

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Tamara T. Krajnović

**EFEKTI IZOKSANTOHUMOLA NA TRETMAN
SOLIDNOG I METASTATSKOG MELANOMA:
DIREKTAN UTICAJ I INTERAKCIJA SA
HEMIOTERAPIJOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Tamara T. Krajnović

**EFFECTS OF ISOXANTHOHUMOL ON THE
TREATMENT OF SOLID AND METASTATIC
MELANOMA: DIRECT IMPACT AND
INTERACTION WITH CHEMOTHERAPY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

MENTOR:

dr Sanja Mijatović,

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Sanja Mijatović,

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Marija Marin,

docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Maksimović-Ivanić,

naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta „Molekularni mehanizmi fiziološke i farmakološke kontrole inflamacije i kancera“ (br. 173013) finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Izjave zahvalnosti

Ogromnu zahvalnost dugujem dr Sanji Mijatović, mojoj mentorki, na nesebičnoj pomoći, vremenu koje mi je posvetila i mudrim savetima koje mi je pružila prilikom vođenja i izrade ove doktorske disertacije. Pre svega joj hvala na dugim razgovorima punim topline i mudrosti, bodrenju i prijateljskom dodiru. Podjednako veliku zahvalnost dugujem dr Danijeli Maksimović-Ivanić, mojoj nezvaničnoj mentorki, na izuzetnoj posvećenosti i velikom zalaganju prilikom rukovođenja ovom doktorskom disertacijom. Njena čelična snaga i nepresušna energija bili su pokretačka sila i konstantna motivacija, čak i kada sam nailazila na naizgled nesavladive prepreke. Od srca im hvala obema na svemu što su učinile za mene, na ukazanom poverenju, na veri da uvek mogu bolje i više, na znanju koje su mi prenele i iskustvu koje su podelile sa mnom na putu mog naučnog sazrevanja. Hvala im na strpljenju, podršci, bezgraničnom razumevanju za probleme, ne samo profesionalne već i lične prirode, hvala im na toplim, majčinskim savetima koji su mi davali snagu da prebrodim svaku prepreku i ne spotaknem se o kamen života, onda kada mi je to bilo zaista neophodno. Privilegija je imati ih za šefice, mentorke, prijatelje, životne uzore...

Najiskrenije se zahvaljujem dr Mariji Marin na posvećenom vremenu i uloženom trudu, ukazanom poverenju i susretljivosti, a nadasve korisnim savetima i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem prof. dr Ludgeru Wessjohannu i prof. dr Goranu Kaluđeroviću, izvanrednim naučnicima i vrsnim hemičarima, koji su omogućili pristup jedinjenju ispitivanom u ovoj studiji i pružili mi priliku da proširim svoje znanje i steknem iskustvo svojim boravkom u Nemačkoj.

Veliko hvala svim mojim kolegama sa odeljenja za Imunologiju na kolegijalnosti, dobroj energiji i drugarskoj atmosferi koja je vladala u laboratoriji. Hvala dr Stanislavi Stošić-Grujičić na pruženoj prilici da budem deo ovog odeljenja, dr Mariji Mojić na uloženom vremenu, strpljenju i velikoj pomoći prilikom mog upoznavanja sa eksperimentalnim radom i dr Milici Vujičić na pruženoj prijateljskoj ruci pri mojim prvim naučnim koracima. Veliko hvala Ceci i Sanji i svim ostalim članovima moje grupe na iskrenim razgovorima i drugarskoj pomoći koju su mi rado pružili.

Iskazujem zahvalnost dr Ivani Mirkov i dr Dušku Dunderoviću na pomoći prilikom izvođenja eksperimenata.

Dijani, mojoj prijateljici, mom saputniku, mojoj savesti, dugujem neizmernu zahvalnost na nesebičnoj pomoći i podršci koju mi je uvek i bezrezervno pružala. Hvala joj što je uvek tu, za i pored mene, u svim lepim i manje lepim trenucima. Ivani, mojoj taličnoj drugarici, bez koje ne bih bila tu gde jesam, hvala na pozitivnoj energiji i neiscrpnj motivaciji i podstrecima, što me je uvek čuvala i bodrila, bila moja podrška koja mi ne dozvoljava da posrnem i padnem. Njih dve su oličenje pravog prijateljstva, onoga čemu čovek teži da stekne tokom celog života.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojim namilijima, tati Tihomiru, mami Dragici i sestri Adrijani. Oni su oduvek bili moja čvrsta stena, moja mirna luka, moj siguran dom. Nesebičnom ljubavlju, verom i podrškom su mi davali snagu, hrabrost i samopouzdanje za sve podvige. I naposljetku, dvema dušama moje duše, mojoj ljubavi Tomu i mojoj devojčici Tari, posebno se zahvaljujem jer oni daju smisao svemu što radim i što jesam, mom celom životu. Oni su inspiracija koja me vodi. Hvala im što mi daju krila.

