* (Мајкић-Синг, 2006). Карциноембрионални антиген је најчешће коришћени



тумор маркер, али је недовољно специфичан за рано откривање болести. У повишеним вредностима, среће се и код других канцера (плућа, дојка, панкреас), као и код бенигнух лезија (цироза, панкреатитис, запаљења колона) (Stevović, 1994; Tagi и сар., 2010).

Пацијенти са канцером колона који није метастазирао обично имају операцију као главни или први третман. Адјувантна (додатна) хемиотерапија се такође може користити. Већина адјувантних третмана примењује се најчешће током 6 месеци (*Cancer Facts & Figures*, 2014). На основу истраживања Америчког друштва за канцер (*American Cancer Society. Treatment of Colon Cancer, by Stage*) дефинисано је укупно 5 стадијума развоја канцера колона, као и одговарајућа терапија.

У фази 0 канцера колона, хирургија је обично довољна. Ово се може урадити у већини случајева уклањањем полипа (полипектомија) или локална ексцизија кроз колоноскоп. Уклањање дела црева (делимична колектомија) повремено може бити потребна ако је канцер превелики да би се уклонио локалном ексцизијом.

У фази I, канцер се проширио и захватио слојеве зида колона, али не шире изван зида самог колона (или у околним лимфним чворовима). Фаза I обухвата канцер који је био део полипа. Ако је полип потпуно уклоњен током колоноскопије, без ћелија канцера на угловима (маргинама), други третман не мора бити потребан.

Фаза II подразумева да је канцер прерастао зид колона, и евентуално продро у оближње ткиво, али још није проширен на лимфне чворове. Операција којом се уклања део колона који садржи канцер (делимична колектомија) заједно са лимфним чворовима у близини може бити једина терапија која је потребна. Лекар може препоручити адјувантну хемиотерапију ако постоји већи ризик од рецидива због одређених фактора (канцер изгледа абнормално када се посматра под микроскопом, или ако је канцер прерастао у оближње крвне судове или лимфне чворове). Ако се користи хемиотерапија, главне опције укључују 5-флуороурацил (5-FU) и *leucovorin*, *oxaliplatin* или *capecitabine*, али и друге комбинације се такође могу користити (*American Cancer Society. Treatment of Colon Cancer, by Stage*).

У фази III, метастазе су се прошириле на оближње лимфне чворове, али се још нису прошириле на друге делове тела. Операција којом се уклања део колона са канцером (парцијална колектомија), заједно са околним лимфним чворовима, затим адјувантна хемиотерапија јесте стандардни третман за ову фазу. Хемиотерапија обично подразумева

употребу FOLFOX (5-FU, *leucovorin* и *oxaliplatin*) или CapeOx (*capecitabine* и *oxaliplatin*) режима, али неки пацијенти могу добити 5-FU са *leucovorin* или *capecitabine* само на основу њихових потреба у смислу узраста и здравља. Само зрачна терапија и/или хемиотерапија може бити опција за људе који нису довољно здрави за операцију (Libutti и сар., 2015).

У фази IV канцер се проширио из колона до удаљених органа и ткива. Канцер колона најчешће метастазира у јетру, али се такође може проширити на другим местима, као што су плућа, мозак, перитонеум, или до удаљених лимфних чворова. У већини случајева је мало вероватно излечење операцијом. Међутим, ако постоји само неколико мањих области ширења канцера (метастазе) у јетри или плућима и могу се уклонити заједно са канцером колона, тада хирургија може помоћи да пацијенти дуже живе и можда се чак и излече. Ако се метастазе не могу уклонити јер су превелике или их има превише, хемиотерапија се може дати пре хирургије (неoadјувантне хемотерапије). Затим, ако се канцер смањује, следи операција. Ако је канцер превише метастазирао, хемиотерапија је главни третман (Libutti и сар., 2015; Hsu и сар., 2016).

## 1.2 Карцином дојке

Према Светском фонду за истраживање канцера (*World Cancer Research Fund International*), карцином дојке је најчешћи тумор који се јавља у општој популацији, са доминантном инциденцом код жена (Ferlay и сар., 2012). Око 1,7 милиона нових случајева откривени су у 2012. години. У добро развијеним земљама рано откривање карцинома дојке омогућава стопу петогодишњег преживљавања у 80-90% случајева. Нажалост, код детекције касног карцинома дојке, стопа петогодишњег преживљавања смањује се на око 22% (Howlader и сар., 2017).

Учесталост карцинома дојке код жена варира значајно, са највише инциденци у Сједињеним Америчким Државама и северној Европи, средњој, јужној и источној Европи и Јужној Америци, док је најмања у Азији. Међутим, стопе инциденци су у порасту у азијским земљама са традиционално ниском учесталосту, посебно у Јапану, Сингапуру, и урбаним областима Кине (Youlden и сар., 2014).

Етиологија карцинома дојке је вишеструка. Око 99% карцинома дојке јавља се у женској популацији (*Cancer Facts & Figures*, 2014). Женски полни хормони су важан разлог зашто жене чешће добијају канцер дојке него мушкарци. Хормони јајника стимулишу развој дојки, због чега је временски утицај изложености естрогену и прогестерону од суштинске важности (Santen, 2003). Осим тога, гени и утицај околине су такође укључени. Додатни фактори ризика код наследног карцинома дојке и јајника (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, HBOC) могу бити учесталост мутација у генима *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *ATM*, *CHEK2* or *PALB2* (Godet и Gilkes, 2017). Фактори који утичу на агресивност (метастатски потенцијал) карцинома дојке нису до данас у довољној мери објашњени. Осим тога, није јасно зашто се нека врста канцера проширила на кости или на меко ткиво, а друга претежно у трбушну дупљу, као и зашто су неки тумори метастазирају одмах, док други продукују метастазе много касније (Lauman и сар., 2007). Боље разумевање биологије карцинома дојке је важно, посебно због чињенице високог метастатског потенцијала и високе учесталости појаве ове врсте карцинома.

Први знак карцинома дојке је грудвица у ткиву дојке која се на додир разликује од околног ткива (понекад се ове промене не могу детектовати додиром). Даље, може се приметити промена у величини и/или облику дојке, увлачење брадавице или дела коже дојке, појава секрета из брадавице, рупичасте промене на кожи груди, љуштење на пигментираној површини коже која окружује брадавицу или кожу дојке (Dawood и сар., 2011).

Постоји неколико начина за лечење карцинома дојке (Wolff и сар., 2014) у зависности од врсте и стадијума.

- Локални третман. Ови третмани представљају локалне терапије које третирају канцер без утицаја на остатак тела. Локалне терапије могу укључивати хирургију и радиотерапију. Ови третмани имају веће шансе да буду корисни у ранијој фази (мање развијених) канцера, иако се могу користити и у неким другим ситуацијама;
- Системски третмани канцера дојке подразумевају примену лекова орално или директно у крвоток. Ова врста терапије назива се системска јер може допрети до ћелија канцера било где у телу.

У зависности од типа карцинома дојке, постоје различити приступи у третирању канцера (Wolff и сар., 2014).

**Хемиотерапија.** Хемиотерапија је врста системске терапије која се не преписује у третману сваког типа карцинома дојке, нпр. у третману локализованих, тј карцинома дојке који се нису проширили на локалне лимфне чворове, није потребно применити хемиотерапију. Може се аплицирати након операције као помоћна (адјувантна) хемиотерапија или пре операције као неoadјувантна хемиотерапија, у циљу покушаја смањивања канцера који је превелики за операцију у време постављања дијагнозе. Неoadјувантна терапија се може користити и у покушају да се канцер смањи због каснијег уклањања мање инванзивном операцијом. Исто тако, апликацијом хемиотерапије пре него што је канцер уклоњен, лекари могу боље да виде како канцер реагује на њу. Ако први сет хемио лекова не смањује канцер, лекар ће знати да су потребни и други лекови. Код напредних карцинома дојке хемиотерапија се може користити као главни третман за жене чији се канцер проширио ван дојке и лимфних чворова у подручју пазуха. Дужина лечења зависи од квалитета хемиотерапије и од степена толеранције на терапију. У већини случајева, хемиотерапија је најефикаснија када се користи комбинација више од једног лека (Carrick и сар., 2009):

- *Anthracyclines*, као што је *doxorubicin (Adriamycin)* и *epirubicin (Ellence)*;
- *Taxanes*, као што је *(Taxol)* и *docetaxel (Taxotere)*;
- 5-FU;
- *Cyclophosphamide (Cytosan)*;
- *Carboplatin (Paraplatin)*.

Најчешће се користе комбинације 2 или 3 од горе наведених лекова.

**Хормонска терапија.** Раст неких врста карцинома дојке значајно зависи од продукције хормона (*American Cancer Society. Hormone Therapy for Breast Cancer*). Тако, естроген (ЕР)-позитивне и/или прогестерон (ПР)-позитивне ћелије карцинома дојке имају на својој површини рецепторе који везују ове хормоне икоји им стимулишу пролиферацију. Постоје различити начини да се заустави везивање хормона за ове рецепторе. Хормонска терапија је облик системске терапије и препоручује се само код жена чији карциноми експримирају хормонске рецепторе (позитивни су за хормонске рецепторе). Хормонска терапија се често користи после операције (као помоћна терапија) како би се смањио ризик од поновне појаве канцера (рецидива).

Лекови који блокирају естрогене рецепторе су:

- *Tamoxifen*;
- *Fulvestrant*.

Третмани које снижавају ниво естрогена

- *Aromatase inhibitors* (инхибитори ароматазе)
  - *Letrozole (Femara)*;
  - *Anastrozole (Arimidex)*;
  - *Exemestane (Aromasin)*.

Неки карциноми дојке на својој површини експримирају рецепторе за хумани епидермални фактор раста (HER2). Код ових типова карцинома дојке могуће је применити циљану терапију за HER2-позитивне канцере дојке, која подразумева употребу следећих лекова:

- *Trastuzumab (Herceptin)*;
- *Pertuzumab (Perjeta)*;
- *Lapatinib (Tyverb)*.

Карциноми који не експримирају ни рецепторе за естроген и прогестерон, а такође немају експримиране ни HER2 рецепторе називају се троструко-негативни (енгл. *triple-negative*) карциноми дојке.

Троструко-негативни канцер дојке расте и шири се брже од већине других врста карцинома дојке. Хормонска терапија, као ни лекови који циљају HER2, нису од помоћи у лечењу ових канцера, па је хемиотерапија је обично стандардни третман за овај тип карцинома дојке.

### 1.3 Ћелијске линије као модел системи у испитивању канцера

Имортализована ћелијска линија је популација ћелија изолована из вишећелијског организма, које због одређених мутација избегавају нормално ћелијско старење. Овакве ћелије се гаје током дужег временског периода *in vitro*. Мутације неопходне за бесмртност могу настати природно или бити намерно индуковане у експерименталне сврхе. Имортализоване ћелијске линије су веома важан модел систем за истраживање у биохемији и ћелијској биологији вишећелијских организама, као и у биотехнологији. Ово поједностављује анализу у биологији ћелија које иначе имају ограничен животни век

(Allen и сар., 2005). У Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, ПМФ Крагујевац, као модел системи за испитивање молекуларних механизма антиканцерогеног деловања биоактивних супстанци, користе се имортализоване ћелијске линије карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480), дојке (MDA-MB-231, MCF-7), као и здрава ћелијска линија фибробласта изолованих из феталне плеуре плућа (MRC-5). Тестиран је велики број биоактивних супстанци пореклом из природних извора (екстракти биљака, гљива и лишајева, прополис, матична млеч, изолована фенолна једињења – флавоноиди и фенолне киселине из природних супстанци), као и новосинтетисаних или модификованих хемијских једињења, чиме је потврђена употребљивост ћелијских линија као модел система за испитивање молекуларних механизма ћелија канцера (Stanković и сар., 2011; Milutinović и сар., 2015; Šeklić и сар., 2016; Alimpić и сар., 2017; Cvetković и сар., 2017; Čanović и сар., 2017; Petrović и сар., 2017; Živanović и сар., 2017).

### ***1.3.1 Вијабилност ћелија***

Одређивање вијабилности култивисаних ћелија је једна од основних анализа потребних у свакој студији која користи ћелије као модел систем. Квантификација ћелијске пролиферације може помоћи у одређивању оптималних услова за гајање ћелија. Такође, одређивање цитотоксичног ефекта биоактивних супстанци помаже у испитивању утицаја одређених третмана на испитивани модел систем ћелија (King и Robins, 2006).

Параметри који дефинишу ћелијску вијабилност у одређеном експерименту могу се разликовати услед разних утицаја, који као последицу индукују различите промене у редокс потенцијалу, интегритету ћелијских мембрана, активности ћелијских ензима. Основа сваког преклиничког тестирања је испитивање цитотоксичности третмана. Наиме, када се испитује нова супстанца или биоактивни екстракт природног порекла, први тест обично је тест цитотоксичности. Тестови цитотоксичности се користе за одређивање броја живих или мртвих ћелија у популацији ћелија (након третмана одређеном супстанцом). Са друге стране, пролиферациони тестови се користе за испитивање брзине раста ћелијске популације.

До данас су развијене различите методе за одређивање ћелијске вијабилности. Принцип ових метода зависи од физико-хемијских параметара који се одређују, те се могу поделити

на методе засноване на примени микроскопије (флуоресцентна и светлосна микроскопија), спектрофотометрије (читач микротитар плоча – ELISA) или проточне цитометрије.

Тестови за одређивање ћелијске вијабилности углавном указују на одређене маркере ћелијске активности, а могу указати на то како ћелије реагују на одређене стимулансе.

Тестови за одређивање ћелијске вијабилности користе се приликом испитивања ефеката фармаколошких препарата на ћелије, успостављања оптималних услова за одгајање ћелија, или за утврђивање стања ћелија пре отпочињања неког експеримента.

У дисертацији су коришћена два теста за одређивање ћелијске вијабилности: спектрофотометријски МТТ тест и тест за одређивање вијабилности ћелија заснован на бојењу Hoechst® 33342 бојом.

**Табела 1.** Преглед најчешће коришћених тестова за одређивање пролиферације, ћелијске вијабилности, цитотоксичности и апоптозе (преузето из *Abcam, A guide to cell viability, proliferation and apoptosis assays* и модификовано).

Тест	Ћелијска пролиферација	Ћелијска вијабилност	Цитотоксичност	Апоптоза
Аппехин				Х
АТР и АDP одређивање		Х		
Активност каспаза				Х
Ћелијски циклус	Х	Х		
Ћелијска пролиферација	Х	Х		
Ћелијска вијабилност	Х	Х		
ДНК фрагментација (TUNEL тест)				Х
GSH/GSSG одређивање				Х
LDH тест цитотоксичност и		Х	Х	
Тест живе/мртве ћелије		Х	Х	Х
Потенцијал мембране митохондрија				Х
Активност каспаза				Х

### 1.3.2 Апоптоза

Апоптоза (изведено из старогрчког *ἀπόπτωσης* „пропадање“) је процес програмиране ћелијске смрти који се догађа само у вишећелијским организмима (Green, 2011). Биохемијски процеси воде ка специфичним променама у ћелији (морфологији) и коначно смрти ћелије. Ове промене укључују пупљење ћелијске мембране, хроматинску кондензацију, фрагментацију хромозомалне ДНК, фрагментацију нуклеуса и формирање апоптотских тела. Између 50 и 70 милијарди ћелија умре процесом апоптозе сваког дана у једном одраслом људском телу (Karam, 2009).

Насупрот некрози, која представља једну форму трауматичне ћелијске смрти, резултујући акутним одумирањем ћелије, апоптоза је високо регулисани и контролисани процес; нпр. одвајање прстију на рукама и ногама у процесу развоја ембриона се дешава зато што ћелије између појединачних прстију улазе у процес апоптозе. За разлику од некрозе, апоптоза производи ћелијске фрагменте који се називају апоптотска телашца, оивичена ћелијском мембраном која бивају препозната и уклоњена фагоцитима пре него што њихов садржај исцури и изазове оштећење околних ћелија (Alberts и сар., 2008).

Када једном започне, процес апоптозе се веома тешко зауставља због тога што је то изузетно регулисани процес. Апоптоза може бити иницирана на два начина. Унутрашњи пут индукује ћелијску смрт услед одређеног стреса детектованог изнутра, док спољашњи пут афектира ћелије стресом индукованим споља (нпр. од друге ћелије). Оба пута индукују ћелијску смрт активацијом каспаза, које су заправо протеазе, тј. ензими који деградирају ћелијске протеине (Alberts и сар., 2008).

Тестови за одређивање апоптозе проучавају ћелије у процесу умирања одређивањем маркера који су активирани током програмиране ћелијске смрти (Milutinović и сар., 2015). Ови специфични биохемијски и морфолошки маркери се не јављају током некрозе. Тестови за апоптозу се користе у испитивањима молекуларних механизма цитотоксичности и типа смрти тестираних лекова или неких других биоактивних супстанци, или како одређено ткиво/ћелија реагује на токсичне материје. Генерално, уколико креирамо супстанцу која би требало да поседује антиканцерогене ефекте, апоптоза је жељени тип смрти ћелије, посебно имајући у виду да некроза изазива запаљенске процесе у организму.



#### 1.4 Миграција, инвазивност и метастаза

Ћелијска миграција је нормалан и неизоставан механизам којим се ћелија адаптира на различите услове током свог живота. Ћелија може мигрирати услед потребе обезбеђивања хранљивих материја, услед промењене структуре екстрацелуларног матрикса (ЕЦМ), због потребе међућелијске комуникације, имунског одговора на спољне надражаје и др. (Treat и сар., 2012). Међутим, миграција ћелија канцера представља најзначајнији проблем у целом процесу канцерогенезе и клиничком третману (Friedl и Wolf, 2010). Како је ћелијска миграција широк појам, ћелијска инвазија је процес специфичан искључиво за ћелије канцера током њиховог продирања кроз базалну мембрану и ЕЦМ у околна ткива. Инвазивност различитих ћелија канцера је различита и може се квантификовати *инвазивним потенцијалом* ћелија (Clark и Vignjević, 2015). Инвазивне ћелије поседују тзв. *инвазивни фенотип* условљен иререверзибилним променама компоненти цитоскелета и ослабљеним међућелијским везама. Инвазивне ћелије канцера појачано експримирају протеолитичке ензиме и металопротеиназе које разграђују ЕЦМ и олакшавају њихову миграцију у околна ткива (Mattila и Lappalainen, 2008; Friedl и Wolf, 2010; Weinberg, 2014). Способност ћелија канцера да се шире од првобитне локације и инвадирају и колонизују удаљене локације организма јесте основна карактеристика која разликује бенигне од малигнух тумора. Метастазирање је главни узрок смрти од канцера. Све док канцер остаје ограничен на једну одређену локацију, постаји могућност хируршке интервенције. Када ћелије канцера почну да се шире кроз организам, све их је теже контролисати. Прво, оне могу доћи до удаљених локација органа и формирати секундарне канцере. Друго, ћелије канцера које су способне да се шире стичу особине које их чине отпорнијим на третман и уништење од стране имуног система (Vinogradov и Wei, 2012). Стога, детекција удаљеног ширења и метастазирања често је индикатор лоше прогнозе за пацијента. Ово се огледа у систему класификације канцера, који пружа универзални систем за описивање анатомског опсега канцера (King и Robins, 2006; Weinberg, 2014).

Инвазивне ћелије канцера, које продиру из свог примарног места у околна ткива, у највећем броју случајева узрокују појаву *метастаза* продирући у судове крвотока и лимфотока и ширећи се по организму у удаљене органе. Термин метастаза потиче од комбинације две грчке речи „мета“, што значи „следећи“ или „изван“, и „стаза“, што значи

„место“ или „став“. Дакле, може се рећи да је појава метастаза коначно условљена инвазијом ћелија канцера. Овај процес је могућ уласком у лимфне или крвне судове. Најновије откриће новог органа *интерстицијума*, широко распрострањеног простора између органа испуњеног флуидима, указује на велику могућност да ћелије канцера инвадирају управо кроз овај *орган* (Benias и сар., 2018). Интерстицијум је широко распрострањен простор између органа попуњен флуидима. Регионална инвазија је сама по себи фактор лоше прогнозе. Локални инвазивни канцер се не рачуна као метастатски. Он се може лечити коришћењем истих протокола као код не-метастатских, локализованих лезија (Zhang и сар., 2012).

Дуго времена, метастатске болести су сматране крајњим кораком у напредовању канцера. Сматрало се да највише трансформисане ћелије канцера стичу капацитет да постану независне од њиховог примарног порекла, да нападну друге органе, да путују у телу и да формирају колоније. Овај став поткрепљен је открићима матичних ћелија канцера, које су способне да се самообнове и такође генеришу ћерке ћелије које еволуирају у различите ћелијске облике и фенотипове у зависности од интеракције са околином (Li и сар., 2007). Тако, у датом канцеру, може да постоји и неколико линија развоја ћелија канцера. Већина ћелија може да се развије у одређеном правцу, чиме се чувају особине опште структуре ткива где су настали. Ове ћелије доприносе растућој локалној маси канцера. Друге ћелије могу развити различите облике и улоге, пролазећи кроз морфолошке прелазне облике које им омогућавају да пређу препреке и нападају друге органе. Ово су метастатске ћелије (Brabletz и сар., 2005). Из тога следи да се метастатске ћелије могу јавити чак и у веома малим, по свему судећи раним лезијама канцера. Ово може објаснити зашто више од 10% пацијената може имати метастазе без идентификације примарног канцера (Freudenberg и сар., 2008). Код ових пацијената, примарни канцер може бити толико мали да није детектован.

#### ***1.4.1 Молекуларни механизми метастазе***

Метастаски процес се састоји од низа корака током кога ћелије канцера напуштају оригинални канцер, улазе у лимфу или крвоток (процес назван „интравасија“), опстају и мигрирају стварајући колоније у удаљеним органима. Овај сложени процес подразумева

да метастатске ћелије могу стећи многе нове особине путем генетичких и епигенетичких промена (Yokota, 2000; Vogenrieder и Herlyn, 2003).

Инвазивност канцера подразумева пролаз кроз ткивне баријере и инвазију у околна ткива. Међутим, постоје јасно дефинисани оквири који одређују да ли одређена ћелија канцера има способност да метастазира. Нпр. продукција протеаза (Turpeenniemi-Нујанен и сар. 1985) је препозната као један од фактора које узрокују инвазивност, где су идентификовани рецептори на површини ћелије, који су неопходни у посредовању метастаза (Gunthert и сар. 1991). Са друге стране, инвазија као први критични корак у метастатском процесу, захтева промене механизма међућелијске адхезије, као и адхезије ћелија на екстрацелуларни матрикс (Mego и сар., 2010). Главна група молекуларних медијатора међућелијске адхезије је фамилија кадхерина. Инвазија је често праћена смањењем експресије кадхерина (Yilmaz и Christofori, 2010). Даље, инвазија је омогућена протеолитичком деградацијом ЕЦМ, што омогућава да ћелије канцера продиру кроз границе ткива. Задржавање ћелија канцера на ЕЦМ углавном је посредовано интегринима, који чине трансмембранске хетеродимере. Деградација ЕЦМ пре свега је посредована класом протеина металопроотеиназа (Egeblad и Werb, 2002). На основу нивоа учешћа генетских промена у метастатском процесу, разликују се две опште класе гена метастаза: гени иницијацијске метастазе и гени напредовања метастазе (Nguyen и Massague, 2007). Гени иницијације метастазирања су они који у примарним канцерима омогућавају ћелијама канцера да уђу у циркулацију. Гени напредовања метастазирања су они који испуњавају одређене функције које ограничавају брзину у основном расту канцера. Гени вируленције метастаза су они који дају селективну предност у другим местима, чиме узимају учешће у метастатској колонизацији, али не и у развоју примарног канцера. Међутим, пре него што постану кандидати за метастазе, малигне ћелије морају да испуне низ услова: оне морају бити у стању да се неограничено шире и да иницирају формирање нових капилара и крвних судова, процес назван ангиогенеза (Hanahan и Weinberg, 2000). Како канцери расту, морају се прилагодити и одговорити на притиске унутрашње средине, попут оних које врши имуни систем, или на снижење притиска кисеоника и повећања киселости средине (Fidler и сар., 2000). Такви капацитети се стичу током иницијације и локалног развоја канцера, али морају остати активни током целог периода развоја

метастаза, јер су од кључне важности за преживљавање ћелија канцера током њиховог ширења у организам и током развоја удаљених колонија.

#### 1.4.2 Лечење метастатског канцера

Присуство, број и локација метастаза су кључни параметри за одабир одговарајућих терапијских метода. У већини случајева третман се састоји од комбинације локалне терапије у циљу уклањања примарног тумора, као и системске терапије усмерене на уништавање микрометастаза као превенција стварања додатних (Fidler, 2002; Fidler и сар., 2007). Главни локални третмани су хирургија и радиотерапија (тј. употреба 3-димензионалног зрачења у веома ограниченој области тела). Системски третмани обухватају хемиотерапију, затим биолошку, а када је то могуће, и хормонску терапију. Биолошке терапије могу користити моноклонална антитела која циљају ћелије канцера или факторе који блокирају процесе укључене у метастазирање, као што је ангиогенеза. Тренутни приступи у развоју лекова се фокусирају на неутрализацији одређених фактора који су укључени у инвазивност тумора, као што су металопроотеиназе или интегрини. Избор лечења зависи од многих фактора, нарочито од врсте канцера, величине, броја и локализације метастаза, општег стања и старости пацијената и третмана и одговора пацијента који је већ примио одређену терапију.

## 2. Механизми редокс равнотеже

Људски организам је кључно зависан од употребе кисеоника у процесу респирације, тј. продукције потребне енергије. Међутим, аеробни начин живота носи и одређене ризике. Наиме, молекуларни кисеоник због својих хемијских особина, у одређеним условима иницира каскаду реакција које у крајњој инстанци продукују слободно-радикалске реактивне кисеоничне врсте (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Како би се ниво ROS због своје изузетне хемијске реактивности и штетности држао у довољно ниској концентрацији, ћелије су развиле тзв. *антиоксидационе заштитне системе*. Осетљива хемијска равнотежа количине насталих ROS при употреби молекулског кисеоника може бити нарушена посебно разним спољним утицајима (јонизујућа зрачења, присуство

тешких метала и других хемијских супстанци), фаворизујући повећану продукцију ROS. Описани процеси дешавају се спонтано у сваком тренутку у свакој људској ћелији, док су нпр. фагоцити специјализовани за непрекидну повећану синтезу ROS (Halliwell и Gutteridge, 2006; Marković и сар., 2006, 2007). Редокс биологија је важна грана науке која истражује феномене редокс система ћелије у многим физиолошким процесима, као што су ћелијска пролиферација, пренос сигнала, међућелијска комуникација, инфламација, одбрана од микроорганизама, старење, канцерогенеза, апоптоза, некроза, токсично деловање лекова и др. (Halliwell и Gutteridge, 2006).

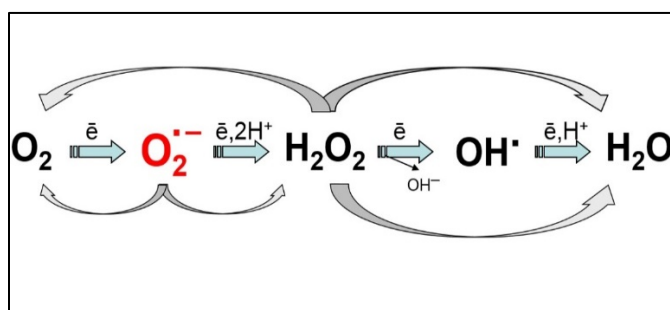
Све ћелије морају да одржавају редокс равнотежу. Осим тога, оне морају бити у стању да брзо осете и реагују на различите индукторе који ремете редокс хомеостазу. Модификације редокс-осетљивих протеина радикалима који потичу од ROS и реактивних врста азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) се дешавају као један од главних пост-транслационих механизма у регулацији функције протеина. Ове модификације се могу регулисати редукујућим системима, од којих су глутатион (GSH) и тиоредоксин (Trx) системи са најистакнутијим функцијама у ћелијама сисара. Редокс путеви су строго контролисани и обично су веома осетљиви на егзогене и ендogene реактивне молекуле који лако модификују критичне редокс осетљиве аминокиселинске групе протеина (Rhee и сар., 2005; Marković и сар., 2006, 2007; Banerjee, 2008; Flohe, 2010; Herrmann и Dick, 2012).

## 2.1. Реактивне врсте кисеоника

Стварање реактивних врста кисеоника неизбежна је последица живота у аеробном окружењу. Митохондријални енергетски метаболизам, тј. митохондријални електрон транспортни респираторни ланац, под физиолошким условима представља квантитативно највећи извор ROS за већину ћелија (Kowaltowski и сар., 2009). Молекулски кисеоник ( $O_2$ ), коначни акцептор електрона у митохондријском електрон транспортном ланцу, прихвата четири електрона у једном кораку и производи  $H_2O$  (Шема 1). У првом кораку, након примања првог електрона, молекулски кисеоник лако прелази у нестабилни супероксид анјон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ). Примањем другог електрона, супероксид анјон радикал прелази у стабилнији водоник пероксид ( $H_2O_2$ ). Међутим, како је ћелија окружење у којем се налази велики број молекула оксиданаса и антиоксиданаса, судбина водоник пероксида може

бити различита. Највероватнија даља хемијска реакција јесте примање и трећег електрона резултирајући генерисањем два молекула хидроксил радикала ( $\bullet\text{OH}$ ), који због своје нестабилности даље примају и четврти електрон градећи молекул воде (Valko и сар., 2006).

Многи кораци у респираторном ланцу укључују реакције са једним електроном, фаворизујући моновалентну редукцију  $\text{O}_2$ . Високо редукујућа интрамитохондријална средина промовише електронски ток углавном кроз респираторне комплексе I (*NADH: ubiquinone oxidoreductase*) и III (*ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase; cytochrome bc1 complex*), што доводи до продукције ROS (Lambert и Brand, 2004; Starkov, 2008). Штавише, у различитим патолошким стањима, продукција ROS кроз реакције редукције једним електроном је убрзана митохондријалном дисфункцијом (Dikalov, 2011). Поред респираторног ланца у митохондријама, други ензими, као што су ксантин оксидазе, азот оксид синтазе и цитохром P450, производе реактивне врсте као метаболички нуспроизвод, док никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (NADPH) оксидазе произведе ROS у својој примарној функцији.



**Шема 1.** Процес формирања супероксид анјон радикала и његова дисмутација (преузето из [http://genomics.unl.edu/RBC\\_EDU/sod.html](http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/sod.html))

### Супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

Супероксид анјон радикал настао је од молекуларног кисеоника примањем једног електрона.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  нема способност да продре кроз липидне мембране, јер је негативно наелектрисан. (Guskova и сар., 1984). Формирање супероксид анјон радикала одвија се спонтано, посебно у аеробном окружењу богатом електронима у близини унутрашње митохондријалне мембране респираторног ланца (Turrens, 2003). Супероксид анјон радикал (као и водоник пероксид) се производи ендогено од стране флавоензима, нпр.

ксантин оксидазе (Kurpusamy и Zweier, 1989). Други ензими који генеришу супероксид су липоксигеназа и циклооксигеназе (Kontos и сар., 1985; McIntyre и сар., 1999). NADPH-зависна оксидаза фагоцита представља пример високе продукције  $O_2^{\cdot-}$ . Два молекула супероксида брзо дисмутирају на водоник пероксид и молекуларни кисеоник и ова реакција се додатно убрзава помоћу супероксид дисмутазе (SOD) (Fridovich, 1995).

### ***Водоник пероксид ( $H_2O_2$ )***

$H_2O_2$  није слободни радикал, али је ипак веома важан због своје способности да пролази кроз биолошке мембране. Он игра улогу у формирању интермедијера радикала и у продукцији више реактивних молекула кисеоничних радикала. Друга важна функција  $H_2O_2$  јесте његова улога интрацелуларног сигналног молекула (Sundaresan и сар., 1995; Rhee, 1999).

### ***Хидроксил радикал ( $\bullet OH$ )***

Због своје јаке реактивности са биомолекулима,  $\bullet OH$  је вероватно у стању да учини више штете биолошким системима него било који други молекул ROS (Halliwell и Gutteridge, 2006). Хидроксил радикал се формира из водоник пероксида у реакцији коју катализују метални јони ( $Fe^{2+}$  или  $Cu^+$ ), често везани у комплексима са различитим протеинима или другим молекулима у познатој Фентоновој реакцији:



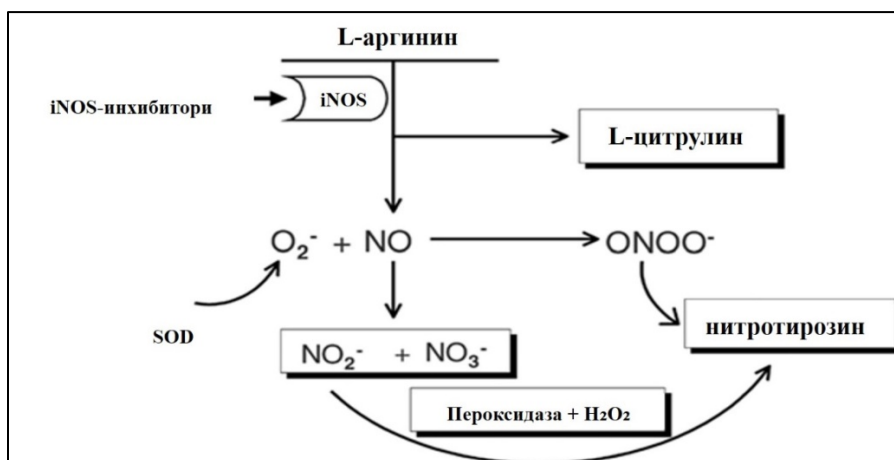
## **2.2. Азот моноксид и реактивне врсте азота**

Реактивне врсте азота (RNS) су различита једињења изведена из азот монооксида (NO), укључујући нитроксил анјон, нитрозонијум катјон, виши оксиди азота, S-нитрозотиоли, и др. RNS су препознатљиве по томе што играју кључну улогу у физиолошкој регулацији многих процеса живих ћелија (Marković и сар., 2006, 2007; Martínez и Andriantsitohaina, 2009). Ендогено, NO је продукован од стране азот моноксид синтазе који користе L-аргинин и кисеоник као супстрат формирајући NO и цитрулин (Moncada и сар., 1991).

NO припада групи слободних радикала и сличан је  $O_2^{\cdot-}$  у неколико аспеката, посебно у томе што лако реагује са већином биомолекула. С друге стране, лако реагује са осталим слободним радикалима (нпр. са пероксил и алкил радикалима), генеришући углавном мање реактивне молекуле, тако да заправо делује као антиоксиданс (сакупљач слободних

радикала). Показано је да NO инхибира липидну пероксидацију у ћелијским мембранама (Rubbo и сар., 2000). Међутим, ако се  $O_2^{\cdot-}$  ствара у великим количинама паралелно са NO, они брзо реагују дајући пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), који је високо цитотоксичан (Hogg и Kalyanaraman, 1998; Ferrer-Sueta и Radi, 2009) (Шема 2). Пероксинитрити могу реаговати директно са различитим биомолекулима у једној или дво-електронској реакцији са  $CO_2$  формирајући изузетно реактивне нитрозо пероксикарбоксилате ( $ONOOCO_2^-$ ). Брзина ових различитих реакција пероксинитрита зависи од рН, температуре и врсте једињења присутних у околној средини (Radi и сар., 2001). Укупан ефекат NO на редокс статус ћелија је очигледно вишеструк, иако у многим аспектима изгледа да функционише као антиоксиданс, а не оксиданс (Halliwell, 1999). Пероксинитрити индукују нитрозовање тирозина *in vivo* (Wink и Mitchell, 1998).

RNS делују заједно са ROS у оштећењу ћелије, узрокујући нитрозациони стрес. Најчешћи продукт реакције NO и  $O_2^{\cdot-}$  јесте пероксинитрит, који може реаговати директно са протеинима који садрже прелазни метал у активном центру. Дакле, може модификовати протеине попут хемоглобина, миоглобина и цитохрома Ц оксидацијом гвожђа хема у одговарајући фери облик. Пероксинитрити могу да мењају протеинску структуру преко реакције са различитим аминокиселинама у пептидним ланцима. Најчешћа реакција са аминокиселинама је оксидација цистеина. Друга реакција је нитровање тирозина. Све ове реакције утичу на структуру и функцију протеина и тако имају потенцијал да изазову промене у каталитичкој активности ензима, измењену организацију цитоскелета и онемогућавају нормалну ћелијску комуникацију (Pacher и сар., 2007).



Шема 2. Синтеза NO и пероксинитрита, као и њихова дисмутација *in vivo*



**Индуцибилна азот моноксид синтаза (iNOS)**

iNOS је један од три кључна ензима који генерише синтезу азот монооксида из аминокиселине L-аргинин (Moncada и сар., 1991). NO продукован од iNOS игра важну улогу у бројним механизмима: регулацији крвног притиска, зарастању рана и одбрамбених механизма домаћина у физиолошким и патофизиолошким условима (упала, инфекција, канцерогенеза, цироза јетре, дијабетес).

Улога iNOS током развоја канцера је веома комплексна и није у потпуности расветљена. Процеси малигне трансформације, ангиогенезе и метастазирања су модулисани активношћу iNOS (Vannini и сар., 2015). Са друге стране, NO произведен у макрофагима има потенцијално цитотоксични ефекат на ћелије канцера. Стога, разумевање биолошке активности iNOS је од великог значаја, нарочито у канцерима са високом метастатском активношћу (Lechner и сар., 2005).

**2.3. Ефекти ROS и RNS на миграторни потенцијал канцера**

Оксидациони стрес се дефинише као дисбаланс између производње слободних радикала и реактивних метаболита, и њихове елиминације заштитним антиоксидационим механизмима. Ова неравнотежа доводи до оштећења важних биомолекула у ћелији са потенцијалним утицајем на цео организам (Durackova, 2009).

Иницирање канцерогенезе посредоване ROS може бити директна (оксидација, нитровање, халогеновање ДНК, РНК и липида) или пак посредована сигналним путевима активираних реактивним врстама кисеоника и азота. Уз помоћ митохондријалног респираторног ланца, аеробни организми могу да постигну много већу ефикасност у производњи енергије у поређењу са анаеробним организмима. Међутим, једна мана аеробне респирације је континуирани прелаз електрона на O<sub>2</sub> током синтезе АТФ у митохондријама, при чему око 1-5% укупног кисеоника доводи до стварања супероксида као нус продукта (Reuter и сар., 2010). Један од главних ензима за неутрализацију ROS јесте митохондријска манган-супероксид дисмутаза (Mn-SOD) (Karihtala и Soini, 2007).

ROS могу појачати инвазију канцера и стварање метастаза повећањем стопе миграције ћелија. Током трансформације у инвазивни канцер, епителне ћелије подлежу дубоким променама у морфологији и адхезивном режиму, што доводи до губитка нормалне

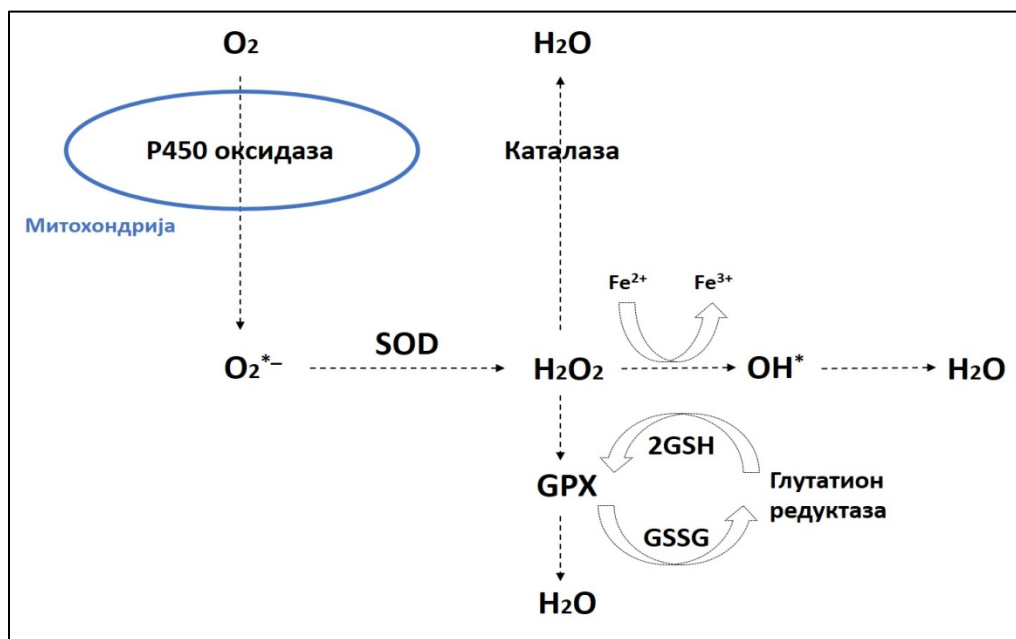
епителне поларизације и прелазак на више покретни, инвазивни фенотип. На пример, интравенозно третирање ћелија канцера мишева водоник пероксидом фаворизује формирање метастаза у плућима, што указује на важност функције ROS у метастазирању ћелија канцера (Kundu и сар., 1995). Ово може бити објашњено редукцијом адхезије ћелија канцера на базалну ламину, или пак појачаном експресијом протеина који регулишу ћелијску покретљивост. На пример, оксидациони стрес регулише експресију интерцелуларног адхезионог протеина-1 (енгл. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1), који представља ћелијски површински протеин у ендотелним и епителним ћелијама, највероватније услед активирања NF-κB (енгл. *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*) (Reuter и сар., 2010). ICAM-1, заједно са IL-8, регулише трансендотелијалну миграцију неутрофила и има потенцијалну функцију у метастазирању канцера (Roebuck, 1999).

Са друге стране, верује се да металопротеиназе матрикса (ММП) имају централну улогу у метастазирању, а њихова повећана експресија је повезана са инвазијом и метастазирањем малигнух тумора различитог порекла (Roebuck, 1999). ММП су способне да разлажу компоненте базалне мембране и екстрацелуларног матрикса (Nelson и сар., 2000). На пример, Mori и сарадници су утврдили да су ММП-13, ММП-3 и ММП-10 непосредно регулисане утицајем ROS (Mori и сар., 2004). Активација ММП, попут ММП-2, вероватно настаје реакцијом ROS са тиолним групама у протеазном каталитичком домену (Rajagopalan и сар., 1996).

#### 2.4. Антиоксидациони заштитни систем

У циљу одржавања редокс равнотеже у ћелији, развијени су специјализовани антиоксидациони системи (Halliwell и Gutteridge, 2006; Marković и сар., 2014). Главни антиоксидациони системи укључују SOD, које су локализоване у различитим субћелијским локацијама и катализују дисмутацију  $O_2^{\bullet -}$  продукујући  $H_2O_2$ . Каталазе редукују  $H_2O_2$  до  $H_2O$ , док неколико Trx изоформи кроз тиол-дисулфидне реакције цистеина редукују оксидоване протеине (Klomsiri и сар., 2011). Глутатион пероксидазе катализују редукцију липида, као и  $H_2O_2$  до  $H_2O$ ; глутатион синтетазе и γ-глутамил цистеин синтетазе су одговорне за синтезу главног ћелијског антиоксиданса, редукованог

глутатиона (Buelna-Chontal и Zazueta, 2013). Аскорбинска киселина,  $\alpha$ -токоферол, каротеноиди, мокраћна киселина и полифеноли имају улогу у антиоксидационом систему одбране као сакупљачи ROS (Hernández-Reséndiz и сар., 2012) (Шема 3).



**Шема 3.** Стварање и неутрализација водоник пероксида у условима ћелијског одговора на промене у редокс равнотежи (Слика преузета и модификована из <http://www.benbest.com/lifeext/aging.html>).

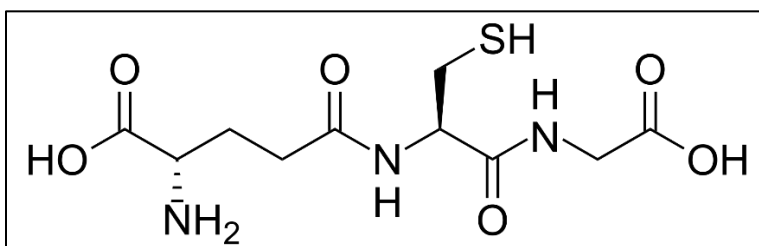
#### 2.4.1. Глутатион (GSH)

Главни тиолни антиоксиданс је трипептид, глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеин-глицин) (Шема 4). GSH је вишефункционални унутарћелијски неензимски антиоксиданс. Сматра се да су тиол-дисулфиди главни редокс пуфери ћелије (Masella и сар., 2005). Редуковани глутатион је GSH, глутатион у оксидованој форми је GSSG, глутатион дисулфид. GSH у једру одржава редокс стање критичних протеинских сулфхидрила који су неопходни за репарацију ДНК и одржавање редокс равнотеже. Оксидационо окружење доводи до брзе модификације протеинских сулфхидрила (протеин-SH), двоелектронска оксидација даје сулфанилну киселину (протеин-SOH) а једноелектронска оксидација тиил радикале (протеин-S<sup>\*</sup>) (Ји и сар., 1999). Ови делимично оксидовани производи реагују са GSH и формирају агрегате протеина и глутатион-протеине (протеин-SSG), који се даље редукују у глутатионском циклусу помоћу глутатион редуктазе и малих протеина попут глутаредоксина и тиоредоксина, како би повратили протеинске сулфхидриле (протеин-

SH). Генерално, антиоксидациони капацитет тиолних једињења потиче од атома сумпора који лако може да надокнади губитак једног електрона (Kagouі и сар., 1996).

Главне заштитне улоге глутатиона против оксидационог стреса су:

- (i) GSH је кофактор неколико детоксикационих ензима који штите од оксидационог стреса, нпр. глутатион пероксидаза (GPX), глутатион S-трансфераза (GST) и други;
- (ii) GSH учествује у транспорту аминокиселина кроз мембрану ћелије;
- (iii) GSH сакупља хидроксил радикал и синглетни кисеоник директно детоксикујући  $H_2O_2$  и липидне пероксиде каталитичким деловањем глутатион пероксидаза;
- (iv) GSH може да регенерише најважније антиоксидансе, витамине Ц и Е и да их врати њиховим активним облицима. Изложеност ROS/RNS, или једињења која могу генерисати ROS (нпр. 4-хидрокси-2-ноненал), могу повећати садржај GSH повећавањем стопе GSH синтезе (Valko и сар., 2006).



Шема 4. Трипептид глутатион:  $\gamma$ -глутамил-цистеин-глицин.

#### 2.4.2 Селено ензими укључени у редокс одговор

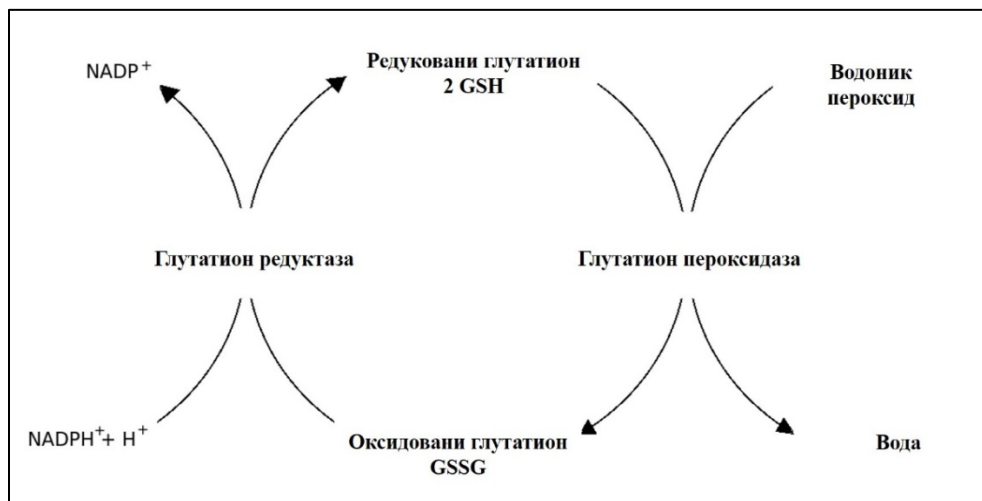
Селен (Se) је битан и јединствен ултрамикроелемент који игра кључну улогу у функционисању организма. Se је неопходан за многе ћелијске физиолошке функције, а посебно је битна уградња селеноцистеина у селенопротеине. Људски геном продукује 25 селенопротеина (Lobanov и сар., 2009). Неки од ових протеина су есенцијални ензими који не само да интегришу Se у облику селеноцистеина, већ захтевају селеноцистеин у свом активном центру (Arner, 2010). Антиоксидациона функција Se се приписује неким од тих селенопротеина који непосредно штите од оксидационог стреса. Поред тога, регенерација и активација антиоксиданаса мале молекулске тежине (Q10, витамин Ц и Е итд.) посредоване селенопротеинима, такође чини Se индиректним антиоксидансом (Hatfield и сар., 2009; Marković и сар., 2011).