Efekti izoksantohumola na tretman solidnog i metastatskog melanoma: direktan uticaj i interakcija sa hemioterapijom

Sažetak

Izoksantohumol (IXN), prenilflavonoid iz hmelja, poseduje spektar bioloških aktivnosti značajnih za tretman brojnih patoloških stanja. U ovoj studiji ispitivan je njegov uticaj na modelima solidnog i metastatskog melanoma *in vitro* i *in vivo*, u kontekstu samostalnog delovanja na ćelije melanoma različite agresivnosti i interakcije sa hemioterapijom. Pokazano je da su efekti IXN bili postojani na svim ćelijskim linijama melanoma – od nisko invazivne forme B16 poreklom iz miša, preko visoko invazivne linije humanog porekla A-375, do metastatskog klona B16-F10. Pored inhibicije proliferacije uočene na svim linijama, tretman IXN doveo je do diferencijacije i gubitka pluripotentnih svojstava B16 i A-375 ćelija, uz prisustvo apoptoze i značajne promene u signalnim putevima relevantnim za ove procese. Sa druge strane, IXN je uz indukciju programirane ćelijske smrti tipa I i II na klonu B16-F10, smanjio klonogeni potencijal populacije preživelih ćelija i, narušavajući integrinsku signalizaciju, redukovao adhezivnost, migratornost i invazivnost. Pored jasnog trenda u supresiji solidnog, a posebno metastatskog melanoma, IXN je potencirao delovanje paklitaksela (PCT) *in vitro* i *in vivo*. Za razliku od paralelnog tretmana, aplikovanje IXN 7 sukcesivnih dana pre početka hemioterapije učinilo je efikasnom subterapeutsku dozu PCT u modelu singenog metastatskog melanoma. Ovaj podatak je, uz histopatološku potvrdu promene fenotipa ćelija u metastazama, podvukao važnost indukcije diferencijacije u kasnijem učinku hemioterapije. Opisani rezultati predstavljaju prvi dokaz antitumorske aktivnosti IXN *in vivo*, kao i značajan doprinos novom konceptu diferencijacione terapije u lečenju solidnih i metastatskih maligniteta.

Ključne reči: melanom, prenilflavonoidi, hemioterapija, apoptoza, autofagija, diferencijacija, adhezija, migracija, invazija, hemosenzitizacija

Naučna oblast: Biologija tumora

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

UDK broj:

Effects of isoxanthohumol on the treatment of solid and metastatic melanoma: direct impact and interaction with chemotherapy

Abstract

Isoxanthohumol (IXN), a prenylflavonoid from hops, owns a spectrum of biological activities important for the therapy of numerous pathological conditions. In this study, its influence on solid and metastatic melanoma models *in vitro* and *in vivo* was investigated, in the context of independent action on melanoma cells of different aggressiveness and interaction with chemotherapy. The effects of IXN were consistent in all cell lines – from the low-invasive mouse-derived B16 form and highly invasive line of human origin A-375 to metastatic clone B16-F10. In addition to proliferation inhibition observed in all cell lines, IXN treatment led to differentiation and loss of pluripotent properties of B16 and A-375 cells, with the presence of apoptosis and significant changes in signaling pathways relevant to these processes. On the other hand, along with induction of apoptosis and autophagy in B16-F10 clones, IXN decreased the clonogenic potential in the population of surviving cells and, by disrupting integrin signaling, reduced adhesion, migration and, invasiveness. Aside from a clear trend in the suppression of solid and metastatic melanoma, IXN potentiated the action of paclitaxel (PCT) *in vitro* and *in vivo*. Unlike concomitant treatment, the 7-days application of IXN before the start of chemotherapy made the subtherapeutic dose of PCT effective in the metastatic melanoma model. This data, along with histopathological confirmation of changes in cells' phenotype in metastases, underlined the importance of induction of differentiation for chemotherapy outcome. The described results represent the first proof of IXN antitumor activity *in vivo*, as well as a significant contribution to a new concept of differentiation therapy in the treatment of solid and metastatic malignancies.

Key words: melanoma, prenylflavonoids, chemotherapy, apoptosis, autophagy, differentiation, adhesion, migration, invasion, chemosensitization

Scientific field: Tumor biology

Scientific subfield: Experimental oncology

UDC number:

Lista skraćenica:

3-MA – 3-metiladenin
8-PN – 8-prenilnaringenin
ABB – pufer za vezivanje aneksina (engl. *Annexin Binding Buffer*)
ABC – engl. *ATP-Binding Cassette*
ABCB1 – engl. *ATP-Binding Cassette subfamily B member 1*
ABCG2 – engl. *ATP-Binding Cassette subfamily G member 2*
AO – akridin-oranž (engl. *Acridine Orange*)
Ann V-FITC – aneksin V konjugovan FITC
ANOVA – analiza varijanse
APS – amonijum-persulfat
Arp2/3 – engl. *Actin Related Protein 2/3*
ATCC – Američka kolekcija kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*)
BRAF – engl. *B-type Raf kinase*
BSA – albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumine*)
CAFs – fibroblasti povezane sa kancerom (engl. *Cancer-Associated Fibroblasts*)
CFSE – 5(6)-karboksifluorescein diacetat N-sukcinimidil estar
cisPt – cisplatina
CSC – tumorske matične ćelije (engl. *Cancer Stem Cells*)
CTC – cirkulišuće tumorske ćelije (engl. *Circulating Tumor Cells*)
CTLA-4 – engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4*
CV – kristal violet (engl. *Crystal Violet*)
CYP1A2 – engl. *Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2*
CYP2C8 – engl. *Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8*
CYP2C19 – engl. *Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19*
DAB – diaminobenzedin
DAF-FM diacetat – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DHR 123 – dihidrorodamin 123
DMF – *N,N*-dimetilformamid
DMSO – dimetil sulfoksid
DMX – dezmetilksantohumol
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DOXO – doksorubicin hidrohlorid
DPX – dibutl ftalat polistiren ksilen
DTT – ditiotreitol
ECM – vanćelijski matriks (engl. *ExtraCellular Matrix*)
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
EMT – epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)
ERK – engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
FACS – protočna citofluorimetrija ili ćelijsko sortiranje aktivirano fluorescencom (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*)
FBS – serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*)
FGF – faktor rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*)
F.I.C. – engl. *Fractional Inhibitory Concentration*
FITC – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)
GFR – receptor za faktor rasta (engl. *Growth Factor Receptor*)
HMGB1 – engl. *High Mobility Group Box 1*
HRP – peroksidaza rena (engl. *HorseRadish Peroxidase*)
H&E – hematoksilin-eozin
IL – interleukin

ILK – engl. *Integrin-Linked Kinase*
IFN- γ – interferon gama
ICAM-1 – engl. *InterCellular Adhesion Molecule-1*
iNOS – inducibilna azot-monoksid sintaza (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*)
IQ – 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f] kinolin
IXN – izoksantohumul
JAK/STAT – engl. *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*
KRAS – engl. *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*
L-dopa – 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
MAPK – mitogenom-aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MDR – višestruka rezistencija na lekove (engl. *Multi-Drug Resistance*)
MEK – engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase*
MET – mezenhimalno-epitelna tranzicija (engl. *Mesenchymal-Epithelial Transition*)
MIC – ćelije koje iniciraju metastaze (engl. *Metastasis-Initiating Cells*)
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
NF- κ B – nukleusni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*)
NO – azot-monoksid
PBS – fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *Phosphate Buffer Saline*)
PBSTw – PBS sa 0,1% Tween 20
PCT – paklitaksel
PD-1 – engl. *Programmed Death 1*
PE – efikasnost sađenja (engl. *Plating Efficiency*)
PEC – ćelije peritonealnog eksudata (engl. *Peritoneal Exudate Cells*)
PFA – paraformaldehid
PI – propidijum-jodid
PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*)
PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid
PTEN – engl. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*
RhoGEF – engl. *Rho Guanine nucleotide Exchange Factor*
ROCK – engl. *Rho-Associated Protein Kinase*
ROS/RNS – reaktivne vrste kiseonika i azota (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)
RPMI – medijum za kultivaciju ćelija (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*)
SD – standardna devijacija
SDS – natrijum dodecil sulfat
SF – frakcija preživljavanja (engl. *Surviving Fraction*)
SHIME – engl. *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*
SV – srednja vrednost
TEMED – N,N,N',N'-tetrametilen-1,2-diamin
TGB – engl. *Tris-Glycine Buffer*
TGF- β – faktor rasta transformacije beta (engl. *Transforming Growth Factor beta*)
Tie 2 – engl. *Tyrosine-protein kinase receptor 2*
TNF- α – faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*)
TRIS-HCl – trisaminometan hidrohlorid
VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
VEGFR2 – receptor 2 vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*)
XN – kasantohumul