### Глутатионски систем

Глутатионски систем је NADPH-зависни редокс регулациони систем. Једна од његових главних функција је детоксикација ксенобиотика и њихових метаболита, било директно помоћу GSH, или индиректно помоћу GST (Lu, 2009) (Шема 5). Поред тога, GSH служи као кофактор глутатион пероксидаза (GPxs) и за глутаредоксине (Grxs). Оксидована форма GSSG редукује се помоћу флавопротеина глутатион редуктазе (GR).

### Глутатион пероксидазе (GPx)

GPx катализују GSH-зависну реакцију са разним врстама хидропероксида (Brigelius-Flohe и Maiorino, 2013). Укупно осам GPx се експримира код људи. Већина њих су селенопротеини (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx6), док преостали ензими имају цистеин (Cys) уместо селеноцистеина (SeCys) у свом активном центру (GPx5, GPx7, GPx8) (Торро и сар., 2009). GPx катализују редукцију  $H_2O_2$  или органских хидропероксида у воду или одговарајуће алокоhole, обично уз помоћ GSH као редуктанта (Ursini и сар., 1995). Присуство SeCys у каталитичком центру обезбеђује брзу реакцију хидропероксида, као и брзу репродуктивност од стране GSH. Поседују антиоксидациону функцију у различитим локацијама и ћелијским деловима: GPx1 у цитоплазми и митохондријама, GPx2 у епителу, GPx3 у плазми (сва три у воденој фази). Са друге стране GPx4 штити мембране од утицаја оксидационог стреса (Lu и сар., 2009).



Шема 5. Глутатионски систем.

### **Глутатион пероксидаза 1**

GPx1 је ензим који је код људи кодиран геном *GPX1* на хромозому 3 (Kiss и сар., 1998). Овај ген кодира више чланова породице глутатион пероксидазе. Функције глутатион пероксидаза које учествују у детоксикацији  $H_2O_2$ , спадају у најважније антиоксидационе ензиме код људи. GPx1 је свеprisутно експримиран у многим ткивима, где штити ћелије од оксидационог стреса (Brigelius-Flohé и Maiorino, 2013; Higashi и сар., 2013). Унутар ћелија, локализује се у цитоплазми и митохондријама.

GPx1 је први идентификовани селенопротеин (Rotruck и сар., 1973). Он је хомотетрамер који реагује са  $H_2O_2$  и растворљивим нискомолекуларним хидропероксидима. Улога GPx1 у канцерогенези је објашњена (Brigelius-Flohé и Kipp, 2009). GPx1 је способан да делује превентивно утичући на смањење оксидационо индукованих мутација ДНК (Baliga и сар., 2007). На овај начин GPx1 може спречити канцерогенезу у фази иницијације. Његова улога у фази промоције мање је позната. Такође, студије показују и заштиту ћелија канцера од оксидационих једињења генерисаних метаболизмом лекова против канцера услед високе експресије GPx1 (Vibet и сар., 2008). Способност GPx1 да снизи цитотоксичност индуковану повећаним оксидационим стресом у нормалним ћелијама може негативно утицати на третман канцера. Наиме, спречавање редокс покренуте апоптозе ћелија канцера фаворизује њихово преживљавање и њихов раст (Brigelius-Flohé и Kipp, 2009).

### **Глутатион пероксидаза 2**

GPx2 је хомотетрамер и веома је сличан GPx1. Ген *GPX2* лоциран је на хромозому 14 (Chu, 1994). Протеин кодиран овим геном припада породици глутатион пероксидаза, чији чланови катализују редукцију органских хидропероксида и  $H_2O_2$  глутатионом, штитећи ћелије од оксидационог оштећења. GPx2 је селенопротеин, који садржи SeCys у активном центру (Emmink и сар., 2014). Између осталих, GPx2 је регулисан помоћу Nrf2 (енгл. *Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor*) (Banning и сар., 2005). Код кичмењака постоји неколико чланова ове фамилије гена, који варирају у ћелијској локацији и специфичности. Овај протеин је доминантно експримиран у гастроинтестиналном тракту (такође и у јетри), локализован је у цитоплазми и користи водоник пероксид као супстрат. Прекомерна експресија овог гена је повезана са повећаном диференцијацијом и пролиферацијом у колоректалном канцеру.

### **Глутатион пероксидаза 3**

GPx3 је слична GPx1. Ген *GPX3* лоциран је на хромозому 5 (Chu, 1994). То је тетрамер који садржи два од четири аргинина одговорних за везивање GSH (Aumann и сар., 1997). Овај протеин је високо заступљен у крвној плазми. Смањење експресије овог гена услед хиперметилације је примећено у широком спектру хуманих малигнитета, укључујући канцер штитасте жлезде (тиреоиде), хепатоцелуларног канцера и хроничне мијелоидне леукемије (Falck и сар., 2010). Смањена експресија овог гена углавном представља лош физиолошки знак у прогнози болести. Тако, GPx3 се може сматрати једним од тумор-супресора (Liu и сар., 2015).

### **Глутатион пероксидаза 4**

Глутатион пероксидаза 4 је ензим који је код људи кодиран *GPX4* геном на хромозому 19 (Esworthy и сар., 1994). GPX4 је хидропероксидаза фосфолипида која штити ћелије од липидне пероксидације мембрана. GPx4 катализује редукцију  $H_2O_2$ , органских хидропероксида и липидних пероксида помоћу GSH и има функцију заштите ћелије од оксидационог стреса. GSSG, који се ствара приликом редукције водоник пероксида од стране GPx4, рециклира се помоћу глутатион редуктазе и NADPH/ $H^+$ .

### **Глутатион пероксидаза 6**

GPx6 је изузетно хомологна са GPx3. Ген *GPX6* лоциран је на хромозому 6. GPx6 је селенопротеин, који се експримира само код људи, али не и код пацова или мишева (Kryukov и сар., 2003). До сада, GPx6 још увек није пречишћена, нити су изведене кинетичке анализе. Стога, постоји веома мали број информација о GPx6 (Brigelius-Flohé и Maiorino, 2013), те сматрамо да испитивање GPx6 у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама може значајно допринети бољем разумевању улоге овог протеина.

### **Глутатион S трансфераза**

Глутатион S трансферазе (GST), раније познате као лигандини, поседују специфичну ензимску активност у смислу интеракције са GSH приликом везивања на ксенобиотике у детоксикацији. GST могу представљати до 10% садржаја протеина у цитоплазми у појединим органима сисара (Boyer, 1989). GST катализују коњугације GSH преко сулфхидрил група са електрофилним центрима различитих једињења како би постала растворљивија у води (Douglas, 1987). Ова активност детоксикује једињења као што су

пероксилирани липиди и омогућава разградњу ксенобиотика. GST може везивати токсине и имати функцију транспортних протеина (Leaver и George, 1998), одавде стари назив лигандина.

Кључна улога GST јесте помоћ у депротоновању GSH. Добијени тиолатни анјон (GS-) снажан је нуклеофил и лако реагује са електрофилним супстратима (Wu и Dong, 2012). Многи типови GST екпримирани су кроз одговор ћелије у процесу активације Nrf2 услед ћелијског одговора на повећани оксидациони стрес. Поред своје детоксикационе активности, GST поседује и метаболичке функције у катализи синтезе стероида, леукотриена, простагландина, тестостерона и прогестерона (Hayes и сар., 2005).

### **Тиоредоксин редуктаза**

Тиоредоксин редуктаза (TrxR) је једини познати ензим који редукује Trx (Mustacich и Powis, 2000) и стога је централна компонента у тиоредоксин систему. Ген *TrxR* лоциран је на хромозому 12 (Simone и Kathryn, 2001). Trx систем постоји у свим ћелијама и има улогу у одбрани ДНК од оксидационог оштећења услед метаболизма кисеоника и редокс сигнализације помоћу молекула као што су  $H_2O_2$  и NO (Lillig и Holmgren, 2007; Meyer и сар., 2009). Trx систем који се састоји од NADPH и изоформи TrxR и Trx представља главни систем редукције дисулфидних веза у ћелији (Lu и Holmgren, 2014).

### **2.4.3. Транскрипциони фактори редокс равнотеже**

#### ***Nrf2***

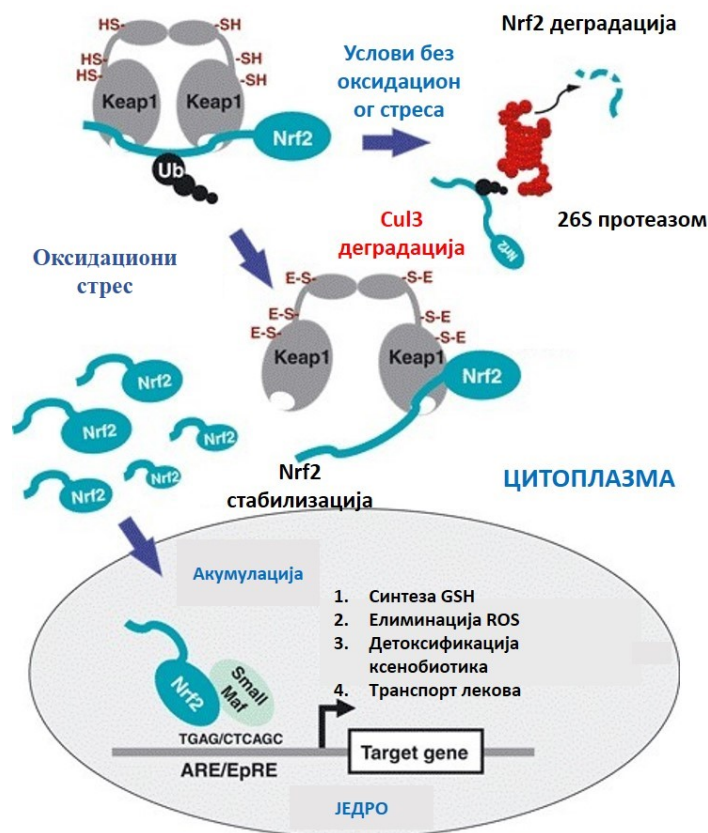
Транскрипциони фактор Nrf2 је члан тзв. CNC (*Cap 'n' Collar*) породице базних протеина и по први пут је описан у студији Moі и сар., 1994. године. Nrf2 регулише експресију протеина који фаворизују преживљавање ћелије, као што су ензими који испољавају директне или индиректне антиоксидационе функције (Alam и сар., 1999; Ishii и сар., 2000; Banning и сар., 2005), молекуларни шаперони (Kwak и сар., 2003), протеини који фаворизују синтезу и регенерацију GSH (Hayes и McLellan, 1999; Harvey и сар., 2009), протеини који учествују у метаболизму лекова (Itoh и сар., 1997; Hayashi и сар., 2003), као и препознавању, репарацији и одстрањивању оштећених протеина (Kwak и сар., 2003; Hu и сар., 2006).



Са друге стране, Nrf2 је једини контролор ензима који су одговорни за продукцију GSH, који је најзаступљенији антиоксидациони кофактор у ћелији (Meister, 1983; Taguchi и сар., 2011). Nrf2 подржава не само синтезу GSH него и његову употребу, јер контролише експресију бројних ROS-детоксикационих ензима као што су GPx2 и неколико GST (Thimmulappa и сар., 2002; McGrath-Morrow и сар., 2009). Гени за Trx1, и пероксиредоксин 1 су директне транскрипционе мете Nrf2 (Kim и сар., 2007; Chorley и сар., 2012). Поред свог директног ангажовања у ROS детоксикацији преко GSH метаболизма, Nrf2 индиректно помаже у модулирању концентрације ROS регулацијом хомеостазе слободног Fe(II). Fe(II) катализује Фентонову реакцију, која описује конверзију H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до веома реактивног OH<sup>•</sup> радикала (Gutteridge, 1986).

Са овако широким спектром циљаних гена, Nrf2 свакако припада групи најзначајнијих транскрипционих фактора који штите ћелију од спољних извора оксидационог стреса, отровних састојака у храни или од инфекција.

Nrf2 припада типу транскрипционих фактора који се налазе у цитоплазми и који су у нормалним условима подложни константној протеазомалној деградацији (Nguyen и сар., 2003). У склопу цитоплазматског комплекса са фактором Keap1 (енгл. *Kelch-like ECH-associated protein 1*) служи за сталну детекцију оксиданаса. Модификација и конформациона промена Keap1, услед повећане продукције ROS, дозвољава транслокацију Nrf2 у једро и омогућава функционисање Nrf2 као транскрипционог фактора. Keap1 је заправо инхибитор Nrf2 у нормалним околностима (Niture и сар., 2010). Keap1–Nrf2 регулациони сигнални пут игра кључну улогу у заштити ћелије од оксидационог стреса и/или ксенобиотичког оштећења. Дакле, у нормалним условима Nrf2 је константно убиквитинован помоћу комплекса Cul3–Keap1 убиквитин E3 лигазе и убрзано деградиран у протеазомима. У условима повећаног оксидационог стреса реактивне групе цистеина Keap1 се модификују и онемогућавају процес убиквитинације Nrf2 (Taguchi и сар., 2011). Практично, оксидација -SH група Keap1 уводи Nrf2 у једро омогућавајући му умрежавање са другим факторима укљученим у антиоксидациони одговор ћелије и експресију веома великог броја ензима који промовишу преживљавање ћелије и заштиту од оксидационог стреса. Примери типичних циљаних гена од стране Nrf2 су Trx и GSH антиоксидациони системи, као што су Trx1, TrxR1, GR и GSTs (Ishii и сар., 2000; Harvey и сар., 2009; Sebula и сар., 2015) (Шема 6).



Шема 6. Функције Nrf2 (преузето из Pavelescu, 2015 и модификовано)

У многим људским канцерима примећене су мутације у *Keap1-Nrf2* генима. Ове мутације дестабилизују активност *Keap1-Nrf2* комплекса, спречавају убиквитинацију Nrf2 и фаворизују константну активност Nrf2. Повећана експресија Nrf2 циљаних гена даје предност како здравим тако и ћелијама канцера у смислу отпорности (Padmanabhan и сар., 2006; Singh и сар., 2006; Ohta и сар., 2008).

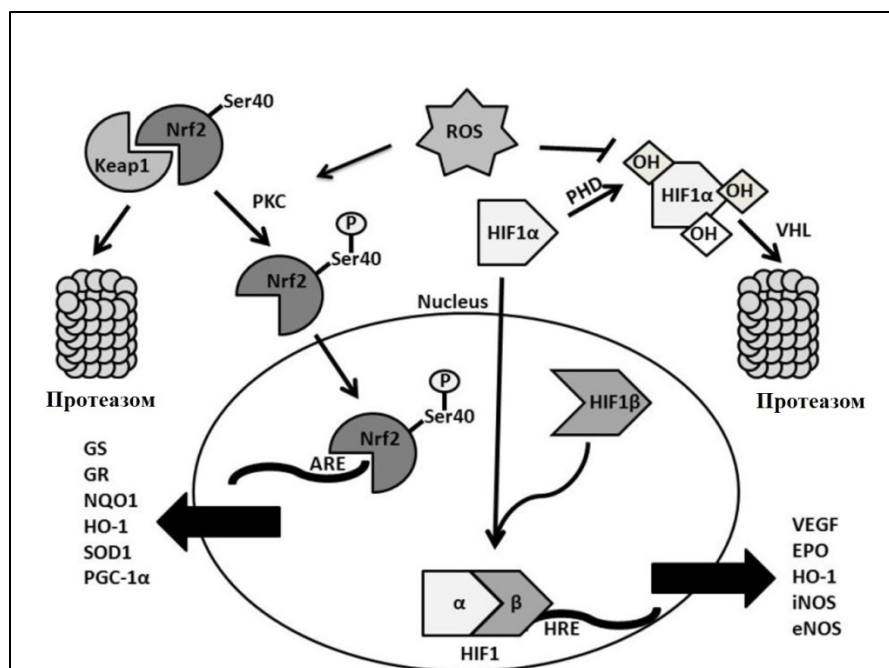
Сагласно литератури, нису забележене мутације у *Keap1* и *Nrf2* генима у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама (Probst и сар., 2015). Међутим, код MDA-MB-231 ћелија установљена је стабилна појачана експресија Nrf2, која пак појачава отпорност ових метастатских ћелија према хемотерапеутицима (Wang и сар., 2008). Иако су горе описане позитивне стране Nrf2, постоји и негативна страна овог транскрипционог фактора: стабилна прекомерна експресија резултира појачаном отпорношћу ћелија канцера према хемотерапеутицима укључујући цисплатину, доксорубицин и етопозид (Ryoo и сар., 2016).

**Хипоксија индуковани фактор - HIF**

Кисеоник је неопходан за живот еукариотске ћелије и нераскидиво везан за еволуцију вишећелијских организама. Правилан ћелијски одговор на промене у концентрацији кисеоника током нормалног развоја, или у патолошким процесима, као што су кардиоваскуларне болести и канцер, у крајњој линији регулисан је једним од транскрипционих фактора, хипоксија индукованим фактором (енгл. *Hypoxia-Inducible Factor*, HIF) (Greer и сар., 2012). HIF је транскрипциони фактор који у условима хипоксије интерагује са другим специфичним кофакторима и тако активира велики број гена који регулишу и промовишу адаптивне одговоре, у условима поремећене концентрације кисеоника. До данас најбоље описани члан ове генске породице, HIF-1, регулише више од 100 гена који кодирају метаболичке ензиме, факторе раста и многе друге факторе који обезбеђују адекватан одговор ћелије на хипоксију (Semenza, 2000; Maxwell, 2005).

Истраживања су показала да је HIF-1 хетеродимер који се састоји од HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  субјединица (Wang и сар., 1995). Ниво HIF-1 $\alpha$  протеина у хипоксији расте, транслоцира се у једро и димеризује са HIF-1 $\beta$ . Затим се овај хетеродимер везује за *hypoxia response elements* (HRE) у промоторским областима HIF циљаних гена (Wilkins и сар., 2016). У ћелији, када је изложена хипоксији, дешавају се системске промене у циљу минимализирања хипоксичног стреса и успостављања адекватне оксигенације.

HIF-1 је такође повезан и са ROS-индукованом канцерогенезом у великом броју људских органа, укључујући бешику, дојку, колон, мозак, простату и др. (Talks и сар., 2000). Повећани садржај HIF-1 експресије показатељ је не тако доброг исхода код пацијената са канцером врата, главе, колоне и др. (Rankin и Giaccia, 2008). Ова појава је доста распрострањена у канцеру и упућује нас на то да HIF-1 можда и активно учествује у процесу канцерогенезе. Резултати указују на то да су ROS, генерисани у митохондријалном комплексу III, потребан кофактор за хипоксичну активацију HIF-1 (Klimova и Chandel, 2008). На тај начин, ROS се могу сматрати директним активаторима HIF-1 у хипоксичним канцерима.



**Шема 7.** Сумарни дијаграм стимулације Nrf2 и HIF1 током оксидационог стреса. (Thompson и сар., 2012)

Перитуморско ткиво метастатске масе често је хипоксично. HIF-1 је круцијални протеин који омогућава туморску прогресију индукујући алтернативне метаболичке путеве у ћелији канцера (Ziello и сар., 2007). Због овога, HIF-1 поседује веома важну улогу у пролиферацији тумора (Shi и Fang, 2004). Са порастом канцера, расте и хипоксично окружење због екстремне енергетске потребе ћелија канцера које се веома брзо деле. Ангиогенеза је обично индукована потребом ткива за оксигенацијом, енергијом и храном (Carmeliet и сар., 1998). Тако, хипоксија изазива одговор ћелије канцера у смислу превазилажења ових услова, што води неоангиогенези и расту канцера. Важност овог протеина у канцерогенези показује и пример да у ћелијама глиобластома ниво HIF-1 $\alpha$  расте пропорционално са порастом канцера (Zagzag и сар., 2000).

Поред тога, HIF-1 утиче и на многе друге ћелијске процесе. Нпр., прекомерна експресија HIF-1 у епителним ћелијама индукује повећану ћелијску апоптозу (Krick и сар., 2005). Иако тачан метаболички пут овог процеса још увек није јасан, подаци указују да хипоксични услови индукују активацију тумор супресора p53. Услед интеракције HIF-1 протеина и p53, p53 је стабилизован и способан да активира гене као што је p21, који изазива апоптозу (Krick и сар., 2005).

**NF-κB**

Транскрипциони фактор NF-κB је сложени протеин који контролише транскрипцију ДНК, продукцију цитокина и преживљавање ћелија. NF-κB се може наћи у скоро свим типовима животињских ћелија и учествује у ћелијским одговорима на стимулусе као што су стрес, цитокини, слободни радикали, тешки метали, ултраљубичасто зрачење, оксидовани LDL и бактеријски или вирусни антигени (Brasier, 2006; Gilmore, 2006). NF-κB игра кључну улогу у регулисању имуног одговора на инфекцију (к лаки ланац је критична компонента имуноглобулина). Неправилна регулација NF-κB повезана је са канцером, запаљенским и аутоимуним болестима, септичним шоком, вирусним инфекцијама и неправилним имуним одговором (Albensi и Mattson, 2000; Meffert и сар., 2003). NF-κB се активира различитим про-инфламаторним рецепторима, као што су T рецептори, B рецептори и рецептори тумор некротског фактора (енгл. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) (Iwai, 2012). NF-κB регулише експресију више од 100 гена укључених у имуни и инфламаторни одговор ћелије. Такође, сматра се да је ово први описани транскрипциони фактор регулисан повећаном концентрацијом ROS (Schreck и сар., 1991).

Док одређени гени регулисани помоћу NF-κB играју веома значајну улогу у регулисању концентрације ROS у ћелији, ROS такође поседују и различите инхибиторне и стимулативне улоге у сигналним путевима NF-κB (Morgan и Liu, 2011). ROS могу да покрену и апоптоске и некротске механизме у ћелији у зависности од озбиљности оксидационог стреса (Saito и сар., 2006). Иако постоји неколико изузетака када NF-κB учествује у ћелијској смрти (Perkins и Gilmore, 2006), у већини случајева експресија NF-κB циљаних гена промовишу преживљавање ћелије. Један од кључних сигналних путева који повезују NF-κB, ROS и ћелијску смрт одиграва се у интеракцији између NF-κB и JNK (енгл. *c-Jun N-terminal kinase*). Интеракција NF-κB и JNK спречава непрестану JNK активацију и тако спречава апоптозу и/или некрозу (Morgan и сар., 2008). Један од најзначајнијих начина како NF-κB утиче на концентрацију ROS јесте повећање експресије антиоксидационих протеина:

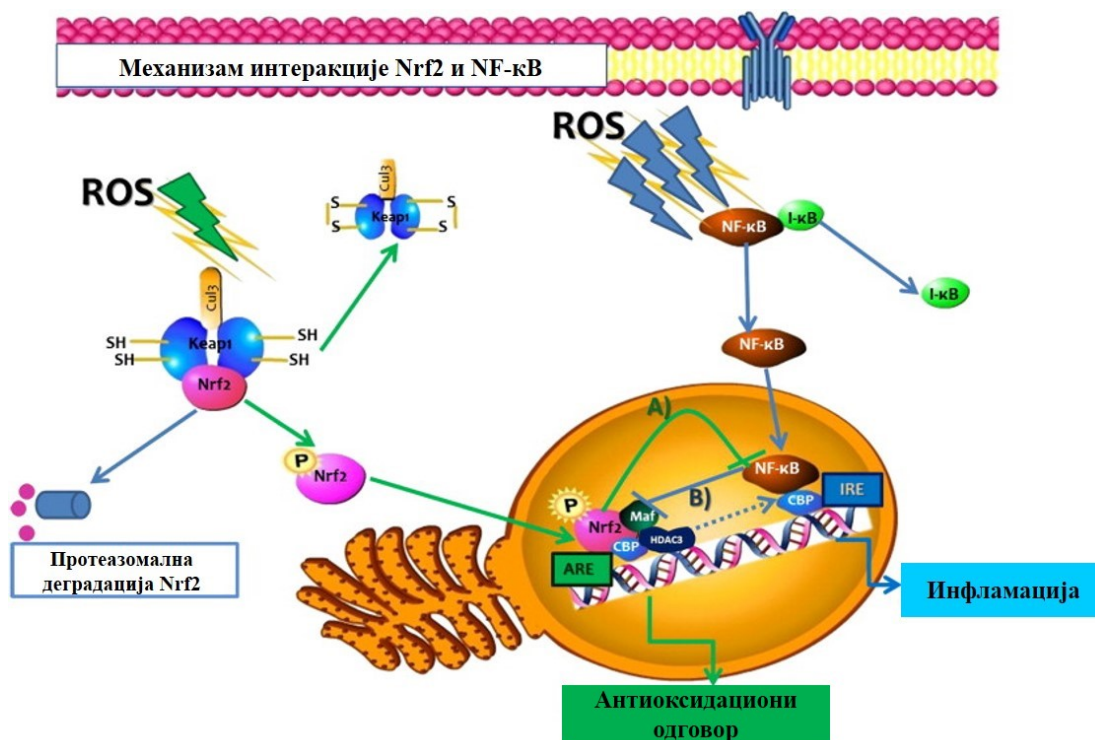
- Манган супероксид дисмутаза (MnSOD, или SOD2) је можда најпознатији NF-κB циљани ген са антиоксидационом активношћу (Jones и сар., 1997);
- Бакар-цинк дисмутаза (Cu,Zn-SOD, или SOD1) (Rojo и сар., 2004);

- *Ferritin Heavy Chain* (FHC) активиран оксидационим оштећењем (Pham и сар., 2004);
- Trx1 и Trx2 (Kairisalo и сар., 2007);
- GST (Xia и сар., 1996);
- Металотионеин-3 (MT3) (Howells и сар., 2010);
- NAD(P)H дехидрогеназа [*quinone*] 1 (NQO1) (Yao и сар., 1997);
- GPx1 (Lei и сар., 2007).

Активација NF-κB је примећена у многим типовима канцера, укључујући карцином дојке (Chua и сар., 2007), меланом (Yang и сар., 2007), карцином плућа (Tew и сар., 2007), колона (Scartozzi и сар., 2007), и др. Присуство активираног NF-κB у туморима није представљено узрочно-последичном везом са развојем канцера. Укратко, ћелијски процеси укључени у канцерогенезу јесу самодовољност у смислу продукције сигнала раста, инхибиције инхибитора раста, избегавања апоптозе, безграничног репликативног потенцијала, инвазивности и метастатског потенцијала, као и непрекидне ангиогенезе (Hanahan и Weinberg, 2000). Активација NF-κB је укључена у свим овим процесима.

Актуелне информације указују на то да Nrf2 и NF-κB сигнални путеви деле заједничке ефекторе и регулаторне тачке. NF-κB сигнални пут инхибиран је помоћу неколико Nrf2 активатора. Са друге стране, NF-κB може директно да супримира Nrf2 сигнални пут још на транскрипцијском нивоу (Buelna-Chontal и Zazueta, 2013). Нпр. неколико анти-инфламаторних и антиканцерогених фитоједињења супримирају NF-κB сигнализацију, док у исто време активирају Nrf2 сигнални пут (Gao и сар., 2005), показујући да су супресија NF-κB сигнализације и истовремена активација Nrf2 сигналног пута повезани. У зависности од концентрације ROS, активирају се различити редокс осетљиви транскрипциони фактори. Оксидациони стрес ниског интензитета индукује Nrf2, транскрипциони фактор који даље трансактивира гене који кодирају антиоксидационе ензиме. Оксидациони стрес средњег интензитета повлачи укључивање анти-инфламаторног одговора активацијом NF-κB, док оксидациони стрес високог интензитета индукује, између осталог, повећање пропустљивости митохондријалне мембране и нарушавање тока електрона, резултирајући апоптозом или некрозом (Gloire и сар., 2006). Нпр., на месту запаљенског процеса, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се продукује од стране макрофага и неутрофила интензитетом од 2-6 x 10<sup>-4</sup> μM/h по ћелији, тј. ћелије могу бити изложене концентрацији

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> од 100 μM (Lander, 1997). Како је отпорност према апоптози једна од главних карактеристика ћелије канцера (Hanahan и Weinberg, 2000), NF-κB често може допринети овој отпорности у многим типовима канцера (Barkett и Gilmore, 1999).



**Шема 8.** Механизам интеракције NF-κB и Nrf2 сигналних путева. Плаве стрелице илуструју NF-κB транскрипциону активацију и претпостављену интеракцију са Nrf2. Зелене стрелице илуструју Nrf2 сигналну активацију и NF-κB инхибицију (преузето из Buelna-Chontal и Zazueta, 2013 и модификовано).

### 3. Терапија канцера - Цитостатици

Цитостатици су лекови који се користе у циљу блокирања пролиферације ћелија канцера. Могу се класификовати у складу са њиховим механизмима деловања. Преглед најважнијих група дат је у Табели 2.

Табела 2. Цитостатски механизми деловања одабраних активних супстанци (преузето из Eitel и сар., 1999).

Врста цитотоксичног једињења	Пример једињења	Механизам деловања
Алкилирајуће супстанце	Ифозфамид Циклофосфамид Треосулфан Карбоплатина Цисплатина	Алкилација ДНК ↓ Cross link ↓ Спречавање репликације ДНК
Антиметаболити	Цитарабин 5-флуороурацил Гемцитабин Меркаптопурин Метотрексат	Инкорпорација у ДНК током репликације ↓ Инхибиција даље репликације
Митотички инхибитори	Паклитаксел Винорелбин Доцетаксел Винкрестин Винбластин Виндесин	Ометање стварања деобног вретена ↓ Заустављање митозе током метафазе
Цитотоксични антибиотици	Даунорубицин Доксорубицин Епирубицин Митозантрон	Интеркалација између база ДНК ↓ Спречавање репликације ДНК
Инхибитор топоизомеразе I	Етопозид Тенипозид	Инхибиција топоизомеразе I, која уклања торзионе силе унутар ДНК
Инхибитор топоизомеразе II	Топетокан	Инхибиција топоизомеразе II, која катализује торзију ДНК

Обзиром да се ћелије канцера, физиолошки мало разликују од здравих ћелија, цитостатски лекови не утичу само на ћелије канцера, већ на све ћелије које се деле. Због тога, значајни нежељени ефекти могу се јавити као што су мучнина, губитак косе и имуносупресија.

### 3.1. Хемијски комплекси

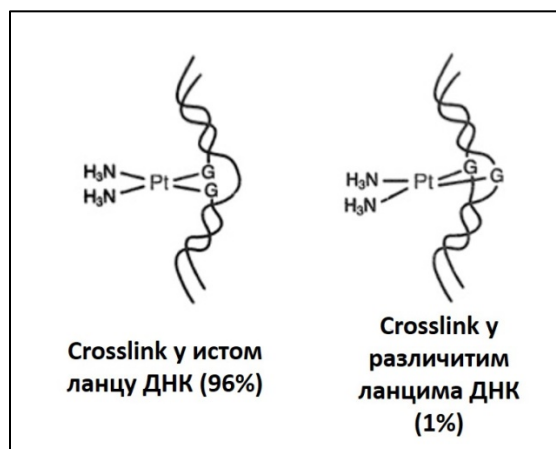
#### Историјат развоја хемиотерапеутика

Цисплатина је откривена 1965. године на Државном универзитету у Мичигену од стране Барнета Розенберга (Rosenberg и сар., 1965). Ово откриће је убрзало серију истраживања ефеката платинских супстанци на ћелијску деобу. Цисплатина је први пут употребљена у терапији канцера тестиса 1978. године (Williams и Whitehouse, 1979). Платински



комплекси су хемиотерапеутски агенси засновани на координационим комплексима платине. Ове супстанце се користе у терапији више од 50% пацијената који болују од канцера. Најзаступљенији платински лекови су цисплатина и карбоплатина, као и многи други (Johnstone и сар., 2014). Лимитирајући фактор у употреби платинских лекова у третирању канцера јесу нежељени ефекти на здраве ћелије и ткива, са посебним акцентом на неуротоксичност и нефротоксичност (Donzelli и сар., 2004).

Механизам деловања цисплатине најчешће је везан за тзв. *crosslink* ДНК у истом или у различитим ланцима ДНК (Шема 9). Већином, ове супстанце делују на N-7 позиције гуанина (Rudd и сар., 1995; Poklar и сар., 1996). Резултат ове хемијске модификације ДНК молекула је заустављање репликације и репарације ДНК. Платински комплекси се често пореде са алкилирајућим агенсима због сличног дејства, иако не поседују алкилне групе (Cruet-Hennequart и сар., 2008).

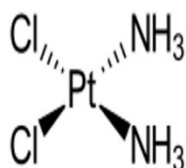


**Шема 9.** Спектроскопски потврђено везивање цисплатине за ДНК (преузето из Lempers и Reedijk, 1991 и модификовано).

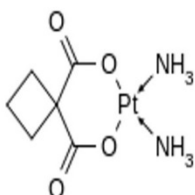
Цисплатина је први употребљени лек на бази метала. Иако је прошло више од 40 година од открића антитуморских својстава цисплатине, платински лекови су једини лекови на бази метала који се користе у клиничкој пракси за лечење канцера. Предности и недостаци широко коришћених лекова на бази платине покренули су потрагу за аналогним комплексима прелазних метала. Један од главних циљева модерних бинеорганских и медицинских истраживања је развој нових лекова на бази метала са фармацеутском активношћу побољшаном у односу на цисплатину (Lippert, 1999; Alessio, 2011; Bergamo и Sava, 2015). Стратегија синтезе платинских комплекса заснована је на увођењу, углавном,

лиганада који садрже азот због лакше координације са централним атомом платине. Хемијска активност и употреба платинских агенаса зависи од оксидационог стања платине, која може бити Pt(II) или Pt(IV) (Ђуран, 2000).

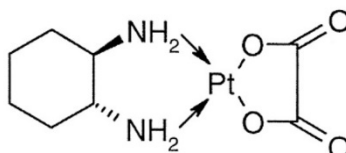
Цисплатина



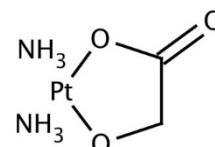
Карбоплатина



Оксалиплатина



Недаплатина



У монографији *Примена комплексних једињења у медицини* (Ђуран, 2000), наведене су заједничке карактеристике антитуморских комплекса платине, који су структурно слични цисплатини:

- комплекси су електронеутрални;
- *cis* изомери су активни, док *trans* изомери немају значајну активност;
- оксидационо стање платине је +2 или +4;
- лиганд често подлеже супституционим реакцијама и слабо је координован за платину;
- амински лиганди су јако координисани за платину и не подлежу супституцији.

Првобитно је претпостављено да паладијум(II) комплекси не поседују антитуморска својства. Поредећи их са цисплатином, одговарајући *cis*-Pd комплекси (*cis*-[Pd(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]) не показују антитуморску активност. Како је координациона хемија Pd(II) и Pt(II) једињења веома слична, Pd(II) комплекси су често коришћени као молекулски модели јер реагују око 104-105 пута брже него њихови Pt(II) аналози (Bugarčić и сар., 2015). Међутим, увођење неких нових лиганада у координациону сферу Pd(II) може да резултује комплексима са значајним антитуморским својствима (Abu-Surrah и Kettunen, 2006; Gao и сар., 2008, 2009).

Главна стратегија у креирању нових лекова заснованих на металима јесте креирање лекова који ће бити довољно реактивни да се везују за биолошку мету, али не толико реактивни да ће бити деактивирани од стране других биомолекула различитих од циља. Ово се може постићи употребом тзв. про-лекови (енгл. *pro-drugs*). Про-лекови су једињења која

пролазе кроз трансформацију *in vivo* ослобађајући активну компоненту која може деловати као лек *in situ*. Pt(IV) комплекси су најпознатија група про-лекова која се може користити да би се превазишли неки од проблема повезаних са цисплатином и њеним аналозима. Висока кинетичка инерција Pt(IV) комплекса у односу на њихове Pt(II) аналоге уводи стабилност лека (Ronconi и Sadler, 2007; Barry и Sadler, 2013).

Данашња истраживања у области лекова на бази метала су такође усмерена на комплексе метала из 9. групе периодног система, односно комплексе иридијума, осмијума и родијума (Petrović и сар., 2008; Vogojeski и сар., 2011; Yoshinari и сар., 2012; Čanović и сар., 2017). Основна карактеристика ових комплекса је инертност. Међутим, реактивност и биолошка активност ових комплекса се може побољшати погодним избором лиганда.

У поређењу са другим прелазним металима, употреба паладијума и његових комплекса у медицини је ограничена. У почетку, паладијум је коришћен као радиоактивни изотоп у третману брзо растућег канцера простате (Potters и сар., 2001; Stone и Stock, 2002). Откриће антитуморског ефекта цисплатине и одговарајућих комплекса повећало је интересовање за откриће других ефикасних комплекса са другим металима и лигандима. Паладијум(II) је један од првих метала чији су комплекси коришћени у клиничким испитивањима у терапији канцера, пре свега због сличне хемијске реактивности са комплексима платине(II). Постоје покушаји да се креирају комплекси паладијума(II) са инертним лигандима као што су сумпорни или селенски. Паладијум(II) комплекси са сумпорним лигандима ефикаснији су од аналогних антитуморских комплекса других метала - никал(II), бакар(II) и цинк(II) (Das и Livingstone, 1978).

### 3.2. Прооксидациони лекови

Редокс дерегулација потиче од промена метаболизма у зависности од ROS и RNS, што се може искористити за селективно третирање редокс хемиотерапеутицима. Промена параметара оксидационог стреса доприноси генотипским и фенотипским променама карактеристика ћелија канцера и може представљати циљано место за деловање редокс хемиотерапеутика. Редокс хемиотерапеутици представљају антиканцерогена једињења која су креирана да циљано повећају концентрацију слободних радикала у ћелији канцера, и на тај начин је најчешће уведу у апоптозу. У малигним ћелијама је ниво оксидационог

стреса на вишем нивоу у односу на здраве ћелије (Sosaa и сар., 2013). Стога, апликација додатне количине једињења која тај стрес додатно повећавају може бити опасно за малигну ћелију водећи је до ћелијске смрти. Насупрот томе, обзиром да је ниво оксидационог стреса у здравим ћелијама нижи, претпоставка је да ће генерално повећани оксидациони стрес мало утицати на здраве ћелије, односно да ове ћелије поседују функционални антиоксидациони систем заштите. Терапијски оквир може бити одређен разликом редокс равнотеже између нормалних и ћелија канцера (Wondrak, 2009).

Доказано је да ROS учествују у антитуморским процесима у терапији многим хемиотерапеутицима, који се користе у клиничкој пракси. Неки од примера су паклитаксел, доцетаксел, цисплатина, доксорубицин, арсен триоксид, бортезомиб, прокарбазин и етопозид (Renschler, 2004; Fang и сар., 2007). На пример, одавно је познато да су микротубуле циљ хемиотерапеутског деловања паклитаксела (таксола), због повећане акумулације  $H_2O_2$  *in vitro* и *in vivo* (Alexandre и сар., 2006).  $H_2O_2$  представља кључни молекул у ћелијској смрти индукованој повећаним оксидационим стресом, зато што су ћелије канцера осетљивије на повећану концентрацију  $H_2O_2$  од здравих ћелија (Chen и сар., 2005).

### 3.3. Антикancerогена својства једињења са селеном

Добро је познато да селен у вишим дозама лако може испољити прооксидациони карактер и тиме вршити одређене потенцијалне антикancerогене (цитотоксичне) функције. Ефикасност и токсичност једињења Se, стога, стриктно зависе од концентрације и хемијских врста, као и од редокс потенцијала (Weekley и Harris, 2013).

Неорганска и органска једињења Se се другачије метаболишу *in vivo* (Nilsonne и сар., 2006). Неорганска једињења Se су углавном базирана на Se(IV) врстама селенита ( $SeO_3^{2-}$ ) самостално или у комбинацији са другим хемиотерапеутицима. Органска су најчешће: селенодиглутатион, селеноаминокиселински деривати, метилселенска киселина, селениди и диселениди, селеноцијанати, хетероцикли. Хемија органских селенских једињења веома је развијена и данас се многи селенски деривати синтетишу у смислу добијања нових једињења са антикancerогеном активношћу (Kostić и сар., 2016).

Као што је горе поменуто, редокс активни Se метаболити представљају важне чиниоце у очувању нормалних функција ћелије. Ова једињења имају способност да утичу на повећање продукције ROS, углавном преко механизма трансформације селенолата помоћу GSH или Trx/Grx система. У овим процесима углавном се продукује супероксид и водоник пероксид, чиме се интензивира ROS индуковани оксидациони стрес изазивајући ћелијски одговор на стрес. Последица повећане продукције ROS услед директне интеракције једињења селена, између осталог изазива оштећења ДНК (el-Ваyouму и сар., 1992; Zhou и сар., 2003; Wucherly и сар., 2004; Qi и сар., 2010; Wallenberg и сар., 2014). Показано је да ови редокс активни метаболити изазивају једноланчане и дволанчане прекиде ДНК (Lu и сар. 1994).

### 3.4. Антиметастатски лекови – миграција

Више од 90% смртних случајева од канцера су узроковане метастазама канцера (Lu и сар., 2013). Стога би антиметастатски третман требало да буде један од најважнијих приступа у повећању шансе за успешну терапију. Садашња хемиотерапија је углавном усмерена на примарне туморе, док је преживљавање пацијената у касној фази врло мало побољшано. Постоји реална потреба за побољшањем протокола примене хемиотерапије различитим методама, нпр., продукција нових врста антиметастатских лекова као и оптимизација њиховог коришћења у смислу индивидуализоване терапије на клиникама (Valastyan и Weinberg, 2011; Lu и сар., 2012). Сваки мали помак у побољшању антиметастатске терапије довешће до великих клиничких достигнућа у терапији канцера (Lu и Lu, 2010). У данашње време антиметастатски лекови могу се поделити у следеће категорије:

- *Лекови који мењају полимеризацију и активност актина.* Неки од примера су: Латрункулин А, који инактивира интеракцију G-актина са тимозином  $\beta 4$  (Nummela и сар., 2006); Хондрамид, који доказано инактивира актин у MDA-MB-231 ћелијама (Menhofer и сар., 2014); TR100, који инактивира тропомиозин (Stehn и сар., 2013) и други;
- *Лекови који дестабилизују актин цитоскелета.* Примери су цитохалазини изоловани из гљива (Van Goietsenoven и сар., 2011) који утичу на полимеризацију актина; геодиамолити, који разарају актинске филаменте (Tannert и сар., 2010);

- *Лекови који утичу на контрактилност актомиозина. Контрактилност актомиозина од изузетног је значаја за потенцијал миграције ћелија (Rodriguez-Hernandez и сар., 2016).*

## ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

### Хипотезе

- ❖ Антиканцерогена једињења не морају испољавати цитостатски и цитотоксични карактер, већ је некада важније да поседују антиинвазивни и антиметастатски потенцијал. Нпр. карциноми дебелог црева и дојке (због физичке доступности) у данашњим условима лако се третирају. Међутим, метастатски потенцијал ове две врсте канцера је изразит и сврстава их у изузетно агресивне. У том смислу, када је реч о третману карцинома дојке и колодебелог цревана, садашња медицина исказује потребу за новим антиметастатским лековима.
- ❖ Органоселенска једињења, ОСЈ, позната су углавном по свом антиоксидационом дејству. Са друге стране, постоје и ОСЈ са изразито прооксидационим особинама. На основу претходног искуства и литературних података, у зависности од хемијске структуре могуће је предвидети оквирно дејство одређеног селено-једињења. Претпоставка је да ће ОСЈ координовано као лиганд у комплексу са паладијумом(II) реаговати цитотоксично и прооксидационо.
- ❖ Редокс равнотежа је веома осетљива, како у здравим, тако и у ћелијама канцера. Најмања промена било ког од многобројних параметара утиче на целу каскаду протеина и малих молекула у ћелији померајући ову равнотежу у једном од могућа два смера, прооксидационом и антиоксидационом. Стога, промена у хемијској структури ОСЈ, као и у концентрацији третмана, може изазвати сасвим другачији одговор на молекуларном нивоу ћелије.
- ❖ Хемијска једињења могу бити донори и/или акцептори електрона у зависности од хемијске структуре. Уколико одређено хемијско једињење поседује потенцијал да отпусти електрон, формирајући слободне радикале, може се очекивати системски одговор ћелије у супротном смеру. (Де)активација глутатионског система на нивоу генске и протеинске експресије значајно је модулисана утицајем примењеног хемијског једињења и значајно утиче на судбину ћелије.

**Циљ докторске дисертације** је да се у *in vitro* условима испитају молекуларни механизми утицаја неких органоселенских једињења (ОСЈ) на редокс статус имортализованих ћелијских линија карцинома дебелог црева НСТ-116 и дојке MDA-MB-231. Циљ је да се анализира утицај ОСЈ на: (а) вијабилност ћелијских линија канцера; (б) миграцију, тј. инвазивни потенцијал ћелија канцера; (в) параметре редокс статуса; (г) генску експресију селено-ензима глутатионског и тиоредоксин система; (д) активност транскрипционих фактора укључених у први одговор ћелије на промене у равнотежи редокс статуса.

### Специфични циљеви

- Евалуација утицаја ОСЈ на вијабилност ћелија аденокарцинома дебелог црева (НСТ-116) и дојке (MDA-MB-231), помоћу МТТ теста;
- Испитивање антимиграторног потенцијала ОСЈ на НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама *Transwell* миграторним тестом;
- Испитивање ефеката ОСЈ на продукцију  $O_2^{\bullet -}$  (NBT тест), нитрита (Griess тест), глутатиона (GSH тест), и протеинску експресију индуцибилне азот моноксид синтетазе (iNOS, имунофлуоресцентни тест);
- Показати у којој мери испитивана ОСЈ утичу на генску експресију циљаних гена за селено-ензиме глутатион пероксидазе (*GPX1, 2, 3, 4, 6*), глутатион-S-трансферазе (*GST*) и тиоредоксин редуктазе (*TXNRD*) у НСТ-116 ћелијама;
- Показати ефекте ОСЈ на активност транскрипционих фактора укључених у први редокс одговор НСТ-116 ћелија. Фокус је на испитивању транскрипционе активности Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B и њихове међусобне повезаности, флуоресцентном методологијом трансфекције pTRAF вектора у резолуцији једне ћелије и анализом *Operetta* системом.



## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу, у оквиру научно-истраживачког пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС, ИИИ 41010). Део истраживања (Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$  и NF- $\kappa$ B употребом рТРАФ вектора и анализа *Operetta* системом, као и један део анализе експресије гена методом qPCR) је реализован и на Департману за биохемију и биофизику, Каролинска институт, Штокхолм, Шведска, код професора Елиаса Арнера.

### 1. Хемикалије и реагенси

Коришћене хемикалије и реагенси набављени су од различитих произвођача и аналитичке су чистоће. Натријум нитрит (NaNO<sub>3</sub>) набављен је од Зорка фарма, Србија. 5,5'-Дитиобис(2-нитробензоева киселина) (DTNB), N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, трипан плаво, ауранофин, TNF $\alpha$ , и DMOG од Sigma Chemicals Co., САД. Медијум за гајење ћелија (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (*Phosphate Buffer Saline* - PBS) од GIBCO, Invitrogen, САД. Фетални говеђи серум (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 0.25% Трипсин-EDTA, пеницилин и стрептомицин од РАА, Аустрија. Диметил-сулфоксид (DMSO), 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) од SERVA, Немачка. Поливинил алкохол медијум, од Fluka Analytical, Switzerland. Параформалдехид од Merck, Germany. Сулфаниламид и сулфанилна киселина од МР Хемија, Србија. Примарно антителио за iNOS од RD Systems, САД. Секундарно антителио конјуговано са Alexa 448 и DAPI (*Diamidino-2-phenylindole*) боја за детекцију једара, кит за трансфекцију OptiMEM и Turbo-Fect од Thermo Scientific, САД. Кит за реверзну транскриптазу SensiFAST cDNA Synthesis Kit, кит за квантификацију релативне генске експресије SensiFAST™ Lo-ROX Kit од Bioline, Лондон,

Уједињено краљевство. Боја за бојење једара Hoechst 33342 од Life technologies, Karlsbad, Калифорнија, САД.