Sadržaj:

1. Uvod	1
1.1. Kancer	3
1.1.2. Proces metastaziranja	4
1.2. Melanom	8
1.2.2. Terapija melanoma	8
1.3. Upotreba prirodnih proizvoda u terapiji kancera	9
1.4. Flavonoidi	10
1.5. Prenilflavonoidi.....	11
1.6. Izoksantohumol	13
1.6.1. Metabolizam IXN.....	13
1.6.2. Uloga IXN	14
2. Ciljevi istraživanja.....	17
3. Materijal i metode.....	19
3.1. Reagensi	20
3.2. Rastvori	22
3.3. Kulture ćelija.....	23
3.3.1. B16 linija mišjeg melanoma.....	23
3.3.2. B16-F10 linija mišjeg melanoma	24
3.3.3. A-375 linija humanog melanoma	24
3.3.4. Ćelije peritonealnog eksudata miša	24
3.3.5. Uslovi kultivacije	25
3.4. Eksperimentalne životinje.....	25
3.5. Primjenjene metode.....	25
3.5.1. Tripsinizacija ćelija	25
3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija.....	25
3.5.3. Priprema ćelijskih kultura za eksperimentalni rad	26
3.5.4. Testovi vijabiliteta.....	26
3.5.4.1. MTT test	26
3.5.4.2. Kristal violet test.....	26
3.5.5. Protočna citofluorimetrija.....	27
3.5.5.1. Detekcija ćelija u apoptozi.....	27
3.5.5.2. Detekcija aktiviranih kaspaza	28
3.5.5.3. Detekcija autofagije	28
3.5.5.4. Analiza stope proliferacije	29

3.5.5.5. Merenje količine unutarćelijskog azot-monoksida.....	29
3.5.5.6. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota.....	30
3.5.6. Detekcija markera diferencijacije.....	30
3.5.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju	30
3.5.8. Imunoblot analiza	31
3.5.9. Klonogeni esej	31
3.5.10. Esaj za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija <i>in vitro</i>	32
3.5.11. Test zarastanja rana	32
3.5.12. Eseji za kvantifikovanje migracije i invazije ćelija <i>in vitro</i>	33
3.5.13. Analiza izobologramom	33
3.5.14. Indukcija solidnog melanoma i tretman životinja	34
3.5.15. Ispitivanje akutne toksičnosti <i>in vivo</i>	34
3.5.16. Indukcija plućnih metastaza melanoma i tretman životinja	34
3.5.17. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom.....	35
3.5.18. Histologija	35
3.5.18.1. Histochemija (H&E bojenje).....	35
3.5.18.2. Imunohistochemija i imunofluorescenca.....	36
3.5.19. Statistička obrada podataka	36
4. Rezultati.....	37
4.1. Direktna uticaja IXN na vijabilitet i prisustvo smrti ćelija primarnog i metastatskog melanoma <i>in vitro</i>	38
4.1.1. Prenilflavonoidi inhibiraju rast ćelija melanoma <i>in vitro</i>	38
4.1.2. IXN ne smanjuje vijabilitet primarne kulture makrofaga izolovanih iz miša	40
4.1.3. IXN indukuje smrt ćelija primarnog melanoma <i>in vitro</i>	40
4.1.3.1. IXN indukuje apoptozu nezavisnu od aktivacije kaspaza u kulturama B16 i A-375 ćelija.....	40
4.1.3.2. IXN indukuje autofagiju citoprotektivnog karaktera u kulturama B16 i A-375 ćelija	42
4.1.4. IXN indukuje smrt ćelija metastatskog melanoma <i>in vitro</i>	44
4.1.4.1. IXN indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza u kulturi B16-F10 ćelija.....	44
4.1.4.2. IXN indukuje snažnu autofagiju u kulturi B16-F10 ćelija	45
4.2. Definisane mehanizama delovanja IXN na ćelije primarnog i metastatskog melanoma <i>in vitro</i>	47
4.2.1. IXN inhibira proliferaciju i indukuje fenotipsku promenu ćelija primarnog melanoma	47
4.2.1.1. IXN inhibira proliferaciju i ostvaruje permanentan efekat u kulturama B16 i A-375 ćelija.....	47
4.2.1.2. IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija ka melanocitima i redukuje „stem“ profil A-375 ćelija.....	48