## 2. Испитивана органоселенска једињења

Органоселенска једињења (ОСЈ) су Супстанце су хемијски синтетисане и окарактерисане у сарадњи са колегама са Института за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Фенилселенометил циклични етри

**SEL1** - 2-(фенилселенометил)тетрахидрофуран

**SEL2** - 2-(фенилселенометил)тетрахидропиран

добијени су од проф. др Зорице Бугарчић. Резултати синтезе и структурне карактеризације представљени су у раду (Konstantinovic и сар., 1992). Детаљи о синтези дати су у **Прилогу 1**.

Бициклични селено-хидантоин и његов Pd(II) комплекс

**SEL3** - селено-хидантоин (лиганд)

**SEL4** - паладијум(II) комплекс селено-хидантоина

добијени од др Биљане Шмит. Резултати синтезе и структурне карактеризације представљени су у раду (Šmit и Pavlović, 2015). Детаљи о синтези дати су у **Прилогу 1**.

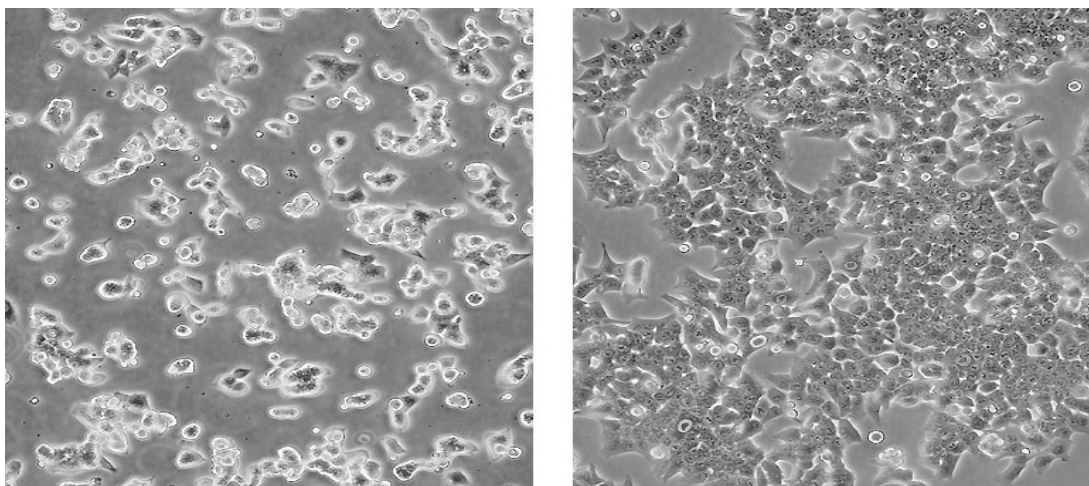
## 3. Имортализоване ћелијске линије канцера

Одгајање и припрема адхерентних ћелија у култури представља поступак манипулације у контролисаним условима, тј. у условима који у највећој мери опонашају физиолошке услове. Контролисани услови су температура од 37 °С, влажност ваздуха (95%), рН (7.2) и концентрација CO<sub>2</sub> од 5%.

Сваки рад са ћелијским линијама подразумева строго придржавање стандарда стерилности, како у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха и филтерима који пречишћавају ваздух, тако и током коришћења лабораторијског посуђа и прибора за рад. Поред редовног одржавања чистоће у лабораторији, стерилисање радних површина UV лампом се такође подразумева.

Ћелије су гајене у специјалним посудама за одгајање ћелијских култура (Т-25 и Т-75 cm<sup>2</sup>) у хранљивом DMEM медијуму, обогаћеним са 10% FBS-а, 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина.

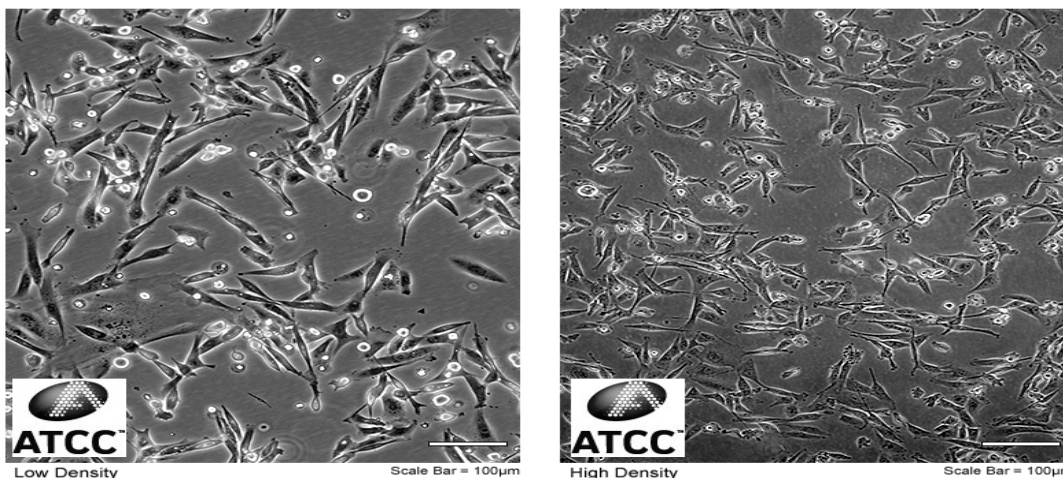
За истраживања су коришћене имортализоване ћелијске линије колоректалног карцинома НСТ-116 (Шема 10) и карцинома дојке MDA-MB-231 (Шема 11). НСТ-116 представља имортализовану, адхерентну ћелијску линију, колоректалног карцинома пореклом од одраслог мушкарца. Ове ћелије имају епителну морфологију и експримиране гене за трансформишући фактор раста  $\beta 1$  и  $\beta 2$ . Ова ћелијска линија посебно је погодна за трансфекцију. Ћелијска линија има мутацију у кодону 13 за *ras* протоонкоген.



**Шема 10.** Морфолошки приказ НСТ-116 ћелија фотографисаних електронским микроскопом (*American Type Culture Collection - ATCC*; <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

MDA-MB-231 представља имортализовану, адхерентну ћелијску линију, метастатског епителног аденокарцинома дојке, пореклом од пацијента женског рода. Ове ћелије имају експримиране рецепторе за епидермални фактор раста (енгл. *Epidermal Growth Factor*, EGF) и трансформишући фактор раста  $\alpha$  (енгл. *Transforming Growth Factor alpha*, TGF- $\alpha$ ) и експримирани онкоген WNT7B.

ATCC Number: **HTB-26**™  
Designation: **MDA-MB-231**



**Шема 11.** Морфолошки приказ MDA-MB-231 ћелија фотографисаних електронским микроскопом (*American Type Culture Collection* - ATCC; <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

### 3.1. Поступак рада са ћелијским културама.

#### *Одлеђивање ћелија*

Криотубе са залеђеним ћелијама су чуване у контејнеру са течним азотом (*Spectrum series 20*), на  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . За потребе експеримената из криотубе је одлеђена суспензија ћелија и ресуспендована у 5 ml комплетног медијума. Суспензија ћелија је центрифугирана 10 минута на 250 g. Медијум је аспириран, а талог ћелија је ресуспендован у нових 5 ml медијума и ћелије су засејане у посуду од T-25. Наредног дана је замењен медијум (Mazur, 1970).

#### *Трипсинизација*

Испитиване ћелије су адхерентне ћелијске линије, које расту формирајући везе са дном посуде у којој се гаје. Због тога је приликом пасажирања, засејавања и било какве манипулације ћелијама неопходно раскинути ове везе, како би се ћелије прикупиле за потребе експеримената. Процес трипсинизације подразумева: одстрањивање медијума из флашка, испирање ћелија са 1 ml 0.25% трипсина, додавање 1 ml 0.25% трипсина на флашк T-25 или 3 ml 0.25% трипсина на флашк T-75. Потребно је сачекати неколико минута да се ћелије одлепе и груписане ћелије фино диспергују. Процес трипсинизације се прекида додатком медијума за гајење ћелија, чиме се постиже њихово разређивање и неутрализација трипсина. Процес трипсинизације је потребно извести у оптималном

најкраћем периоду због тога што предуго излагање ћелија трипсину може изазвати њихово оштећење.

### ***Пасажирање ћелија***

Након засејавања, ћелије се лепе за површину суда у коме се гаје, почињу да расту и деле се. Својим растом и увећавањем броја, ћелије испуњавају слободну површину и црпе хранљиве материје из медијума. Када достигну велики број, контакт између ћелија успорава њихов раст такозваном контактном инхибицијом и долази до накупљања мртвих ћелија. Да би се то избегло, пасажирање ћелија се врши када оне достигну покривеност од 80-90%. Пасажирање представља пребацивање мањег броја ћелија у другу посуду, са новим хранљивим медијумом (Freshney, 1983). Након трипсинизације ћелије се ресуспендују у 5 ml хранљивог медијума и одговарајућа запремина се пребаци у нову посуду уз додатак новог хранљивог медијума до 5 ml у фласк Т-25, односно 12 ml у фласк Т-75. На тај начин се ћелије гаје дуже време у лабораторијским условима.

### ***Одређивање броја и вијабилности ћелија***

У експериментима су коришћене само живе (вијабилне) ћелије. Број ћелија је одређиван тестом са трипан плавим. Трипан плаво је боја која улази у цитоплазму ћелија са оштећеном мембраном и отуда се мртве ћелије виде под микроскопом као плаво обојене, док живе ћелије остају необојене. Ћелијска суспензија је мешана са бојом у односу 1:1 и наливана на коморицу за бројање ћелија (хемоцитометар). Ћелије су бројане у 2 велика дијагонална квадрата, површине  $0.0003 \text{ mm}^2$ , на хемоцитометру под светлосним инвертним микроскопом. Средња вредност броја ћелија из два квадрата се користи за прерачун за одређивање броја ћелија у милилитру суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе.

Број ћелија по милилитру = средња вредност броја ћелија из оба квадрата  $\times$  разблажење  $\times 10^4$  (корекциони фактор - дубина коморе и запремина у ml)

Након одређивања броја расположивих ћелија у 1 ml прерачунаван је њихов број потребан за експериментални рад.

Вијабилност ћелија је израчуната према следећој формули:

Број живих ћелија/укупан број ћелија (живе и мртве)  $\times 100 = \%$  живих ћелија.

Вијабилност ћелија коришћених у експериментима је била већа од 90%.

## 4. Методе испитивања биолошких ефеката ОСЈ

### 4.1. Третмани хемијским супстанцама

У третманима ћелија коришћени су раствори испитиваних ОСЈ припремани у различитим концентрацијама по потреби протокола експеримента. Основни раствори свих ОСЈ припремани су растварањем у 100% DMSO у концентрацији 100 mM. Ови раствори су прављени непосредно пре третмана. Раствори нижих концентрација, коришћених у третманима, припремани су разблажењем основног раствора медијумом за одржавање ћелија. На овај начин, у највишој примењеној концентрацији (500  $\mu\text{M}$ ) концентрација DMSO била је 0.5%, која није токсична у односу на испитиване ћелије. Преципитација испитиваних супстанци није уочена, тј. манипулисано је правим растворима тачно дефинисаних концентрација.

За одређивање цитотоксичности (МТТ тест), НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије засејане су у микротитар плоче са 96 бунарића ( $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације у инкубатору, ћелије су третиране са 100  $\mu\text{l}$  раствора испитиваних ОСЈ (концентрација 0.1, 1, 10, 50, 100 и 500  $\mu\text{M}$ ). Нетретираним (контролним) ћелијама је замењен свеж медијум. Време третмана је 24 и 72 сата.

Код одређивања ефекта испитиваних ОСЈ на миграторни потенцијал, ћелије су засејаване у Transwell плоче са 24 бунарића ( $1 \times 10^5$  ћелија по бунарићу) у растворима од 10 и 100  $\mu\text{M}$  ОСЈ. Време третмана је 24 сата.

За одређивање концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (NBT тест), нитрита (метода по Griess-у) и GSH, ћелије су засејаване у микротитар плоче са 96 бунарића ( $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу за NBT тест и методу по Griess-у и  $5 \times 10^4$  ћелија по бунарићу за одређивање концентрације GSH). Ћелије су третиране исто као код МТТ теста. Време третмана је 24 и 72 сата.

За одређивање протеинске експресије iNOS имунофлуоресценцом, ћелије су засејане на покровно стакло у микротитар плочи са 6 бунара ( $5 \times 10^4$  ћелија по бунару). Након постизања 80% покривености, ћелије су третиране са 2 ml одговарајућег раствора третмана (50  $\mu\text{M}$  ОСЈ), а контролним ћелијама је замењен медијум. Време третмана је 24 сата.

#### 4.2. Одређивање вијабилности ћелија и процена цитотоксичности ОСЈ

За одређивање вијабилности ћелија и процену цитотоксичности ОСЈ коришћена је колориметријска метода, МТТ тест (Mosmann, 1983). МТТ је жуто обојена тетразолијумова со, која се у живим ћелијама под дејством митохондријаних редуктаза редукује у љубичасто обојен формазан. Интензитет боје се може квантификовати мерењем на спектрофотометру на таласној дужини од 550 nm. По завршетку третмана у контролне и третиране ћелије је додаван раствор МТТ-а (5 mg/ml у PBS-у) у запремини од 25  $\mu$ l. Након инкубације од 2.5 сата на 37 °C, раствор МТТ је аспириран и формазан је растваран у 150  $\mu$ l DMSO-а. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C). Бунарићи у којима је био само медијум без ћелија, касније аспириран и додат DMSO, служили су као слепа проба („blank“). Добијене вредности апсорбанци су пропорционалне интензитету ћелијске респирације, односно броју живих ћелија. Процент живих ћелија је израчунаван као однос апсорбанци третираних ћелија и апсорбанце контролних ћелија, помножен са 100.

#### 4.3. Одређивање миграторног потенцијала ћелија

За испитивање миграторног потенцијала ћелија коришћена је Transwell метода (Chen, 2005). Принцип методе се заснива на мерењу пролазности ћелија засејаних на мембрану са порама у присуству и одсуству атрактанта, у овом случају 10% FBS. Пролазност/миграција ћелија праћена је у присуству и одсуству третмана. Transwell плоча се састоји од 24 бунарића и 24 чашице које на свом дну имају мембрану са порама величине 8  $\mu$ m на које се засејавају ћелије. НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије коришћене у експерименту су гајене у DMEM медијуму са 10% FBS, затим су испране два пута PBS-ом, трипсинизирани и ресуспендовани у DMEM медијуму без серума, а затим центрифугиране 3 минута на 800 rpm. Након центрифугирања ћелије су пребројане и  $1 \times 10^5$  ћелија је ресуспендовано у 500  $\mu$ l DMEM медијума без серума са различитим третманима. Контролне ћелије су засејане у DMEM медијуму без серума. Овако припремљена ћелијска суспензија у третману је засејана у чашице са мембранским дном (24 well ThinCert™, Greiner Bio-One), а затим су чашице стављене у плочу са бунарићима и инкубирани 24 h у инкубатору. Као атрактант, у све бунариће је додат DMEM медијум са 10% FBS-а. После истека инкубације, ћелије на мембранама су испране PBS-ом и фиксиране у 4%

параформалдехиду 20 минута на собној температури. После поновног испирања PBS-ом, ћелије које нису мигрирале су одстрањене са унутрашње стране мембране помоћу штапића за уши. Преостале ћелије на мембрани су бојене 10 минута 0.1% кристал виолетом у MES пуферу. Након бојења мембране су исечене уз помоћ скалпела и пренете у плочу са 96 бунарића а затим су одбојене у 100  $\mu\text{l}$  10% сирћетне киселине. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C), на 550 nm. Миграторни потенцијал ћелија се изражава као оптичка густина (OD). Резултати су приказани и у односу на проценат вијабилних ћелија одређених МТТ тестом.

#### **4.4. Испитивање параметара редокс статуса**

##### **4.4.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала**

Концентрација  $\text{O}_2^{\cdot-}$  је одређивана спектрофотометријски, NBT тестом (Auclair и Voisin, 1985). Метода се заснива на редукцији нитроблу-тетразолијума (NBT) до нитроблу-формаза у присуству  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . NBT тест се користи као мера стварања  $\text{O}_2^{\cdot-}$  у хемијским и биолошким системима. Потенцијал ћелија да стварају реактивне врсте кисеоника може се одредити мерењем редукције NBT. Оксидована форма NBT је жута, а редукован формазан је плава до сиво-црн. Након завршетка инкубације ћелија са третманима, додаван је раствор NBT-а (5 mg/ml у PBS-у) у запремини од 10  $\mu\text{l}$ . Након инкубације од 45 минута на 37 °C, додато је 10  $\mu\text{l}$  DMSO-а и бојена реакција је очитавана на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C), на 550 nm. Добијене вредности апсорбанци су коришћене у даљем прорачуну, да би се добила концентрација  $\text{O}_2^{\cdot-}$  изражена у nmol/ml. Вредности апсорбанци третираних и контролних ћелија су дељене са моларним екстинкционим коефицијентом за моноформазан ( $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$\text{nmol NBT/ml} = A/0.015 \times V_{\text{cuv}} / V_{\text{ex}}$$

A - апсорбанца;  $V_{\text{cuv}}$  - укупна запремина раствора у бунарићу = 120  $\mu\text{l}$ ;  $V_{\text{ex}}$  - запремина ћелија са третманом = 100  $\mu\text{l}$ .

##### **4.4.2. Одређивање концентрације нитрита**

Овај тест се базира на реакцији диазотовања, коју је првобитно описао Griess (1879). Сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, реагују са нитритима ( $\text{NO}_2^-$ ), дајући стабилно азотно једињење, пурпурне боје. Концентрација



нитрита је директно пропорционална пурпурној боји чији се интензитет мери на ELISA читачу, на таласној дужини од 550 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је, по завршетку инкубације ћелија са третманима, центрифугирана 10 минута на 300 грм, како би се одстраниле партикуле из супернатанта. За одређивање стандардне криве, у бунариће је додата серија разблажених раствора  $\text{NaNO}_2$  концентрација 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 и 1.56  $\mu\text{M}$ . У бунариће је додато 50  $\mu\text{l}$  супернатанта. Уз помоћ вишеканалне пипете, додато је 50  $\mu\text{l}$  сулфаниламидног реагенса у све бунариће, као и у бунариће са нитритним стандардом за стандардну криву. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Након тога је додато по 50  $\mu\text{l}$  N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса у све бунариће, укључујући и бунариће са нитритним стандардом. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Пурпуна боја се одмах развија. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C), на 550 nm. Концентрација  $\text{NO}_2^-$  се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве за нитрите и изражава се у  $\text{nmol/ml}$ .

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{ml} = A/F \times R$$

A – апсорбанца; F – фактор добијен из нагиба криве; R – разблажење.

#### **4.4.3. Одређивање концентрације редукованог глутатиона**

Концентрација GSH у ћелијама је мерена спектрофотометријском методом (Baker и сар., 1990). Метода се занима на оксидацији редуковане форме глутатиона помоћу сулфидног реагенса 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB), чији се интензитет боје мери на ELISA читачу на 405 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је, по завршетку времена инкубације ћелија са третманом, центрифугирана 10 минута на 1000 грм. Медијум из свих бунарића је аспириран и додато је 100  $\mu\text{l}$  2.5% ледене сулфосалицилне киселине. Микротитар плоча је инкубирана 15 минута на леду и након тога центрифугирана 15 минута на 1000 грм. На другу микротитар плочу је одпипетирано 50  $\mu\text{l}$  супернатанта и додато 100  $\mu\text{l}$  реакционе смеше, која је припремљена непосредно пре почетка рада. Реакциона смеша представља 1 mM DTNB, растворен у DMSO-у и допуњен 100 mM фосфатним пуфером, pH 7.4 + 1 mM EDTA до потребне запремине. Микротитар плоча је инкубирана 5 минута на собној температури и након тога је апсорбанца очитана

на 405 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C). Концентрација редукованог глутатиона се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH, а изражава се у nmol/ml.

$$\text{nmol GSH/ml} = A/F \times R$$

A – апсорбанца; F – фактор добијен из нагиба криве; R – разблажење.

#### ***4.4.4. Обрада резултата у односу на број вијабилних ћелија***

Прерачун у односу на број вијабилних ћелија настао је из потребе схватања и дискусије резултата у што реалнијим оквирима. Наиме, одређивање супероксид анјон радикала, нитрита, глутатиона и миграције засновано је на спектрофотометријским методама, где се мери апсорбанца у целом бунарићу микротитар плоче. Добијене вредности представљају апсолутну вредност мереног параметра за цео бунарић. Међутим, како се број ћелија у појединачним бунарићима након третмана испитиваним ОСЈ разликује, што је у корелацији са цитотоксичним потенцијалом ОСЈ, потребно је прерачунати измерене вредности апсорбанце у односу на тачан број ћелија у бунарићу. Обзиром да на почетку експеримента полазимо од истог броја ћелија (нпр. 10.000) по бунарићу и узимајући у обзир да је одређена испитивана супстанца цитотоксична, након 24 или 72 сата од третмана заправо констатујемо опадање броја живих ћелија у односу на контролу. Број ћелија можемо експериментално одредити непосредно из резултата МТТ теста. Прорачун на основу броја вијабилних ћелија врши се по следећој формули (Johansson и сар., 2015; Živanović и сар., 2017):

$$C_x = C_{izr} / f$$

где је

$C_x$  – концентрација параметра у односу на број ћелија

$C_{izr}$  – концентрација у целом бунарићу

f – фактор,  $f = \% \text{вијабилности} / 100$

#### ***4.4.5. Одређивање протеинске експресије индуцибилне азот моноксид синтазе имунофлуоресценцом***

Протеинска експресија iNOS се одређује методом имунофлуоресценце (Higuchi и сар., 2001). Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских

делова флуоресцентним бојама. Техника се заснива на принципу антиген-антитело. Специфичност реакције антиген-антитело омогућава да се овом методом тачно и прецизно прати како присуство и локализација, тако и дистрибуција одређеног протеина у ћелији или ткиву. Ова техника омогућава посматрање како појединачних протеина, тако и комплетних ћелијских структура. Антитело као индикаторни молекул је обележено флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије. Детекција се врши флуоресцентним микроскопом. Након истека времена инкубације ћелија са третманима (24 сата), ћелије су испране PBS-ом. Затим су ћелије фиксирани 4% параформалдехидом, раствореним у PBS-у, 20 минута на собној температури. Након фиксације, ћелије су три пута испране PBS-ом и пермеабилеизоване 2 минута хладним метанолом ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Након пермеабилеизације, ћелије су испране три пута PBS-ом и блокиране 20 минута са 1% BSA. Овако фиксирани ћелије су инкубирани сат времена са специфичним примарним антителом. Парче парафилма је стављено у петри кутију, дезинфиковано 75% алкохолом, на њега је нанета кап од 60  $\mu\text{l}$  раствора примарног антитела (анти-iNOS, RD Systems) у PBS-у концентрације 20  $\mu\text{g/ml}$  и на кап је постављена покривна плочица тако да страна на којој су ћелије, буде окренута ка парафилму. Након инкубације са примарним антителом, покривне плочице су враћене у бунариће, испране три пута по 5 минута PBS-ом и иста процедура је поновљена за инкубацију са секундарним антителом конјугованог са Alexa488 (Thermo Scientific), разблаженог у PBS-у у односу 1:200. За визуелизацију плаво обојених једара коришћена је DAPI боја, у разблажењу 1:1000. Након инкубације са секундарним антителом покривне плочице су враћене у бунариће, испране три пута по 5 минута PBS-ом и залепљене на предметно стакло уз помоћ поливинил алкохол медијума. Препарати су остављани преко ноћи да се осуше и након тога посматрани на флуоресцентном микроскопу (Ti-Eclipse), на филтерима одређених таласних дужина и увеличању 600x.

## **5. Статистичка обрада резултата**

Сви појединачни експерименти рађени су у трипликату, а добијени резултати представљају средњу вредност из три независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су обрађени у SPSS (Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата

(SPSS for Windows, ver. 17, 2008). Коришћен је програм ANOVA, при чему је  $p < 0.05$  сматрана статистички значајном разликом.  $IC_{50}$  вредности, концентрације третмана које убијају 50% ћелија, су прерачунате из дозно зависних кривих добијених у компјутерском програму *CalcuSyn*.

## **6. Анализа експресије иРНК за гене важне у редокс контроли, qRT-PCR метода**

Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* - qRT-PCR) је метода специфична за квантитативно одређивање генске експресије (Winer и сар., 1999; Schmittgen и Livak, 2008). Генерално, геном дефинише оквир, тј. представља потенцијал за експресију одређеног гена. Међутим, експресија датог гена зависи од више фактора и коначно транскриптом тј. информациона РНК (иРНК) представља реално стање активности гена. Ниво генске експресије, тј. квантификација иРНК врши се методом qRT-PCR. qRT-PCR метода подразумева превођење свих иРНК у комплементарну ДНК (енгл. *Complementary DNA*, cDNA), чија се количина одређује амплификацијом уз помоћ флуоресцентне боје. У овој дисертацији коришћена је *Sybr Green* боја која интеркалира у дволанчану ДНК емитујући сигнал. Што је већа количина полимеризоване ДНК, интензивнији је и сигнал, тј. индиректно говорећи, већа је концентрација иРНК и експресије гена.

НСТ-116 ћелије засејане су у Т25 флашкове. Након постизања конфлуентности од око 80% ћелије су третиране испитиваним једињењима селена - ОСЈ (у концентрацијама 10 и 100  $\mu\text{M}$ ) и натријум селенитом (позитивна контрола), а трајање третмана је 24 сата. Нетретиране ћелије служе као негативна контрола.

### **6.1. Изолација укупне РНК**

Изолација укупне РНК из ћелија вршена је стандардном методом употребом TRIzol<sup>®</sup> реагенса. Изолована РНК растворена у води слободној од РНаза и чувана на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Изоловање укупне РНК врши се у неколико једноставних корака. Ћелије су избројане, трипсинизирани и центрифугиране 10 мин/ 1200 rpm. На  $10^6$  ћелија иде 1 ml TRIzol<sup>®</sup>. На 1 ml суспензије додаје се по 200  $\mu\text{l}$  хлороформа. Смеша се енергично промеша и остави 15

минута на собној температури. Након лизирања ћелија, смеша се центрифугира 15 мин/12000 rpm/4 °C. Центрифугирањем су одвојене три фазе. У горњој, воденој фази налази се РНК, у средњој фази је ДНК, док се у доњој органској фази налазе ресуспендовани протеини. Водена фаза са РНК пажљиво је пренета у другу микропрувету и додато је 500 µl изопропанола, а затим остављено 10 минута на собној температури. Након тога, садржај је центрифугиран 10 мин/12000 rpm/4 °C. Супернатант се одбацује, а РНК која је у талогу испира се помоћу 80% етанола и центрифугира 5 мин/7500 rpm/4 °C три пута. Након сушења на ваздуху, узорак укупне РНК се раствори у 20 µl PCR воде. Концентрација је одређена на биофотометру (*Eppendorf BioPhotometer Plus*) на таласној дужини од 260 nm. Поред одређивања концентрације РНК, важно је контролисати и евентуални садржај примеса ДНК у узорку, мерењем односа апсорбанци 260/280 nm. На основу литературе уколико је однос 1.8-2.0 узорак се третира као чист и спреман је за рад.

## 6.2. Превођење РНК у комплементарну ДНК, реверзна транскриптаза

Превођење информационе РНК у комплементарну ДНК (цДНК) вршено је употребом кита реверзне транскриптазе *SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline)* на апарату *Eppendorf Mastercycler* по упутству произвођача.

Реакциона смеша направљена је на следећи начин:

Реагенс	Запремина
Тотална РНК (концентрације 1 µg)	n µl
5x TransAmp пуфер	4 µl
Реверзна транскриптаза	1 µl
PCR вода	Укупно до 20 µl

Реакција се изводи у следећим корацима:

Р.Бр.	Корак	Време	Температура
1.	Везивање прајмера	10 минута	25 °C
2.	Реверзна транскрипција	15 минута	42 °C
3.	Деактивација процеса	5 минута	85 °C

На овај начин добијена је комплементарна ДНК, која је доста стабилнија од РНК и може се чувати месецима на -80 °C.

### 6.3. qRT-PCR

Квантификација релативне генске експресије вршена је употребом SensiFAST™ Lo-ROX Kit (*Bioline*) на апарату Applied Biosystems 7500 real-time PCR system (*Applied Biosystems*).

Реакциона смеша направљена је на следећи начин:

Реагенс	Запремина	Коначна концентрација
2 x SensiFAST™ SYBR Lo-ROX kit	10 µl	1 x
Forward прајмер (концентрације 10 µM)	0.5 µl	400 nM
Reverse прајмер (концентрације 10 µM)	0.5 µl	400 nM
10 µM узорка цДНК	0.5 µl	100 nM
PCR вода	Укупно до 20 µl	

Реакција се изводи у следећим корацима:

Р.Бр.	Корак	Време	Температура
1.	Активација полимеразе	2 минута	95 °C
2.	Денатурација	15 секунди	95 °C
3.	Полимеризациона реакција	1 минут	57 °C

На крају процеса ланчане реакције, програм је покренуо и анализу крива топљења.

Гени и одговарајући прајмери представљени су у Табели 3.

**Табела 3.** Преглед сенквенци прајмера коришћених у експериментима испитивања утицаја ОСЈ на релативну генску експресију одабраних гена.

Назив гена	Скраћеница	Секвенца прајмера
Глутатион пероксидаза 1	GPX1	F 5'– CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG – 3'
		R 5'– GAGGGACGCCACATTCTCG – 3'
Глутатион пероксидаза 2	GPX2	F 5'– GGTAGATTTCAATACGTTCCGGG – 3'
		R 5'– TGACAGTTCTCCTGATGTCCAAA – 3'
Глутатион пероксидаза 3	GPX3	F 5'– AGAGCCGGGGACAAGAGAA – 3'
		R 5'– ATTTGCCAGCATACTGCTTGA – 3'
Глутатион пероксидаза 4	GPX4	F 5'– GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC – 3'
		R 5'– CCGAACTGGTTACACGGGAA – 3'
Глутатион пероксидаза 6	GPX6	F 5'– GCCCTCCGACCTCTGATCTT – 3'
		R 5'– TGTCTGACTTGACTGTGCTGA – 3'
Глутатион S трансфераза	GST	F 5'– TCTTTTGCATAGAGACCATGACCAG – 3'
		R 5'– CTCCTACTCCAGTAACTCCCGACT – 3'
Тиоредоксин редуктаза	TXNRD	F 5'– ATATGGCAAGAAGGTGATGGTCC – 3'
		R 5'– GGGCTTGTCTAACAAGCTG – 3'
β актин	β-actin	F 5'– AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG – 3'
		R 5'– GCCTTCATACATCTCAAGTTGG – 3'

Контролни или *housekeeping* ген обично представља неки од конститутивних гена, потребних за одржавање основних функција ћелије, који су експримирани и у нормалним и у патофизиолошким стањима (Eisenberg и Levanon, 2003). Често коришћени гени су: 18S rRNA (18S рибозомална РНК), 28S rRNA (28S рибозомална РНК), TUBA ( $\alpha$ -тубулин), АКТВ ( $\beta$ -актин),  $\beta$ 2М ( $\beta$ 2-микроглобулин), ALB (албумин), RPL32 (рибозомални протеин L32), TBP (ТАТА секвенца), CYCC (циклофолин Ц), EF1A (елонгациони фактор 1 $\alpha$ ), GAPDH и др. Квантификација релативне генске експресије базира се на компарацији са контролним геном  *$\beta$ -actin* одређивањем  $2^{-\Delta Ct}$  из Ct вредности које је апарат одредио (Schmittgen и Livak, 2008).

За израчунавање односа релативне генске експресије испитиваних гена у третманима ОСЈ у односу на експресију ових гена у контролним (нетретираним) ћелијама (**R**), користи се следећа формула:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = R$$

$\Delta Ct_1$  = разлика Ct вредности испитиваног гена у третираним ћелијама и Ct вредности  *$\beta$ -actin*-а у третираним ћелијама;

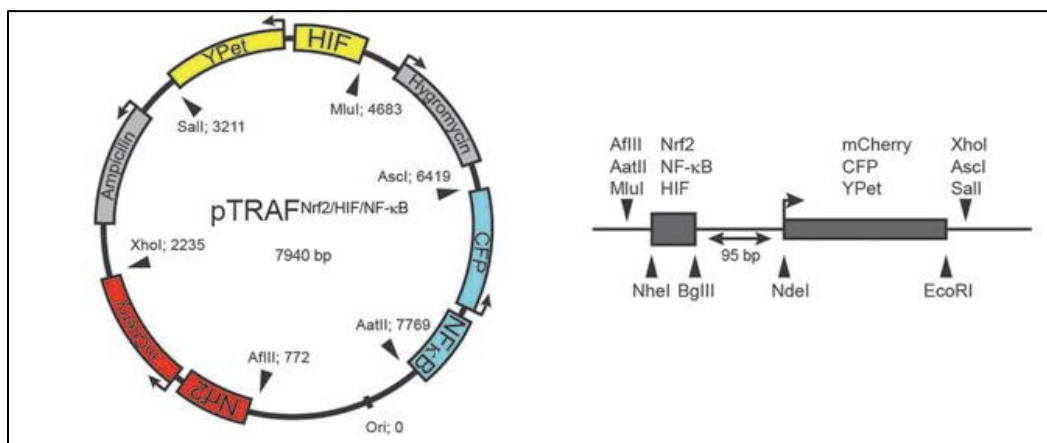
$\Delta Ct_2$  = разлика Ct вредности испитиваног гена у контролним ћелијама и Ct вредности  *$\beta$ -actin*-а у контролним (нетретираним) ћелијама.

## 7. Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$ и NF- $\kappa$ B употребом рТРАФ вектора

Ћелије канцера испољавају промењени редокс статус у односу на здраве ћелије. У том смислу, синергија различитих сигналних путева у различитим условима (нпр. током третмана активним супстанцама) није довољно испитана. Употреба рТРАФ вектора даје допринос бољем разумевању ове проблематике. НСТ-116 ћелије стабилно су трансфектоване рТРАФ вектором који нам омогућава праћење редокс регулисаних транскрипционих фактора Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B у реалном времену у резолуцији појединачне ћелије. Трансфекција ћелија изведена је помоћу рТРАФ<sup>Nrf2/HIF/NF $\kappa$ B</sup> вектора који садржи промоторске елементе активације Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B непосредно испред секвенци које

кодирају три флуоресцентна протеина mCherry, YPet и CFP (Метода и конструкција pTRAF вектора детаљно описани у Johansson и сар., 2015 и Прилог 2).

pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> вектор, коришћен за стабилну трансфекцију, садржи Nrf2, HIF и NF-κB елементе. pTRAF вектор креиран је модификацијом комерцијалног pGL4.32 вектора. Експресија Nrf2, HIF и NF-κB гена праћена је посредно мерењем флуоресценције флуоресцентних протеина mCherry, Ypet и CFP. Наиме, уместо клонирања целих гена Nrf2, HIF и NF-κB клонирани су њихови комплетни промотори на које су везани гени који кодирају флуоресцентне протеине mCherry, Ypet и CFP. Коначно, интензитет индукције експресије Nrf2 гена праћен је црвеном флуоресценцом mCherry протеина, HIF жутом флуоресценцом YPet протеина и NF-κB гена плавом флуоресценцом CFP протеина. pTRAF вектор приказан је на Шеми 12.



**Шема 12.** pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> плазмид омогућава симултану детекцију активације Nrf2, HIF и NF-κB. На шеми се виде елементи одговора за Nrf2, HIF и NF-κB који у исто време експримирају и флуоресцентне протеине mCherry (црвено), YPet (жуто) и CFP (сиво). На шеми десно приказана су рестрициона места.

Синтетисани флуоресцентни протеини праћени су методом флуоресцентне микроскопије у резолуцији појединачне ћелије *Operreeta* системом.

### 7.1. Третман

У циљу испитивања транскрипционе активности коришћене су нетоксичне концентрације испитиваних ОСЈ и једињења позитивне контроле. У том смислу, једињења селена аплицирана су у концентрацијама 0.5, 1 и 5 μM. Једињења позитивне контроле: ауранофин



(1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{TNF}\alpha$  (5 ng/ml) и DMOG (250  $\mu\text{M}$ ). Нетретиране ћелије служе као негативна контрола.

Тест вијабилности рађен је коришћењем Hoechst (33342; Life technologies) боје. Тест је заснован на принципу бојења ДНК у једрима живих ћелија. Наиме, Hoechst 33342 се везује за дволанчану ДНК емитујући плаву флуоресценцију. Hoechst 33342 се посебно везује за аденин-тимин богате регионе ДНК у малом жљебу. Интензитет плаве флуоресценце указује на број вијабилних ћелија у узорку.

## 7.2. Анализа *Operetta* системом

НСТ-116 ћелије су засејане у плоче са 96 бунарића обложених колагеном у броју од 20.000 ћелија по бунарићу, 24 сата пре трансфекције. Ћелије су трансфековане помоћу 0,02  $\mu\text{g}$  ДНК, 5  $\mu\text{l}$  OptiMEM и 0,04  $\mu\text{l}$  Turbo-Fect раствора (55  $\mu\text{l}$  медијума укупно) и остављене да инкубирају преко ноћи. Након 24 сата, ћелије су третиране испитиваним супстанцама уз додатну инкубацију од 24 сата. Ћелије су припремљене за анализу додатком 40 ng/ml Hoechst боје 30 минута за добро бојење једара. Након тога, ћелије су фиксиране 2% леденим параформалдехидом и остављене 10 минута на собној температури. У бунариће је затим додат PBS и плоче су остављене у фрижидеру до анализе. Компјутерски програми Columbus (PerkinElmer), ImageJ и Excel (Microsoft) коришћени су за анализу података добијених помоћу система *Operetta high-content imaging systems*. Овим програмима обрађене су флуоресцентне фотографије и израчунат интензитет флуоресценције у свакој ћелији. Флуоресцентни микроскоп AxioVert 40 CFL (Zeiss) коришћен је за праћење ћелија. За квантификацију у резолуцији појединачне ћелије коришћено је снимање по 7 поља у сваком бунарићу. Снимане су обе стране, као и центар. Коришћена је како светлосна микроскопија, тако и 4 филтера за детекцију флуоресценце: сигнали за mCherry, YPet, CFP и Hoechst (Johansson и сар., 2015).

## РЕЗУЛТАТИ

### *Биолошки ефекти испитиваних супстанци и механизми деловања*

#### 1. Цитотоксичност испитиваних органоселенских једињења

Цитотоксичност испитиваних органоселенских једињења (ОСЈ) одређивана је МТТ тестом. Цитотоксичност је изражена преко  $IC_{50}$  вредности ( $\mu M$ ), концентрације која убија 50% ћелија.

Третмани:

**SEL1** - 2-(фенилселенометил)тетрахидрофуран

**SEL2** - 2-(фенилселенометил)тетрахидропиран

**SEL3** - селено-хидантоин (лиганд)

**SEL4** - паладијум(II) комплекс селено-хидантоина

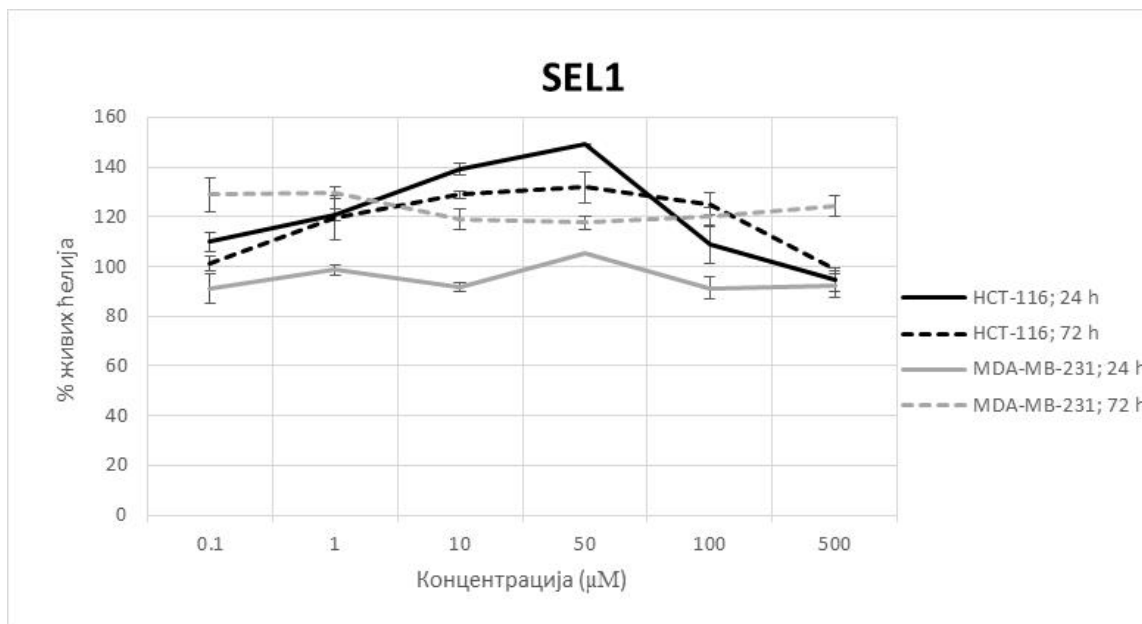
МТТ метода, представља тест који даје процену броја живих ћелија на основу активности њихових митохондрија. Резултати вијабилности ћелија користе се не само за објашњавање цитотоксичних утицаја испитиваних супстанци, већ и за прорачун концентрације реактивних врста кисеоника и азота, глутатиона, прорачун утицаја супстанци на миграцију и активност транскрипционих фактора (више информација у одељку *Материјал и методе*).

Резултати добијени након третмана SEL1 и SEL2 представљени су у Табели 4 и на Графиконима 1 и 2. SEL1 и SEL2 индукују пролиферацију НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија након 24 и 72 сата од третмана, тј. нису цитотоксични (Табела 4 и Графикони 1, 2). Резултати показују већи пролиферативни ефекат након 24 сата у односу на 72 сата (осим у третману SEL1 на MDA-MB-231 ћелијама). Ови подаци указују на акутни пролиферативни ефекат третмана, при чему SEL2 показује јачи ефекат од SEL1.

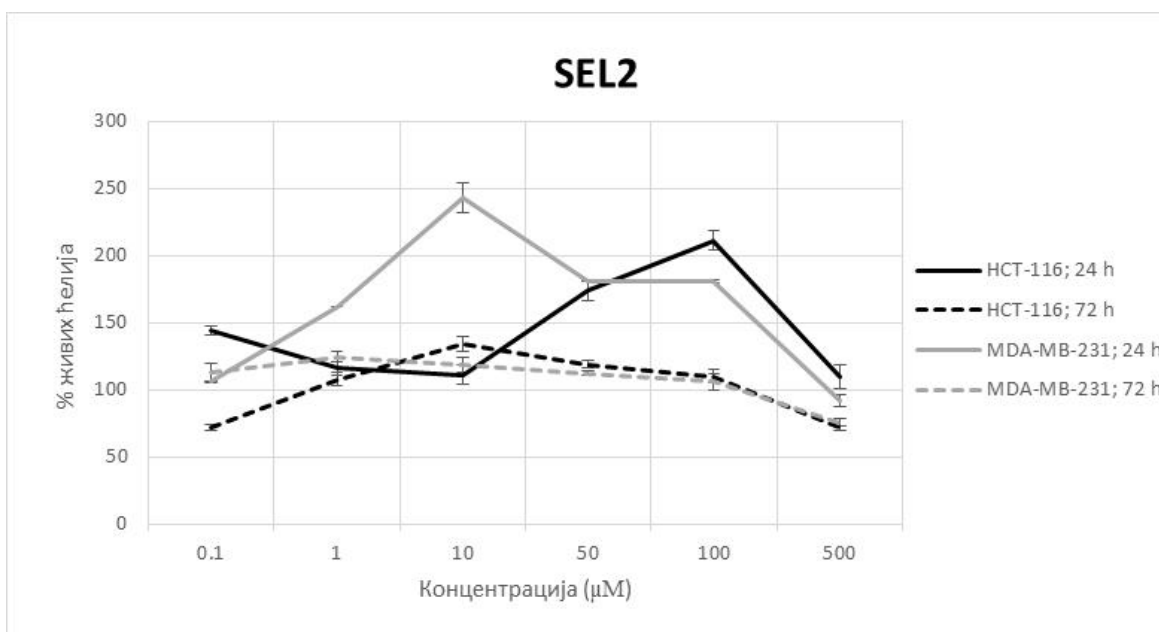
Табела 4. Ефекти SEL1 и SEL2 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.

Вијабилност ћелија (МТТ тест)					
Једињење	Концентрација (μM)	НСТ-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL1	0	100%	100%	100%	100%
	0.1	109.99±3.84*	101.29±2.89	90±0.28*	130±0.15*
	1	120.54±2.36*	119.75±8.93*	99±0.18	125±0.18*
	10	139.06±2.36*	128.96±1.51*	91±0.06*	120±0.27*
	50	148.99±0.34*	131.78±6.26*	105±0.15	122±0.09*
	100	108.67±7.32	125.17±4.56*	95±0.09	123±0.07*
	500	94.91±4.70	98.95±0.68	96±0.14	125±0.14*
SEL2	0	100%	100%	100%	100%
	0.1	144.11±2.86*	71.55±2.32*	115±0.16*	110±0.22*
	1	115.83±5.39*	107.94±4.55	165±0.15*	115±0.05*
	10	111.16±7.15	134.46±5.73*	245±0.35*	110±0.06*
	50	173.82±7.49*	119.07±2.54*	185±0.17*	112±0.16*
	100	211.37±6.99*	109.99±5.21	180±0.15*	107±0.06*
	500	109.85±8.99	71.41±1.46*	95±0.13	75±0.09*

Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна грешка, n=3. \*p<0.05, статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.



Графикон 1. Ефекти SEL1 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија, 24 и 72 сата након третмана.



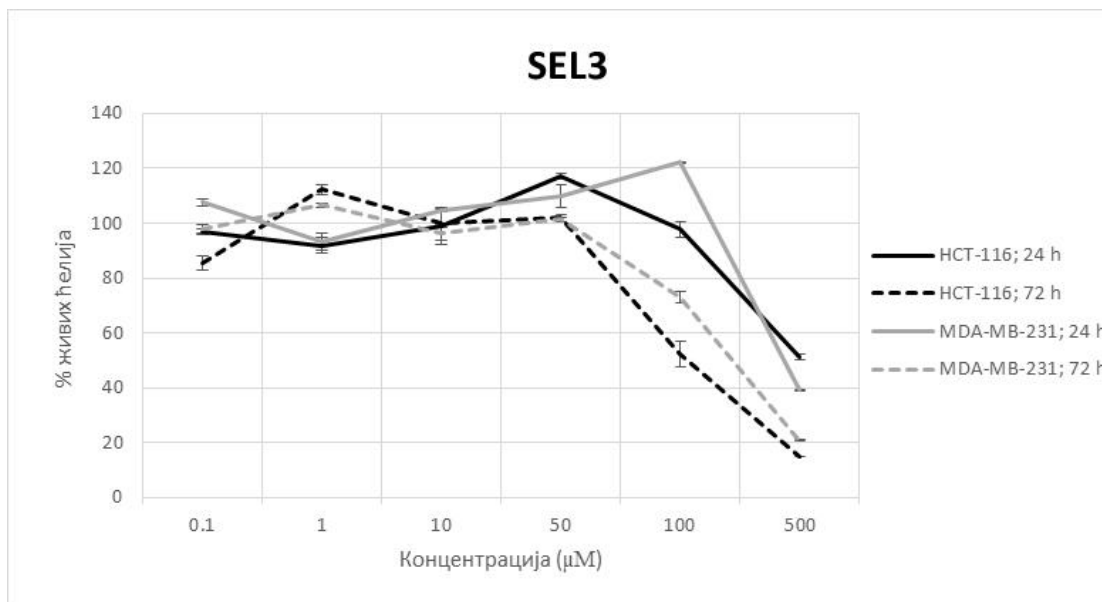
**Графикон 2.** Ефекти SEL2 на вијабилност HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 сата након третмана.

Испитивани третмани SEL3 и SEL4 значајно смањују вијабилност HCT-116 ћелија, што указује на њихов цитотоксични карактер (Табела 5). SEL3 индукује дозно и временски зависно смањење ћелијске вијабилности, са добром цитотоксичношћу након 72 сата (Графикон 3). Са друге стране, SEL4 у нижим концентрацијама показује јачи цитотоксични карактер акутно, тј. након 24 сата, док више концентрације делују токсичније након 72 сата (Графикон 4). На основу добијених резултата можемо закључити да SEL4 показује јачу цитотоксичност од SEL3. На MDA-MB-231 ћелијама испитиване супстанце такође показују дозно и временски зависно повећање цитотоксичности, тј. са повећањем концентрације у дужем временском периоду третмана вијабилност третираних ћелија опада. Изразитији ефекат добијен је у третману са SEL4.