4.2.1.3. IXN suprimira produkciju ROS/RNS u kulturama B16 i A-375 ćelija i smanjuje količinu unutarćelijskog NO u kulturi A-375 ćelija	51
4.2.1.4. IXN različito utiče na signalne puteve PI3K/Akt i MAPK u B16 i A-375 ćelijama.	53
4.2.2. IXN inhibira proliferaciju, pokretljivost i invazivnost metastatske linije melanoma	56
4.2.2.1. IXN inhibira proliferaciju i smanjuje klonogeni potencijal B16-F10 ćelija.....	56
4.2.2.2. IXN smanjuje metastatski potencijal B16-F10 ćelija	57
4.2.2.3. IXN negativno reguliše ekspresiju proteina relevantnih za proces metastaziranja kod B16-F10 ćelijske linije.....	59
4.3. Indirektan uticaj IXN – interakcija sa hemioterapijom <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	62
4.3.1. IXN interaguje sa hemioterapijom <i>in vitro</i>	62
4.3.2. IXN u kombinaciji sa PCT suprimira rast melanoma <i>in vivo</i> na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma.....	63
4.3.3. IXN suprimira formiranje plućnih metastaza <i>in vivo</i> na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma	65
4.3.4. IXN potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza <i>in vivo</i> u poređenju sa kombinovanim tretmanom sa PCT na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma	68
4.3.5. Pretretman IXN potencira delovanje PCT i suprimira formiranje plućnih metastaza <i>in vivo</i>	69
5. Diskusija	73
6. Zaključci	87
7. Literatura	89

Look deep into nature, and then you will understand everything better.

– Albert Einstein

1. Uvod

1.1. Kancer

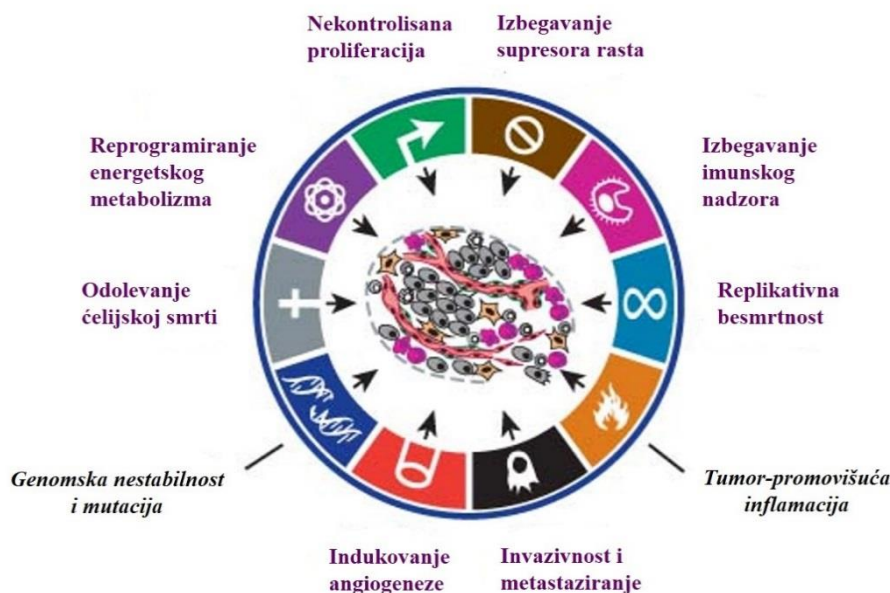
Kancer predstavlja jednu od najčešćih i klinički najizazovnijih grupa bolesti današnjice. Ovo oboljenje je drugi uzrok smrtnosti u svetu, sa tendencijom da u bliskoj budućnosti nadmaši kardiovaskularne bolesti, trenutno vodeći uzrok mortaliteta ljudi. U svetu godišnje kancer uzrokuje više od 7 miliona smrtnih slučajeva i biva dijagnostikovano kod oko 10 miliona ljudi, sa trendom neprekidnog rasta [1,2]. Iako u Evropi živi samo 9% svetske populacije, ona čini čak 25% udela u globalnom opterećenju kancerom*. Na ovom kontinentu u 2018. godini zabeleženo je 3,91 miliona novih slučajeva (isključujući nemelanomski rak kože) i 1,93 miliona umrlih od malignih bolesti. Najčešći tipovi tumora su karcinom dojke (13,4% svih kancera), kolorektalni karcinom (12,8%), kancer pluća (12%) i kancer prostate (11,5%), koji zajedno čine skoro polovinu sveukupnog opterećenja kancerom u Evropi. Ove vrste tumora su ujedno bile vodeće po mortalitetu u populaciji obolelih od malignih bolesti u Evropi 2018. godine, sa kancerom pankreasa na četvrtom mestu ispred kancera prostate. Stope smrtnosti od kancera su prilično visoke i za muškarce i za žene u zemljama Istočne Evrope, Baltika i Balkana (npr. Slovačka, Letonija, Litvanija, Srbija i Hrvatska)[3]. Delom zato što su uzroci nastanka i progresije tumora izuzetno kompleksni i samo delimično shvaćeni, a uprkos ogromnim naporima naučnika u oblasti biologije kancera, napredak postignut u terapiji ove opake bolesti u proteklih 30 godina nije značajno povećao ukupnu stopu preživljavanja tj. smanjio godišnju stopu smrtnosti od većine tipova epitelnih tumora na globalnom nivou [2].