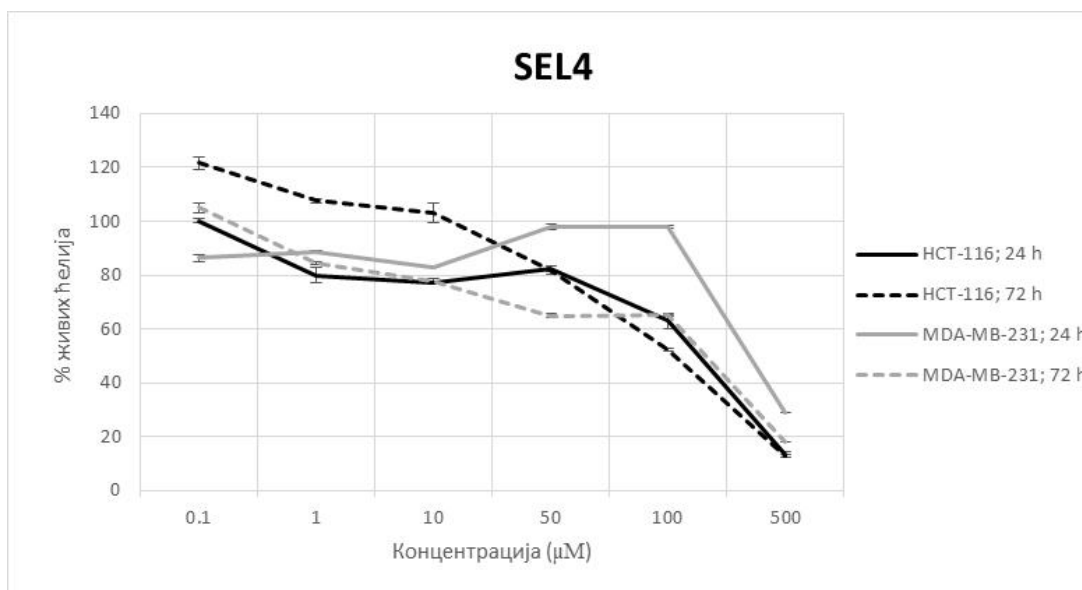
Табела 5. Ефекти SEL3 и SEL4 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија.

Вијабилност ћелија (MTT тест)					
Једињење	Концентрација (μM)	НСТ-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL3	0	100%	100%	100%	100%
	0.1	96.76±0.97	85.53±2.73*	107.63±1.31*	97.94±1.45
	1	91.81±2.84*	112.42±1.82*	93.30±3.05	106.53±0.82*
	10	98.92±0.54	99.91±6.03	104.79±0.43	96.17±3.84
	50	117.23±1.11*	101.83±1.32	109.81±4.31	101.38±0.93
	100	97.72±2.86	52.13±4.78*	122.06±0.31*	72.92±1.91*
	500	51.12±1.06*	14.75±0.1*	39.10±0.38*	20.83±0.44*
SEL4	0	100%	100%	100%	100%
	0.1	100.22 ±4.22	121.55±2.1*	86.45±1.32*	104.94±2.01
	1	79.86±2.19*	107.64±0.84*	88.57±0.71*	84.45±0.73*
	10	77.35±1.98*	103.15±3.63	82.95±0.27*	77.84±0.82*
	50	82.2±1.26*	81.86±1.42*	98.02±1.03	64.92±0.93*
	100	63.01±1.23*	52.15±0.58*	97.81±0.55	65.07±0.35*
	500	13.15±0.02*	12.59±0.53*	28.82±0.04*	18.06±0.14*

Вредности су изражене као средња вредност ± стандардна грешка, n=3. \*p<0.05, статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.



Графикон 3. Ефекти SEL3 на вијабилност НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 сата након третмана.



**Графикон 4.** Ефекти SEL4 на вијабилност HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија 24 и 72 h након третмана.

У Табели 6 дате су  $IC_{50}$  вредности испитиваних ОСЈ на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Анализирајући ове вредности долазимо до закључка да SEL3 и SEL4 испољавају извесне цитотоксичне ефекте. SEL3 показује цитотоксичност само након 72 сата, нарочито на HCT-116 ћелијама. SEL4 показује бољу цитотоксичност на обе ћелијске линије, при чему је у HCT-116 ћелијама  $IC_{50}$  вредност нижа након 24 сата у односу на 72 сата, али и у односу на позитиван контролни третман цисплатином, што указује на акутни ефекат ове супстанце. SEL4 је цитотоксичан само након дужег периода третмана на MDA-MB-231 ћелијама. На основу приказаних  $IC_{50}$  вредности и цитотоксичности SEL3 и SEL4, можемо говорити о већој осетљивости HCT-116 ћелија у односу на MDA-MB-231 ћелије.

**Табела 6.** Цитотоксичност -  $IC_{50}$  вредности испитиваних ОСЈ и цисплатине (CisPt, позитивна контрола) на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама.

Цитотоксичност - $IC_{50}$ вредности, µM				
Супстанца	HCT-116		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h
SEL1	>500	>500	>500	>500
SEL2	>500	>500	>500	>500
SEL3	>500	92.10	>500	288.5
SEL4	80.90	130.70	>500	81.65
CisPt	219.17	19.4	322.40	38.60

## 2. Ефекти ОСЈ на миграторни потенцијал ћелија канцера

За испитивање миграторног потенцијала ћелија, коришћена је Transwell метода. Принцип методе је да се мери пролазност ћелија засејаних на мембрану са порама у присуству и одсуству атрактанта. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-2100C), на 550 nm. Миграторни потенцијал се изражава као оптичка густина (OD) и приказан је у Табели 7. На основу ових вредности, можемо закључити да сва четири ОСЈ повећавају миграторни потенцијал HCT-116 ћелија, док углавном делују антимиграторно на MDA-MB-231 ћелије, осим у случају нижих концентрација SEL3 и SEL4 када показују промиграторни ефекат.

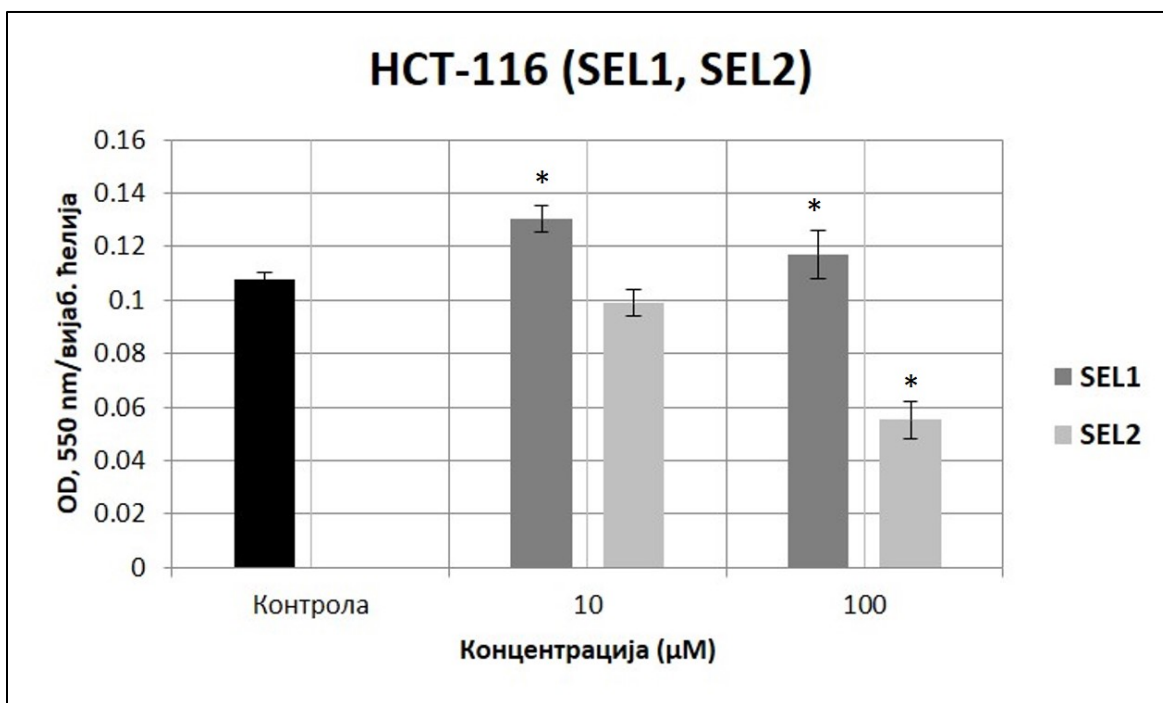
**Табела 7.** Утицај SEL1, SEL2, SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија, 24 сата након третмана.

<b>Миграторни потенцијал ћелија, OD<sub>550 nm</sub></b>			
Једињење	Концентрација (μM)	HCT-116	MDA-MB-231
SEL1	0	0.1075±0.003	0.4605±0.006
	10	0.1304±0.005*	0.368±0.007*
	100	0.1168±0.009	0.387±0.012*
SEL2	0	0.1075±0.003	0.4605±0.006
	10	0.099±0.005*	0.147±0.015*
	100	0.055±0.007*	0.239±0.022*
SEL3	0	0.1075±0.003	0.4605±0.006
	10	0.104±0.011	0.501±0.009*
	100	0.124±0.009*	0.192±0.019*
SEL4	0	0.1075±0.003	0.4605±0.006
	10	0.165±0.005*	0.551±0.015*
	100	0.197±0.002*	0.285±0.032*

Резултати су изражени као апсорбанца очитана на 550 nm. \*p<0.05, статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Када се очитане вредности (OD<sub>550</sub>) изразе у односу на број вијабилних ћелија након испитиваних третмана, добијамо детаљније податке и анализу ефеката ОСЈ на миграторни потенцијал испитиваних ћелија канцера колона и дојке. На Графиконима 5 и 6 су приказани резултати утицаја SEL1 и SEL2. Евидентно је да SEL2 показује значајан антимиграторни ефекат на обе ћелијске линије, док SEL1 делује антимиграторно само на

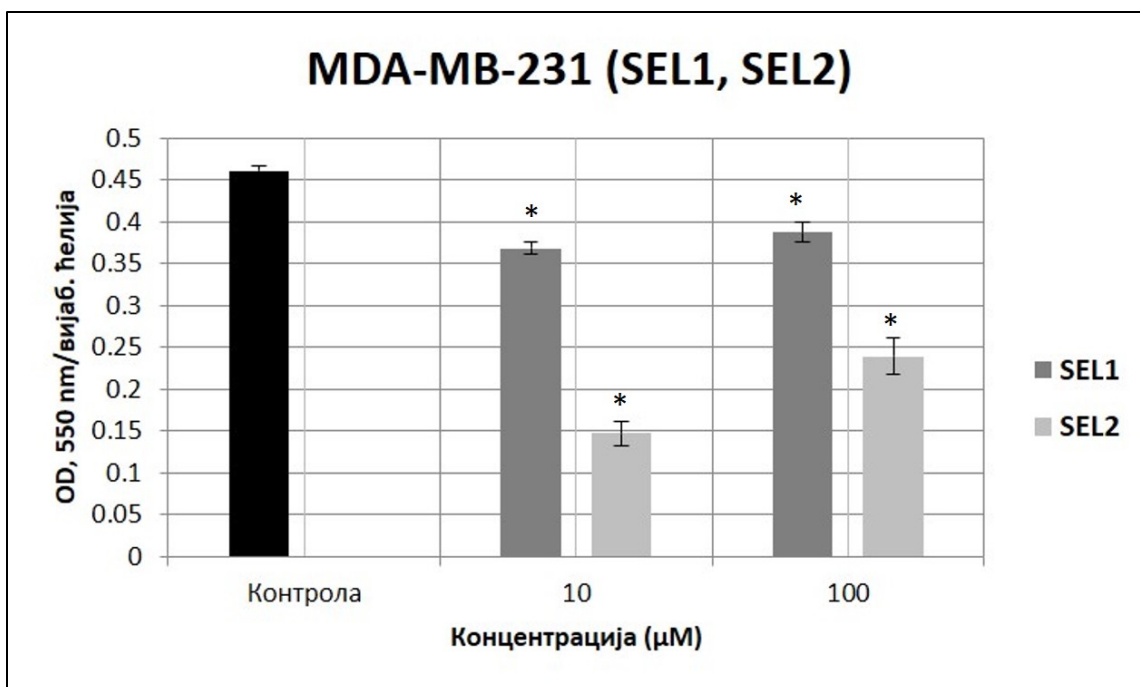
MDA-MB-231 ћелије, а промигранторно на НСТ-116 ћелије. Значајно је да су оба једињења значајно инхибирала миграцију MDA-MB-231 ћелија, које су иначе имортализоване метастатске ћелије. Такође, SEL2 показује јачи антимигранторни ефекат у односу на друго, хемијски сродно једињење SEL1.



**Графикон 5.** Утицај SEL1 и SEL2 на миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија након 24 сата од третмана.

Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија. Резултати су представљени као средња вредност из 2 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

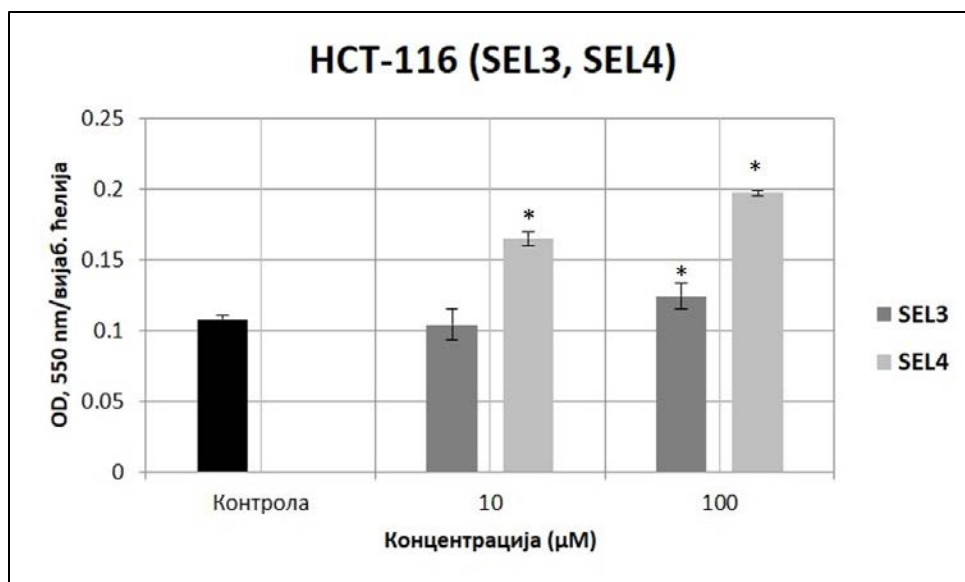




**Графикон 6.** Утицај SEL1 и SEL2 на миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија након 24 сата од третмана.

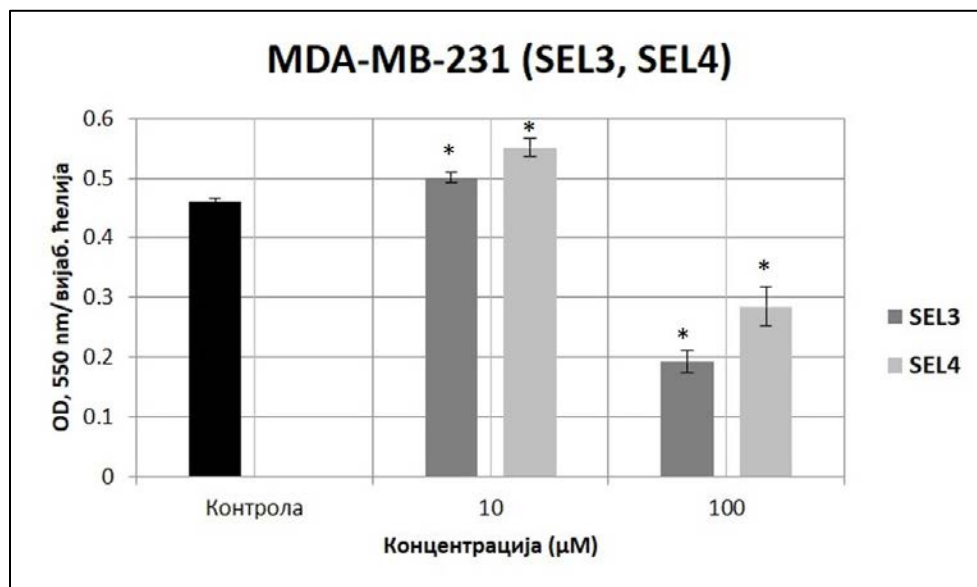
Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија. Резултати су представљени као средња вредност из 2 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Графикони 7 и 8 представљају ефекте SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија. Приметили смо да испитивана ОСЈ делују промиграторно на HCT-116 ћелије (Графикон 7), док показују значајан антимиграторни ефекат на MDA-MB-231 метастатским ћелијама (Графикон 8). Специфично, SEL3 је показао значајан ефекат само у вишој концентрацији (100 µM) на MDA-MB-231 ћелијама, смањујући њихову миграцију за око 50%. Са друге стране, SEL4 значајно повећава миграцију HCT-116 ћелија.



**Графикон 7.** Утицај SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал HCT-116 ћелија након 24 сата од третмана.

Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија. Резултати су представљени као средња вредност из 2 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.



**Графикон 8.** Утицај SEL3 и SEL4 на миграторни потенцијал MDA-MB-231 ћелија након 24 сата од третмана.

Вредности су изражене у односу на број вијабилних ћелија. Резултати су представљени као средња вредност из 2 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

### 3. Ефекти ОСЈ на параметре прооксидационо/антиоксидационог статуса

#### 3.1. Концентрација супероксид анјон радикала

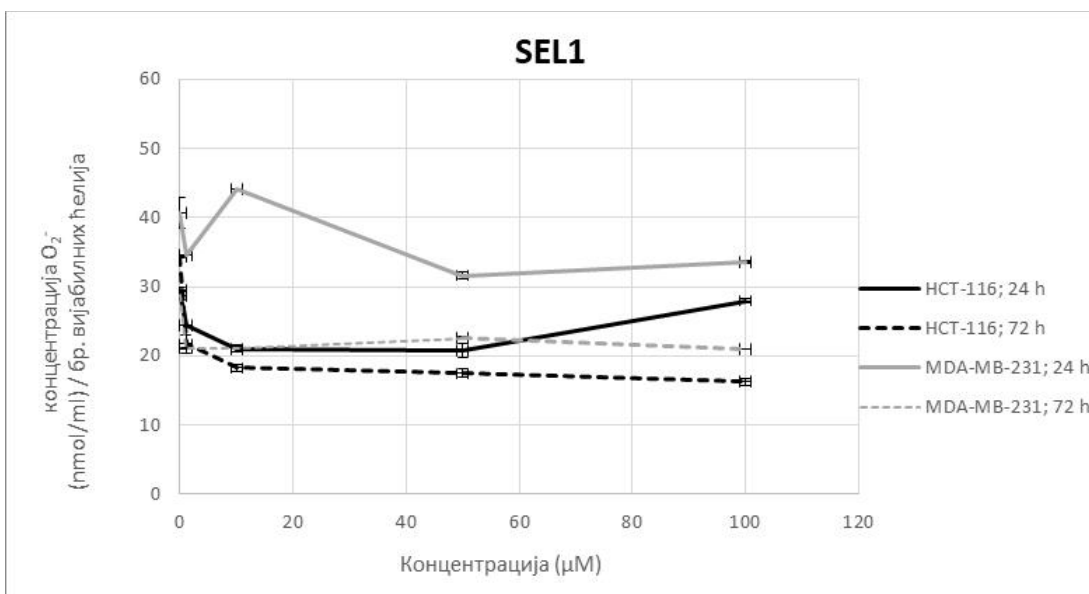
Концентрација  $O_2^{\cdot-}$  у контролним ћелијама и ћелијама третираним испитиваним супстанцама одређивана је спектрофотометријски након 24 и 72 сата. Генерално, SEL1 и SEL2 смањују концентрације  $O_2^{\cdot-}$ , при чему су ефекти значајни у НСТ-116 ћелијама након 72 сата, а у MDA-MB-231 ћелијама након 24 сата (Табела 8).

**Табела 8.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

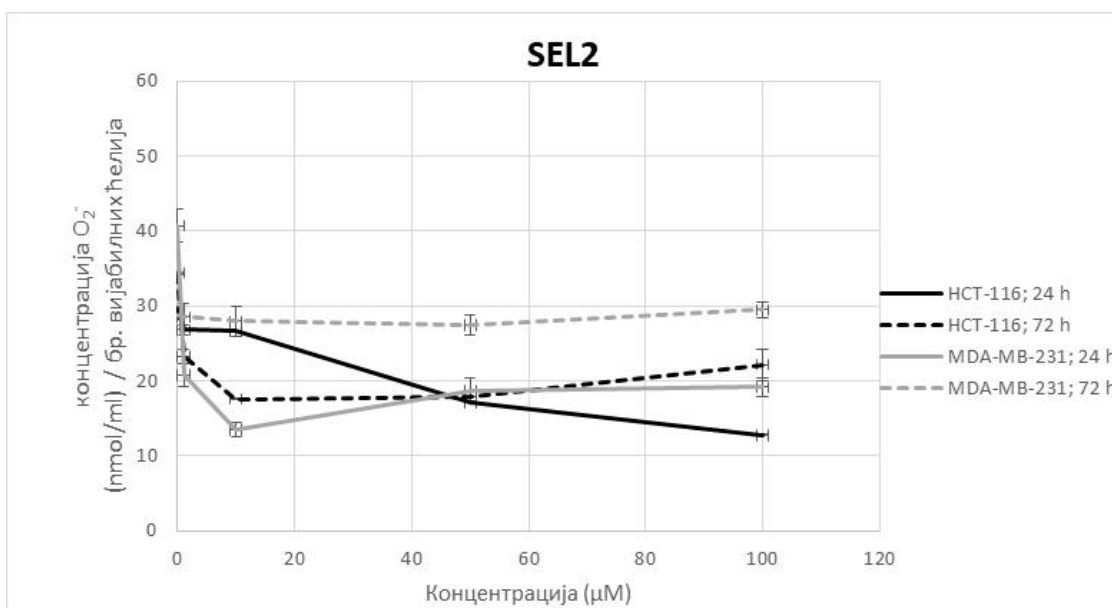
Супероксид анјон радикал (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (μM)	НСТ-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL1	0	29.60±0.30	34.40±0.20	40.71±2.20	28.75±0.61
	1	29.40±0.01	26.10±1.30*	34.28±0.04*	26.36±0.12*
	10	29.30±0.40	23.8±0.50*	40.16±0.08	25.32±0.52*
	50	31.20±1.10	23.6±0.60*	33.20±0.48*	27.60±0.24
	100	30.80±0.30	20.4±0.50*	31.88±0.20*	25.84±0.08*
SEL2	0	29.60±0.30	34.40±0.20	40.71±2.20	28.75±0.61
	1	32.20±0.70*	25.60±0.90*	34.29±1.59*	32.83±1.70*
	10	30.70±0.05	24.60±0.10*	33.09±0.96*	30.78±2.02
	50	30.00±0.10	23.20±0.05*	34.69±1.61*	30.74±1.32
	100	27.40±0.10*	25.50±2.10*	34.45±1.31*	31.55±0.98

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Разматрајући ове резултате у односу на број вијабилних ћелија (Графикони 9 и 10), антиоксидациони ефекти SEL1 и SEL2 су потврђени кроз значајно нижу концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  у обе тестиране ћелијске линије канцера. Узевши у обзир чињеницу да антиоксиданси штите ћелије од слободних радикала, пораст вијабилности узрокован третманом са SEL1 и SEL2 је разумљив.



**Графикон 9.** Ефекти SEL1 на концентрацију  $O_2^{\bullet-}$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 10.** Ефекти SEL2 на концентрацију  $O_2^{\bullet-}$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.

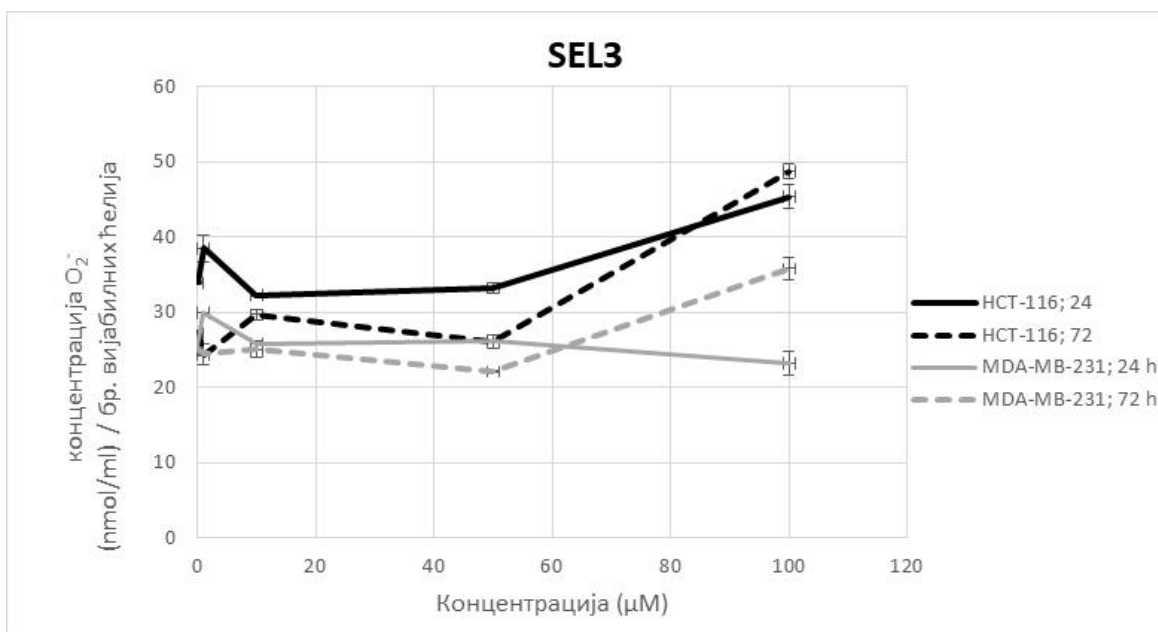
Третмани са SEL3 и SEL4 индукују значајне промене у концентрацији  $O_2^{\cdot-}$ . SEL3 показује прооксидациони ефекат након 24 сата, јер долази до значајног повећања концентрације  $O_2^{\cdot-}$  у обе испитиване линије канцера (Табела 6). SEL4 у највишој примењеној дози повећава концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 ћелијама, док у свим примењеним дозама значајно повећава ниво овог параметра у MDA-MB-231 ћелијама (Табела 9), што указује на јачи прооксидациони ефекат SEL4 у метастаској линији карцинома дојке.

**Табела 9.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

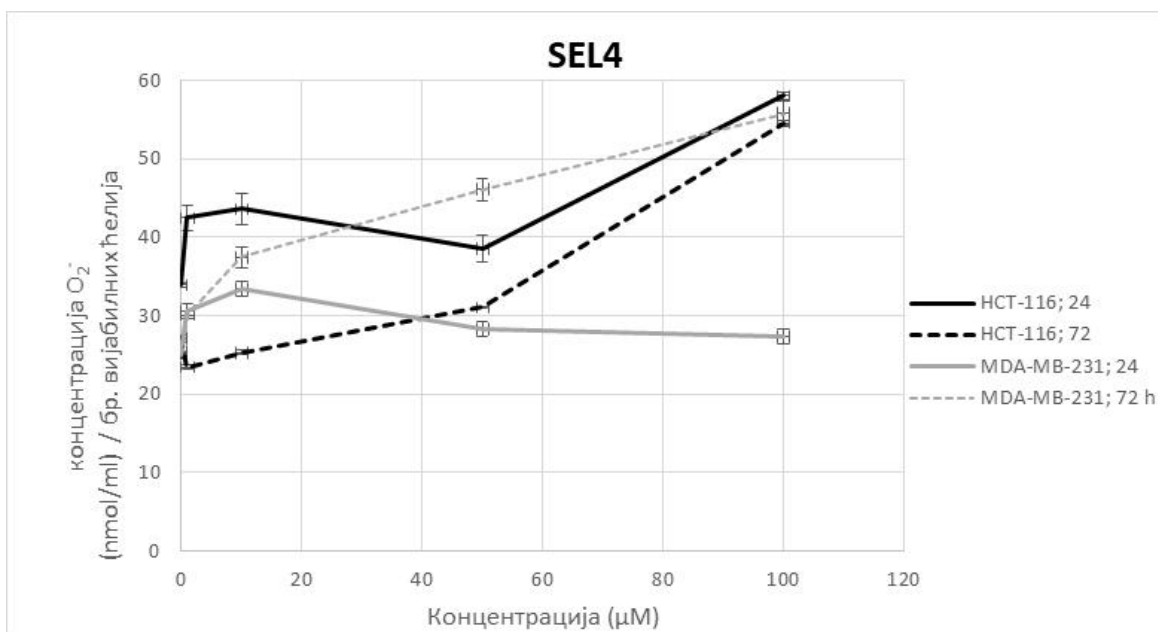
Супероксид анион радикал (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (μM)	НСТ-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL3	0	33.92±0.25	27.20±0.26	25.54±0.36	24.98±0.25
	1	35.31±1.77	27.33±1.40	27.92±0.05*	26.05±0.30
	10	31.92±0.16	29.60±0.70*	27.07±0.16	24.03±1.09
	50	38.91±0.65*	26.53±0.10	28.67±0.89*	22.40±0.09*
	100	44.32±1.60*	25.41±1.07	28.29±1.58*	26.11±1.43
SEL4	0	33.92±0.25	27.20±0.26	25.54±0.36	24.98±0.25
	1	33.95±1.57	25.23±0.23*	27.09±0.39*	25.41±0.44
	10	33.76±2.01	26.11±0.28*	27.71±0.31*	29.15±1.35*
	50	31.68±1.72	25.44±0.05*	27.76±0.20*	29.95±1.41*
	100	36.59±0.49*	28.48±0.24*	26.77±0.34*	36.32±1.60*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Када се концентрације супероксид анион радикала изразе у односу на број вијабилних ћелија, недвосмислено је евидентан прооксидациони, дозно-зависан ефекат SEL3 и SEL4 на обе ћелијске линије, са изузетком третмана након 24 сата на MDA-MB-231 ћелијама (Графикони 11 и 12). Испитивани третмани SEL3 и SEL4 делују прооксидационо и на тај начин утичу на смањење способности ћелије да преживи, што је у сагласности са резултатима МТТ теста.



**Графикон 11.** Ефекти SEL3 на концентрацију  $O_2^{\cdot -}$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 12.** Ефекти SEL4 на концентрацију  $O_2^{\cdot -}$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.

### 3.2. Концентрација нитрита

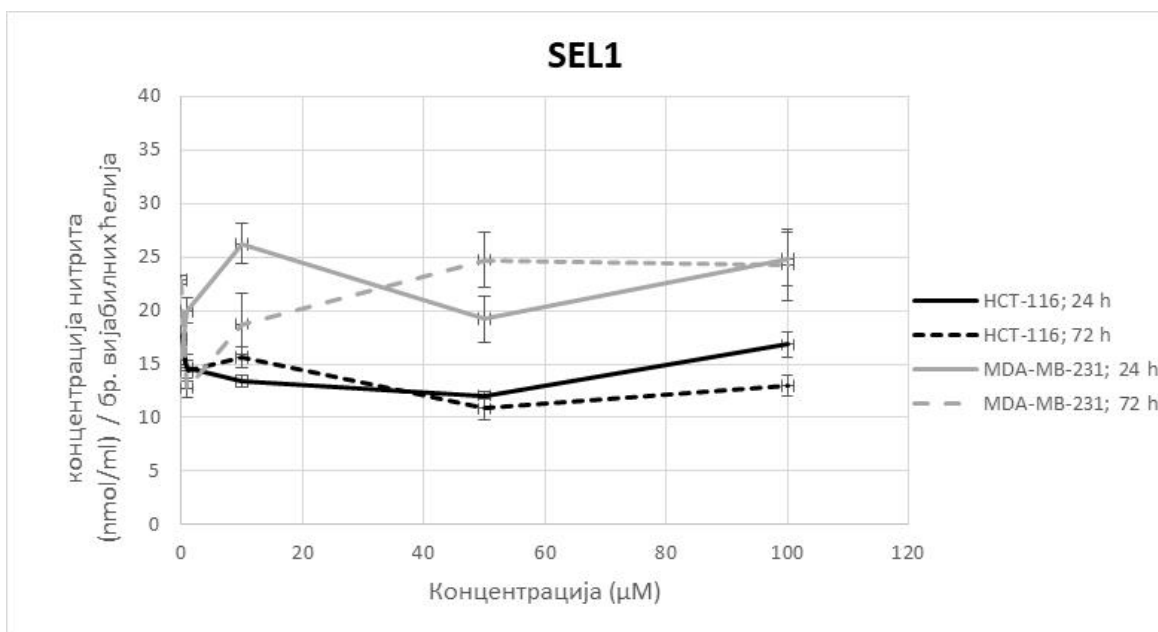
Концентрација  $\text{NO}_2^-$  као индикатора азот монооксида у контролним ћелијама и ћелијама третираним испитиваним супстанцама је одређивана спектрофотометријски након 24 и 72 сата. Резултати испитивања утицаја SEL1 и SEL2 показују значајно повећање нитрита у MDA-MB-231 ћелијама, док су концентрације нитрита непромењене, незнатно повећане или смањене у HCT-116 ћелијама, у зависности од дозе и времена инкубације третмана (Табела 10).

**Табела 10.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

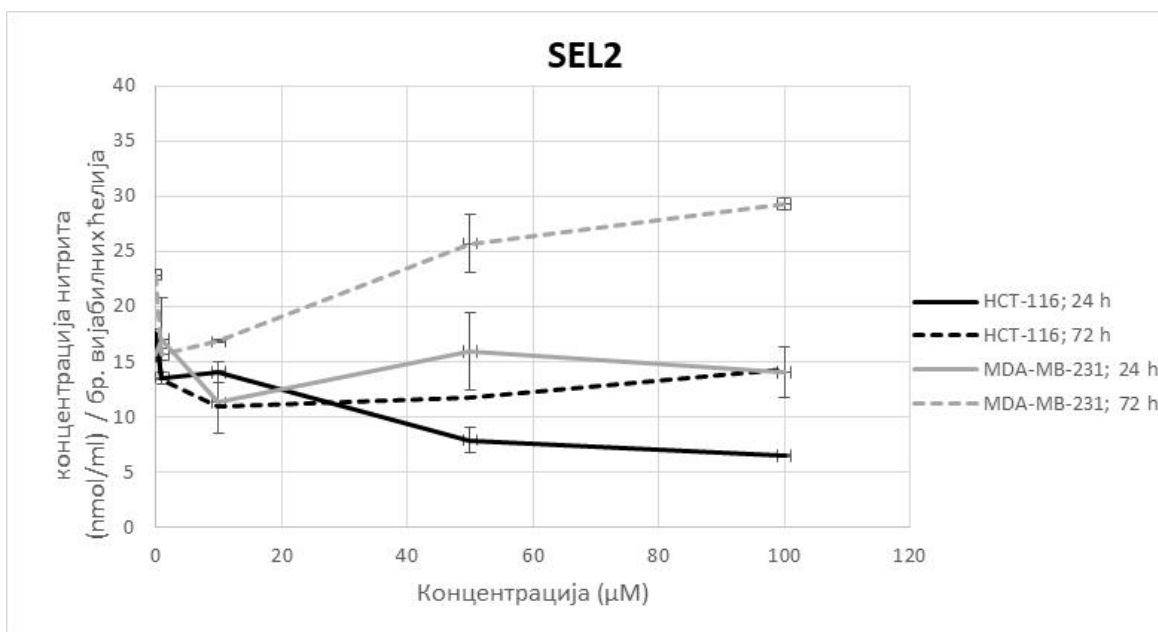
Нитрити (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL1	0	17.33±0.57	17.52±0.76	15.65±0.69	22.89±0.41
	1	17.59±1.25	17.25±2.17	19.76±1.18*	15.96±0.90*
	10	18.77±0.53	20.35±0.36*	23.85±1.88*	22.50±2.85
	50	18.08±0.34	14.65±0.89*	20.19±2.17*	30.15±2.58*
	100	18.50±1.12	16.28±0.89	23.60±2.51*	29.90±3.33*
SEL2	0	17.33±0.57	17.52±0.76	15.65±0.69	22.89±0.41
	1	16.26±0.56	14.67±0.43*	28.14±3.72*	17.98±0.49*
	10	16.16±0.89	15.28±0.67*	27.68±2.85*	18.53±1.84*
	50	13.82±1.14*	15.23±1.29	29.54±3.54*	28.78±2.53*
	100	14.02±0.16*	16.52±1.50	25.33±2.31*	31.36±2.41*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Прорачун добијених резултата у односу на број вијабилних ћелија, показује да SEL1 не мења значајно концентрацију нитрита у HCT-116 ћелијама, док значајно повећава концентрацију овог параметра у MDA-MB-231 ћелијама (Графикон 13). SEL2 акутно, након 24 сата, смањује концентрацију нитрита у обе ћелијске линије. Овакав тренд се задржава и након 72 сата третмана у HCT-116 ћелијама, док се у MDA-MB-231 ћелијама концентрација нитрита значајно повећава (Графикон 14). Ови резултати показују да испитивана једињења индукују нитрозациони стрес у метастаској линији карцинома дојке.



**Графикон 13.** Ефекти SEL1 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 14.** Ефекти SEL2 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



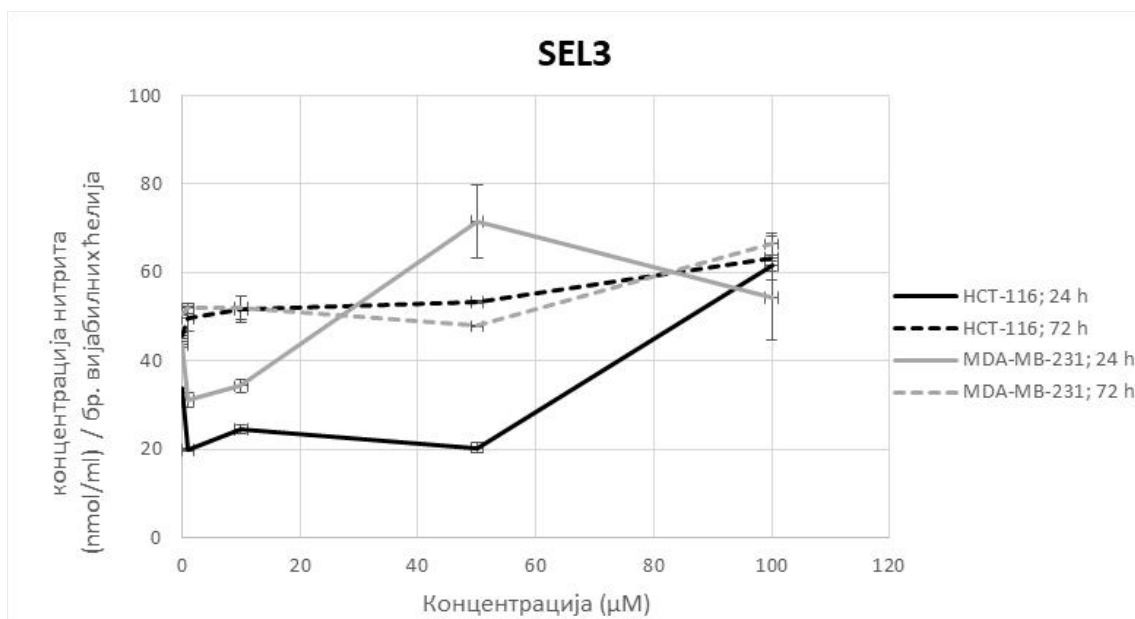
SEL3 и SEL4, након 24 сата третмана, значајно повећавају концентрације  $\text{NO}_2^-$  у обе испитиване ћелијске линије (изузетак је третман SEL3 у HCT-116 ћелијама – повећање је само у највећој примењеној дози), при чему су промене далеко израженије у MDA-MB-231 ћелијама (Табела 11). Третмани SEL3 и SEL4, након 72 сата, не мењају, индукују благо повећање или смањење концентрације нитрита у зависности од примењене дозе.

**Табела 11.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

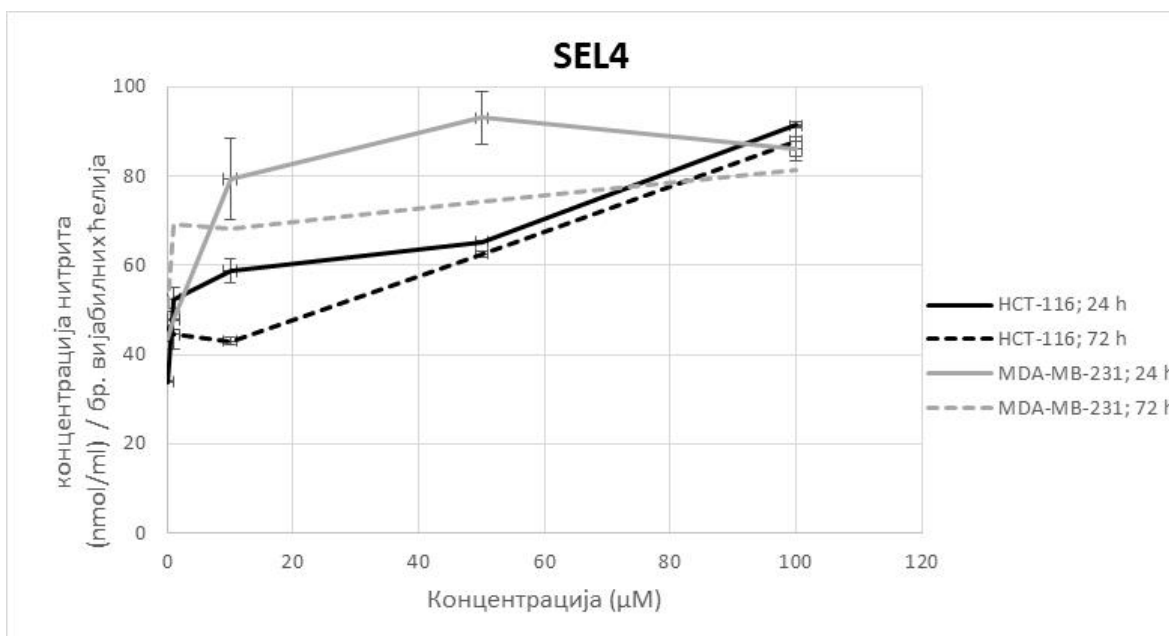
Нитрити (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL3	0	33.85±0.15	45.77±0.77	43.65±0.65	50.77±0.47
	1	18.28±0.25*	55.77±2.78*	29.08±1.73*	55.31±1.12*
	10	24.35±0.89*	51.60±2.99*	36.03±1.48*	50.13±2.62
	50	23.96±1.03*	54.32±0.40*	78.65±8.25*	48.64±0.17
	100	60.12±1.26*	32.95±4.94*	66.38±9.50*	48.45±2.59
SEL4	0	33.85±0.15	45.77±0.77	43.65±0.65	50.77±0.47
	1	41.81±2.60*	47.80±3.25	42.50±2.43	58.55±0.53*
	10	45.49±2.75*	44.35±0.79*	65.78±9.00*	53.02±0.12*
	50	53.67±0.20*	51.25±0.68*	91.23±5.93*	48.17±2.63
	100	57.58±0.69*	45.78±3.46	84.20±2.83*	52.95±0.53

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Када се добијени резултати изразе у односу на број вијабилних ћелија, евидентно је да SEL3 смањује концентрације  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116, а повећава у MDA-MB-231 ћелијама након 24 сата третмана, док су вредности овог параметра повишене након 72 сата у обе ћелијске линије (Графикон 15). SEL4 значајно повећава концентрација  $\text{NO}_2^-$  у обе линије, а промене су израженије након 24 сата третмана и у MDA-MB-231 ћелијама (Графикон 16).



**Графикон 15.** Ефекти утицаја SEL3 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 16.** Ефекти утицаја SEL4 на концентрацију  $\text{NO}_2^-$  у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 сата од третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.

### 3.3. Концентрација глутатиона

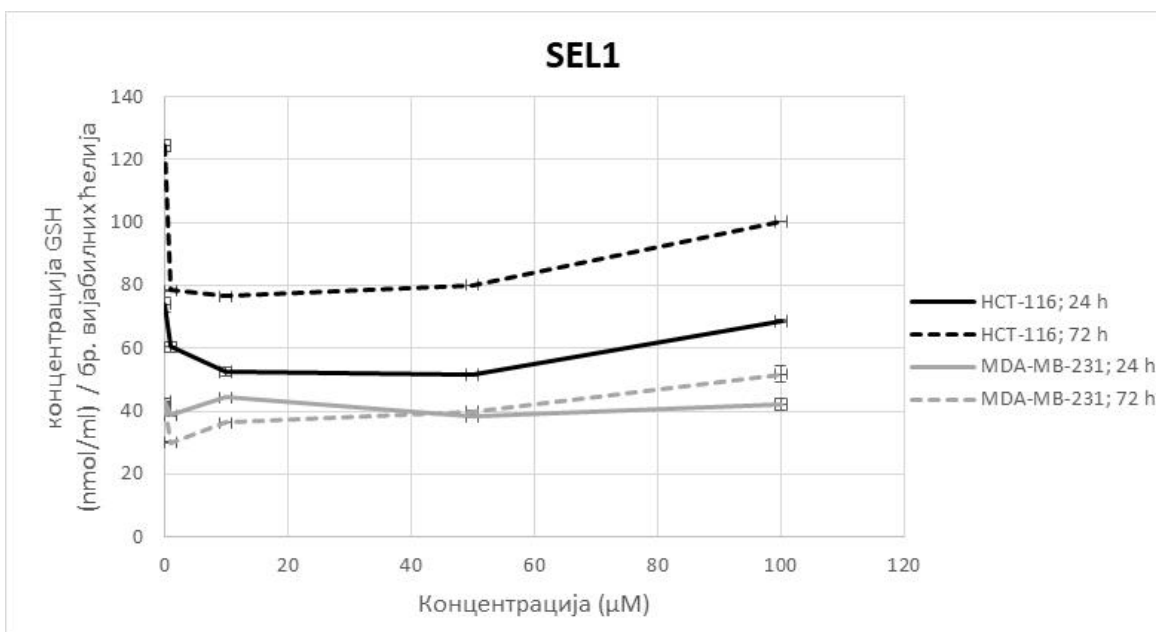
Концентрација GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама одређивана је спектрофотометријски. SEL1 и SEL2 углавном смањују, или не мењају концентрацију GSH у обе ћелијске линије, осим у MDA-MB-231 ћелијама након 72 сата третмана (Табела 12), што показује да испитивана ОСЈ релативно мењају антиоксидациони статус ћелија канцера.

**Табела 12.** Ефекти SEL1 и SEL2 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

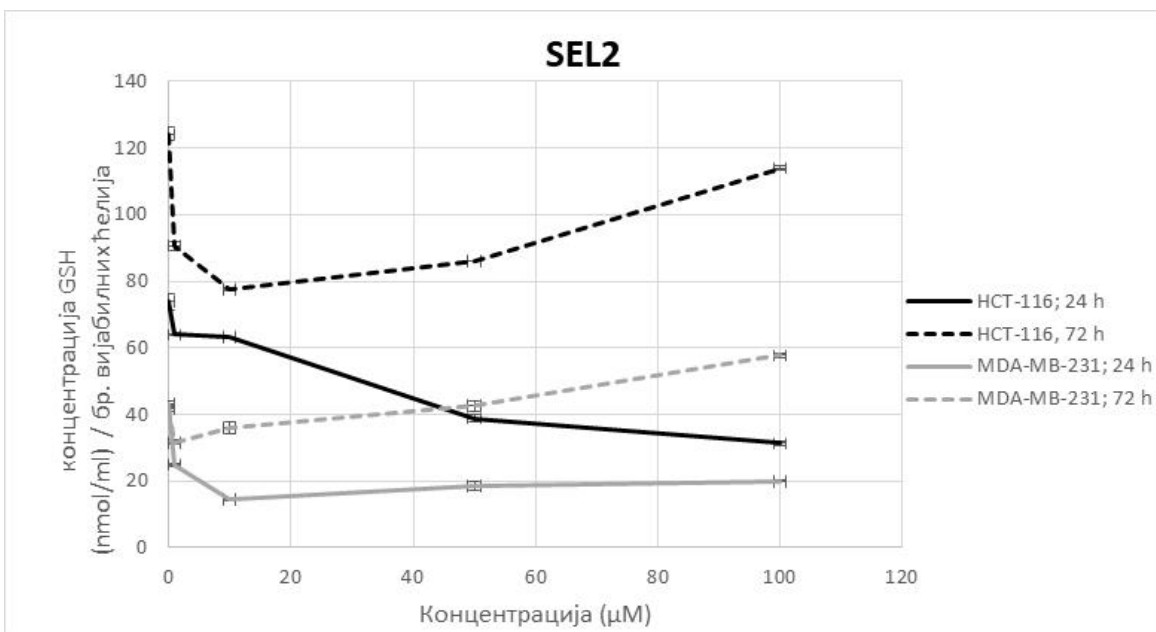
Редуковани глутатион (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL1	0	73.95±2.41	124.30±2.01	43.29±0.96	41.83±0.97
	1	72.49±1.53	94.01±0.38*	38.31±0.16*	37.58±0.19*
	10	73.51±1.28	99.46±0.22*	40.39±0.25	43.60±0.03
	50	77.42±0.67	108.12±0.03*	40.32±0.51*	48.70±0.23*
	100	75.42±0.57	125.45±0.10	40.07±1.98*	63.73±2.52*
SEL2	0	73.95±2.41	124.30±2.01	43.29±0.96	41.83±0.97
	1	76.76±0.26*	99.84±1.37*	41.18±0.42	36.34±0.61*
	10	72.74±0.19	108.57±0.28*	35.74±0.45*	39.62±1.79
	50	68.00±1.187*	111.88±0.09*	34.27±1.34*	47.74±1.63*
	100	67.36±0.54*	131.05±0.54*	35.99±0.32*	61.82±0.79*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

Добијени резултати изражени у односу на број вијабилних ћелија, показују да SEL1 и SEL2 већ у нижим дозама значајно снижавају концентрацију GSH, тренд остаје на нивоу платоа са повећањем доза третмана, а промене су израженије након 72 сата (Графикони 17, 18). MDA-MB-231 ћелије су далеко стабилније у контексту овог параметра - SEL1 и SEL2 само у високим дозама значајно повећавају концентрацију GSH; изузетак је третман SEL2 који значајно снижава GSH у MDA-MB-231 ћелијама након 24 сата третмана (Графикони 17, 18).



**Графикон 17.** Ефекти SEL1 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 18.** Ефекти SEL2 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.

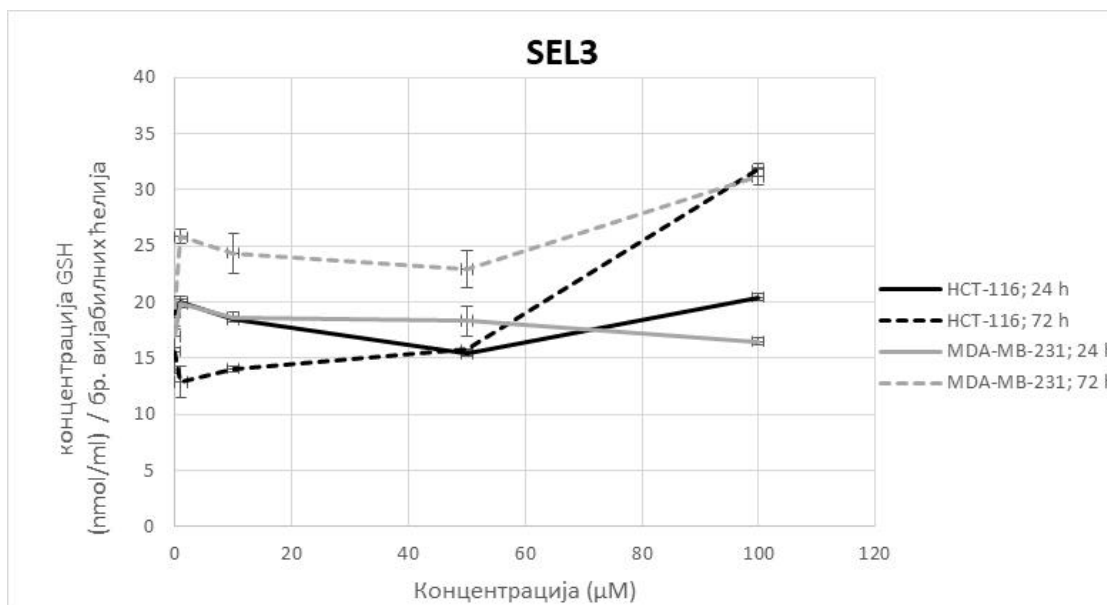
SEL3 и SEL4 не мењају концентрације GSH у HCT-116 ћелијама, док значајно повећавају концентрацију овог параметра у MDA-MB-231 ћелијама (Табела 13).

**Табела 13.** Ефекти SEL3 и SEL4 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама.

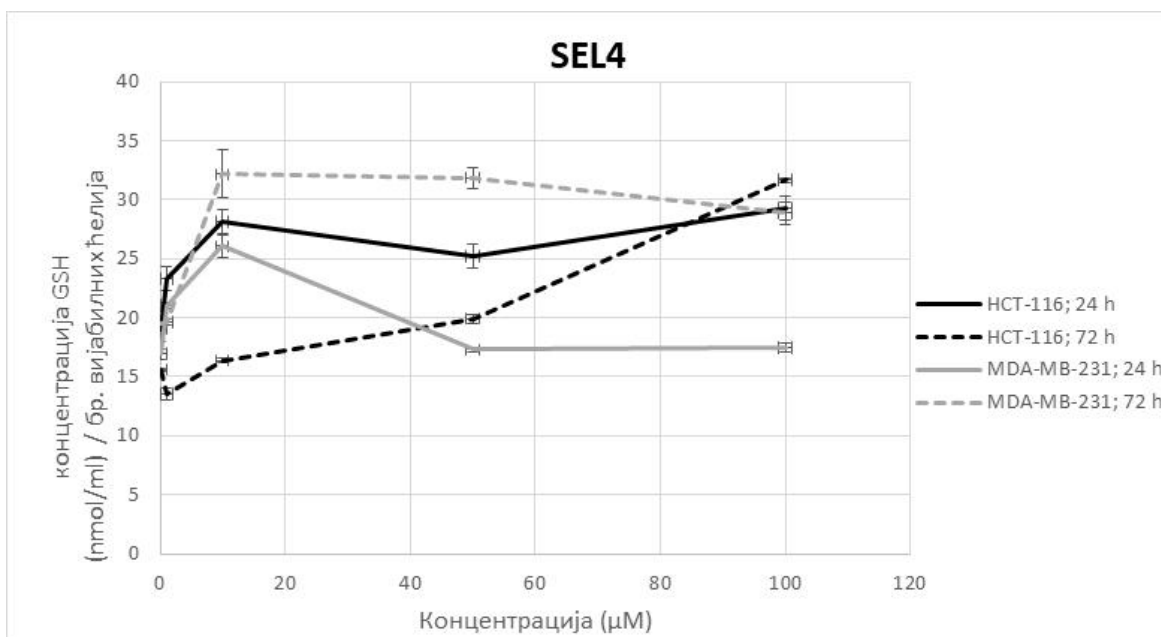
Редуковани глутатион (nmol/ml)					
Једињење	Концентрација (µM)	HCT-116		MDA-MB-231	
		24 h	72 h	24 h	72 h
SEL3	0	19.04±0.14	15.61±0.11	16.94±0.44	19.55±0.45
	1	18.35±0.49	14.52±0.34	18.56±1.51	27.51±1.51*
	10	18.30±0.21	14.06±0.24	19.54±1.36	23.45±0.97*
	50	18.09±0.21	16.07±0.30	20.14±0.22*	23.28±2.50*
	100	19.97±0.29	16.56±0.73	20.14±1.58*	22.73±1.19*
SEL4	0	19.04±0.14	15.61±0.11	16.94±0.44	19.55±0.45
	1	18.60±0.32	15.23±0.53	18.63±0.26*	19.88±0.30
	10	21.77±0.21*	16.91±0.15*	21.61±0.98*	25.03±2.05*
	50	20.75±0.93	16.32±0.38	16.95±0.15	20.69±0.88
	100	18.45±0.74	16.52±0.19	17.09±0.34	18.78±0.94

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , статистички значајна разлика вредности третмана у односу на контролу.

У односу на број вијабилних ћелија SEL3 и SEL4 значајно повећавају концентрацију GSH након 72 сата третмана, у високим дозама у HCT-116 ћелијама, као и у свим примењеним дозама у MDA-MB-231 ћелијама (Графикони 19, 20). SEL4 значајно повећава концентрацију овог параметра након 24 сата третмана, у свим примењеним дозама у HCT-116 и у ниским дозама у MDA-MB-231 ћелијама (Графикон 20). Повећање концентрације GSH је далеко израженије након 72 сата третмана и ефекти су јачи у присуству SEL4.



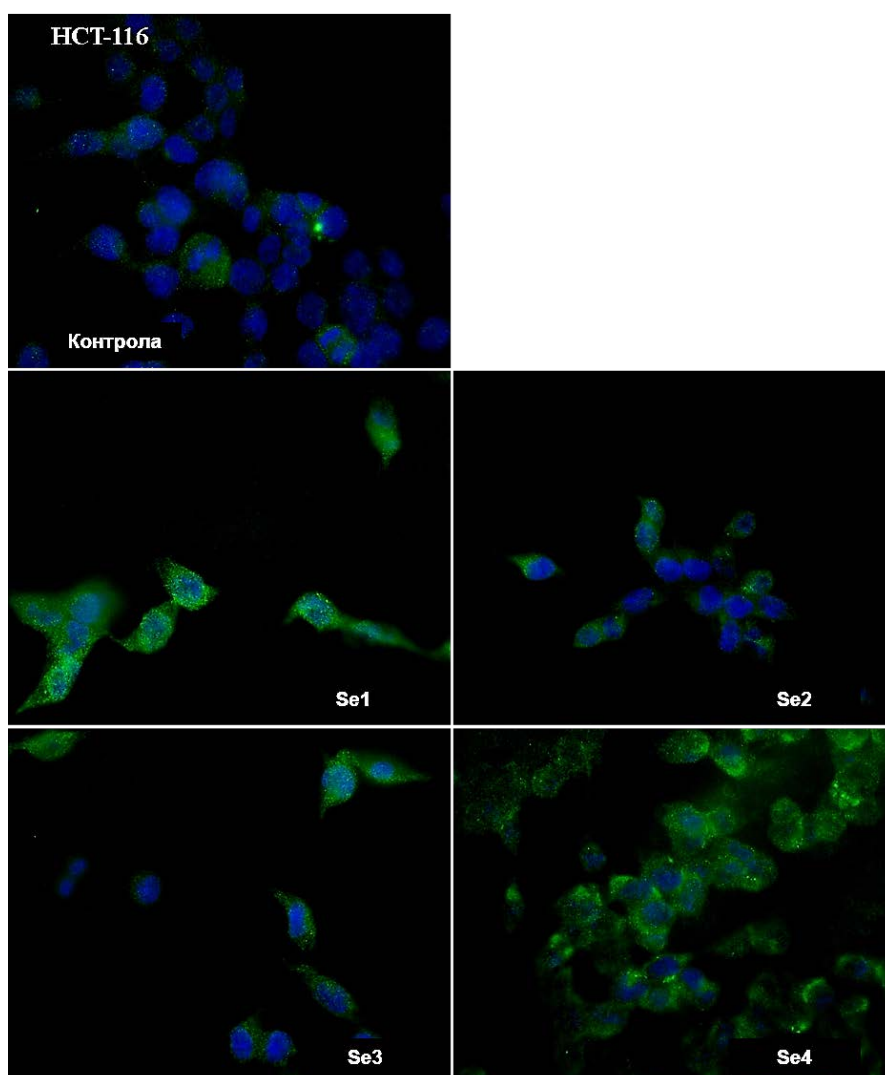
**Графикон 19.** Ефекти SEL3 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.



**Графикон 20.** Ефекти SEL4 на концентрацију GSH у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама, након 24 и 72 h третмана. Резултати су приказани у односу на ћелијску вијабилност.

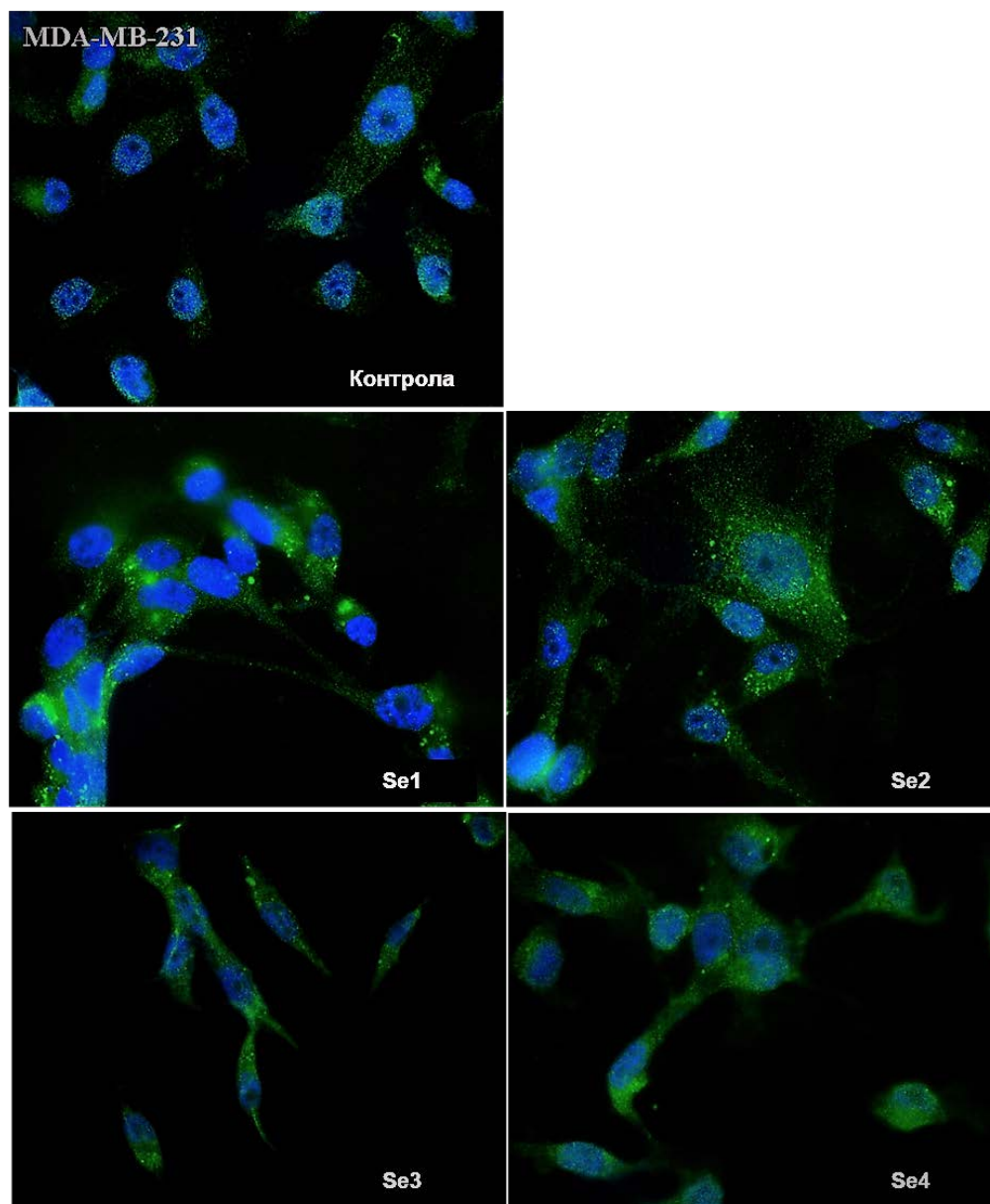
### 3.4. Ефекти ОСЈ на протеинску експресију iNOS

iNOS један је од ензима који ендогено синтетише NO, а такође је укључен у велики број различитих биохемијских реакција и сигналних путева у ћелији. Протеинска експресија одређена је методом имунофлуоресценце у HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијама. Сви испитивани третмани, у концентрацији од 50  $\mu$ M након 24 сата, повећавају експресију iNOS у HCT-116 ћелијама (Слика 1), при чему SEL1 и SEL4 показују значајне ефекте. Највеће повећање протеинске експресије iNOS у присуству SEL4 јесте у корелацији са повећањем концентрације нитрита након овог третмана (Табела 10 и 11).



**Слика 1.** Протеинска експресија iNOS у HCT-116 ћелијама третираним ОСЈ (50  $\mu$ M), након 24 сата третмана. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антитело Alexa448).

Протеинска експресија iNOS у нетретираним MDA-MB-231 ћелијама (Слика 2) је виша у односу на HCT-116 ћелије (Слика 1). SEL1, SEL2, SEL3 и SEL4 индукују значајно повећање експресије овог ензима у MDA-MB-231 ћелијама (Слика 4), што је у корелацији са значајно повећаном концентрацијом NO<sub>2</sub><sup>-</sup> након третмана (Табела 10 и 11).

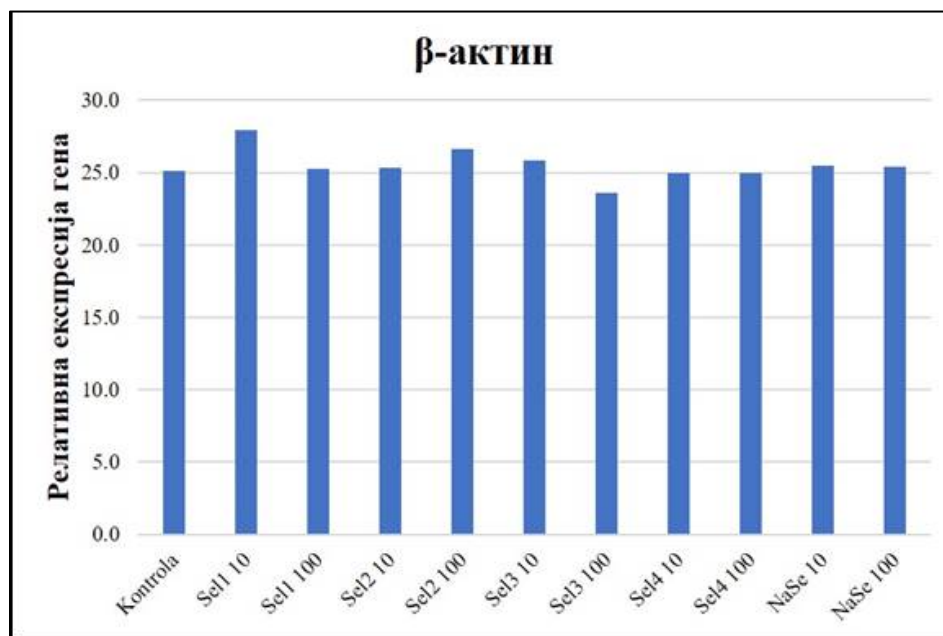


**Слика 2.** Протеинска експресија iNOS у MDA-MB-231 ћелијама третираним испитиваним ОСЈ (50 μM), након 24 сата третмана. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антителиво Alexa448).



#### 4. Анализа генске експресије ензима важних за редокс контролу

За анализу експресије иРНК за гене који кодирају ензиме важне за регулацију редокс равнотеже (*GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX6*, *GST*, *TXNRD*), коришћене су НСТ-116 ћелије третиране испитиваним ОСЈ и натријум селенитом (NaSe, позитивна контрола). Време третмана је 24 сата, а концентрације ОСЈ су 10  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ . Нетретиране ћелије служе као негативна контрола. Квантификација релативне генске експресије испитиваних гена је базирана на компарацији са контролним геном  $\beta$ -актина (*housekeeping* ген), из  $C_t$  вредности које је софтвер одредио. Контролни ген служи као референтна тачка квантификације генске експресије испитиваних гена. У нашим истраживањима генска експресија  $\beta$ -актина је стабилна ( $25.49 \pm 1.06$ ), а  $C_t$  вредности су представљене на Графикону 21.



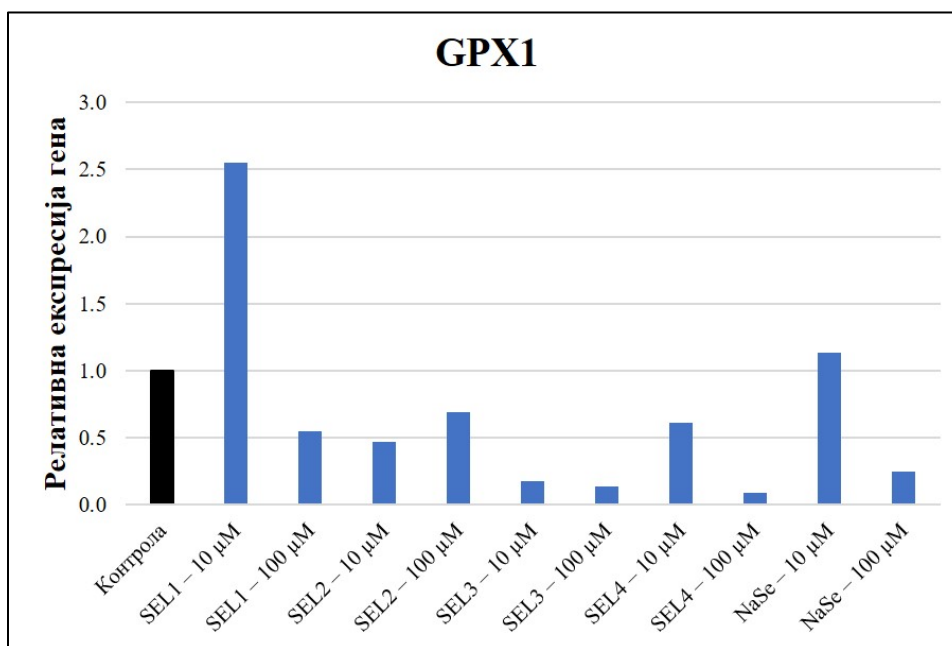
**Графикон 21.** Експресија иРНК за  $\beta$ -актин у третману SEL1-4 једињењима на НСТ-116 ћелијама.

Релативна експресија испитиваних гена се изражава у односу на експресију  $\beta$ -актина, референтног гена ( $2^{-\Delta C_t}$ ), на основу добијених  $C_t$  вредности. Квантификација односа релативне генске експресије испитиваних гена у третманима ОСЈ у односу на експресију ових гена у контролним (нетретираним) ћелијама, одређивана је помоћу формуле  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Резултати ефеката SEL1-4 на селено-ензиме глутатионског и тиоредоксин система ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), који су у исто време и циљани гени Nrf2 транскрипционог фактора, приказани су на графиконима 22-28 (релативна експресија свих гена у контролним ћелијама је 1).

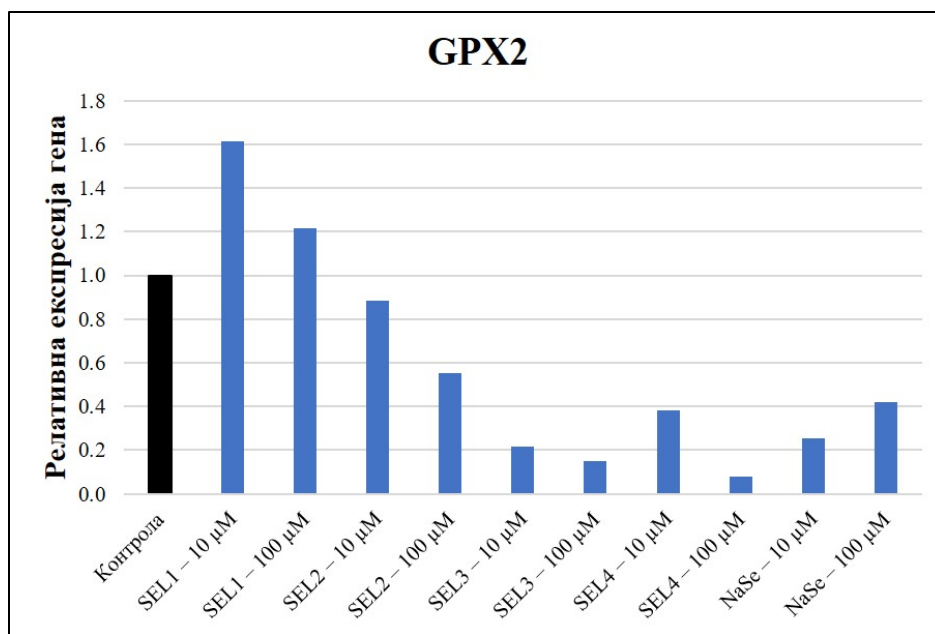
#### 4.1. Релативна експресија иРНК за гене *GPX1*, 2, 3, 4 и 6

На графикону 22 приказана је релативна експресија иРНК за *GPX1* ген у третману ОСЈ на НСТ-116 ћелијама. Сви третмани снижавају експресију иРНК за овај ген, осим SEL1, који у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  индукује 2.55 пута већу експресију иРНК у односу на контролне нетретирание ћелије. SEL3 и SEL4 показују јачу супресију *GPX1* гена, у односу на SEL1 и SEL2, као и у односу на позитивну контролу NaSe.



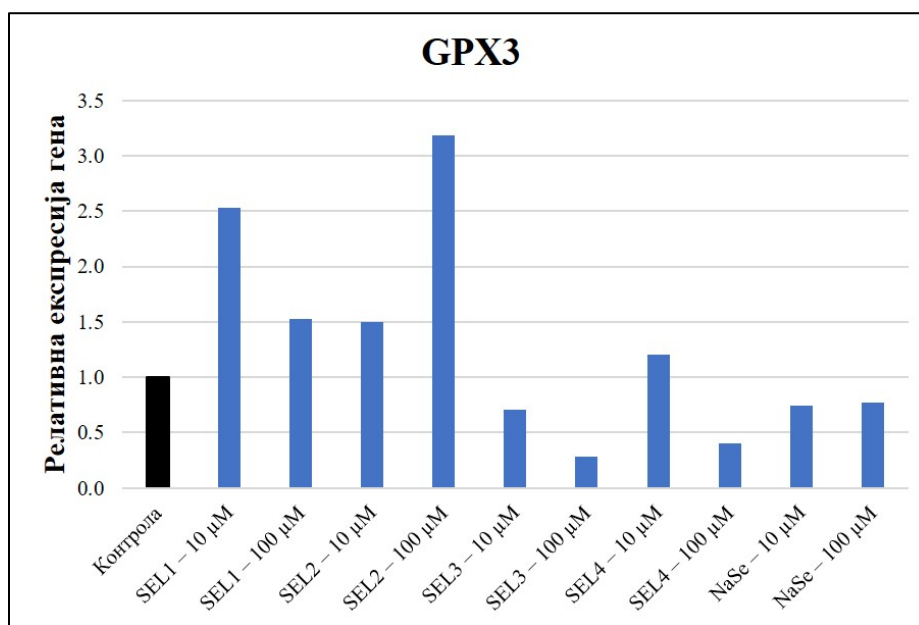
Графикон 22. Релативна експресија иРНК за *GPX1* ген у НСТ-116 ћелијама.

Експресија гена *GPX2* представљена је на Графикону 23. SEL1 у обе концентрације индукује повећану експресију, док остале супстанце супримирају *GPX2* ген. SEL1 у нижој концентрацији показује боље ефекте. Приметно је да SEL1 и SEL2 индукују вишу генску експресију *GPX2* гена у односу на третман SEL3 и SEL4, као и у односу на позитивну контролу.



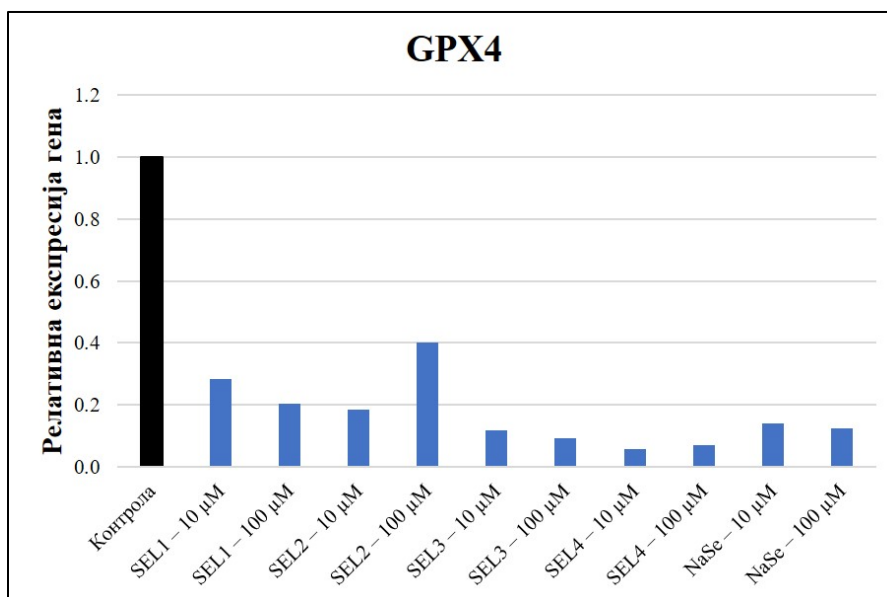
Графикон 23. Релативна експресија иРНК за *GPX2* ген у НСТ-116 ћелијама.

Сличан тренд примећен је и код експресије иРНК за *GPX3* ген (Графикон 24). Стимулација експресије се јавља у третманима SEL1 и SEL2 (1.49 до 3.18 пута већа експресија у односу на нетретиране ћелије), док SEL3 и SEL4 супримирају експресију овог гена (осим SEL4 у већој концентрацији). У оба случаја, промене су веће у односу на позитивну контролу.

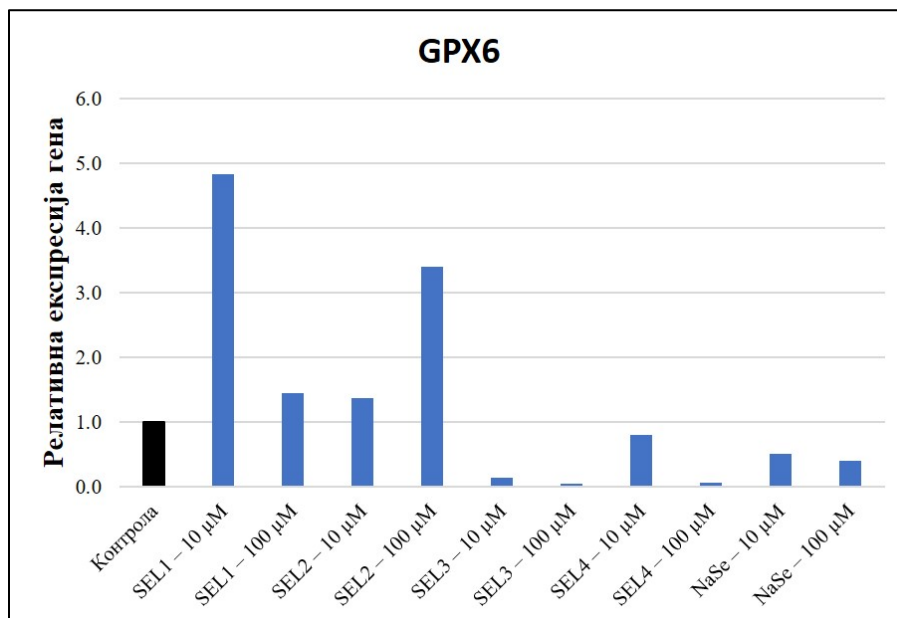


Графикон 24. Релативна експресија иРНК за *GPX3* ген у НСТ-116 ћелијама.

Експресија иРНК за *GPX4* ген у НСТ-116 ћелијама је супримирана у односу на нетретиране ћелије код свих једињења, при чему су ефекти SEL3 и SEL4 јачи (Графикон 25). Експресија иРНК *GPX6* гена показује да SEL1 и SEL2 индукују повећану генску експресију, док SEL3 и SEL4 супримирају *GPX6* ген, у односу на нетретиране ћелије и у односу на позитивну контролу (Графикон 26).



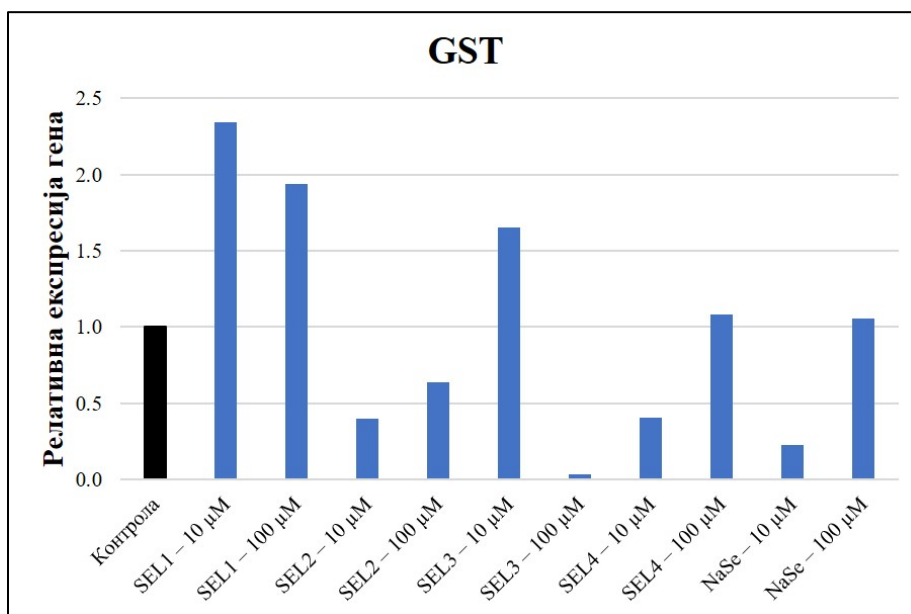
Графикон 25. Релативна експресија иРНК за *GPX4* ген у НСТ-116 ћелијама.



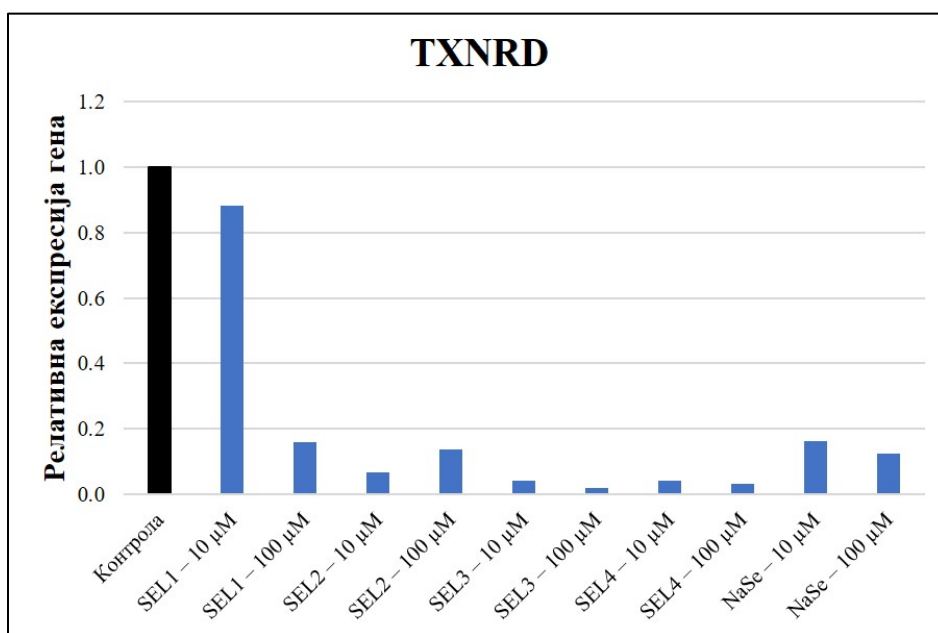
Графикон 26. Релативна експресија иРНК за *GPX6* ген у НСТ-116 ћелијама.

4.2. Релативна експресија иРНК за *GST* и *TXNRD* гене

У НСТ-116 ћелијама, SEL1 индукује појчану, док SEL2 супримира експресију *GST* gena у односу на негативну и позитивну контролу (Графикон 27). SEL3 у нижој концентрацији и SEL4 у вишој концентрацији стимулишу експресију, док остале две концентрације ова два ОСЈ супримирају *GST* ген. Што се тиче експресије *TXNRD* gena, сви третмани значајно супримирају експресију овог gena (Графикон 28).



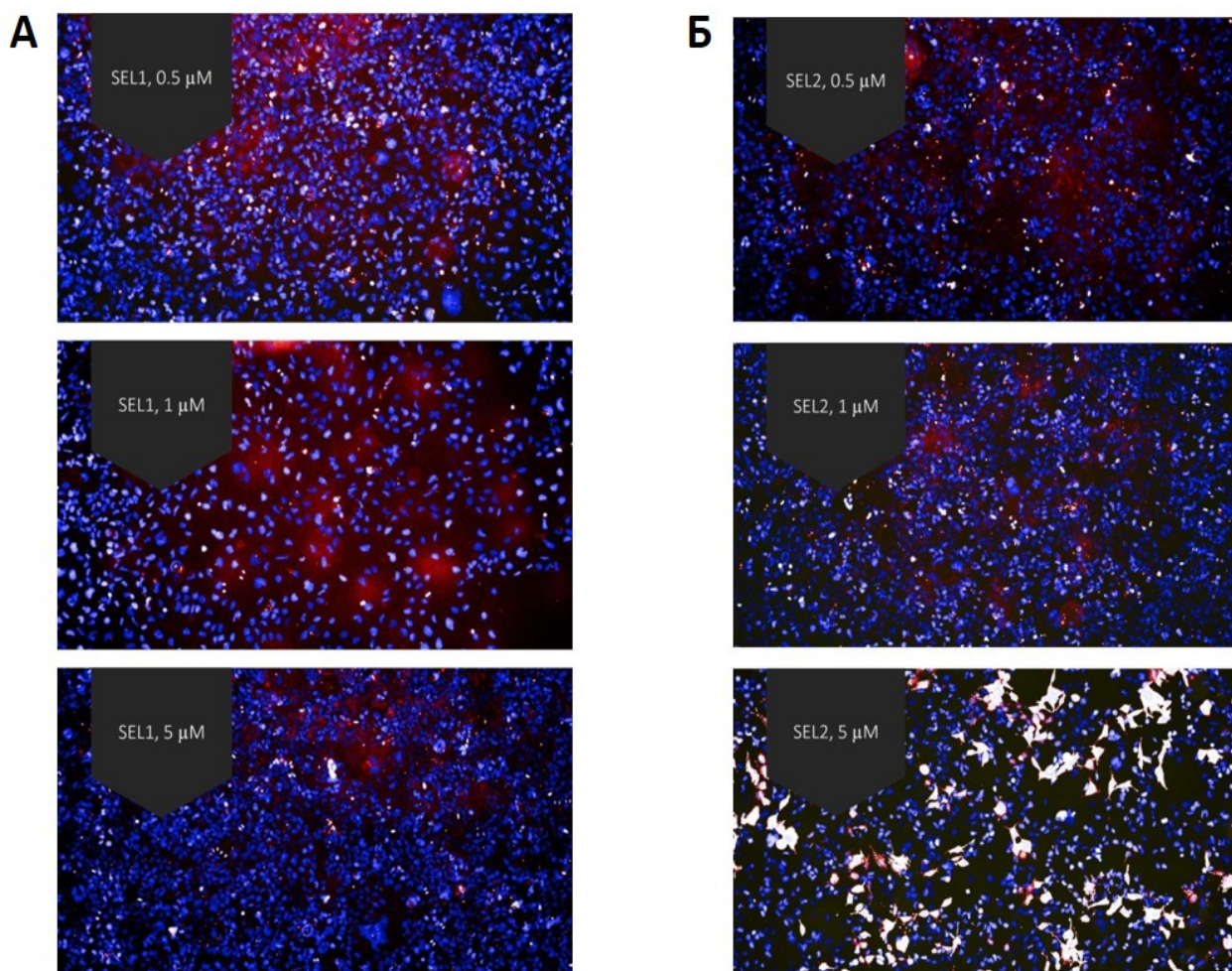
Графикон 27. Релативна експресија иРНК за *GST* ген у НСТ-116 ћелијама.



Графикон 28. Релативна експресија иРНК за *TXNRD* ген у НСТ-116 ћелијама.

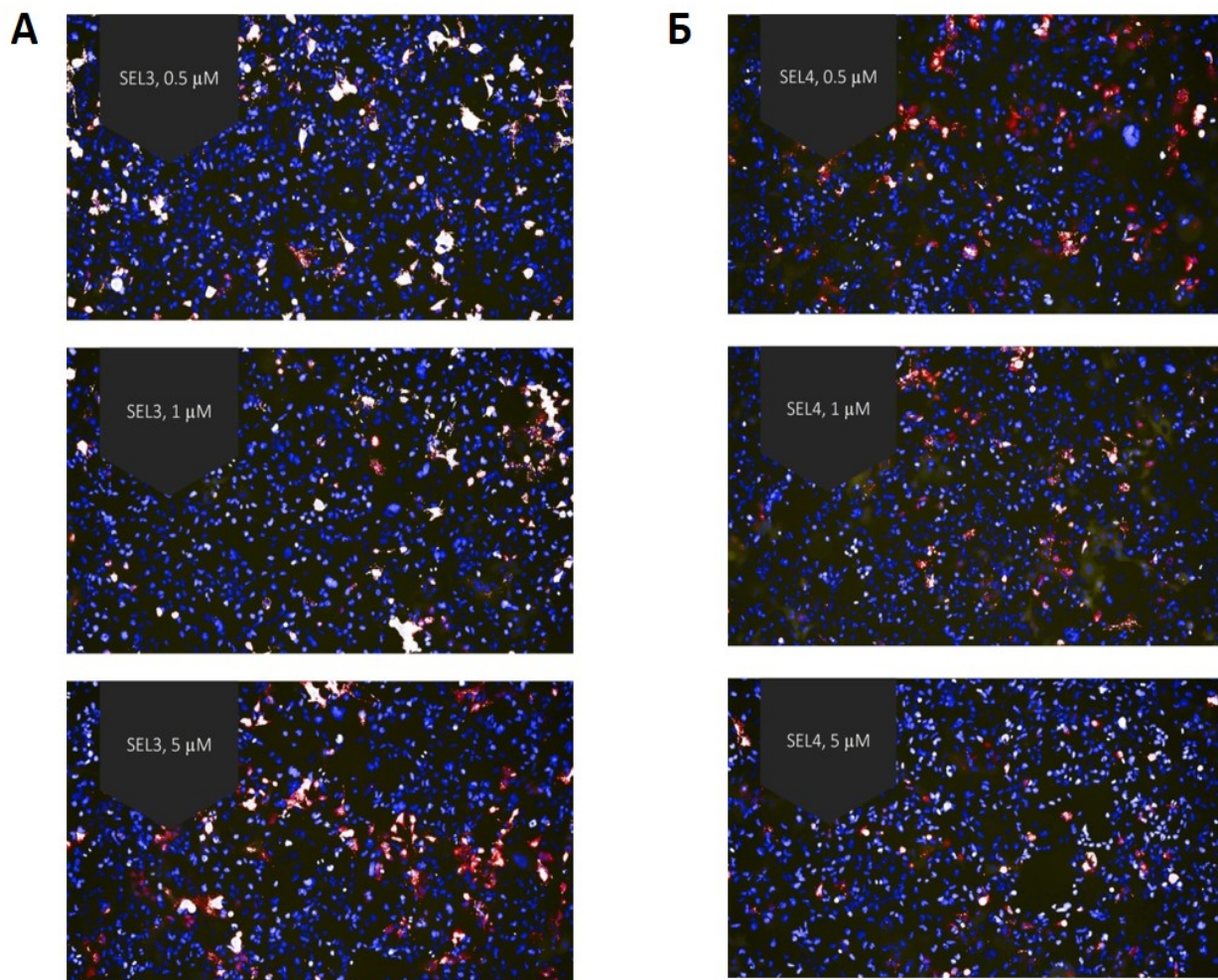
## 5. Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$ и NF- $\kappa$ B употребом рТРАФ вектора и системом Operetta

Трансфекција НСТ-116 ћелија са рТРАФ<sup>Nrf2/HIF/NF- $\kappa$ B</sup> вектором, у комбинацији са флуоресцентном микроскопијом, омогућава симултано праћење активације три транскрипциона фактора. Детектована је синергија између ова три сигнална пута у третману ОСЈ (SEL1, 2, 3 и 4). Индукција Nrf2 даје црвену, HIF жуту, NF- $\kappa$ B плаву флуоресценцу, док комбинација ове три флуоресценце даје симултани комбиновани одговор (Слика 3 – SEL1 и SEL2; Слика 4 – SEL3 и SEL4) у резолуцији појединачне ћелије.

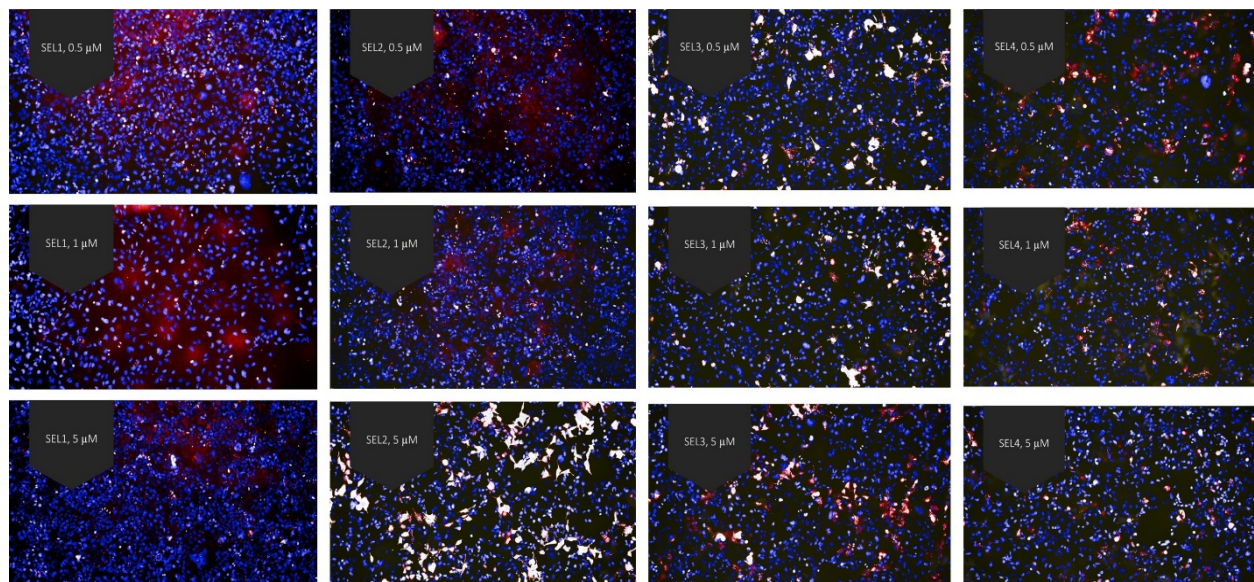


**Слика 3.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рТРАФ вектором у условима нормоксије. Третмани SEL1 (А) и SEL2 (Б), концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu$ М након 24 сата.





**Слика 4.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Третман SEL3 (А) и SEL4 (Б), концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu\text{M}$  након 24 сата.



**Слика 5.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије HCT-116 ћелија трансфектоване pTRAF вектором у условима нормоксије. Третман SEL1-4, концентрације 0.5, 1 и 5  $\mu\text{M}$  након 24 сата.