Kancer može biti uzrokovan kako faktorima spoljašnje sredine, tako i genetičkom predispozicijom. Tumorigeneza je definisana kao višestepeni proces koji podrazumeva sukcesivnu akumulaciju genetskih promena u ćeliji koje prouzrokuju genetičku nestabilnost [4]. Tvrdnja da je preduslov da od zdrave ćelije nastane tumorska upravo prisustvo više mutacija, bilo da su one suptilne poput tačkastih mutacija ili očigledne kao hromozomski rearanžmani [5], početkom 21-og veka biva relativizovana podacima o inaktivaciji tumor supresora epigenetskim putem, čime ova bolest poprima formu fizioloških poremećaja koji ne moraju eksplicitno biti u vezi sa mutagenim promenama [6]. Revizija Knudsovog koncepta se dalje prenosi i na fazu progresije bolesti koja ne korelira sa daljom akumulacijom promena u genima, kako se ranije očekivalo [7]. Danas se sve više suočavamo sa poimanjem maligne transformacije kao reprograma u koji ćelija ulazi krećući se ka fenotipu bliskom embrionalnom [8–10]. Prema trenutnim procenama, samo 5 – 10% svih slučajeva kancera uzrokovano je direktno prepoznatim genetskim defektima kao što su mutacije dobijanja funkcije (engl. *gain-of-function mutations*) u onkogenima, mutacije gubitka funkcije (engl. *loss-of-function mutations*) u tumor supresornim genima i mutacije sistema za DNK (engl. *Deoxyribonucleic Acid*) reparaciju [1,11]. Dobro je poznato da se većina humanih kancera dovodi u vezu sa sredinskim faktorima, uključujući hemijske, radioaktivne ali i biološke faktore, poput virusa koji direktno ili indirektno deluju na nastanak mutacionih događaja. Postoje značajne razlike u incidenci kancera, mortalitetu i preživljavanju među etničkim grupama koje imaju različite životne stilove i izložene su različitim faktorima životne sredine. Faktori rizika koji mogu promovisati kancerogenezu, a vezani su za životnu sredinu i stil života su upotreba duvana, prekomerna konzumacija alkohola, preterana izloženost ultraljubičastom zračenju, slaba fizička aktivnost i nezdrava ishrana. Brojne epidemiološke studije potvrđuju da orkestrirano delovanje više faktora rizika vodi u malignu transformaciju, što se dalje dovodi u vezu sa iscrpljivanjem kapaciteta organizma da se reparira i obnovi homeostazu na nivou subćelijskih, ćelijskih struktura i tkiva [1]. Sve je više istraživanja koja upućuju na značaj hrane u nastanku ali i sprečavanju patoloških promena koje se vezuju za malignu transformaciju. Studije su pokazale da je 30 – 40% svih kancera direktno vezano za izbor ishrane i može biti sprečeno odgovarajućim dijetama. To znači da

* Prema definiciji Svetske zdravstvene organizacije, opterećenje bolešću predstavlja uticaj zdravstvenog problema na datu populaciju i meri se pomoću različitih pokazatelja, kao što su mortalitet, morbiditet ili finansijski troškovi.

bi prikladna ishrana umanjila broj obolelih za 3 do 4 miliona svake godine na globalnom nivou [12].

Na putu progresije, tumor stiče osobine koje mu omogućavaju opstanak. Na ćelijskom nivou, transformacija normalne u tumorsku ćeliju zahteva niz uzastopnih koraka koji na kraju dovode do neograničene i nekontrolisane proliferacije, invazije i migracije [11,13]. Dakle, opšte je poznato da tumorske ćelije stiču osam osnovnih svojstava, tzv. obeležja kancera, tokom dugog procesa razvoja tumora i maligne progresije. Ova obeležja koja karakterišu malignu ćeliju su: nekontrolisana proliferacija, izbegavanje supresora rasta, odolevanje ćelijskoj smrti, replikativna besmrtnost, indukovanje angiogeneze, invazivnost i metastaziranje, reprogramiranje energetskog metabolizma i izbegavanje imunskog nadzora. Prema Hanahanu i Weinbergu, dve osobine kancerskih ćelija koje leže u osnovi ovih ćelijskih promena i olakšavaju sticanje navedenih funkcionalnih sposobnosti neophodnih za transformaciju normalne u malignu ćeliju su genomska nestabilnost i inflamacija koja promoviše tumor (Slika 1) [11,14,15].