Флуоресцентно одређивање промоторске активности Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B гена вршено је на систему Operetta. Ћелије су прво засејане у микротитар плоче са 96 бунарића. Након 24 сата ћелије су третиране испитиваним ОСЈ у нетоксичним концентрацијама (0.5, 1 и 5  $\mu\text{M}$ ). Генска активност, индукција или супресија, одређивана је 24 сата након третмана. У исто време, како би се измерена флуоресценција могла изразити у односу на број вијабилних ћелија, одређиван је и тачан број ћелија у појединачним третманима бојењем једара вијабилних ћелија Hoechst бојом (Графикон 29, доњи сиви панел). Коначна квантификација Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B добијена је интегрисањем укупног сигнала флуоресценце и корелацијом са бројем преживелих ћелија у бунарићу (Графикон 29). Тотални ћелијски одговор активације Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B, 24 сата након третмана представљен је као тотални флуоресцентни сигнал за Nrf2 (црвени), HIF (жути) и NF- $\kappa$ B (плави) (Слика 5), подељен са бројем вијабилних ћелија у сваком експерименту (Графикон 29). За квантификацију у резолуцији појединачне ћелије коришћено је снимање по 7 поља у сваком бунарићу. Анализе су вршене системом Operetta. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Сваки од три независна експеримента рађен је у трипликату, тј.  $n = 9$ . Одговарајући софтвер одређивао



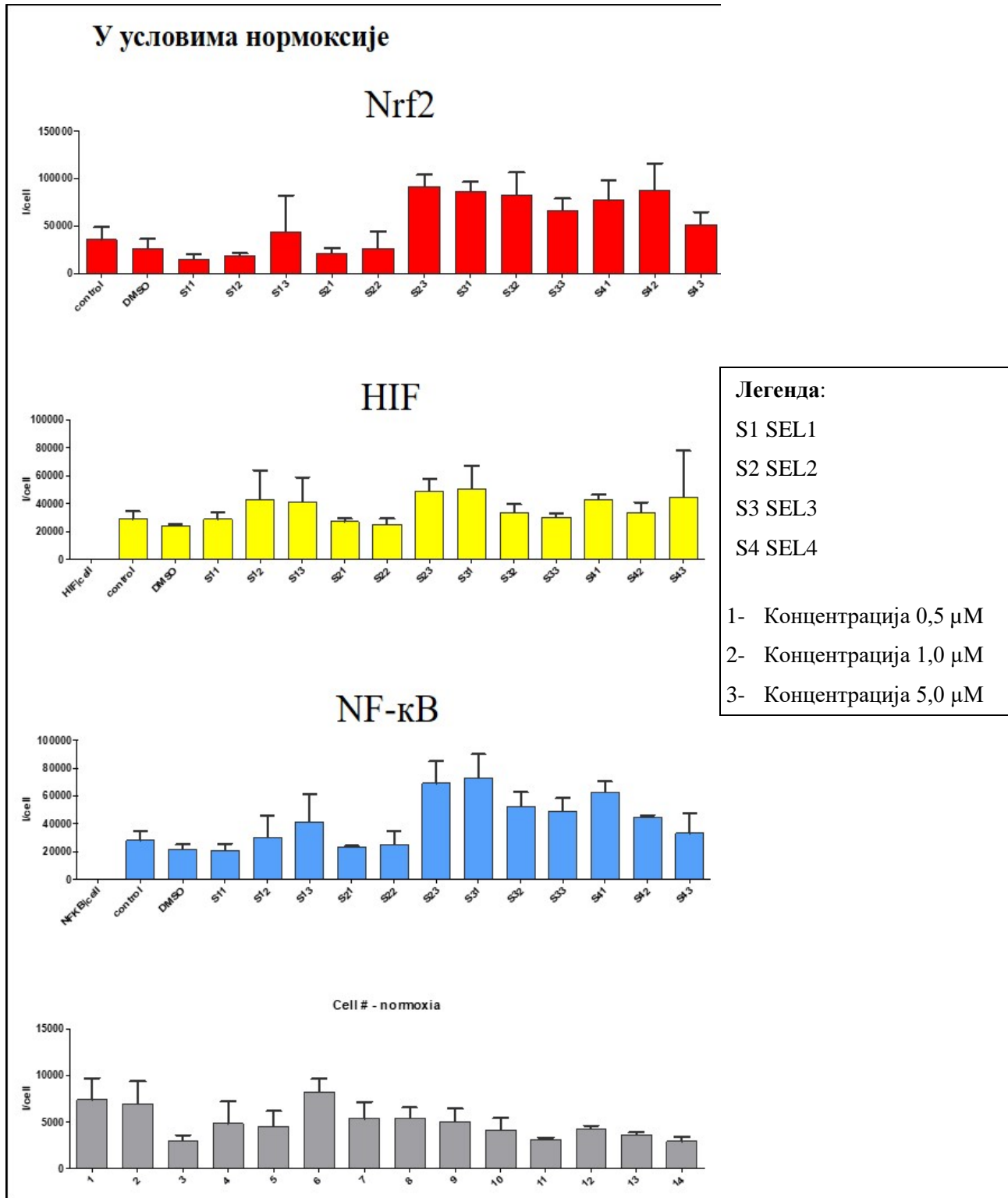
је и квантификовао интензитете три флуоресцентне боје, корелирао са бројем вијабилних ћелија и изразио коначан резултат.

Резултати показују да SEL1 у концентрацијама 0.1 и 1  $\mu\text{M}$  смањују експресију Nrf2 транскрипционог фактора у односу на контролу (нетретиране ћелије), док концентрација 5  $\mu\text{M}$  повећава. Са порастом концентрације SEL1, индукција експресије Nrf2 расте. SEL2 показује исти ефекат као SEL1, с тим што највиша концентрација 5  $\mu\text{M}$  индукује веома високо повећање експресије Nrf2. SEL3 и SEL4 индукују повећање експресије Nrf2 у значајној мери, с тим што највиша концентрација 5  $\mu\text{M}$  показује најслабије ефекте. Поређењем ових једињења, може се закључити да SEL3 и SEL4 у значајнијој мери индукују експресију Nrf2, у односу на SEL1 и SEL2 (Графикон 29).

Што се тиче HIF транскрипционог фактора, SEL1 значајно повећава његову експресију, док SEL2 само у највећој концентрацији. SEL3 и SEL4 имају супротан ефекат - са порастом концентрације, експресија HIF се смањује. Генерално, поредећи ефекте испитиваних ОСЈ, закључак је да сва 4 једињења индукују углавном пораст експресије HIF (Графикон 29), са не тако значајним разликама какве се виде код утицаја на Nrf2.

NF- $\kappa$ B транскрипциони фактор активира се на сличан начин као Nrf2. Наиме, SEL3 и SEL4 индукују далеко већи пораст експресије, у односу на SEL1 и SEL2 (Графикон 29). Код SEL1 и SEL2 примећена је дозна зависност, тј. са повећањем концентрације расте и експресија NF- $\kappa$ B (нарочито код SEL2). SEL3 и SEL4 значајно повећавају експресију у све три концентрације, а експресија NF- $\kappa$ B опада са порастом концентрације третмана. Међутим, и највиша концентрација 5  $\mu\text{M}$  индукује веома значајно повећање.

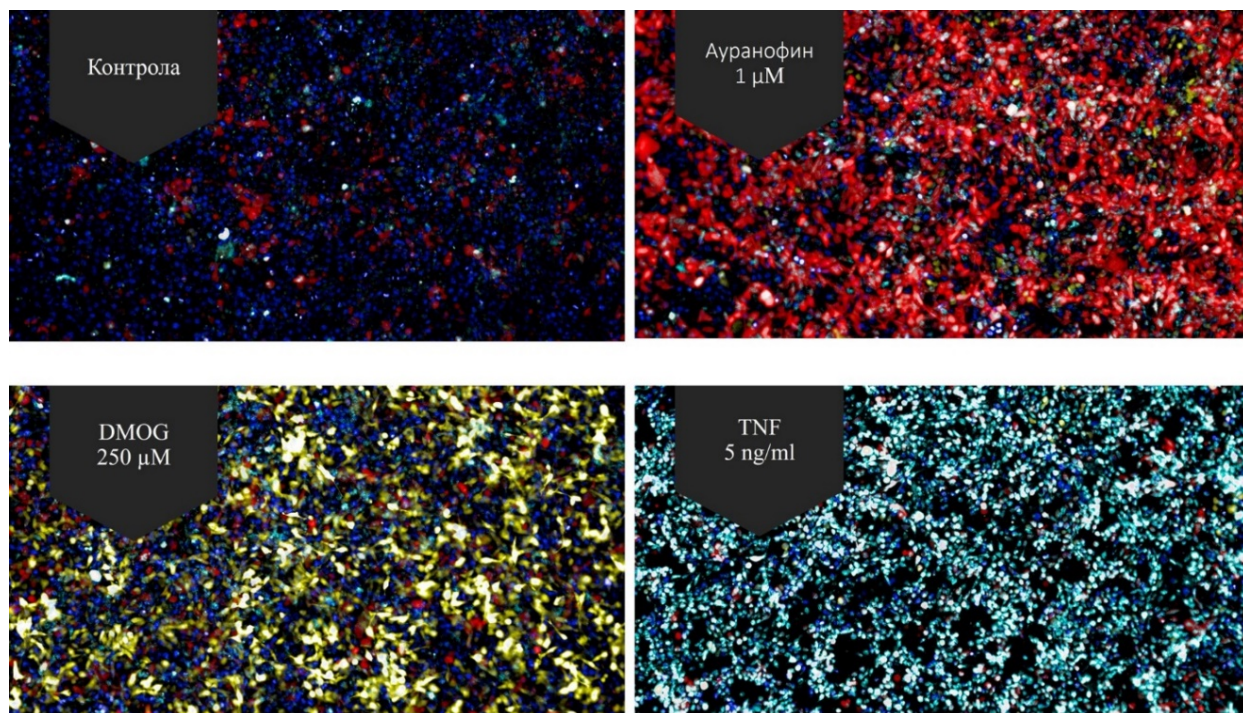
Сагледавши експресију сва три транскрипциона фактора, генерално, SEL3 и SEL4 значајније утичу на њихову појачану експресију, у односу на SEL1 и SEL2 (Графикон 29). Утицај прооксидационог дејства SEL3 и SEL4 може објаснити значајнији пораст Nrf2 и NF- $\kappa$ B, док SEL1 и SEL2 који показују антиоксидационо дејство индукују чак деактивацију ова два транскрипциона фактора.



**Графикон 29.** Специфична индукција Nrf2, HIF и NF-κB у НСТ-116 ћелијама трансфекованих помоћу pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> и анализираних системом Oretta у високој резолуцији.

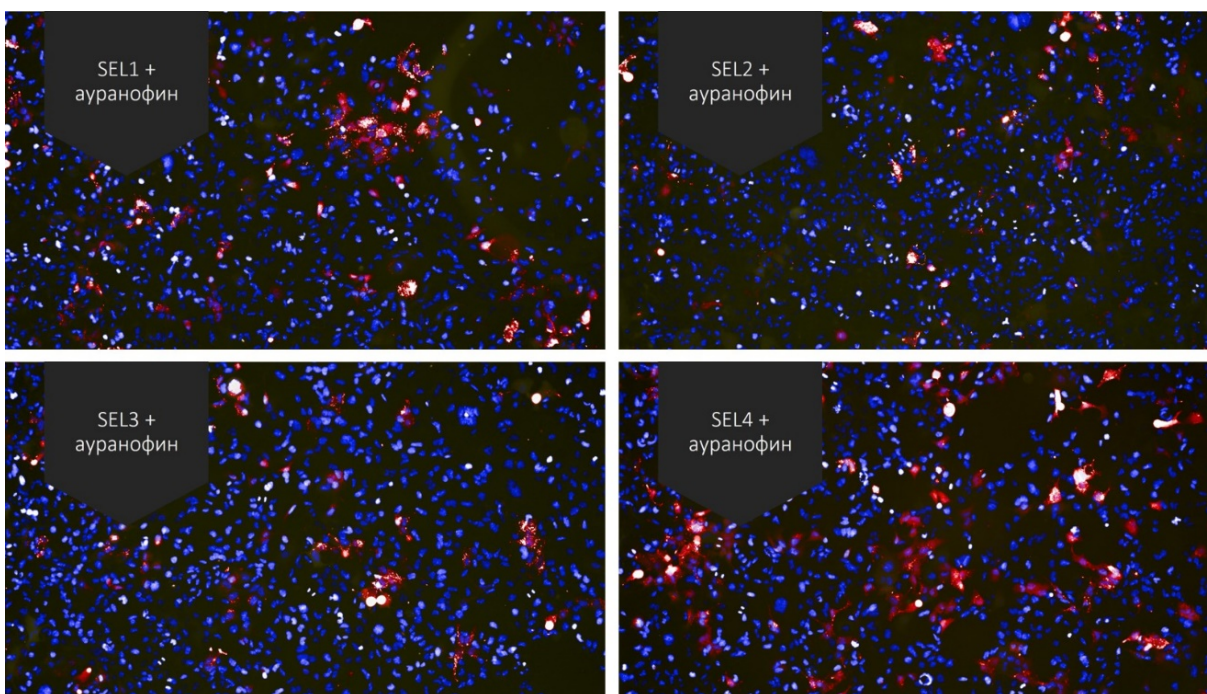
### 5.1. Котретман ОСЈ једињења и супстанци које активирају Nrf2, HIF и NF-κB

Једињења која активирају транскрипционе факторе које пратимо користили смо као позитивну контролу и као котретман са SEL једињењима: ауранофин (1 μM) за активацију Nrf2 (Kim и сар., 2010), диметилноксалиглицин DMOG (250 μM) за активацију HIF (Bruick и McKnight, 2001) и TNFα (5 ng/ml) за активацију NF-κB (Perkins и Gilmore, 2006). На Слици 6 представљени су резултати ефеката третмана ауранофином, DMOG и TNFα на НСТ-116 ћелије. Резултат показује ефекат ове три супстанце као позитивних контрола. Експресија црвеног протеина mCherry услед активације транскрипционог фактора Nrf2 је очигледна. Такође, у третману DMOG активира се жути протеин Yret као доказ активације транскрипционог фактора HIF, док TNFα значајно активира плави флуоресцентни протеин CFP као доказ активације транскрипционог фактора NF-κB.



**Слика 6.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане pTRAF вектором у условима нормоксије. Третман ауранофином (1 μM), DMOG (250 μM) и TNFα (5 ng/ml), након 24 сата.

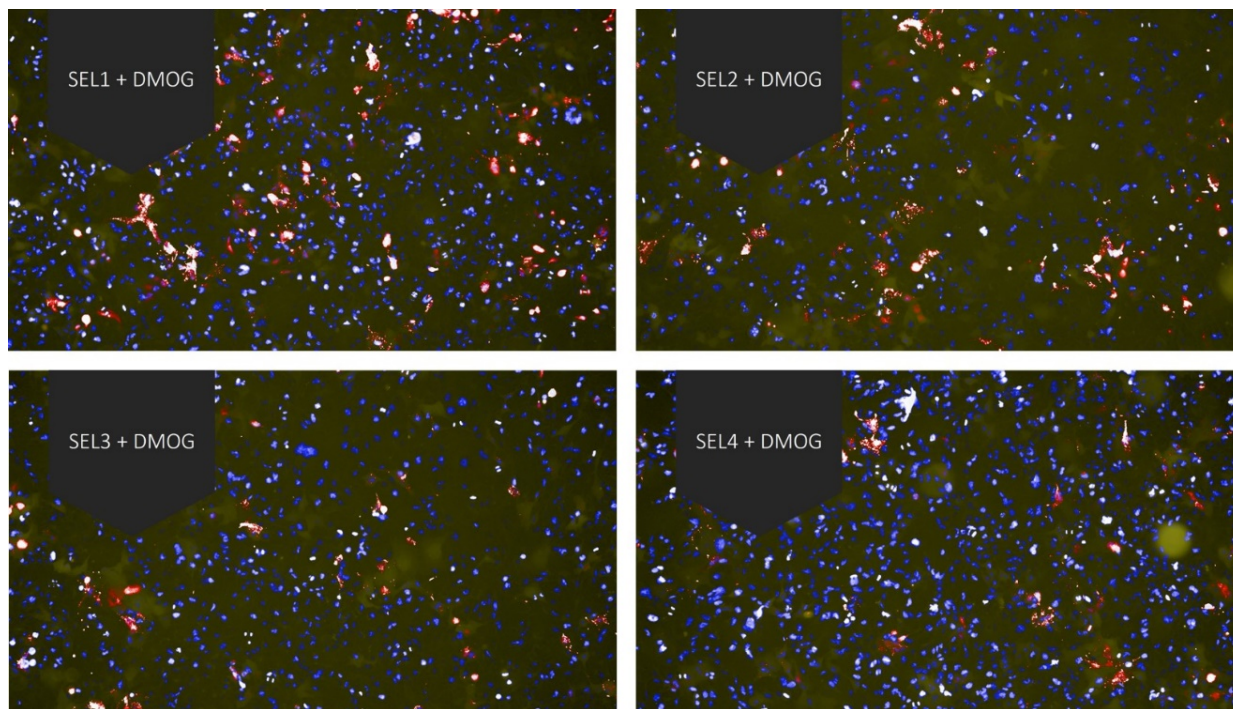
На сликама 7-9 приказани су резултати котретмана једињења SEL1-4 са ауранофином, DMOG и TNF $\alpha$ . Из флуоресцентних панела на Слици 7 можемо закључити да SEL једињења не исказују синергистичко дејство у котретману са ауранофином. Црвена флуоресценца ауранофина се може уочити, али је она у границама експресије Nrf2 код нетретираних ћелија (први панел на слици 6 – контрола).



**Слика 7.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије HCT-116 ћелија трансфековане pTRAF вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са ауранофином (1  $\mu$ M).

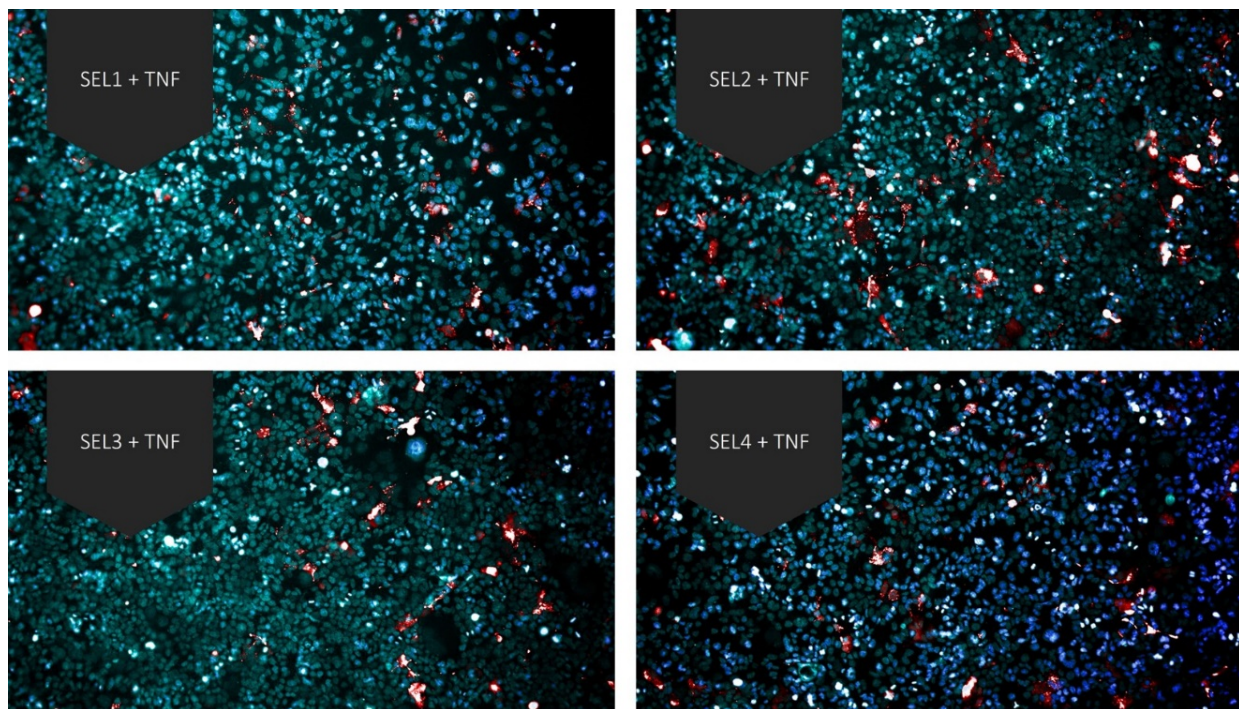
На Слици 8 приказани су резултати потенцијалног синергистичког дејства испитиваних супстанци са DMOG. Из приложеног закључујемо да се жута боја експримираног Yret протеина значајније примећује код SEL1 и SEL2, донекле код SEL4. Сличан ефекат на активацију NIF транскрипционог фактора види се и на Графикону 29, тако да не можемо сасвим сигурно потврдити да је ово повећање флуоресценце жуте боје последица синергистичког ефекта.





**Слика 8.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије HCT-116 ћелија трансфековане pTRAF вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са DMOG (250  $\mu$ M).

На слици 9 видимо јасно појачану експресију плавог флуоресцентног протеина CFP, као одговор на појачану експресију NF- $\kappa$ B услед котретмана посебно SEL1 и SEL2 са TNF $\alpha$ . Другим речима, може се закључити да SEL1 и SEL2, који не показују значајнији ефекат у експресији NF- $\kappa$ B, у котретману са TNF $\alpha$  поседују синергистичко дејство.



**Слика 9.** Панели представљају преклопљене слике флуоресцентне микроскопије НСТ-116 ћелија трансфековане рTRAF вектором у условима нормоксије. Котретман SEL1-4 са TNF $\alpha$  (5 ng/ml).

## ДИСКУСИЈА

На глобалном нивоу, канцер је водећи узрок смрти у развијеним земљама и други водећи узрок смрти у земљама у развоју. Подаци из 2012. показују да је те године било 12,7 милиона случајева канцера и 7,6 милиона умрлих од канцера широм света (Bray и сар., 2012).

Канцер представља последњи корак у прогресији од нормалног ткива, кроз све фазе промена до инвазије кроз базалну мембрану, и формирања метастаза које условљавају највећи проценат морталитета. Еволуција узрапредовалих малигнитета подразумева постепену акумулацију генетичких и епигенетичких промена које промовишу канцер. Измењени гени, онкогени, као и мутирани тумор супресор гени, на начин који мења њихову нормалну функцију, доприносе вишеструким процесима који као крајњи исход могу имати настанак канцера (Hanahan и Weinberg, 2000, 2011). Додатне модификације, као што је епигенетичко утишавање тумор супресор гена, такође доприносе неуморном прогресу канцера (Schreiber и сар., 2011). Такође, мутације у репер механизмима омогућавају накупљање додатних мутација које су у основи еволуције канцера ка све малигнијем фенотипу.

Оксидациони стрес, имплициран у етиологији канцера, резултат је неравнотеже у производњи ROS и RNS, с једне стране, и антиоксидационе одбране ћелије, са друге стране. Реактивне врсте дерегулишу редокс хомеостазу и промовишу формирање канцера иницирањем разних промена у мрежи сигнала који узрокују канцерогенезу. Излагања ултраљубичастим,  $\gamma$ -зрачењима и другим узрочницима канцера у окружењу индукују повећану продукцију ROS, који даље могу индуковати апоптозу ћелија канцера, чиме убијају малигне ћелије, или пак могу индуковати напредовање канцера доприносећи повећању броја мутација и тиме подстичући еволуцију ћелија ка малигном фенотипу. Оксидациони стрес и интеракције гена и околине играју значајну улогу у развоју многих типова канцера, као што су канцер дојке, простате, панкреаса (Acharya и сар., 2010). Неколико транскрипционих фактора и тумор супресора су укључени у одговор ћелије на

оксидациони стрес, као што су Nrf2, NFκB и BRCA1. Обећавајућа стратегија у лечењу канцера јесте циљана промена редокс статуса ћелија канцера употребом нових физиолошки активних једињења са својствима која могу, нпр., да промовишу оксидациони стрес у ћелијама канцера, индукују ћелије да иду ка апоптози, или да смањују свој метастатски потенцијал.

Оксидациони стрес може бити резултат већег броја ендогених извора, укључујући производњу кисеоничних радикала митохондријалним оксидативним фосфорилацијама. Митохондрије су значајан извор ROS јер су главни потрошачи молекуларног кисеоника у ћелијама (Archer и сар., 2008; Addabbo и сар., 2009). Систем прве ћелијске одбране састоји се од неколико ензима, као што су глутатион S-трансферазе, NADP(H) хинон оксидоредуктазе (NQO1), глутатион-пероксидазе.

Оксидациони стрес може изазвати позитивне реакције као што је пролиферација, али и негативне одговоре као што су инхибиција раста или смрт ћелија. Између осталих, статус ћелијског редокс статуса одржава класа молекула тиоредоксина (Trx). Trx су једни од кључних регулатора сигнализације у ћелијским реакцијама укључених у борбу против различитих стресова. Trx испољавају цитопротективну активност усмерену ка смањивању процеса апоптозе изазване оксидационим стресом. Штавише, Trx је укључен у регулацију интеракција између протеина или протеина и нуклеинских киселина преко својих остатака цистеина. Током оксидационог стреса Trx се транслоцирају из цитоплазме у једру где испољавају своју заштитну улогу (Arner и Holmgren, 2006).

Метастазирање је изузетно сложен процес који се одвија кроз низ секвенцијалних корака који укључују инвазију у суседна ткива, интравазацију, транспорт кроз циркулаторни систем и заустављање на секундарном месту. Метастазе су узрок 90% смртних случајева код људи оболелих од канцера (Weigelt и сар., 2005). Упркос клиничком значају, мало се зна о генетичким и биохемијским детерминантама метастаза (Mehlen и Puisieux, 2006).

Обимна истраживања током последње две деценије показала су механизам помоћу којег континуирани оксидациони стрес може довести до канцера. Оксидациони стрес може активирати различите факторе транскрипције, укључујући Nrf2, NF-κB, HIF-1α и многе друге (Reuter и сар., 2010). Активација ових транскрипционих фактора може довести до експресије стотина различитих гена, укључујући оне за факторе раста, запаљенске



цитокине, хемокине, регулаторне молекуле ћелијског циклуса и антиинфламаторне молекуле.

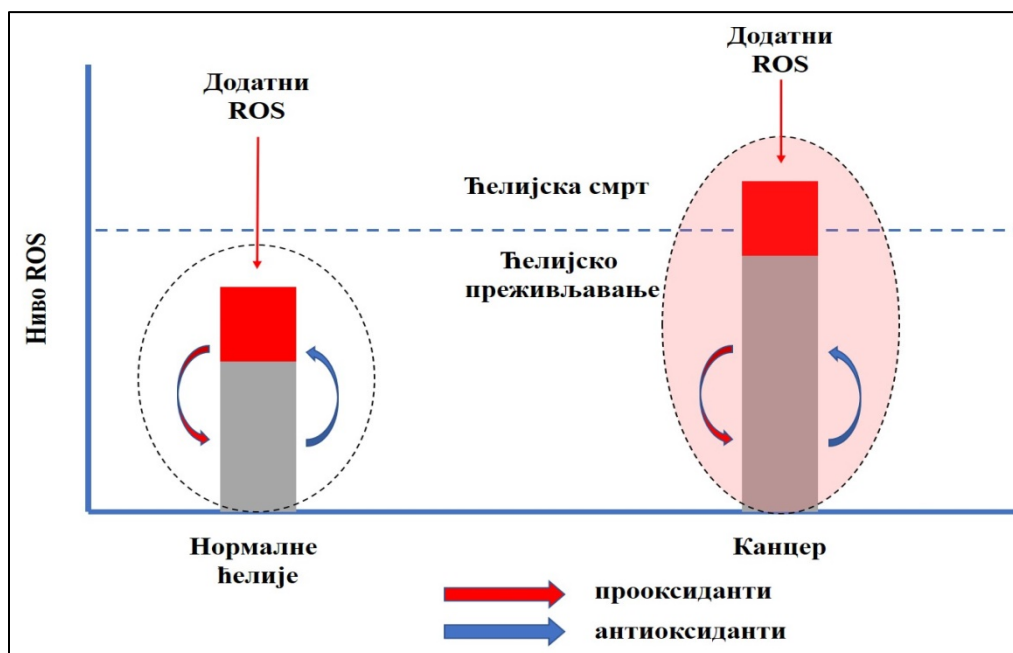
ROS могу повећати инвазивност канцера и способност за метастазирање повећањем миграторног потенцијала ћелија. Приликом трансформације у инвазивни канцер, епителне ћелије пролазе дубоке промене у морфологији и адхезивном режиму, што резултира губитком нормалне епителне поларизације и диференцијације, трансформишући се у покретнији инвазивни фенотип. На пример, лечење ћелија канцера водоник-пероксидом интравенозним инјекцијама код мишева повећава стопу формирања метастаза у плућима, што указује на то да је функција ROS важна у ширењу метастатских туморских ћелија (Kundu и сар., 1995). Ово се може догодити услед смањења капацитета везивања ћелија канцера на базалну ламину, или пак због повећане активности или експресије протеина који регулишу ћелијску покретљивост. На пример, оксидациони стрес регулише експресију интерцелуларног адхезијског протеина-1 (ICAM-1), највероватније услед активације NF-κB. ICAM-1 заједно са IL-8 регулише трансендотелијалну миграцију неутрофила и има потенцијалну функцију у метастазирању (Roebuck, 1999). Металопротеиназе, MMP, су способне да неутралишу већину компоненти базалне мембране и екстрацелуларног матрикса (Nelson и сар., 2000). Донори водоник пероксида и азот-моноксида, као и повећана експресија iNOS, стимулишу експресију неколико MMP (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-13) (Nelson и Melendez, 2004) и тиме повећавају инвазивни потенцијал ћелија.

Иако умерено повећање ROS може изазвати пролиферацију ћелија, прекомерне количине ROS могу изазвати оксидационо оштећење липида, протеина и ДНК, изазивајући онкогене трансформације, повећање метаболичке активности и митохондријалне дисфункције (Dreher и Junod, 1996; Behrend и сар., 2003; Pelicano и сар., 2003). Многи извештаји сугеришу да су ћелије канцера под континуираним оксидационим стресом (Шема 13) (Pervaiz и Clement, 2004). Студије на хуманим ћелијским линијама канцера јасно показују да ове ћелије производе ROS много више од здравих ћелија (Lu и сар., 2007). ROS су дефинисани као важни молекули укључени у вишестепени процес канцерогенезе (Klauning и Kamendulis, 2004). Добро је познато да ћелије канцера испољавају одређене промене у функцији митохондрија што доводи до промена у процесу дисања. Ова митохондријална дисфункција може изазвати ниску ефикасност протока електрона у

митохондријалном ланцу, повећавајући „цурење“ електрона и доводећи до појачаног генерисања ROS. Настали оксидациони стрес може проузроковати даље оштећење митохондријалне ДНК и респираторног ланца, повећавајући продукцију ROS (Zorov и сар., 2006).

Повећани оксидациони стрес који се примећује у ћелијама канцера такође може резултирати смањењем садржаја или инактивацијом антиоксиданаса (Conklin, 2004). Већина ћелија канцера обично експримира врло мало антиоксидационих ензима, као што су каталаза, супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза, за које је познато да играју заштитну улогу против ROS у нормалним ћелијама (Pelicano и сар., 2004). Недостатак одговарајуће антиоксидационе одбране чини ћелије канцера веома осетљивим на оксидациони стрес.

Нова стратегија у борби против канцера названа је „оксидациона терапија“ и развијена је индуковањем цитотоксичног оксидационог стреса у лечењу канцера. Ово се може постићи двома различитим методама: индуковање генерисања цитотоксичних нивоа ROS и инхибирање антиоксидационог система ћелија канцера (Trachootham и сар., 2009; Liou и Storz, 2010; Zhang и сар., 2016).



**Шема 13.** Умерено повећање ROS може промовисати пролиферацију ћелија и преживљавање. Међутим, када пораст ROS достигне одређени ниво (токсични праг), може доћи до исцрпљивања антиоксидационог капацитета ћелије и смрти ћелије.

Познато је да лекови многих класа антинеопластичних агенаса генеришу висок ниво оксидационог стреса у биолошким системима (Conklin, 2000). Ове класе лекова укључују антрациклине, већину алкилирајућих средстава, комплексе координоване платине, епиподофилотоксине и камптотетине.

Откриће цисплатине од стране Барнета Росенберга 1960. године, прекретница је у историји једињења на бази метала коришћених у лечењу канцера. Платински лекови, као што су цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина, представљају главна једињења на бази метала у лечењу канцера. Данашње истраживање у овој области усмерено је и на метале из 9. групе периодног система, тј. комплекса паладијума, иридијума, осмијума и родијума (Џановић и сар., 2017; Џивановић и сар., 2017). Главна карактеристика ових комплекса је инертност, док се реактивност и биолошка активност могу побољшати одговарајућим избором лиганата.

Селен је ултрамикроелемент са веома важним биолошким функцијама (Goldhaber, 2003; Thomson, 2004). Доказано је да је селен антиоксиданс са снажним протективним својствима, посебно у нижим примењеним концентрацијама (Kiełczykowska и сар., 2018; Ungvári и сар., 2014). Међутим, високе концентрације селена могу индуковати генерисање реактивних радикалских врста (Falandysz и Lipka, 2006). Постоји широка разноликост у природи једињења селена због четири различита оксидациона стања (-2, 0, +4 и +6). Таріеро и сар. (2003) су показали да метаболити селенских једињења индукују ROS, што заузврат може изазвати оксидационе модификације и прекидање ланца ДНК. Различите студије показују да, у стресним реакцијама индукованим једињењима селена у ћелијским линијама канцера, долази до апоптозе и заустављања циклуса ћелијског раста услед пораста ROS. Поред тога, пре појаве апоптозе, једињења селена утичу на експресију и/или активност сигналних молекула, фактора повезаних са митохондријама, транскрипционих фактора, гена тумор супресора и ћелијског редукованог глутатиона (Sanmartín и сар., 2012). Класификација селенских једињења приказана је у Табели 14.

Табела 14. Класификација једињења селена на основу хемијске структуре.

<b>Селено аминокиселине</b>
Селенометионин (SeMet), Метилселеноцистеин (MeSeCys), Селеноцистамин, Селеноцистеин (SeCys)
<b>Селено хетероциклична једињења</b>
<b>Селеноцијанати</b>
<b>Изоселеноцијанати</b>

Преузето из (Sanmartín и сар., 2012).

### *Пролиферативни vs. цитотоксични ефекти ОСЈ*

На почетку, потребно је објаснити природу и разлике испитиваних једињења на хемијском нивоу, што свакако условљава комплетан биолошки одговор на испитиваним ћелијским линијама канцера колона и дојке. Наиме, SEL1 и SEL2 су фенилселено етри док су SEL3 и SEL4 бициклични фенилселено хидантоини. SEL1 и SEL2 имају хемијски сличну структуру, у смислу да је SEL1 тетраhydroфурански а SEL2 тетраhydroпирански селенодериват. SEL3 и SEL4 припадају посебној групи једињења. SEL3 је органоселенско једињење хидантоинског типа и представља лиганд којим је координован паладијум(II) при чему је добијен комплекс, SEL4. С обзиром да ова четири једињења могу да се поделе у две различите класе органских једињења, резултати интензивног биолошког тестирања приказани у овој дисертацији показују различитост у постигнутим ефектима. SEL1 и SEL2 нису цитотоксични на испитиваним ћелијским линијама, напротив стимулишу пролиферацију ћелија, док SEL3 и SEL4 показују значајно цитотоксично дејство, посебно SEL4, што се може приписати утицају координованог паладијума(II). Исказано бројевима, SEL1 и SEL2 показују IC<sub>50</sub> вредности веће од 500 µM на обе ћелијске линије. Са друге стране, IC<sub>50</sub> вредности за SEL3 су >500 и 92.1 µM након 24 и 72 сата на HCT-116 ћелијама, док је ефекат на MDA-MB-231 ћелијама мање значајан са вредностима >500 и 288.5 µM након 24 и 72 сата од третмана. Вредности IC<sub>50</sub> једињења SEL4 су 80.9 и 130.7 µM након 24 и 72 сата на HCT-116 ћелијама и >500 и 81.65 µM на MDA-MB-231 ћелијама. Анализирајући ефекте испитиваних супстанци на параметре редокс статуса, утврђено је да SEL1 и SEL2 показују антиоксидациони карактер (Кошарић и сар., 2014), док SEL3 и SEL4 делују изразито прооксидационо, што се свакако може довести у везу са цитотоксичношћу (Živanović и сар., 2017). Резултати показују да SEL1 и SEL2 индукују значајније смањење

O<sub>2</sub><sup>-</sup> у НСТ-116 ћелијама, у односу на МДА-МВ-231 ћелије. Обрнуто, концентрација GSH значајно је повећан под утицајем ове две супстанце. Закључено је да SEL1 и SEL2 показују антиоксидациони потенцијал на испитиваним ћелијским линијама. Са друге стране, SEL3 и SEL4 су индуковали статистички значајно повећање концентрације слободно-радикалских честица, указујући на свој прооксидациони карактер. Овај ефекат израженији је у третману комплексом SEL4. Како је горе описано, виша концентрација слободно-радикалских честица, тј. прооксидациони ефекат у директној је спрези са смањењем вијабилности испитиваних ћелија и обрнуто, нижи ниво оксидационог стреса води повећаној пролиферацији ћелија (Petrović и сар., 2016, Petrović и сар., 2017; Živanović и сар., 2017), што је у сагласности са литературним подацима цитираним у уводном делу ове дисертације.

Поредећи ефекте на ћелијским линијама, може се рећи да су НСТ-116 ћелије осетљивије на третмане. Оваква разлика у осетљивости ћелија може се приписати пореклу изолованих ћелија. Наиме, док су НСТ-116 ћелије пореклом из примарног карцинома, МДА-МВ-231 ћелије потичу из ћелија из плеуралне ефузије метастатског, отпорнијег карцинома, дакле од ћелија које су већ стекле способност за метастазирање. Овај закључак потврђен је нашим интензивним студијама (Кошарић и сар., 2014; Petrović и сар., 2014, 2015, 2017; Živanović и сар., 2017).

### ***Ефекти ОСЈ на миграцију ћелија канцера***

Испитивање антиканцерогеног деловања ОСЈ праћено је у два аспекта – кроз утицај на вијабилност ћелија, и кроз утицај на миграторни потенцијал ћелија канцера. Антиканцерогени потенцијал који у крајњем ефекту има за циљ смањење вијабилности ћелија канцера је само један од приступа у терапији. Третман канцера требало би допунити и употребом лекова који инхибирају способност ћелија канцера да инвадирају у околна ткива и успоставе секундарне туморе, метастазе. Супстанце чији се ефекат базира само на цитотоксичности су претежно усмерене ка смањењу ћелијске масе канцера. Међутим, смањивање и елиминација самог канцера ретко је апсолутна и/или одржива у дужем временском оквиру са нејасним ефектом на његов метастатски потенцијал. У том смислу, може се рећи да цитостатици који смањују канцер, често не могу да елиминишу способност датог тумора да метастазира. Зато, додатак терапији која подразумева

употребу лекова који у исто време смањују метастатски потенцијал (тзв. *мигратацији*) је од изузетне важности.

Сходно наведеном, спроведена истраживања у оквиру ове дисертације базирана су на дефинисању антимиграторног потенцијала испитиваних ОСЈ. SEL1 повећава миграцију НСТ-116 ћелија, док делује антимиграторно на MDA-MB-231 ћелијама. SEL2 показује антимиграторни потенцијал на обе испитиване ћелијске линије канцера, са израженијим ефектом на метастатским MDA-MB-231 ћелијама. Што се тиче SEL3 и SEL4, показали су значајне ефекте на повећање миграторног потенцијала НСТ-116 ћелија, док у вишој тестираној концентрацији показују значајан антимиграторан ефекат на MDA-MB-231 ћелијама. Ефекти смањења миграторног потенцијала у третману ОСЈ посебно су значајни у случају MDA-MB-231 ћелија, које су метастатског порекла. SEL1 и SEL2 не показују цитотоксични ефекат, али са друге стране имају антимиграторни потенцијал, посебно на метастатским MDA-MB-231 ћелијама. SEL3 и SEL4 пак испољавају у значајној мери оба ефекта, тј. делују и цитотоксично и антимиграторно, израженије на MDA-MB-231 ћелијама.

Посматрајући ефекте испитиваних ОСЈ на миграцију ћелија карцинома дебелог црева и дојке, у односу на промене индуковане у редокс систему ћелија, не могу се једнозначно објаснити. Наиме, у ћелији у сваком тренутку постоји одређена редокс равнотежа условљена реалним биохемијским и физичким околностима у којима се ћелија налази. Многи ћелијски механизми одређени су и условљени овом равнотежом. Свака промена индукована споља утиче на промену равнотеже редокс статуса, која пак условљава одређени одговор ћелије на дату промену. Сходно томе, SEL1 и SEL2 показују антиоксидациони и антимиграторни потенцијал, док SEL3 и SEL4 делују као прооксиданси индукујући цитотоксичност и смањење миграторног потенцијала само у метастатским MDA-MB-231 ћелијама, док делују промиграторно на НСТ-116 ћелије.

Значајно повећање ROS/RNS директно утиче на миграторни потенцијал ћелија канцера (Urbich и сар., 2002). Утврђено је да умерена продукција ROS/RNS промовише миграцију канцера (Finì и сар., 2008), док прекомерна продукција има супротан ефекат, тј. значајно смањује миграцију ћелија канцера (Nishikawa и сар., 2008). Питање је само како тачно дефинисати танку границу редокс равнотеже. Ова равнотежа важи искључиво у тачно

дефинисаним биохемијским условима у тачно одређеном времену. Промена било ког од ових параметара (чак и време) утиче на померање или чак нарушавање равнотеже.

Слично, наши резултати који упућују на прооксидациони карактер SEL3 и SEL4, показују да умерена индукција оксидационог стреса изазива повећање ћелијске покретљивости, тј. метастатског потенцијала, док са друге стране, висока индукција оксидационог стреса онемогућава бројне ћелијске процесе, па самим тим и ћелијску миграцију. SEL3 на НСТ-116 ћелијама у концентрацији 10  $\mu\text{M}$  не показује значајне промене у концентрацији  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , као ни значајан утицај на миграцију. Са друге стране, концентрација од 100  $\mu\text{M}$  повећава концентрацију  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , такође и миграцију ћелија. На MDA-MB-231 ћелијама у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  нема повећања концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , такође нема ни утицаја на миграцију, док концентрација од 100  $\mu\text{M}$  значајно повећава концентрацију  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , а миграција ћелија значајно опада. Дефинисати шта је умерени, а шта екстремни пораст концентрације слободно-радикалских честица није једноставно, посебно имајући у виду да не постоји одређен стандард који дефинише ову танку границу, која у многим ћелијским процесима помера равнотежу у једном или у другом правцу. Са друге стране, нпр., повећање концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  за 10% у НСТ-116 ћелијама, не мора на исти начин да мења ћелијске процесе, као исто повећање у MDA-MB-231 ћелијама. Практично, овакве упоредне анализе у појединачним случајевима заправо дефинишу природу испитиваних ћелија и дају нам назнаке како предвидети утицај нових физиолошки активних једињења на одређене параметре у условима када нам је позната концентрација слободно-радикалских честица.

Инвазија се састоји од промена у адхезији ћелија канцера на ЕЦМ, протеолитичке деградације ткива и миграције ћелија канцера (Ponta и сар., 1994; Fidler, 2003). Током инвазије, група матрикс металопротеиназа је одговорна за деградацију ЕЦМ (Shiomi и Okada, 2003). ММП се експримирају у високом нивоу код малигних ћелија, у односу на здраве ћелије. Утврђено је да NO модулира експресију ММП и стога утиче на инвазију ћелија канцера (Ishii и сар., 2003). Инвазивно/инхибиторни ефекти NO на експресију ММП-9 испитани су на ћелијској линији MCF-7 карцинома дојке (Jespersen и сар., 2009). Уочено је да додатак донора NO доводи до смањења нивоа иРНК за ММП-9 и смањења транслагације овог протеина.

Код карцинома дојке, NO утиче на смањење агресивности ћелија канцера инхибирајући ћелијску покретљивост и ојачавајући адхезију ћелија, што на крају смањује метастатски потенцијал ћелије (Lahiri и Martin, 2009). Ови резултати показују да NO може драстично ометати или чак елиминисати метастатску прогресију. Фактори који су испитивани укључују трајање изложености азот моноксиду, микроокружење ћелија, флукс NO, фазу циклуса ћелија канцера, као и утицај оксидационих и редукционих средстава (Burke и сар., 2013). Пошто утицај NO такође зависи од концентрације, показано је да се ангиогенеза, пролиферација и метастазирање могу нормално стимулисати нижим нивоима NO (<100 nM). Међутим, веће концентрације NO (> 400-500 nM) не олакшавају прогресију канцера, већ уместо тога промовишу цитотоксичност и ћелијску апоптозу (Ridnour и сар., 2008). Сходно томе, инхибиција преживљавања ћелија и проапоптотски пут услед утицаја NO донора предложена је као нова терапија различитих канцера (Burgaud и сар., 2002). Како је горе наведено, концентрација одређене реактивне честице може условити потпуно другачију судбину ћелије. Концентрација NO у сложеној мрежи молекуларних интеракција у ћелији дефинише да ли ће се метастатски потенцијал појачавати или пак смањивати.

Азот моноксид има парадоксалну улогу у одређеним малигнитетима и ефекат на прогнозу. Недавна клиничка студија показала је да су пацијенти са iNOS-позитивним канцерима имали знатно нижу стопу преживљавања, у односу на оне са iNOS-негативним канцерима у различитим стадијумима колоректалног карцинома, што показује да је прекомерна експресија iNOS везана за повећану смртност (Zafirellis и сар., 2010). NO такође може промовисати формирање и напредовање канцера (Bing и сар., 2001). Са друге стране, студије показују да активација NOS и повећање NO делује антиканцерогено (Xie и сар., 1995; Xie и сар., 1996). Према томе, ефекат NO на метастазирање не може се лако класификовати као „про-метастатски“ или „анти-метастатски“, јер се мора сагледати у ширем контексту синергије са другим факторима, као што су тип ћелије (Ishikawa и сар., 2003), доза (Mocellin, 2009), врста органа (Ishikawa и сар., 2003) итд.

Говорећи о утицају промене концентрације нитрита на миграторни потенцијал, можемо повући следеће паралеле са горе поменути теоријски потврђеним правилима. SEL1 повећава миграцију НСТ-116 ћелија. Посматрајући само концентрацију NO, не бисмо очекивали промене у миграцији ових ћелија, јер се концентрација нитрита (као индикатор



NO) није статистички значајно мењао. Међутим, познато је да тренутна концентрација NO говори само о стању утврђеном у датом тренутку (у нашем случају 24 и 72 сата након третмана). Са друге стране, потребно је посматрати ћелију као систем у широком контексту, колико нам то експериментални подаци омогућавају. Другим речима,  $O_2^{\cdot-}$  поседује екстремно велики афинитет према NO градећи пероксинитрите (Wink и Mitchell, 1998), те је тренутни детектовани ниво нитрита заправо само ниво преосталог NO који није учествовао у поменутој и у другим реакцијама. Такође, неспорна је чињеница да је SEL1 индуковао значајну експресију iNOS протеина и индиректно значајну продукцију NO. Слично важи и за остала испитивана SEL једињења.

Разматрајући појединачно параметар по параметар, који би могао да утиче на миграторни потенцијал испитиваних ћелија, долазимо до закључка да промене у редокс статусу и промене у активацији/деактивацији транскрипционих фактора и циљаних гена могу објаснити промене миграторног потенцијала. Међутим, с обзиром на то да је жива ћелија изузетно сложен систем, са великом сигурношћу можемо тврдити да је само синергија свих параметара одговорна за било који процес, укључујући и метастатски потенцијал, тј. миграцију ћелија. Литература и наши експериментални подаци потврђују да је сваки процес у ћелији одређен равнотежом више фактора и да је линија која дефинише границу равнотежних стања заправо веома деликатна област. Коначно можемо рећи да MDA-MB-231 ћелије интензивније мигрирају од HCT-116 ћелија (Wu и сар., 2011), и да наши резултати који показују смањење миграције MDA-MB-231 услед третмана ОСЈ, представља охрабрујући правац за даља истраживања.

Како је циљ ове дисертације испитивање различитих ОСЈ и различитих ћелијских линија канцера, у контексту објашњавања утицаја на миграторни потенцијал можемо извући следећи закључак. Испитивана једињења делују промиграторно на HCT-116 ћелијској линији карцинома дебелог црева, док на MDA-MB-231 ћелијској линији карцинома дојке делују антимиграторно. У данашње време пуно пажње поклања се тзв. *индивидуализованој терапији*. У том смислу, потребно је знати како одређени лек делује на одређени тип и подтип канцера. На основу горе представљених резултата могли бисмо сугерисати даља свеобухватнија испитивања ових супстанци на антимиграторни потенцијал метастатског карцинома дојке, али не и колона.