Slika 1. **Biološka obeležja kancera.** Preuzeto i modifikovano (Hanahan i Weinberg, 2017) [15]

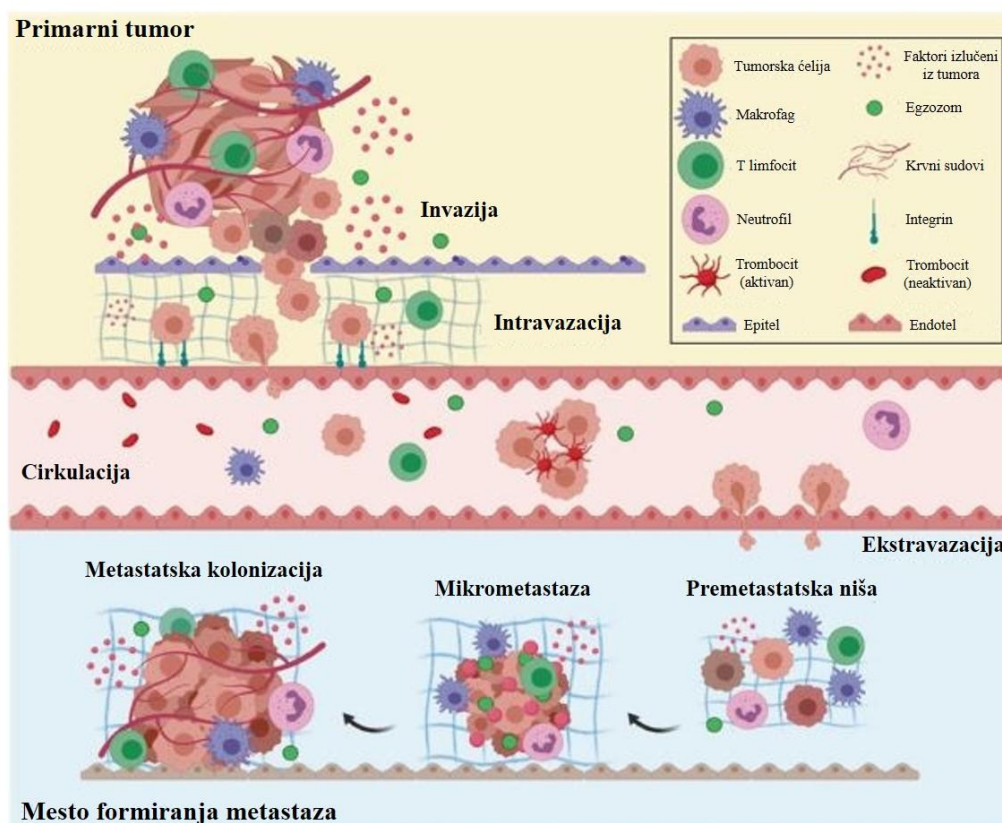
Iako sve tumorske ćelije imaju zajedničke osnovne karakteristike, one se međusobno veoma razlikuju po pripadnosti tkivu čijom su transformacijom nastale i stepenu diferencijacije. Na osnovu embrionalnog porekla postoji gruba podela humanih tumora u četiri grupe. Prvu grupu čine karcinomi, tumori nastali iz epitelnog tkiva koji predstavljaju najčešći vid humanih kancera odgovornih za čak 80% smrti uslovljene kancerom u svetu. Drugoj grupi pripadaju tumori mezodermalnog porekla koji nastaju iz vezivnih tkiva i čine 1% svih dijagnostikovanih maligniteta, a nazivaju se sarkomi. Treću grupu kancera čine tumori hematopoetskih tkiva sa incidencom od 9%, dok se u četvrtu grupu svrstavaju tumori neuroektodermalnog porekla koji su uzrok 2,5% smrtnosti u svetu [5].