*Деловање ОСЈ на редокс систем*

Еукариотска ћелија поседује више повезаних система заштите од утицаја фактора оксидационог стреса. У зависности од врсте и порекла слободнорадикалске честице, или пак ксенобиотица који испољава значајно прооксидационо дејство, ћелија активира различите системе заштите. Висока концентрација слободних радикала утиче на интактност генетичког материјала, протеина и липида ћелије. Како је горе детаљно описано, слободни радикали су способни да изазову мутације генетичког материјала, које могу (али не морају) довести до активирања онкогена или пак деактивирања тумор супресора (Trachootham и сар., 2009). У сваком тренутку, у ћелији постоји одређена концентрација различитих ROS/RNS честица чији ниво здрава ћелија изузетно ефикасно контролише у циљу одржавања равнотеже. Све док је равнотежа прооксидационих и антиоксидационих чиниоца стабилна, не постоји велики ризик од мутација ДНК и/или конформационо/хемијске дестабилизације протеина и липида ћелије. Међутим, уколико је извор ROS/RNS перманентан (нпр. код запаљенских процеса), или уколико дође до значајне акутне интоксикације ћелије слободним радикалима, равнотежа се тренутно нарушава и систем тежи повратку старе равнотеже. Све док антиоксидациони капацитет ћелије није исцрпљен, равнотежа се одржава. Међутим, када капацитет ћелије не успева да неутралише вишак слободних радикала или је стрес континуиран и дуготрајан, долази углавном до трајног нарушавања природне равнотеже. Ћелија тада активира механизам програмиране ћелијске смрти, или долази до соматских промена које воде канцеру, тј. ћелијама које функционишу изван контроле.

Како је већ наведено (Trachootham и сар., 2009), постоји више система који одржавају равнотежу у оптималном стању. Антиоксидациони системи се могу поделити у две групе: неензимски и ензимски. Неензимски системи антиоксидационе одбране ћелије активирају се први. Наиме, у ову групу спадају хемијска једињења са изразитом способношћу да ефикасно реагују са слободним радикалима и ксенобиотцима (витамин А, Ц и Е,  $\beta$ -каротен и GSH). GSH је можда најзначајнији представник ове групе и интензивно је проучаван у овој дисертацији.

Друга група представља ензимски систем антиоксидационе заштите ћелије. Главни представници су: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидазе (GTPx), тиоредоксини (TRXx), пероксиредоксин (PRX) и глутатион трансфераза (GST).

Ензимски систем делује спорије, јер укључује сложену мрежу реакција ROS/RNS и других компоненти које активирају ове чиниоце на нивоу генске и протеинске експресије, али је свакако већег капацитета.

Наша испитивања утицаја ОСЈ на редокс статус ћелијских линија колона и дојке указују на различите ефекте SEL1 и SEL2 са једне стране, у односу на SEL3 и SEL4 са друге стране. SEL1 и SEL2 испољавају антиоксидациони, док SEL3 и SEL4 испољавају прооксидациони ефекат на обе ћелијске линије. SEL2 показује значајнији антиоксидациони ефекат од SEL1, док SEL4 показује значајнији прооксидациони ефекат од SEL3.

Порекло *de novo* награђеног  $O_2^{\cdot-}$  може бити из различитих извора. Једна могућност јесте да структуре испитиваних ОСЈ поседују асиметричне електронске густине које теоријски могу донирати електрон(е), који у крајњој консеквенци могу преко молекулског кисеоника покренути цео низ слободнорадикалских реакција. Друга могућност јесте Фентонова реакција у којој се унутарћелијски водоник пероксид разлаже на  $O_2^{\cdot-}$  и воду. Ова реакција је могућа искључиво уколико је катализована, нпр., гвожђем цитохрома у митохондријама, или пак уколико је катализована другим прелазним металима, као што су паладијум, платина и родијум (Halliwell и Gutteridge, 2006). Обзиром на наше резултате, у којима SEL1 и SEL2 делују антиоксидационо, ову особину с хемијске тачке гледишта можемо приписати антиоксидационим карактеристикама селена у структури једињења. Са друге стране, SEL3 такође садржи селен, али и одређено колебање у смислу индукције и супресије синтезе  $O_2^{\cdot-}$ , те можемо говорити о двојном утицају про/антиоксидационом, где је равнотежа ипак померена у правцу прооксидационог деловања. SEL4 је по својој хемијској структури селено-паладијумски комплекс, те овде заиста можемо претпоставити да је прооксидациони утицај паладијума значајан.

Сва испитивана ОСЈ значајно повећавају концентрације нитрита у НСТ-116 ћелијама; у MDA-MB-231 ћелијама примећен је исти, али израженији ефекат. Порекло нитрита у ћелији далеко је сложеније од претпоставке и доказивања концентрације  $O_2^{\cdot-}$ . Наиме, слично као код  $O_2^{\cdot-}$ , и NO поседује значајну хемијску реактивност, те је концентрација измерен у нашим експериментима тренутно стање одређено након 24 и 72 сата од третмана, у условима редокс равнотеже који важе у датим временским интервалима. Нитрити, као индикатор NO, могу потицати из различитих извора. Једна од могућности,

коју смо експериментално испитали јесте утицај ОСЈ на протеинску експресију iNOS, и показано је да овај биолошки значајан ензим може бити одговоран за продукцију NO и детектованих нитрита. Са друге стране, бар што се тиче SEL3 и SEL4, не можемо искључити могућност да је катаболизам ових једињења допринео повећању концентрације нитрита, посебно зато што у својој структури поседују азотом богате имидазолске прстенове. Међутим, детекција тренутне концентрације нитрита, резултат је и хемијске реактивности NO и  $O_2^{\cdot-}$ , који у веома брзој хемијској реакцији реагују стварајући пероксинитрите (Ferrer-Sueta и Radi, 2009).

Процес очувања редокс равнотеже, како у здравим тако и у ћелијама канцера, дефинисан је сложенем мрежом интеракција више сигналних путева на нивоу протеинске и генске експресије. Са једне стране, најбржи одговор ћелије на нарушавање редокс равнотеже услед повећања ROS/RNS, јесте реакција са GSH и другим антиоксидационим нискомолекуларним биомолекулима, који се природно налазе у свакој ћелији у концентрацијама које зависе од врсте ћелије, соматског стања, ткива, и сл. (Schafer и Buettner, 2001; Trachootham и сар., 2009).

Други, нешто спорији, одговор јесте протеински одговор где ензими и протеини, већ присутни у ћелији, интерагују са ROS/RNS неутралишући их или пак мењајући своју конформацију и облик у циљу постизања активне форме која покреће експресију одређених гена чији протеински производи даље учествују у одговору ћелије на нарушену редокс равнотежу. У том смислу, испитивани транскрипциони фактори покрећу даље механизме за заштиту ћелије услед повећане продукције ROS/RNS.

Један од главних система одбране који се углавном покрећу помоћу активiranог Nrf2 транскрипционог фактора јесте глутатионски систем заштите (Ma, 2013). Наиме, повећана продукција ROS утиче на активацију Nrf2, који даље активира транскрипцију гена као што су гени за глутатион пероксидазе. У циљу испитивања утицаја ОСЈ на активирање транскрипционих фактора и њихових циљаних гена испитивана је експресија гена селено ензима *GPX1*, 2, 3, 4 и 6 у НСТ-116 ћелијама. Наша је претпоставка да ОСЈ активирају ове гене преко Nrf2 механизма. Тако, релативна експресија иРНК за *GPX1-6* гене указује на бољи ефекат антиоксидационих једињења SEL1 и SEL2, у односу на прооксидансе SEL3 и SEL4. Механизам повећане експресије *GPX1-6* гена очигледно не зависи искључиво од Nrf2 система. Друга два испитивана гена укључена у регулацију редокс равнотеже, такође

регулисани транскрипционим фактором Nrf2, указују на сличан тренд. Наиме, експресију иРНК за *GST* и *TXNRD* гене највише индукују антиоксидациона једињења SEL1 и SEL2.

На основу изнетог, закључујемо да испитивана ОСЈ значајно утичу на активирање више заштитних механизма у одбрани ћелија од повишене продукције ROS/RNS. Са једне стране, активирају се транскрипциони фактори, посебно Nrf2, док са друге стране, долази до повећане експресије гена који се активирају у условима поремећене редокс равнотеже. Одговор ћелије може бити више или мање интензиван, у зависности од потребе у датом тренутку. Показали смо да ћелија, уколико је то потребно, у исто време може укључити више нивоа одговора на поремећај редокс равнотеже, практично идући до саме границе апоптозе. Ова граница/праг је ближа у ћелијама канцера због повећане базалне продукције ROS/RNS, и ту законитост потребно је искорисити у циљу креирања селективнијих агенаса у третману канцера. Селективнија једињења, сходно својим хемијским особинама, индуковала би једнако интензивну продукцију ROS/RNS, али тако да код здравих ћелија не дође до покретања процеса апоптозе, док би код ћелија канцера ова граница била пређена изазивајући контролисану ћелијску смрт.

Сва четири испитивана једињења на НСТ-116 ћелијама индукују значајне промене експресије Nrf2 промотора – SEL1 и SEL2 у мањој мери, док SEL3 и SEL4 у веома значајној мери. Резултати указују на нецитотоксични, антиоксидациони и антимигрантни потенцијал SEL1 и SEL2. Ова два једињења показују дозно зависни ефекат на индукцију Nrf2. Ниже концентрације SEL1 и SEL2 (0.5 и 1  $\mu\text{M}$ ) индукују смањење експресије Nrf2. Ниске концентрације ових једињења такође показују снажан антиоксидациони ефекат, што потврђује ефекат смањења концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . У том смислу, претпоставка је да снажно антиоксидационо дејство испитиваних супстанци у нижим концентрацијама, у значајној мери одржава редокс равнотежу ћелије на нормалном нивоу, те механизам индукције Nrf2 није покренут, тј. комплекс Keap1–Nrf2 у цитоплазми и даље је стабилан. Тек са повећањем концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  долази до раскидања овог комплекса уз снажну индукцију експресије Nrf2. На сличан начин, SEL1 и SEL2, поред тога што својим дејством утичу на смањење активације Nrf2 система, утичу на то да GSH ниво такође буде низак. Како је у уводу описано, Nrf2 фаворизује синтезу и употребу GSH (Hayes и McLellan, 1999; Harvey и сар., 2009). Како је ефекат на смањење концентрације  $\text{O}_2^{\cdot-}$  у нижим концентрацијама SEL1 и SEL2 значајан, активација Nrf2 система није нужна, те ни

продукција GSH. Ћелија кроз своје комплексне регулационе системе свакако користи сваки начин за уштеду своје енергије.

Са друге стране, SEL3 и SEL4 индукују експресију Nrf2 више него двоструко у односу на контролу. Ова појава није изненађујућа, имајући у виду да ова два једињења пре свега индукују продукцију  $O_2^{\cdot-}$ . Прво долази до раскидања комплекса Keap1–Nrf2, а онда касније у каскади реакција и до повећања концентрације Nrf2 и GSH, нарочито у третману цитотоксичним и веома прооксидационим SEL4.

Еспресија HIF транскрипционог фактора у HCT-116 ћелијама генерално је повећана у третману свим OCJ. Наиме, како канцери поседују потенцијал покретања *de novo* процеса ангиогенезе у хипоксичним условима (Pang и Poon, 2006), није изненађујуће да испитиване супстанце показују ефекат појачане индукције експресије HIF. Иако сва четири испитивана OCJ индукују појачану експресију HIF, SEL1 и SEL2, обзиром на њихову антиоксидациону природу, индукују HIF у значајно мањој мери, у односу на SEL3 и SEL4 који делују изузетно прооксидационо.

NF-κB транскрипциони фактор такође је индукован у већој мери у односу на контролу у третману са OCJ једињењима. Висока експресија NF-κB специфична је у канцерима (Xia и сар., 2014). Слично, као код HIF, антиоксиданси SEL1 и SEL2 индукују експресију NF-κB у значајно мањој мери од прооксиданаса SEL3 и SEL4.

Сва три транскрипциона фактора, заправо су део ћелијског система за преживљавање. ROS индукована експресија Nrf2, HIF и NF-κB су процеси који фаворизују преживљавање чак и ћелија канцера (Reuter и сар., 2010). Са друге стране, уколико је оксидациони стрес високог интензитета, ови механизми нису довољни да заштите ћелију, те она најчешће активира процес апоптозе. Како је горе поменуто, здраве ћелије поседују нижу границу базалне продукције ROS у односу на ћелије канцера. Прооксидационо засновани антиканцерогени лекови управо имају за циљ да подигну концентрација ROS, у мери да у здравој ћелији покрену заштитне системе, а да у исто време концентрација ROS у ћелији канцера буде толико висок да антиоксидациони системи не успеју да одрже редокс равнотежу, а све у циљу покретања процеса апоптозе.

Генерално, из изведеног се може закључити да SEL1 и SEL2 делују антиоксидационо и нецитотоксично; SEL3 и SEL4 делују прооксидационо и цитотоксично; сва 4 OCJ првенствено делују антимигрантно на MDA-MB-231 метастатским ћелијама; утврђена је

експериментална синергија хемијских структура, индукције синтезе реактивних врста, генске и протеинске експресије са особинама третираних ћелија – вијабилност и миграторни потенцијал. Значајност ових резултата пре свега лежи у расветљавању једног сложеног молекуларног механизма одговора ћелије на спољњи утицај третмана хемијским супстанцама. Било који третман неким леком изазива каскаду веома сложених молекуларних промена унутар ћелије. Још значајнији закључак лежи у чињеници да анализа више сличних супстанци даје један модел могућег ефекта, тј. даје одређени ниво предвидивости, који свакако зависи од типа ћелије и многих других фактора. Посебан допринос оваквих истраживања јесте у томе да молекуларна биологија може да обезбеди повратну информацију синтетичкој хемији у смислу предлагања нових, више или мање сличних структура хемијских супстанци које се могу користити у третману канцера. Овакве студије доприносе суштинском интердисциплинарном напору у решавању великих здравствених изазова.

## ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања у оквиру ове докторске дисертације могу се издвојити

### *Општи закључци*

- Тестирана ОСЈ, у зависности од хемијске структуре, дозе и времена третмана, испољавају цитотоксични и антимиграторни потенцијал на ћелијским линијама колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231.
- Параметри оксидационог стреса: супероксид анјон радикал, азот моноксид, iNOS и глутатион карактеришу промене редокс статуса испитиваних ћелијских линија канцера у третману изабраним ОСЈ.
- qRT-PCR анализа генске експресије ензима важних у редокс контроли (иРНК за *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX6*, *GST* и *TXNRD* гене) омогућила је детаљанији увид у механизам деловања ОСЈ на експресију датих гена, посебно имајући у виду њихов значај у антиоксидационој заштити ћелије.
- Флуоресцентна микроскопија у резолуцији појединачне ћелије на изучаваним ћелијским линијама уз употребу pTRAF вектора омогућила нам је детаљну анализу активности Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора укључених у антиоксидациони одговор ћелије.

### *Специфични закључци*

- Једињења SEL1 и SEL2 стимулишу пролиферацију испитиваних ћелија, док SEL3 и SEL4 делују цитотоксично.
- ОСЈ, углавном повећавају миграторни потенцијал испитиваних НСТ-116 ћелија, док на метастатским MDA-MB-231 ћелијама делују углавном антимиграторно.
- Резултати параметара оксидационог стреса показују да једињења SEL1 и SEL2 делују антиоксидационо, док SEL3 и SEL4 делују прооксидационо.



- Експресија иРНК за *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4* и *GPX6* гене у НСТ-116 ћелијама значајно се мења у третману са ОСЈ. SEL1 и SEL2 индукују вишу експресију ових gena у поређењу са SEL3 и SEL4.
- Експресија иРНК за *GST* ген у НСТ-116 ћелијама се мења у зависности од врсте испитиваног ОСЈ - SEL1 повећава, SEL2 инхибира, док SEL3 и SEL4 у зависности од дозе стимулишу или супримирају експресију овог gena у односу на контролне ћелије. Експресија иРНК за *TXNRD* ген је супримирана у свим третманима ОСЈ.
- Анализа утицаја испитиваних ОСЈ на активност транскрипционих фактора у НСТ-116 ћелијама показује да SEL1-4 утичу на значајно повећање експресије Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора.

### ***Коначан закључак***

- Употреба ОСЈ у третману канцера, у зависности од хемијске структуре једињења, не мора увек да испољи експлицитно цитотоксично дејство. У данашње време значајан напор улаже се у креирање лекова са превасходно антиметастатским дејством. Испитивана ОСЈ показују антимигрантни, самим тим и антиметастатски потенцијал.
- Редокс равнотежа је од круцијалне важности за функционисање сваке ћелије. Обзиром да се ћелије канцера налазе константно под већим оксидационим стресом од здравих ћелија, употреба оваквих и сличних ОСЈ (посебно SEL3 и SEL4) са значајним прооксидационим ефектом могу утицати на елиминисање ћелија канцера.
- Утицај ОСЈ на активност транскрипционих фактора и gena укључених у антиоксидациону заштиту ћелије веома је важан, али у исто време може представљати мач са две оштрице. Питање је како употребом лека повећати оксидациони стрес код ћелија канцера и здравих ћелија у мери у којој ће штетити само ћелијама канцера. Са друге стране, умерено повећање ROS/RNS индукује активацију заштитних механизма, који би требало да сачувају само здраве ћелије, док би индуковани ниво активације код ћелија канцера остао недовољан.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Abcam. A guide to cell viability, proliferation and apoptosis assays. <http://www.abcam.com/kits/a-guide-to-cell-viability-proliferation-and-apoptosis-assays>
2. Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1337-1357.
3. Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: A double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3(1): 23-34.
4. Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 2009; 53: 885-892.
5. Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, and Cook JL. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 1999; 274: 26071-26078.
6. Albensi BC, Mattson MP. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 2000; 35(2): 151-159.
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2008. Chapter 17, The Cell Cycle and Programmed Cell Death.
8. Alessio E. Bioinorganic Medicinal Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 2011.
9. Alexandre J, Batteux F, Nicco C. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2006; 119: 41-48.
10. Alimpic AZ, Knezevic AZ, Milutinovic MG, Stevic TR, Savikin KP, Stajic MM, Markovic SD, Marin PD, Matevski V, Duletic-Lausevic SN. Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. Extracts. *Ind Crops Prod* 2017; 105: 1-9.
11. Allen DD, Caviedes R, Cardenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2005; 31(8): 757-768.

12. American Cancer Society. Hormone Therapy for Breast Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/hormone-therapy-for-breast-cancer.html>
13. American Cancer Society. Treatment of Colon Cancer, by Stage. <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>
14. Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 $\alpha$ -KV1.5 O<sub>2</sub>-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: 570-578.
15. Arner ES, Holmgren A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 420-426.
16. Arner ES, Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res* 2010; 316: 1296-1303.
17. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. RA Greenwald (ed), CRC Press, Inc.: Boca Raton. 1985.
18. Aumann KD, Bedorf N, Brigelius-Flohé R, Schomburg D, Flohé L. Glutathione peroxidase revisited-simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling. *Biomed Environ Sci* 1997; 10: 136-155.
19. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990; 190: 360-365.
20. Baliga MS, Wang H, Zhuo P, Schwartz JL, Diamond AM. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biol Trace Elem Res* 2007; 115: 227-242.
21. Banerjee R. Redox Metabolism and Life. In: Redox Biochemistry., edited by Banerjee R, Becker DF, Dickman MB, Gladyshev VN, Ragsdale SW, Hoboken NJ. John Wiley & Sons, Inc., 2008.
22. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohe´ R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4914-4923.
23. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6910-6924.

24. Barry NPE, Sadler PJ. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chem Comm* 2013; 49: 5106-5131.
25. Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* 2006; 312: 1175-1178.
26. Behrend L, Henderson G, Zwacka RM. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 2003; 31(6): 1441-1444.
27. Benias PC, Wells RG, Sackey-Aboagye B, Klavan H, Reidy J, Buonocore D, Miranda M, Kornacki S, Wayne M, Carr-Locke DL, Theise ND. Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues. *Sci Rep* 2018; 8(1): 4947.
28. Bergamo A, Sava G. Linking the future of anticancer metalcomplexes to the therapy of tumour metastases. *Chem Soc Rev* 2015; 44: 8818-8835.
29. Bienz M. APC. *Curr Biol* 2003; 13(6): R215-216.
30. Bing RJ, Miyataka M, Rich KA, Hanson N, Wang X, Slosser HD, Shi SR. Nitric oxide, prostanoids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11): 3385-3392.
31. Bishop DT, Thomas HJW. The genetics of colorectal cancer. *Cancer Surv* 1990; 4: 585-604.
32. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 6524-6536.
33. Bogojeski J, Jelic R, Petrovic D, Herdtweck E, Jones PG, Tamm M, Bugarcic ZD. Equilibrium studies of the reactions of palladium(II) bis(imidazolin-2-imine) complexes with biologically relevant nucleophiles. The crystal structures of [(TLtBu)PdCl]ClO<sub>4</sub> and [(BLiPr)PdCl<sub>2</sub>]. *Dalton Trans* 2011; 40: 6515-6523.
34. Boyer TD. The glutathione S-transferases: an update. *Hepatology* 1989, 9(3): 486-496.
35. Boyle P, Levin B. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008. Lyon: IARC Press.
36. Brabletz T, Jung A, Spaderna S. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 744-749.
37. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006; 6(2): 111-130.
38. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2012; 132(5): 1133-1145.

39. Brigelius-Flohé R, Kipp A. Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis, *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1555-1568.
40. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3289-3303.
41. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; 294(5545): 1337-40.
42. Buelna-Chontal M, Zazueta C. Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword? *Cell Signal* 2013; 25: 2548-2557.
43. Bugarčić ŽD, Bogojeski J, van Eldik R. Kinetics, mechanism and equilibrium studies on the substitution reactions of Pd(II) in reference to Pt(II) complexes with bio-molecules. *Coord Chem Rev* 2015; 292: 91-106.
44. Burgaud JL, Ongini E, del Soldato P. Nitric oxide-releasing drugs: a novel class of effective and safe therapeutic agents. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 360-371.
45. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogen* 2013; 34(3): 503-512.
46. Cancer Facts & Figures 2014. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2014.html>
47. Carmeliet P, Dor Y, Herbert J. Role of HIF-1α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-490.
48. Carrick S, Parker S, Thornton CE, Ghersi D, Simes J, Wilcken N. Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 15(2).
49. Cebula M, Schmidt EE, Arner ES. TrxR1 as a Potent Regulator of the Nrf2-Keap1 Response System. *Antioxid Redox Signal* 2015; 23: 823-853.
50. Chen HC. Boyden Chamber Assay. *Methods Mol Biol* 2005; 294: 15-22.
51. Chen Q, Espey MG, Krishna MC. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a prodrug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13604-13609.
52. Chorley BN, Campbell MR, Wang X, Karaca M, Sambandan D, Bangura F, Xue P, Pi J, Kleeberger SR, Bell DA. Identification of novel NRF2-regulated genes by CHIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 7416-7429.

53. Chu FF. The human glutathione peroxidase genes GPX2, GPX3, and GPX4 map to chromosomes 14, 5, and 19, respectively. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 66(2): 96-98.
54. Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses Ecadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2007; 26(5): 711-724.
55. Clark AG, Matic Vignjevic D. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 36: 13-22
56. Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Can* 2000; 37: 1-18.
57. Conklin KA. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Cancer chemotherapy and antioxidants *J Nutr* 2004; 134: 3201-3204.
58. Cruet-Hennequart S, Glynn MT, Murillo LS, Coyne S, Carty MP. Enhanced DNA-PK-mediated RPA2 hyperphosphorylation in DNA polymerase eta-deficient human cells treated with cisplatin and oxaliplatin. *DNA Repair* 2008; 7(4): 582-596.
59. Cvetković DM, Zivanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochem* 2017; 113: 85-94.
60. Čanović P, Bogojeski J, Košarić JV, Marković SD, Živanović MN. Pt(IV), Pd(II), and Rh(III) complexes induced oxidative stress and cytotoxicity in the HCT-116 colon cancer cell line. *Turk J Biol* 2017; 41: 141-147.
61. Das M, Livingstone SE. Cytotoxic action of some transition-metal chelate of schiffbases derived from S-methyldithiocarbamate. *Br J Cancer* 1978; 37: 466-469.
62. Dawood S, Merajver SD, Viens P, Vermeulen PB, Swain SM, Buchholz TA, Dirix LY, Levine PH, Lucci A, Krishnamurthy S, Robertson FM, Woodward WA, Yang WT, Ueno NT, Cristofanilli M. International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Ann Oncol* 2011; 22(3): 515-523.
63. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(7): 1289-1301.
64. Donzelli E, Carfi M, Miloso M, Strada A, Galbiati S, Bayssas M, Griffon-Etienne G, Cavaletti G, Petruccioli MG, Tredici G. Neurotoxicity of platinum compounds: Comparison

- of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol* 2004; 67(1-2): 65-73.
65. Douglas KT. Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1987; 59: 103-167.
66. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 30-38.
67. Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2009; 59(4): 459-469.
68. Đuran MI. Primena kompleksnih jedinjenja u medicini, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac 2000.
69. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174.
70. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003; 19(7): 362-365.
71. Eitel A, Scherrer M, Kümmerer K. Handling Cytostatic Drugs: A Practical Guide. Bristol-Myers-Squibb, 1999; ISBN 3000040323.
72. el-Bayoumy K, Chae YH, Upadhyaya P, Meschter C, Cohen LA, Reddy BS. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced tumors and DNA adduct formation in the mammary glands of female Sprague-Dawley rats by the synthetic organoselenium compound, 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Res* 1992; 52: 2402-2407.
73. Emmink BL, Laoukili J, Kipp AP, Koster J, Govaert KM, Fatrai S, Verheem A, Steller EJ, Brigelius-Flohé R, Jimenez CR, Borel Rinkes IH, Kranenburg O. GPx2 suppression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res* 2014; 74(22): 6717-6730
74. Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2014; 111: 817-822.
75. Esworthy RS, Doan K, Doroshov JH, Chu FF. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a human testis phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene* 1994; 144(2): 317-318.
76. Falandysz J, Lipka K. Selenium in mushrooms. *Roczn PZH* 2006; 57: 217-233

77. Falck E, Karlsson S, Carlsson J, Helenius G, Karlsson M, Klinga-Levan K. Loss of glutathione peroxidase 3 expression is correlated with epigenetic mechanisms in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Cell Int* 2010; 10(46): 1475-2867.
78. Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007; 15: 475-86.
79. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.
80. Ferrer-Sueta G, Radi R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 2009; 4: 161-177.
81. Fidler IJ, Singh RK, Yoneda J, Kumar R, Xu L, Dong Z, Bielenberg DR, McCarty M, Ellis LM. Critical determinants of neoplastic angiogenesis. *Cancer J* 2000; 6(3): S225-S236.
82. Fidler IJ, Kim SJ, Langley RR. The role of the organ microenvironment in the biology and therapy of cancer metastasis. *J Cell Biochem* 2007; 101: 927-936.
83. Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 89-96.
84. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 453-458.
85. Fini MA, Orchard-Webb D, Kosmider B, Amon JD, Kelland R, Shibao G, Wright RM. Migratory activity of human breast cancer cells is modulated by differential expression of xanthine oxidoreductase. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1008-1026.
86. Flohe L. Changing paradigms in thiology: from antioxidant defense toward redox regulation. *Methods Enzymol* 2010; 473: 1-39.
87. Freshney RI. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. New York: Alan R. Liss Inc. 1983.
88. Freudenberg LS, Rosenbaum-Krumme SJ, Bockisch A, Eberhardt W, Frilling A. Cancer of unknown primary. *Recent Results Cancer Res* 2008; 170: 193-202.
89. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 97-112.
90. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188(1): 11-19.



91. Gao E, Liu C, Zhu M, Lin H, Wu Q, Liu L. Current development of Pd(II) complexes as potential antitumor agents. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 356-368.
92. Gao E, Zhu M, Yin H, Liu L, Wu Q, Sun Y. Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity in vitro of dinuclear Pd(II) and Pt(II) complexes dibridged by 2,2'-azanediyldibenzoic acid. *J Inorg Biochem* 2008; 102: 1958-1964.
93. Gao Z, Chiao P, Zhang X, Zhang X, Lazar MA, Seto E, Young HA, Ye J. Coactivators and corepressors of NF-kappaB in IkappaB alpha gene promoter. *J Biol Chem* 2005; 280: 21091-21098.
94. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006; 25(51): 6680-6684.
95. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1493-1505.
96. Godet I, Gilkes DM. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther* 2017; 4(1): 10.15761/ICST.1000228.
97. Goldhaber SB. Trace element risk assessment: Essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 38: 232-242.
98. Green D. Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011.
99. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 2012; 31: 2448-2460.
100. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt. Ueber einige azoverbindungen. *Chem Ber* 1879; 12: 426-428.
101. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Hausmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
102. Guskova RA, Ivanov II, Koltover VK, Akhobadze VV, Rubin AB. Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radicals. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes* 1984; 778(3): 579-585.
103. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986; 201: 291-295.

104. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22(4): 191-197.
105. Halliwell B, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine. New York, NY, USA: Oxford University Press. 2006.
106. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272.
107. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
108. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
109. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 443-453.
110. Hatfield DL, Yoo MH, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1541-1545.
111. Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310: 824-829.
112. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 51-88.
113. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31: 273-300.
114. Hernández-Reséndiz S, Buelna-Chontal M, Correa F, Zazueta C. (April 25th 2012). Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Diseases, Oxidative Stress and Diseases Volodymyr Lushchak, IntechOpen, DOI: 10.5772/35005.
115. Herrmann JM, Dick TP. Redox Biology on the rise. *Biol Chem* 2012; 393: 999-1004.
116. Higashi Y, Pandey A, Goodwin B, Delafontaine P. Insulin-like growth factor-1 regulates glutathione peroxidase expression and activity in vascular endothelial cells: Implications for atheroprotective actions of insulin-like growth factor-1. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(3): 391-399.

117. 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.
118. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 593-600.
119. Howells C, West AK, Chung RS. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): evaluation of the biological function of growth-inhibitory factor in the injured and neurodegenerative brain. *FEBS J* 2010; 277: 2931-2939.
120. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/), based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.
121. Hsu HC, Thiam TK, Lu YJ, Yeh CY, Tsai WS, You JF, Hung HY, Tsai CN, Hsu A, Chen HC, Chen SJ, Yang TS. Mutations of KRAS/NRAS/BRAF predict cetuximab resistance in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* 2016; 7(16): 22257-70.
122. Hu R, Xu C, Shen G, Jain MR, Khor TO, Gopalkrishnan A, Lin W, Reddy B, Chan JY, Kong AN. Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett* 2006; 243: 170-192.
123. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, Bannai S, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 16023-16029.
124. Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, Fujisawa H, Otsuka F, Esumi H. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines. *Int J Cancer* 2003; 103(2): 161-168.
125. Ishikawa T, Yoshida N, Higashihara H, Inoue M, Uchiyama K, Takagi K, Handa O, Kokura S, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Different effects of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase on pulmonary or liver metastasis of colon cancer in mice. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20(5): 445-450.

126. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 313-322.
127. Iwai K. Diverse ubiquitin signaling in NF- $\kappa$ B activation. *Trends Cell Biol* 2012; 22(7): 355-364.
128. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
129. Jespersen C, Doller A, Akool el-S, Bachmann M, Müller R, Gutwein P, Mühl H, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Molecular mechanisms of nitric oxide-dependent inhibition of TPA-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MCF-7 cells. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 276-287.
130. Ji YB, Akerboom TPM, Sies H, Thomas JA. S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1999; 362: 67-78.
131. Johansson K, Cebula M, Rengby O, Dreij K, Carlström KE, Sigmundsson K, Piehl F, Arnér ESJ. Cross Talk in HEK293 Cells Between Nrf2, HIF, and NF- $\kappa$ B Activities upon Challenges with Redox Therapeutics Characterized with Single-Cell Resolution. *Antioxid Redox Sign* 2015; 26(6): 229-246.
132. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs-phenanthriplatin. *Anticancer Res* 2014; 34(1): 471-476.
133. Jones PL, Ping D, Boss JM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6970-6981.
134. Jurišić V, Živančević-Simonović S. Etiologija i patogeneza tumora. U: Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2002; 463-485.
135. Kairisalo M, Korhonen L, Blomgren K, Lindholm D. Xlinked inhibitor of apoptosis protein increases mitochondrial antioxidants through NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 138-144.
136. Karam JA. Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy. Netherlands: Springer. 2009.

137. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007; 115: 81-103.
138. Karoui H, Hogg N, Frejaville C, Tordo P, Kalyanaraman B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite-ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies. *J Biol Chem* 1996; 271: 6000-6009.
139. Kielczykowska M, Kocot J, Paździor M, Musik I. Selenium - a fascinating antioxidant of protective properties. *Adv Clin Exp Med* 2018; 27(2): 245-255.
140. Kim YJ, Ahn JY, Liang P, Ip C, Zhang Y, Park YM. Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology. *Cancer Res* 2007; 67: 546-554.
141. Kim NH, Oh MK, Park HJ, Kim IS. Auranofin, a gold(I)-containing antirheumatic compound, activates Keap1/Nrf2 signaling via Rac1/iNOS signal and mitogen-activated protein kinase activation. *J Pharmacol Sci* 2010; 113(3):246-54.
142. King RJB, Robins MW. *Cancer Biology*. 3rd ed., Pearson, Prentice Hall, Harlow, England, 2006.
143. Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, Protopopov AI, Kelve M, Kiss H, Kholodnyuk ID, Imreh S, Klein G, Zabarovsky ER. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogen Cell Genetics* 1998; 79(3-4): 228-230.
144. Klauning JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 239-267.
145. Klimova T, Chandel NS. Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 2008; 15: 660-666.
146. Klomsiri C, Karplus PA, Poole LB. Cysteine-Based Redox Switches in Enzymes. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(6): 1065-1077.
147. Konstantinovic S, Bugarcic Z, Milosavljevic S, Schroth G, Mihailovic MLJ. Regioselectivity in cyclofunctionalization of olefinic alcohols with benzeneselenenyle halides at different temperatures. *Liebigs Ann Chem* 1992; 3: 261-268.

148. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 1985; 57: 142-151.
149. Kostić MD, Divac VM, Bugarčić ZM. Electrophilic Selenocyclofunctionalization in the Synthesis of Biologically Relevant Molecules. *Curr Org Chem* 2016; 20: 1-14.
150. Košarić JV, Cvetković DM, Živanović MN, Čurčić MG, Šeklić DS, Bugarčić ZM, Marković SD. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran. *J BUON*; 2014; 19(1): 283–290.
151. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Free Radic. Mitochondria and reactive oxygen species. *Biol Med* 2009; 47: 333-343.
152. Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in hypoxia induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Resp Cell Molec Biol* 2005; 32: 395-403.
153. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 2003; 300: 1439-1443.
154. Kundu N, Zhang S, Fulton AM. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13: 16-22.
155. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 1989; 264: 9880-9884.
156. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, and Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem* 2003; 278: 8135-8145.
157. Lahiri M, Martin JH. Nitric oxide decreases motility and increases adhesion in human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2009; 21(2): 275-281.
158. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* 2004; 382: 511-517.

159. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11(2): 118-124.
160. Layman R, Olson K, Van Poznak C. Bisphosphonates for breast cancer: questions answered, questions remaining. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 341-367.
161. Leaver MJ, George SG. A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation. *Mar Env Res* 1998; 46(1-5): 71-74.
162. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Semin Canc Biol* 2005; 15: 277-289.
163. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 2007; 27: 41-61.
164. Lempers ELM, Reedijk J. Interactions of platinum amine compounds with sulfur-containing biomolecules and DNA fragments. *Coord Chem Rev* 1991; 37: 175-217.
165. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res* 2007; 17: 3-14.
166. Libutti SK, Willett CG, Salz LB, Levine RA. Chapter 60: Cancer of the rectum. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 10th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
167. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antiox Redox Signal* 2007; 9(1): 25-47.
168. Liou G-Y, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44(5): 1-31.
169. Lippert B. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Antitumor Drug. Zurich, Switzerland: Wiley-VCH. 1999.
170. Liu Q, Jin J, Ying J, et al. Frequent Epigenetic Suppression of Tumor Suppressor Gene Glutathione Peroxidase 3 by Promoter Hypermethylation and Its Clinical Implication in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. Cho WC, ed. *Int J Mol Sci* 2015; 16(5): 10636-10649.
171. Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1424-1428.
172. Lu DY, Lu TR, Cao S. Cancer metastases and clinical therapies. *Cell Dev Biol* 2012; 1: e110.

173. Lu DY, Lu TR, Wu HY. New Insights into Individualized Antimetastatic Therapy. *Adv Tech Biol Med* 2013; 1: 1
174. Lu DY, Lu TR. Antimetastatic activities and mechanisms of bisdioxopiperazine compounds. *Anti-Cancer Agent Med Chem* 2010; 10: 564-570.
175. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Rad Biol Med* 2014; 66: 75-87.
176. Lu J, Kaeck M, Jiang C, Wilson AC, Thompson HJ. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1531-1535.
177. Lu L, Oveson BC, Jo YJ, Lauer TW, Usui S, Komeima K, Xie B, Campochiaro PA. Increased expression of glutathione peroxidase 4 strongly protects retina from oxidative damage. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(4): 715–724.
178. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59.
179. Lu W, Ogasawara MA, Huang P. Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discov* 2007; 4: 67-73.
180. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009; 76(1): 1-18.
181. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 401–426.
182. Majkić-Singh N. Tumorski marker: biohemija i klasifikacija. *Jugoslov Med Biohem.* 2006; 25(2): 79-88.
183. Marković SD, Đaćić DS, Cvetković DM, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biol Trace Elem Res* 2011; 142: 660-670.
184. Marković SD, Đorđević NZ, Ćurčić MG, Štajn AŠ, Spasić MB. Biotransformation and nitroglycerin-induced effects on antioxidative defense system in rat erythrocytes and reticulocytes. *Gen Physiol Biophys* 2014; 33(4): 393-401
185. Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Spasić MB. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol Res* 2006; 55: 389-396.



186. Marković SD, Vukajlović MDj, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Jones DR, Spasić MB. A comparative study of the effects of molsidomine and 3-morpholinosydnonimine on redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 251-258.
187. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(3): 669-702.
188. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 577-586.
189. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 446-454.
190. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 2005; 90: 791-797.
191. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; 168(934): 939-49.
192. McGrath-Morrow S, Lauer T, Yee M, Neptune E, Podowski M, Thimmulappa RK, O'Reilly M, Biswal S. Nrf2 increases survival and attenuates alveolar growth inhibition in neonatal mice exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 296: L565-L573.
193. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 539-545.
194. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nature Neuroscience* 2003; 6(10): 1072-1078.
195. Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7: 693-701.
196. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(6): 449-458.
197. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220: 472-477.

198. Meng D, Yuan M, Li X, Chen L, Yang J, Zhao X, Ma W, Xin J. Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Lung Cancer* 2013; 81: 1-10.
199. Menhofer MH, Kubisch R, Schreiner L, Zorn M, Foerster F, Mueller R, Raedler JO, Wagner E, Vollmar AM, Zahler S. The actin targeting compound Chondramide inhibits breast cancer metastasis via reduction of cellular contractility. *PLoS One* 2014; 9(11): e112542.
200. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 924-935.
201. Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Ann Rev Genetics* 2009; 43: 335-367.
202. Milutinović M, Stanković M, Cvetković D, Maksimović V, Šmit B, Pavlović R, Marković S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with new-synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *J Food Biochem* 2015; 39(3): 238-250.
203. Mocellin S. Nitric oxide: cancer target or anticancer agent? *Curr Cancer Drug Targets* 2009; 9(2): 214-236.
204. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9926-9930.
205. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
206. Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res* 2008; 18: 343-349.
207. Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res* 2011; 21: 103-115.
208. Mori K, Shibamura M, Nose K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7464-7472.
209. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth* 1983; 65(1-2): 55-63.
210. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000; 346 (Pt 1): 1-8.

211. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-1149.
212. Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 768-784.
213. Nguyen DX, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 341-352.
214. Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278: 4536-4541.
215. Nilsson G, Sun X, Nyström C, Rundlöf AK, Fernandes AP, Björnstedt M, Dobra K. Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 874-885.
216. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008; 266: 53-59.
217. Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244: 37-42.
218. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
219. Nummela P, Yin M, Kielosto M, Leaner V, Birrer MJ, Hölttä E. Thymosin beta4 is a determinant of the transformed phenotype and invasiveness of S-adenosylmethionine decarboxylase-transfected fibroblasts. *Cancer Res* 2006; 66: 701-712.
220. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, Suzuki T, Kobayashi A, Yokota J, Sakiyama T, Shibata T, Yamamoto M, Hirohashi S. Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. *Cancer Res* 2008; 68: 1303-1309.
221. Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Petre A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther Advance* 2009; 16(1): 1-12.
222. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315-424.

223. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, Kang MI, Kobayashi A, Yokoyama S, Yamamoto M. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* 2006; 21: 689-700.
224. Pang RWC and Poon RTP. Clinical implications of angiogenesis in cancers. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2(2): 97–108.
225. Pavelescu LA. On reactive oxygen species measurement in living systems. *J Med Life* 2015; 8: 38-42.
226. Pelicano H, Carney D, Huang P. Ros stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7(2): 97-110.
227. Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 2003; 278: 37832-37839.
228. Perkins ND, Gilmore TD. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ* 2006; 13: 759-772.
229. Pervaiz S, Clement MV. Tumor intracellular redox status and drug resistance serendipity or a causal relationship? *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1969-1977.
230. Petrovic D, Hill LMR, Jones PG, Tolman WB, Tamm M. Synthesis and reactivity of copper(I) complexes with an ethylene-bridged bis(imidazolin-2-imine) ligand. *Dalton Trans* 2008; 21: 887-894.
231. Petrovic VP, Simijonovic D, Zivanovic MN, Kosaric JV, Petrovic ZD, Markovic S, Markovic SD. Vanillic Mannich bases: synthesis and screening of biological activity. Mechanistic insight into the reaction with 4-chloroaniline. *RSC Adv* 2014; 4: 24635-2464.
232. Petrovic VP, Zivanovic MN, Simijonovic D, Đorovic J, Petrovic ZD, Markovic SD. Study of the structure, prooxidative, and cytotoxic activity of some chelate copper(II) complexes. *Chem Pap* 2017; 71(11): 2075–2083.
233. Petrovic VP, Zivanovic MN, Simijonovic D, Dorovic J, Petrovic ZD, Markovic SD. Chelate N,O-palladium(ii) complexes: synthesis, characterization and biological activity. *RSC Adv* 2015; 5: 86274-86281.
234. Pham CG, Bubicic C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti FM, Torti SV, Franzoso G. Ferritin heavy chain upregulation

- by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell* 2004; 119: 529-542.
235. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Win AK, Baron JA, Lindor NM, Potter JD, Newcomb PA. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. *Br J Cancer* 2013; 108: 1757-1764.
236. Poklar N, Pilch DS, Lippard SJ, Redding EA, Dunham SU, Breslauer KJ. Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability, and energetics of a 20-mer DNA duplex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(15): 7606-7611.
237. Ponta H, Sleeman J, Herrlich P. Tumor metastasis formation: cell-surface proteins confer metastasis-promoting or -suppressing properties. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198(1): 1-10.
238. Popović O. Tumori tankog i debelog creva. U: Manojlović D. Interna medicina. III izdanje. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2003, str. 723-728.
239. Potters L, Cao Y, Calugaru E. A comprehensive review of CT-based dosimetry parameters and biochemical control in patients treated with permanent prostate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 605–614.
240. Probst BL, McCauley L, Trevino I, Wigley WC, Ferguson DA. Cancer Cell Growth Is Differentially Affected by Constitutive Activation of NRF2 by KEAP1 Deletion and Pharmacological Activation of NRF2 by the Synthetic Triterpenoid, RTA 405. *PLoS One* 2015; 10(8): e0135257.
241. Qi Y, Schoene NW, Lartey FM, Cheng WH. Selenium compounds activate ATMdependent DNA damage response via the mismatch repair protein hMLH1 in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 33010-33017.
242. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. Unraveling peroxy-nitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 463–488.
243. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98: 2572-2579.
244. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 678-85.

245. Renschler MF. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1934-40.
246. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49(11): 1603-1616.
247. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1543-1552.
248. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 1999; 31: 53-59.
249. Ridnour LA, Thomas DD, Switzer C, Flores-Santana W, Isenberg JS, Ambs S, Roberts DD, Wink DA. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer. *Nitric Oxide* 2008; 19(2): 73-76.
250. ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. *F1000Res* 2016; F1000 Faculty Rev-783. 5
251. Rodriguez-Hernandez I, Cantelli G, Bruce F, Sanz-Moreno V. Rho,
252. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med* 1999; 4: 223-230.
253. Rojo AI, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci* 2004; 24: 7324-7334.
254. Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord Chem Rev* 2007; 251: 1633-1648.
255. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 1965; 205(4972): 698-699.
256. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179: 588-590.
257. Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP, Freeman BA. Nitric oxide reaction with lipid peroxy radicals spares alpha-tocopherol during lipid

- peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alphatocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem* 2000; 275: 10812-10818.
258. Rudd GN, Hartley JA, Souhami RL. Persistence of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinking in peripheral blood mononuclear cells from elderly and young individuals. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 35(4): 323-326.
259. Ryoo I, Kim G, Choi B, Lee S, Kwak M. Involvement of NRF2 signaling in doxorubicin resistance of cancer stem cell-enriched colonospheres. *Biomol Ther (Seoul)* 2016; 24(5): 482-488.
260. Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kimata J, Kinumi T, Yoshida Y, Noguchi N, Niki E. Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 2006; 40: 619-630.
261. Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 9649-9672.
262. Santen RJ. Risk of breast cancer with progestins: critical assessment of current data. *Steroids* 2003; 68: 953-964.
263. Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, Catalano V, Quadri A, Zorzi F, Berardi R, Biscotti T, Labianca R, Falcone A, Cascinu S. Nuclear factor- $\kappa$ B tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(25): 3930-3935.
264. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30(11): 1191-1212.
265. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols* 2008; 3(6): 1101-1108.
266. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10: 2247-2258.
267. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011; 331: 1565-1570.

268. Seklic S, Stankovic MS, Milutinovic MG, Topuzovic MD, Stajn AS, Markovic SD. Cytotoxic, antimigratory, pro- and antioxidative activities of extracts from medicinal mushrooms on colon cancer cell lines. *Arch Biol Sci* 2016; 68(1): 93-105.
269. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474-1480.
270. Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1082-1087.
271. Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22(2-3): 145-152.
272. Simone AO, Kathryn FT. Genomic organisation and alternative splicing of mouse and human thioredoxin reductase 1 genes. *BMC Genomics* 2001; 2: 10.
273. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, Herman JG, Baylin SB, Sidransky D, Gabrielson E, Brock MV, Biswal S. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PloS Med* 2006; 3(10): 1865-1876.
274. Sosaa V, Molinéa T, Somozaa R, Paciuccib R, Kondohc H, Lleonarta ME. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 376-390.
275. Stanković M, Ćurčić M, Žižić J, Topuzović M, Solujić S, Marković S. Teucrium plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 4190-4205.
276. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann NY Acad Sci USA* 2008; 1147: 37-52.
277. Stehn JR, Haass NK, Bonello T, Desouza M, Kottyan G, Treutlein H, Zeng J, Nascimento PR, Sequeira VB, Butler TL, Allanson M, Fath T, Hill TA, McCluskey A, Schevzov G, Palmer SJ, Hardeman EC, Winlaw D, Reeve VE, Dixon I, Weninger W, Cripe TP, Gunning PW. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. *Cancer Res* 2013; 73: 5169-5182.
278. Stevović DM. Karcinomi kolona i rektuma. U: Dragović M, Gerzić Z. Osnovi hirurgije. Beograd, Medicinska knjiga, 1994.
279. Stone NN, Stock PG. Complications following permanent prostate brachytherapy. *Eur Urology* 2002; 41: 427-433.



280. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270: 296-299.
281. Šmit B, Pavlović RZ, Radosavljević-Mihailović A, Došen A, Ćurčić MG, Šeklić DS. and Živanović MN. Synthesis, characterization and cytotoxicity of a palladium(II) complex of 3-[(2-hydroxybenzylidene)amino]-2-thioxoimidazolidin-4-one. *J Serb Chem Soc* 2013; 78(2): 217–227.
282. Šmit BM, Pavlović RZ. Three-step synthetic pathway to fused bicyclic hydantoins involving a selenocyclization step. *Tetrahedron* 2015; 71: 1101-1108.
283. Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2010; 45(12): 1201-1211.
284. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* 2011; 16: 123-140.
285. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-421.
286. Tannert R, Milroy LG, Ellinger B, Hu TS, Arndt HD, Waldmann H. Synthesis and structure-activity correlation of natural-product inspired cyclodepsipeptides stabilizing F-actin. *J Am Chem Soc* 2010; 132: 3063–3077.
287. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 134-144.
288. Tew GW, Lorimer EL, Berg TJ, Zhi H, Li R, Williams CL. SmgGDS regulates cell proliferation, migration, and NF-kappa B transcriptional activity in non-small cell lung carcinoma. *J Biol Chem* 2007; 283(2): 963-976.
289. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2002; 62: 5196-5203.
290. Thompson JW, Narayanan SV, Perez-Pinzon MA. Redox signaling pathways involved in neuronal ischemic preconditioning. *Curr Neuropharmacol* 2012; 10: 354-369.

291. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: A review. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58: 391-402.
292. Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1486-1500.
293. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev* 2009, 8: 579-591.
294. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration. *Compr Physiol* 2012; 2(4): 2369-2392.
295. Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Hart IR, Grant SS, Liotta LA. Expression of collagenase IV (basement membrane collagenase) activity in murine tumor cell hybrids that differ in metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 99-103.
296. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552(Pt 2): 335-344.
297. Ungvári É, Monori I, Megyeri A, Csiki Z, Prokisch J, Sztrik A, Jávora A, Benkő I. Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food Chem Toxicol* 2014; 64: 298-306.
298. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002; 106: 981-986.
299. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumannv, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.
300. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147: 275-292.
301. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40
302. Van Goietsenoven G, Mathieu V, Andolfi A, Cimmino A, Lefranc F, Kiss R, Evidente A. In vitro growth inhibitory effects of cytochalasins and derivatives in cancer cells. *Planta Med* 2011; 77: 711-717.
303. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 2015; 6: 334-343.

304. Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–1351.
305. Vibet S, Goupille C, Bougnoux P, Steghens JP, Gore J, Maheo K. Sensitization by docosahexaenoic acid (DHA) of breast cancer cells to anthracyclines through loss of glutathione peroxidase (GPx1) response. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1483-1491.
306. Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 2012; 7(4): 597–615.
307. Wallenberg M, Misra S, Wasik AM, Marzano C, Bjornstedt M, Gandin V, Fernandes AP. Selenium induces a multi-targeted cell death process in addition to ROS formation. *J Cell Mol Med* 2014; 18(4): 671-684.
308. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514.
309. Wang XJ, Sun Z, Villeneuve NF, Zhang S, Zhao F, Li Y, Chen W, Yi X, Zheng W, Wondrak GT, Wong PK, Zhang DD. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* 2008; 29(6): 1235-1243.
310. Weekley CM, Harris HH. Which form is that? The importance of selenium speciation and metabolism in the prevention and treatment of disease. *Chem Soc Rev* 2013; 42: 8870-8894.
311. Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Rev Cancer* 2005; 5: 591-602.
312. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed., Garland Science, New York and London, 2014.
313. Wilkins SE, Abboud MI, Hancock RL, Schofield CJ. Targeting protein–protein interactions in the HIF system. *Chem Med Chem* 2016; 11: 773-786.
314. Williams CJ, Whitehouse JM. Cis-platinum: a new anticancer agent. *Br Med J* 1979; 1(6179): 1689-1691.
315. Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase±polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in Vitro*. *Anal Biochem* 1999; 270: 41-49.

316. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
317. Wolff AC, Domchek SM, Davidson NE, Sacchini V, McCormick B. Chapter 91: Cancer of the Breast. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, eds. *Abeloff's Clinical Oncology*. 5th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier; 2014.
318. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(12): 3013-3069.
319. Wu B, Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012; 33: 656-668.
320. Wu Z, Li X, Sunkara M, Spearman H, Morris AJ, Huang C. PIPKIgamma regulates focal adhesion dynamics and colon cancer cell invasion. *PLoS One* 2011; 6(9): e24775.
321. Wycherly BJ, Moak MA, Christensen MJ. High dietary intake of sodium selenite induces oxidative DNA damage in rat liver. *Nutr Cancer* 2004; 48: 78-83.
322. Xia C, Hu J, Ketterer B, Taylor JB. The organization of the human GSTP1-1 gene promoter and its response to retinoic acid and cellular redox status. *Biochem J* 1996; 313(Pt1): 155-161.
323. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2(9): 823-830.
324. Xie K, Dong Z, Fidler IJ. Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 1996; 59(6): 797-803.
325. Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, Nathan C, Fidler IJ. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 1995; 181(4): 1333-1343.
326. Yang J, Pan WH, Clawson GA, Richmond A. Systemic targeting inhibitor of kappaB kinase inhibits melanoma tumor growth. *Cancer Res* 2007; 67(7): 3127-3134.
327. Yao KS, Hageboutros A, Ford P, O'Dwyer PJ. Involvement of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB transcription factors in the control of the DT-diaphorase expression induced by mitomycin C treatment. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 422-430.

328. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 629-642.
329. Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 497-503.
330. Yoshinari A, Tazawa A, Kuwata S, Ikariya T. Synthesis, structures, and reactivities of pincer-type ruthenium complexes bearing two proton-responsive pyrazole arms. *Chem Asian J* 2012; 7: 1417-1425.
331. Youlden DR, Cramb SM, Yip CH, Baade PD. Incidence and mortality of female breast cancer in the Asia-Pacific region. *Cancer Biol Med* 2014; 11(2): 101–115.
332. Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K. Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. *APMIS* 2010; 118(2): 115-124.
333. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 2000; 88: 2606-2618.
334. Zhang B-N, Cao X-C, Chen J-Y, Chen J, Fu L, Hu X-C, Jiang Z-F, Li H-Y, Liao N, Liu D-G, Tao O, Shao Z-M, Sun Q, Wang S, Wang Y-S, Xu B-H, Zhang J. Guidelines on the diagnosis and treatment of breast cancer (2011 edition). *Gland Surgery* 2012; 1(1): 39-61.
335. Zhang L, Li J, Zong L, Chen X, Chen K, Jiang Z, Nan L, Li X, Li W, Shan T, Ma Q, Ma Z. Reactive Oxygen Species and Targeted Therapy for Pancreatic Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 1616781.
336. Zhou N, Xiao H, Li TK, Nur EKA, Liu LF. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *J Biol Chem* 2003; 278: 29532-29537.
337. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 2007; 80: 51-60. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim Biophys Acta (BBA)–Bioenergetics* 2006; 1757: 509-517.
338. Živanović MN, Košarić JV, Šmit B, Šeklić DS, Pavlović RZ, Marković SD. Novel seleno-hydantoin palladium(II) complex – antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *Gen Physiol Biophys* 2017; 36(2): 187-196.

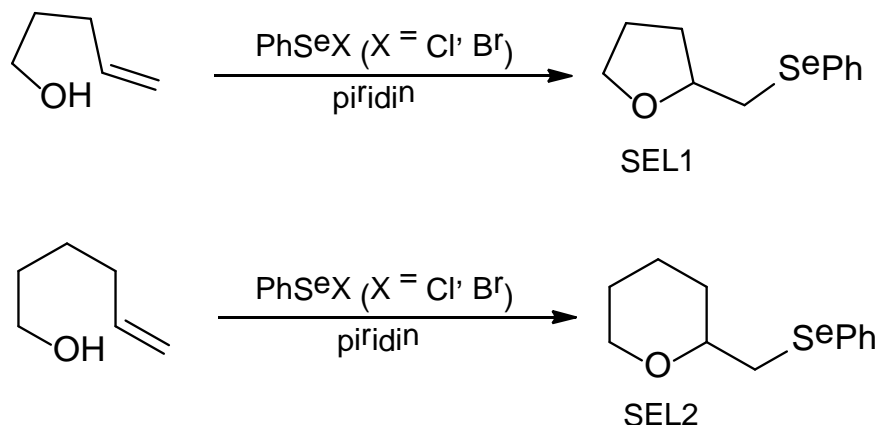
## ПРИЛОЗИ

### Прилог 1

#### Синтеза 2-(фенилселенометил)тетра-хидрофурана (SEL1) и

#### 2-(фенилселенометил)тетра-хидропирана (SEL2)

Фенилселеноетри, 2-(фенилселенометил)тетра-хидрофуран и 2-(фенилселенометил)тетра-хидропиран, добијени су од одговарајућих алкохола пент-4-ен-1-ол и хекс-5-ен-1-ол и PhSeCl или PhSeBr у присуству пиридина (Шема 14) (Konstantinovic и сар., 1992). Раствору алкенола (0.086 g пент-4-ен-1-ол и 0.100 g хекс-5-ен-1-ол, 1 mmol) и пиридина (0.079 g, 1 mmol) у сувом дихлорметану (5 cm<sup>3</sup>) додат је чврсти PhSeCl (0.212 g, 1.1 mmol) или PhSeBr (0.260 g, 1.1 mmol) на собној температури. Реакција је трајала неколико минута. Жути раствор испиран је са 1 M HCl, затим zasiћеним воденим раствором NaHCO<sub>3</sub> и водом. Органски слој сушен је изнад безводног Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Продукти су добијени у квантитативном приносу након елуирања трагова дифенил диселенида на колони силика гела дихлорметаном. Продукти су окарактерисани и идентификовани на основу спектралних података.

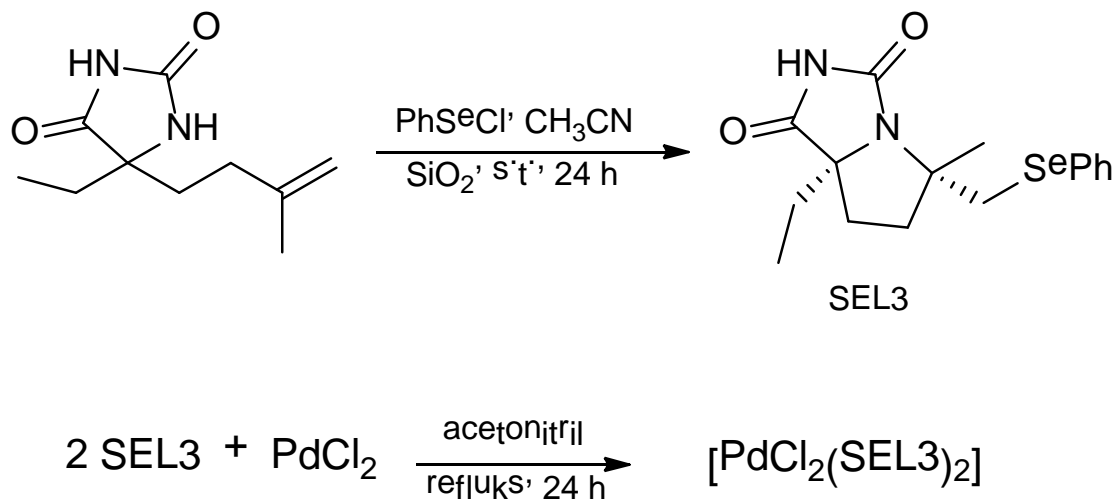


Шема 14. Фенилселеноестерификација пент-4-ен-1-ол и хекс-5-ен-1-ола.

Анализе на гасно-течној хроматографији (GLC) извођене су на Deni instrument, модел 2000 (Наап, Germany) на неполярној колони.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR спектри снимљени су у  $\text{CDCl}_3$  на Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометру. IR спектри добијени су на спектрофотометрима Perkin-Elmer Model 137B и Nicolet 7000 FT (Waltham, Massachusetts, USA). Микроанализа изведена је у лабораторији “Dornis and Colbe” (Höhenweg, Germany). Танкослојна хроматографија (TLC) извођена је на 0.25 mm E. Merck силика гел плочама (60F-254) уз употребу UV светла за визуелизацију мрља. За хроматографију на колони коришћен је E. Merck силика гел (60, particle size 0.063-0.200 mm).

### Синтеза SEL3 и његовог Pd(II) комплекса SEL4

Синтеза лиганда SEL3, селено деривата бицикличног хидантоина (*cis*-7a-етил-5-метил-5-фенилселанилметилтетрахидро-пироло[1,2-с]имидазол-1,3-дион), приказана је на Шеми 15 (Šmit и Pavlović, 2015). У реакцији овог лиганда са  $\text{PdCl}_2$ , награђен је SEL4, комплекс  $\text{PdCl}_2(\text{SEL3})_2$  стехиометрије. Раствор 17.7 mg (0.1 mM)  $\text{PdCl}_2$  у ацетонитрилу (15 ml) загреван је 2 сата на температури кључања растварача. Жуто обојени раствор охлађен је на собну температуру и у тај раствор је додато 70.3 mg (0.2 mM) лиганда SEL3 раствореног у ацетонитрилу (2.5 ml) кап по кап. Реакциона смеша је мешана следећа 24 сата. Добијени жути прах филтриран је и осушен у приносу од 60.9 mg (69%). Структура комплекса SEL4 потврђена је на основу елементалне анализе и спектралних података.



Шема 15. Синтеза SEL3 и SEL4

## Прилог 2

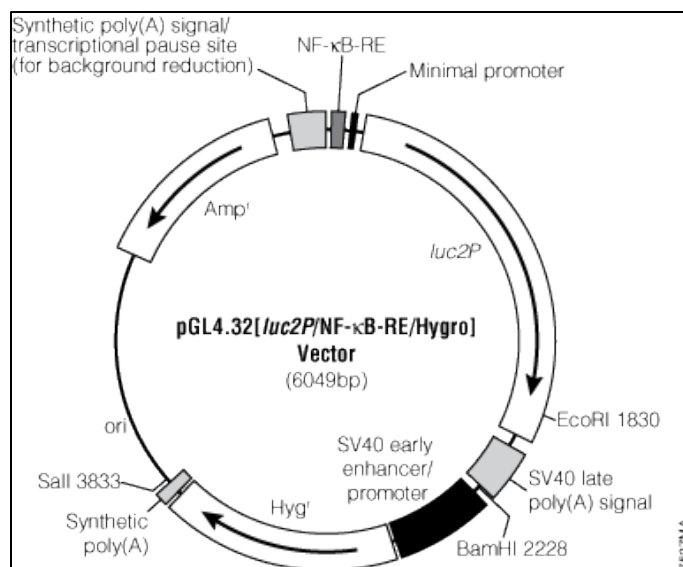
### **Одређивање активности транскрипционих фактора Nrf2, TNF $\alpha$ и NF- $\kappa$ B употребом pTRAF вектора и анализа Operetta системом**

Ћелије канцера испољавају промењени редокс статус у односу на здраве ћелије. У том смислу, синергија различитих сигналних путева у различитим условима (нпр. током третмана активним супстанцама) није довољно испитана. Употреба pTRAF вектора даје допринос у бољем разумевању ове проблематике. НСТ-116 ћелије стабилно су трансфектоване pTRAF репортером који нам омогућава праћење редокс регулисаних транскрипционих фактора Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B у реалном времену у резолуцији појединачне ћелије. Трансфекција ћелија изведена је помоћу pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF $\kappa$ B</sup> вектора који садржи промоторске елементе активације Nrf2, HIF и NF- $\kappa$ B непосредно испред секвенци које кодирају три флуоресцентна протеина mCherry, YPet и CFP.

### **Конструкција pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF- $\kappa$ B</sup> вектора**

pGL4.32 (Promega) вектор који садржи NF- $\kappa$ B елементе који регулишу транскрипцију гена луциферазе *luc2P* коришћен је као основа за клонирање различитих плаزمида коришћених у нашим експериментима (Шема 16) (Johansson и сар., 2015). Четири копије Nrf2 елемента – ARE (енгл. *Antioxidant Response Element*): TGCAAAATCGCAGTCACAGTGACTCAGCAGA ATCTGAGCCTAGG) секвенце гена NAD(P)H:хинон редуктазе 1 (NQO1) и четири копије HIF елемента (HRE: GATCGCCCTACGTGCTGTCTCA) секвенце гена еритропоетина (EPO) синтетисани су са 3' *NheI* крајем и 5' *BglIII* крајем (наручени од BlueHeron). Плазмиди су припремљени Qiagen китовима, за шта је коришћена *Escherichia coli* MachI култивисана у LB медијуму са додатком 100  $\mu$ g/ml ампицилина.





**Шема 16.** pGL4.32 вектор (Promega) кодира ген за NF-κB, луциферазу (*luc2P*) и хигромицин.

Вектори са само једним елементом, тј. једним промотором испитиваног гена називани су на основу испитиваног гена и одговарајућег елемента одговора: pGL4.[испитивани ген]<sup>[Елемент одговора/промотор]</sup>. Плазмид са три елемента одговора који у исто време кодира три различита флуоресцентна протеина (mCherry, YPet и CFP) названи су скраћеницом pTRAF, уз одговарајуће елементе одговора: pTRAF<sup>[Елемент одговора 1, 2, 3]</sup>.

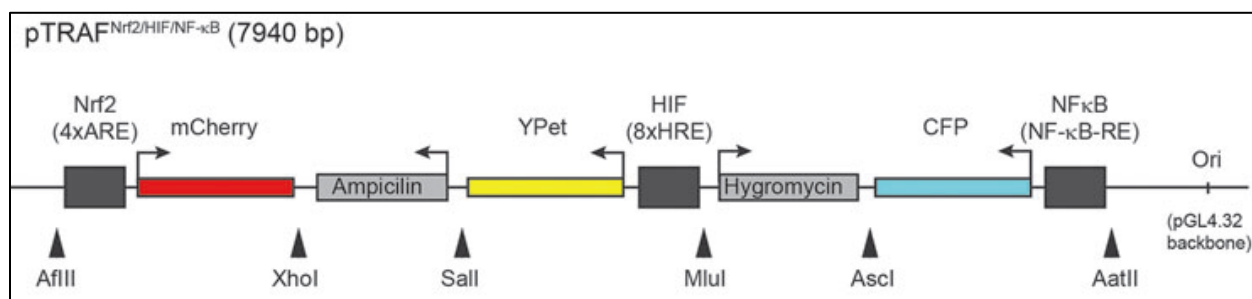
Коришћењем pGL4.32 вектора као основе, NF-κB елемент одговора замењен је са 4 копије ARE (Nrf2 елемент одговора) и са 4 копије HRE (HIF елемент одговора) дајући векторе pGL4.luc2P<sup>Nrf2</sup> и pGL4.luc2P<sup>HIF</sup>. За ово клонирање коришћене су рестриктазе *NheI* и *BglII* (Шема 17).

**Шема 17.** Шема плазида. Ова шема илуструје конструкцију коришћених плазида са информацијама о рестрикционим местима и функционалним генским елементима. На слици је означено *Ori* место (енгл. *Origin of replication*), док су гени одговорни за резистенцију према антибиотику означени светло сивом бојом. Смер транскрипције назначен је стрелицом.

А) Извор секвенци различитих елемената одговора за Nrf2, HIF и NF-κB.

Елемент одговора (RE)	Секвенце репетиција	Извор
Nrf2: 4xARE	4xTGCAAAAATCGCAGTCACAGTGA AGCAGAATCTGAGCCTAGG	H-NQO1 (NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза 1)
HIF: 4xHRE 8xHRE	4xGATCGCCCTACGTGCTGTCTCA 8xGATCGCCCTACGTGCTGTCTCA	H-EPO (људски еритропоетин)
NF-κB: NF-κB-RE	3xGGGAATTTC + 2xGGGGACTTTC	Pgl4.32 вектор (Promega)

Б) pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> вектор



**Замена гена луциферазе у pGL4.luc2P<sup>Nrf2</sup>, pGL4.luc2P<sup>HIF</sup> и pGL4.32 са генима за mCherry и замена 4 копије са 8 копија HRE елемента**

Luc2P ген у pGL4.luc2P<sup>Nrf2</sup>, pGL4.luc2P<sup>HIF</sup> и pGL4.32 замењени су са mCherry употребом стандардних PCR техника. Стога, новосинтетисани вектори садрже mCherry ген на позицији коју је претходно заузимао luc2P ген. Како би се појачала транскрипциона активност HRE елементи су дуплирани са 4 на 8 копија.

mCherry ген у pGL4.mCherry<sup>HIF</sup> и pGL4.mCherry<sup>NF-κB</sup> плазмидима замењени су генима за YPet и CFP.

**Конструкција pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> вектора**

Генски региони pGL4.mCherry<sup>Nrf2</sup>, pGL4.YPet<sup>HIF</sup> и pGL4.CFP<sup>NF-κB</sup> који обухватају елементе одговора, као и гене флуоресцентних протеина третирали су као засебне јединице. Ове Nrf2-mCherry, HIF-YPet и NF-κB-CFP јединице клониране су у основни pGL4.32 вектор. Nrf2-mCherry јединица инсертована је преко AfIII и XhoI рестрикционих места, NF-κB-CFP преко AatII и AscI, а HIF-YPet преко MluI и SalI, чинећи коначни pTRAF<sup>Nrf2/HIF/NF-κB</sup> вектор (Шема 12).

**Третман**

У циљу испитивања транскрипционе активности коришћене су нетоксичне концентрације испитиваних ОСЈ и једињења позитивне контроле. У том смислу, једињења селена аплицирана су у концентрацијама 0.5, 1 и 5  $\mu\text{M}$ . Једињења позитивне контроле: ауранофин (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{TNF}\alpha$  (5 ng/ml) и DMOG (250  $\mu\text{M}$ ). Нетретиране ћелије служе као негативна контрола.

Тест вијабилности рађен је коришћењем Hoechst (33342; Life technologies) боје.

**Анализа Operetta системом**

НСТ-116 ћелије су засејане у 96-well плоче обложене колагеном у броју од 20.000 ћелија по бунарићу 24 сата пре трансфекције. Ћелије су трансфековане помоћу 0,02  $\mu\text{g}$  ДНК, 5  $\mu\text{l}$  OptiMEM и 0,04  $\mu\text{l}$  Turbo-Fect раствора (55  $\mu\text{l}$  медијума укупно) и остављене да инкубирају преко ноћи. Након 24 сата, ћелије су третиране испитиваним супстанцама уз додатну инкубацију од 24 сата. Ћелије су припремљене за анализу додатком 40 ng/ml Hoechst боје 30 минута за добро обојење једара. Након тога, ћелије су фиксиране 2% леденим параформалдехидом и остављене 10 минута на собној температури. У бунариће је затим додат PBS и плоче су остављене у фрижидеру до анализе. Компјутерски програми Columbus (PerkinElmer), ImageJ и Excel (Microsoft) коришћени су за анализу података добијених помоћу система *Operetta high-content imaging systems*. Овим програмима обрађене су флуоресцентне фотографије и израчунат интензитет флуоресценције у свакој ћелији. Флуоресцентни микроскоп AxioVert 40 CFL (Zeiss) коришћен је за праћење ћелија. За квантификацију у резолуцији појединачне ћелије коришћено је снимање по 7 поља у сваком бунарићу. Снимане су обе стране, као и центар. Коришћена је како светлосна микроскопија, тако и 4 филтера за детекцију флуоресценце: сигнали за mCherry, YPet, CFP и Hoechst (Johansson и сар., 2015).

## **БИОГРАФИЈА**

**Јелена В. Кошарић**, студент докторских студија у Лабораторији за молекуларну и ћелијску биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, рођена је 16.12.1979. године у Крагујевцу (Република Србија). Основну и средњу Медицинску школу са одличним успехом завршила је у Крагујевцу.

Дипломске академске студије Биологје уписала је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, школске 1998/99. године. Дипломирала је 2006. године, са просечном оценом 8,18 и одбранила дипломски рад под називом "Различити погледи и осврт на развој вишећелијских животиња" са оценом 10, чиме је стекла звање дипломирани биолог.

Специјалистичке академске студије уписала је школске 2005/06. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на смеру Органска хемија и одбранила специјалистички рад под називом „Селен у људском организму и органским синтезама“, чиме је стекла звање специјалисте хемијских наука.

Последипломске - докторске академске студије Биологије уписала је школске 2009/10. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на смеру Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

У периоду од 2011. до 2017. године учествовала је на конференцијама и у научним радионицама као део тима Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију.

**Јелена В. Кошарић** се успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу. Овладала је савременим техникама и методама које за циљ имају испитивање значаја физиолошких, генетичких, молекуларно-биолошких и туморских маркера у процени ефеката активних супстанци и предвиђању патолошких стања код људи. Способна је да самостално планира и изводи експерименте, обрађује и презентује резултате.

У периоду март - децембар 2016. део својих истраживања, у оквиру дисертације, спровела је на Каролинска институту, Департману за биохемију у тиму професора Арнера Елиаса, а под непосредним руководством др Катарине Јохансон, где је овладала новим техникама потребним у анализи утицаја селенских деривата на ћелије канцера хуманог порекла.

**Јелена В. Кошарић** је поносна мајка Уне од 3 и Андреја од 7 година.

## БИБЛИОГРАФИЈА

Резултати научно-истраживачког рада кандидата **Јелене В Кошарић** објављени су у оквиру **6 библиографских јединица**, од чега 4 рада у међународним научним часописима (у врхунским М21–1 рад, водећим М22–1 рад, међународним М23–2 рада), и 2 конгресна саопштења: 1 саопштење на међународном научном скупу (штампано у изводу М34–1) и 1 саопштење на националном научном скупу (штампано у изводу М64–1).

### **А. Научни радови објављени у научним часописима међународног значаја (SCI, М20):**

#### **Врхунски међународни часописи - М21 (8 бодова)**

1. Petrovic VP, Simijonovic D, Zivanovic MN, **Kosaric JV**, Petrovic ZD, Markovic S, Markovic SD. Vanillic Mannich bases: synthesis and screening of biological activity. Mechanistic insight into the reaction with 4-chloroaniline. *RSC Adv* 2014; 4: 24635-2464. ISSN: 2046-2069. IF<sup>2014</sup> 3.907

#### **Истакнути међународни часописи - М22 (5 бодова)**

2. Čanović P, Bogojeski J, **Košarić JV**, Marković SD, Živanović MN. Pt(IV), Pd(II), and Rh(III) complexes induced oxidative stress and cytotoxicity in the HCT-116 colon cancer cell line. *Turk J Biol* 2017; 41:141-147. ISSN: 1300-0152. IF<sup>2016</sup> 1.038

#### **Међународни часописи -М23 (3 бода)**

3. **Košarić JV**, Cvetković DM, Živanović MN, Ćurčić MG, Šeklić DS, Bugarčić ZM, Marković SD. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran. *J BUON* 2014; 19(1): 283–290. ISSN: 1107-0625. IF<sup>2014</sup> 0.741
4. Živanović MN, **Košarić JV**, Šmit B, Šeklić DS, Pavlović RZ, Marković SD. Novel Seleno-Hydantoin Palladium(II) Complex – Antimigratory, Cytotoxic and Prooxidative Potential on Human Colon HCT-116 and Breast MDA-MB-231 Cancer Cells. *Gen Physiol Biophys* 2017; 36(2):187-196. ISSN 0231-5882. IF<sup>2016</sup> 1.170

### **Б. Саопштења на научним конференцијама међународног значаја, штампана у изводу (М34)**

5. Živanović MN, Cvetković DM, **Košarić JV**, Ćurčić MG, Šeklić DS, Bugarčić ZM, Marković SD. Antioxidative Effects of Novel Selenium Compounds. Congress IUBMB-FEBS Sevilla, Spain. FEBS Journal - Special Issue, 2012. ISSN: 1742-4658

### **В. Саопштења на научним конференцијама националног значаја, штампана у изводу (М64)**

6. Živanović MN, **Košarić JV**, Šeklić DS, Cvetković D, Ćurčić MG, Sukdolak S, Marković SD. Citotoksični i antioksidativni-prooksidativni efekti derivata kumarina na ćelijskoj liniji humanog kolon kancera HCT-116. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, стр. 68. ISBN: 978-86-912893-2-4.

## БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



### КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	<b>Јелена В. Кошарић</b>
Ментор	Доц. др Снежана Марковић
Наслов рада	<b>Испитивање молекуларних механизма дејства неких органоселенских једињења на редокс статус ћелија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231.</b>
Језик публикација	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски / Енглески
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2018.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	34 000 Крагујевац, Радоја Домановића 12
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Физиологија животиња и молекуларна биологија
Предметна одредница/кључне речи	Биологија, Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, Карцином дојке, Карцином колона
Чува се	Библиотека Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

## РЕЗИМЕ

Канцер је комплексна болест која је веома варијабилна у својој појави, развоју и исходу од једног пацијента до другог. То је сложени процес током којег ћелије подлежу дубоким метаболичким променама као што су неконтролисано размножавање, избегавање надзора од стране имуног система и инвазија до удаљених ткива уз формирање метастаза. Канцер је један од главних узрока морбидитета и морталитета у целом свету. Антиканцерогена једињења не морају испољавати цитотоксични карактер, већ је некада важније да поседују антиинвазивни и антиметастатски потенцијал. Нпр. карциноми колона и дојке (због физичке доступности) у данашњим условима лако се третирају. Међутим, метастатски потенцијал ове две врсте карцинома је изразит и сврстава их у изузетно агресивне. У том смислу, када је реч о третману карцинома дојке и колона, садашња медицина исказује потребу за новим антиметастатским лековима. Органоселенска једињења, ОСЈ позната су углавном по свом антиоксидационом дејству. Са друге стране постоје и ОСЈ са изразито прооксидационим особинама. На основу претходног искуства и литературних података, у зависности од хемијске структуре могуће је предвидети оквирно дејство одређеног селено-једињења. Претпоставка је да ће ОСЈ координовано као лиганд у комплексу са паладијумом(II) реаговати цитотоксично и прооксидационо. Редокс равнотежа је веома осетљива, како у здравим, тако и у ћелијама канцера. Најмања промена било ког од многобројних параметара утиче на целу каскаду протеина и малих молекула у ћелији померајући ову равнотежу у једном од могућа два смера, прооксидационом и антиоксидационом. Стога, промена у хемијској структури ОСЈ, као и у концентрацији третмана, може изазвати сасвим другачији одговор на молекуларном нивоу ћелије. Хемијска једињења могу бити донори и/или акцептори електрона у зависности од хемијске структуре. Уколико одређено хемијско једињење поседује потенцијал да отпусти електрон, формирајући слободне радикале, може се очекивати системски одговор ћелије у супротном смеру. (Де)активација глутатионског система на нивоу генске и протеинске експресије значајно је модулисана утицајем примењеног хемијског једињења и значајно утиче на судбину ћелије.

Циљ докторске дисертације је да се у *in vitro* условима испитају молекуларни механизми утицаја неких ОСЈ на редокс статус имортализованих ћелијских линија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231. Евалуација утицаја ОСЈ на вијабилност ћелија карцинома урађена је помоћу МТТ теста, а испитивање антимигрантног потенцијала ОСЈ помоћу *Transwell* теста за миграцију. Испитивање ефеката ОСЈ на концентрацију супероксид анјон радикала (NBT тест), нитрита (Griess тест), глутатиона (GSH тест) извршено је колориметријским методама, док је протеинска експресија индуцибилне азот моноксид синтетазе (iNOS) детектована имунофлуоресцентном микроскопском методом. Помоћу квантитативне PCR (qPCR) методе одређивани су ефекти ОСЈ на експресију и РНК циљаних гена за селено-ензиме глутатионског и тиоредоксин система - глутатион пероксидазе (*GPX1*, 2, 3, 4, 6), глутатион-S-трансферазе (*GST*) и тиоредоксин редуктазе (*TXNRD*) у НСТ-116 ћелијама. У истим ћелијама, испитивани су ефекти ОСЈ на активност Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора и њихове међусобне повезаности, флуоресцентном методологијом трансфекцијом pTRAF вектора у резолуцији једне ћелије и анализом *Operetta* системом.

Резултати показују да једињења SEL1 и SEL2 стимулишу пролиферацију испитиваних ћелија, док SEL3 и SEL4 делују цитотоксично. ОСЈ углавном повећавају миграциони

потенцијал испитиваних НСТ-116 ћелија, док на метастатским MDA-MB-231 ћелијама делују антимигранторно. Резултати параметара оксидационог стреса показују да једињења SEL1 и SEL2 делују антиоксидационо, док SEL3 и SEL4 делују прооксидационо. Експресија иРНК за *GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4* и *GPX6* гене у НСТ-116 ћелијама значајно се мења у третману са ОСЈ. SEL1 и SEL2 индукују вишу експресију ових gena у поређењу са SEL3 и SEL4. Експресија иРНК за *GST* ген у НСТ-116 ћелијама се мења у зависности од врсте испитиваног ОСЈ - SEL1 повећава, SEL2 инхибира, док SEL3 и SEL4 у зависности од дозе стимулишу или супримирају експресију овог gena у односу на контролне ћелије. Експресија иРНК за *TXNRD* ген је супримирана у свим третманима ОСЈ. Анализа утицаја испитиваних ОСЈ на активност транскрипционих фактора у НСТ-116 ћелијама показује да SEL1-4 утичу на значајно повећање активности Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора.

У закључку, тестирана ОСЈ, у зависности од хемијске структуре, дозе и времена третмана, испољавају цитотоксични и антимигранторни потенцијал на ћелијским линијама карцинома колоне НСТ-116 и дојке MDA-MB-231. Параметри оксидационог стреса карактеришу промене редокс статуса испитиваних ћелијских линија канцера у третману изабраним ОСЈ. qRT-PCR анализа генске експресије ензима важних у редокс контроли омогућила је детаљанији увид у механизам деловања ОСЈ на експресију датих gena, посебно имајући у виду њихов значај у антиоксидационој заштити ћелије. Флуоресцентна микроскопија у резолуцији појединачне ћелије на изучаваним ћелијским линијама карцинома, омогућила је детаљну анализу активности Nrf2, HIF и NF-κB транскрипционих фактора укључених у антиоксидациони одговор ћелије.

Значај резултата дисертације. Употреба ОСЈ у третману канцера, у зависности од хемијске структуре једињења, не мора увек да испољи само цитотоксично дејство, већ се значајан напор улаже у креирање лекова са антиметастатским дејством. Испитивана ОСЈ показују антимигранторни, самим тим и антиметастатски потенцијал. Редокс равнотежа је од круцијалне важности за функционисање сваке ћелије. Обзиром да се ћелије канцера налазе константно под већим оксидационим стресом од здравих ћелија, употреба ОСЈ (посебно SEL3 и SEL4) са значајним прооксидационим ефектом могу утицати на елиминисање ћелија канцера. Утицај ОСЈ на активност транскрипционих фактора и gena укључених у антиоксидациону заштиту ћелије веома је важан, али у исто време може представљати мач са две оштрице. У Дисертацији, на основу добијених резултата, детаљно је продискутована проблематика како употребом лека повећати оксидациони стрес код ћелија канцера и здравих ћелија у мери у којој ће штетити само ћелијама канцера.

Датум прихватања теме од стране ННВ факултета	14.09.2016.
Датум одбране	
Чланови комисије	<p>Др Бранка Огњановић, редовни професор                  Др Зорица Бугарчић, редовни професор                  Др Марко Живановић, научни сарадник                  Др Биљана Шмит, виши научни сарадник                  Др Јелена Ракобровић, научни сарадник</p>





UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE  
INSTITUTE OF BIOLOGY AND ECOLOGY

Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia



**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	<b>Jelena V. Košarić</b>
Mentor	Dr Snežana Marković, assistant professor
Title	<b>Molecular Mechanisms Study of Action of Some Organoselenium Compounds on Redox Status in Colon HCT-116 and Breast MDA-MB-231 Cancer Cells</b>
Language of text	Serbian (Cyrillic)
Language of abstract	Serbian (Cyrillic) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2018.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Animal physiology and molecular biology
Key words	Biology, Animal physiology and Molecular Biology Breast Cancer, Colon Cancer
Holding data	Library of Faculty of Science, University of Kragujevac Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia

### Summary

Cancer is a complex disease that is very variable in its appearance, development and outcome from one patient to another. Cancer is a complex process in which cells are subjected to deep metabolic changes such as uncontrolled reproduction, avoidance of control by the immune system, and invasion of distant tissues by the formation of metastases. Cancer is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Anticancer compounds do not need to exhibit a cytotoxic character, but it is sometimes more important to have anti-invasive and anti-metastatic potential. For example, colon and breast carcinoma (due to their physical availability) are easily treated in today's conditions. However, the metastatic potential of these two types of cancer is remarkable and places them in extremely aggressive. In that sense, when it comes to treatment of breast and colon cancer, current medicine is showing the need for new anti-metastatic drugs. Organoselenium compounds, OSCs are known mainly for their antioxidant activity. On the other hand, there are also OSCs with highly prooxidative features. Based on previous experience and literature data, depending on the chemical structure, it is possible to predict the indicative effect of a particular selenium compound. The assumption is that the OSC coordinated as a ligand in the complex with palladium(II) will react cytotoxic and prooxidative. Redox balance is very sensitive in both healthy and cancer cells. The smallest change in any of the many parameters affects the whole cascade of proteins and small molecules in the cell by shifting this balance in one of the possible two directions, prooxidative or antioxidative. Therefore, the change in the chemical structure of the OSCs, as well as in the concentration of treatment, may give rise to a completely different response to the molecular level of the cell. Chemical compounds can be donors and/or acceptors of electrons depending on the chemical structure. If a chemical substance has the potential to release the electron, by forming free radicals, the systemic response of the cell may be expected in the opposite direction. (De)activation of the glutathione system at the level of gene and protein expression is significantly modulated by the influence of the applied chemical compound and significantly affects the fate of the cell.

The aim of this doctoral thesis is to investigate molecular mechanisms of the action of some OSCs on the redox status of immortalized colon cancer HCT-116 and breast cancer MDA-MB-231 cells, in *in vitro* conditions. An assessment of the effect of OSCs on the viability of cancer cells was done using the MTT test, while testing the antimigratory potential of OSCs were performed using the Transwell migration test. Examination of the OSCs effects on the concentration of superoxide anion radical (NBT test), nitrite (Griess test), glutathione (GSH test) was performed by colorimetric methods, while protein expression of inducible nitrogen monoxide synthetase (iNOS) was detected by an immunofluorescence microscopic method. Using the quantitative PCR (qPCR) method, the effects of OSCs on the expression of messenger RNA (mRNA) of target genes for the selenium-containing enzymes of the glutathione and thioredoxin system - glutathione peroxidase (*GPX1*, 2, 3, 4, 6), glutathione-S-transferase (*GST*) and thioredoxin reductase (*TXNRD*) in HCT-116 cells was performed. In the same cells, the effects of OSCs on the activity of Nrf2, HIF and NF- $\kappa$ B transcription factors and their interconnectedness, the fluorescence methodology by transfection of the pTRAF vector in the resolution of one cell and the analysis by the Operetta system were examined.

The results show that the compounds SEL1 and SEL2 stimulate the proliferation of the tested cells, while SEL3 and SEL4 act cytotoxic. Generally, OSCs increase the migratory potential of the examined HCT-116 cells, while on the metastatic MDA-MB-231 cells they act mainly antimigratory. Data for oxidative stress parameters show that compounds SEL1 and SEL2 act as antioxidants, while SEL3 and SEL4 act as prooxidants. The mRNA expression for *GPX1*, *GPX2*,

*GPX3*, *GPX4* and *GPX6* genes in HCT-116 cells is significantly changed in treatment with OSCs. SEL1 and SEL2 induce higher expression of these genes compared to SEL3 and SEL4. The mRNA expression for the *GST* gene in HCT-116 cells changes depending on the type of tested OSCs: SEL1 increases, SEL2 inhibits, and SEL3 and SEL4 stimulate or suppress the expression of this gene depending on the applied dose. The mRNA expression for *TXNRD* gene is suppressed in all OSCs treatments. An analysis of the effect of examined OSCs on the transcription factors in HCT-116 cells shows that SEL1-4 influenced a significant increase in the activity of Nrf2, HIF and NF-κB.

In conclusion, tested OSCs, depending on the chemical structure, dosage and time of treatment, exhibit cytotoxic and anti-invasive potential on the HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. Oxidative stress parameters are characterized by changes in the redox status of the investigated cancer cell lines in the treatment of the selected OSCs. The qRT-PCR analysis of genetic expression of enzymes important in redox control enabled a more detailed insight into the mechanism of action of OSCs in the expression of given genes, especially having in mind their importance in antioxidant cell protection. Fluorescence microscopy in the resolution of an individual cell in the studied cell lines of the cancer enabled us to provide a detailed analysis of the activity of the Nrf2, HIF and NF-κB transcription factors involved in the antioxidant response of the cell.

The significance of the results. The use of OSCs in the treatment of cancer, depending on the chemical structure of the compound, does not always have to cytotoxic effect only, but a significant effort is invested in creating drugs with an antimetastatic effect. The examined OSCs show an antimigratory, and therefore an antimetastatic potential. Redox balance is crucial for the functioning of each cell. Since cancer cells are constantly under high oxidative stress in comparison to healthy cells, the use of OSCs (especially SEL3 and SEL4) with a significant prooxidative effect can affect the elimination of cancer cells. The effect of OSCs on the activity of transcription factors and genes involved in antioxidative cell protection is very important, but at the same time it can represent a two-edged sword. In this dissertation, based on the obtained results, it is discussed in detail how to use the drug to increase oxidative stress in cancer and healthy cells to the extent that it will only harm the cancer cells.

Accepted by scientific board on	14.09.2016.
Defended on	
Commission	<p><b>Dr Branka Ognjanović, full professor</b>  <b>Dr Zorica Bugarčić, full professor</b>  <b>Dr Marko Živanović, research associate</b>  <b>Dr Biljana Šmit, senior research associate</b>  <b>Dr Jelena Rakobradović, research associate</b></p>

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Јелена В. Кошарић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

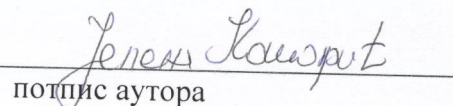
**Испитивање молекуларних механизма дејства неких органоселенских једињења на редокс статус ћелија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршила повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 23.05. 2018. године.

  
потпис аутора



Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Јелена В. Кошарић**

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Испитивање молекуларних механизма дејства неких органоселенских једињења на редокс статус ћелија канцера колона НСТ-116 и дојке MDA-MB-231**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

Дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *CreativeCommons* лиценци:

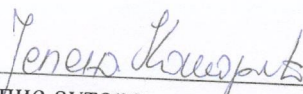
- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада

---

<sup>1</sup>Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *CreativeCommons* лиценци, то не искључује право припадницима јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 4) Ауторство - некомерцијално
- (5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 23.05. 2018. године.

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

---

<sup>2</sup>Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *CreativeCommons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



ORIGINAL ARTICLE

## Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran

Jelena V. Kosaric<sup>1</sup>, Danijela M. Cvetkovic<sup>1</sup>, Marko N. Zivanovic<sup>1</sup>, Milena G. Curcic<sup>1</sup>, Dragana S. Seklic<sup>1</sup>, Zorica M. Bugarcic<sup>2</sup>, Snezana D. Markovic<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department for Biology and Ecology, <sup>2</sup>Department for Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

### Summary

**Purpose:** To determine the antioxidant and antiproliferative influence of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran (1a) and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran (2a) on colon cancer cell line HCT-116 and breast cancer cell line MDA-MB-231.

**Methods:** Cell viability was monitored in a dose-dependent manner using MTT assay. The concentration of superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) was determined spectrophotometrically. Spectrophotometric determination of nitrites ( $NO_2^-$ ) was performed by using the Griess method. Determination of total glutathione (GSH) was also performed spectrophotometrically.

**Results:** HCT-116 cell line was more sensitive to the effects of the investigated substances than MDA-MB-231 cell line. Also, it was noticed that 1a produced greater effect com-

pared to 2a. Moreover, both investigated compounds decreased to a certain degree the oxidative stress by decreasing the  $O_2^{\cdot-}$  and thus the peroxynitrite concentration. At the same time, 1a and 2a acted more efficiently in promoting the endogenous antioxidative capacities (increased GSH concentration) providing better self-defence capabilities for cells.

**Conclusion:** Our findings showed that the investigated selenium compounds play an important role in reducing the levels of reactive oxygen species (ROS); therefore, we believe that, as antioxidants, they could prevent the processes arising as a consequence of oxidative stress, including cancer.

**Key words:** antioxidant, glutathione, nitrogen monoxide, proliferative effect, selenium compounds, superoxide anion radical

### Introduction

Selenium is an essential dietary component for humans. Although the anticancer role of selenium remains unclear, some mechanisms, such as antioxidant protection by selenoenzymes, tumor cell growth inhibition by selenium metabolites, cell cycle modifications, effects on DNA repair and apoptosis have all been described. Excessive consumption of dietary or pharmacological selenium supplements, mainly in the form of sodium selenite, has a potential to expose the body tissues to toxic levels of selenium with consequent negative effects on DNA integrity [1]. Oxidative stress causes production of ROS, which may cause carcinogenesis via genetic and epigenetic mech-

anisms. Elevated levels of ROS have been noted in many tumors, strongly implicating oxidative DNA damage in the etiology of cancer. It is well known that selenium exerts antioxidative characteristics whether it is incorporated in a complex compound or not [2]. Selenium has several anticancer properties related with protection against oxidative stress and is essential for the activity of some antioxidant enzymes with ability to scavenge free radicals [3]. Some studies have shown that selenium increases DNA repair capacity in human cells damaged by hydrogen peroxide and UV light. Selenium supplementation reduced the oxidative DNA damage in adnexectomized patients with BRCA1 mutations [4]. It is known that in rodents selenium supplementation is effective

## Novel seleno-hydantoin palladium(II) complex – antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells

Marko N. Živanović<sup>1</sup>, Jelena V. Košarić<sup>1</sup>, Biljana Šmit<sup>2</sup>, Dragana S. Šeklić<sup>1</sup>, Radoslav Z. Pavlović<sup>2</sup> and Snežana D. Marković<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

**Abstract.** Selenium and palladium containing compounds separately exert multifunctional effects on cells. While selenium containing compounds usually exert antioxidative properties, palladium(II) containing compounds are cytotoxic and prooxidative. Here we investigated biological effects of bicyclic seleno-hydantoin *cis*-7a-ethyl-5-methyl-5-phenylselanylmethyl-tetrahydro-pyrrolo[1,2-c]imidazole-1,3-dione (Hid-Se), and its palladium(II) complex, trans-bis-(*cis*-7a-ethyl-5-methyl-5-phenylselanylmethyl-tetrahydro-pyrrolo[1,2-c]imidazole-1,3-dionato) palladium(II) chloride ((Hid-Se)<sub>2</sub>Pd) on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cell lines. Hid-Se and (Hid-Se)<sub>2</sub>Pd showed prooxidative and cytotoxic character. In all performed experiments (Hid-Se)<sub>2</sub>Pd proved to be more active, i.e. this substance exerted greater prooxidative effect, cytotoxicity and influence on cell migration potential. Even though Hid-Se and (Hid-Se)<sub>2</sub>Pd enhanced migration of HCT-116 cells, very important feature of these substances is the strong antimigratory potential on metastatic MDA-MB-231 cells.

**Key words:** Cancer — Cell Migration — Oxidative stress — Palladium — Selenium

### Introduction

Cancer (*malignant neoplasia*) represents a large disease group, which is characterized by unregulated cell differentiation and formation of malignant tumors, which may invade other parts of the body affecting the basic physiological functions (Craig et al. 2010). In the field of cancer research the most of chemotherapeutic protocols are created with the aim of possessing the cytotoxic effects (Blagosklonny and Fojo 1999; Angelis et al. 2013). However, as primary tumors are significantly different from their metastatic analogues, the effect of a chemotherapeutic is not same on these types of tumors. Metastatic cells exhibit increased motility and increased cell migration from tumor stroma to other parts

of the body (Polyak and Weinberg 2009). Compared to traditional chemotherapy and radiotherapy methods, there are numerous studies which indicate anti-metastatic effects (Eckhardt et al. 2012; Deb et al. 2014).

Modern medicine is still largely focused on the application of platinum-containing (Kalinowska-Lis et al. 2008; Jevtic et al. 2014) and palladium-containing (Sabo et al. 2004; Matovic et al. 2013) chemotherapeutic cytotoxic agents. On the other hand, selenium has proven to be an important supplement for the suppression of the side effects of chemotherapy (Schroeder et al. 2004; Markovic et al. 2011; Brodin et al. 2015; Mut-Salud et al. 2016). Also, selenium-containing compounds exert inhibition of migration of cancer cells (Zec et al. 2012; Chen et al. 2013; Liu et al. 2015). Combining palladium and selenium in the same structure could provide a novel substance with benefits from the both elements. Substances, presented in this study combine bicyclic hydantoin structure and selenium in ligand, and additionally palladium(II) (Pd(II)) in complex of mentioned ligand. The

Correspondence to: Marko N. Živanović, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia  
E-mail: zivanovicm@kg.ac.rs