1.1.2. Proces metastaziranja

Za razliku od benignih, maligni tumori imaju sposobnost da invadiraju susedna tkiva i metastaziraju u udaljene organe. Tako se kancer može definisati kao maligna neoplazija sa

neregulisanom i povećanom proliferacijom ćelija i nekontrolisanom ćelijskom migracijom. Upravo invazija susednih tkiva i uspostavljanje metastatskih žarišta na udaljenim organima predstavljaju napredne faze kancerogeneze i glavne karakteristike agresivnog malignog fenotipa [11,16]. Ovi stadijumi u procesu tumorigeneze su nepredvidljivi i ključan su uzrok neuspeha terapije kancera, a shodno tome su odgovorni za više od 90% smrti povezanih sa ovom opakom bolešću. Kontinuirani razvoj u istraživanju biologije kancera i pojava novih paradigmi u proučavanju metastaza otkrili su neke od molekularnih osnova procesa diseminacije. Tumorska ćelija na putu do ciljnog mesta komunicira sa drugim ćelijama i proteinima. Prepoznavanje ovih interakcija poboljšalo je razumevanje nekih bioloških principa metastatske ćelije koji regulišu njenu pokretljivost i plastičnost. Komunikacija sa mikrookruženjem tumora omogućava invazivnim ćelijama da prevaziđu stromalne izazove, da se nastane i kolonizuju druga tkiva. Ove karakteristike ćelija kancera vođene su genetskim i epigenetskim modifikacijama unutar same tumorske ćelije i njenog mikrookruženja [17].

Diseminacija tumora na udaljena mesta podrazumeva niz uzastopnih koraka počevši od neovaskularizacije primarnog tumora (angiogeneze), odvajanja i posledične migracije metastatskih ćelija sa primarnog tumorskog mesta, invazije kroz bazalnu membranu i vanćelijski matriks (engl. *ExtraCellular Matrix*, ECM) koji okružuje primarni tumor, ulaska u krvne i/ili limfne sudove (intravazacije), cirkulacije i ekstravazacije što konačno dovodi do kolonizacije odnosno invazije ciljnog organa gde se tumorske ćelije integrišu i, u komunikaciji sa mikrookruženjem, formiraju metastaze. Ova složena sukcesija ćelijsko-bioloških događaja naziva se invazivno-metastatska kaskada (Slika 2) [11,16,17].



Slika 2. **Invazivno-metastatska kaskada sa pet ključnih koraka: invazija, intravazacija, cirkulacija, ekstravazacija i kolonizacija.** Preuzeto i modifikovano (Jawad Fares i saradnici, 2020) [17]

Nakon transformacije iz normalne, tumorska ćelija može ostati u stanju mirovanja neodređeni vremenski period ili se razmnožavati i formirati malu, intraepitelnu, rastuću koloniju ćelija ili karcinom *in situ*. Reprogramiranje onkogenim događajima i signali iz okoline mogu dovesti do nastanka tumorskih matičnih ćelija (engl. *Cancer Stem Cells*, CSC), koje tada čine pokretačku snagu kancera i snose značajnu, ako ne i predominantnu odgovornost za heterogenost tumora. Ova mala subpopulacija neoplastičnih ćelija se odlikuje sposobnošću samoobnavljanja i dovodi do nastanka heterogenog, diferenciranog potomstva, ujedno održavajući i sopstveni broj. Njihovo poreklo nije u potpunosti jasno ali se smatra da bi ono moglo biti dvojno – mogle bi nastati od izmenjenih matičnih ćelija odgovarajućeg tkiva ili dediferencijacijom ćelija tumora do sticanja matičnog fenotipa [18]. Smatra se da subpopulaciju CSC čine ćelije koje iniciraju metastaze (engl. *Metastasis-Initiating Cells*, MIC), specifične tumorske ćelije sa sposobnošću naseljavanja sekundarnih organa [19]. Za diseminaciju metastatskih ćelija neophodno je da se one prvo odvoje od primarnog tumora [16]. Invaziju i proces metastaziranja pokreću epigenetski faktori koji su indukovani stimulusima iz okoline (poput starenja i poremećaja cirkadijalnog ritma), zatim adhezivni signali iz komponenata vanćelijskog matriksa (kao što su kolagen i fibrin), mehanički pritisci ECM, interakcije između ćelija, solubilni signali (kao što su faktori rasta i citokini) i, naravno, unutartumorska mikrobiota [20,21]. Proces transdiferencijacije putem kojeg transformisane epitelne ćelije razvijaju sposobnost invazije, migracije, odolevanja stresu i diseminacije naziva se epitelno-mezenhimska tranzicija (engl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) [11]. EMT reguliše reverzibilne biohemijske promene kojima se epitelne ćelije iz visoko diferenciranih, polarizovanih i organizovanih ćelija transformišu u nediferencirane, izolovane i ćelije slične mezenhimalnim, sa migratornim i invazivnim sposobnostima koje stižu formiranjem invazivnih izbočina tzv. invadopodija [22,23]. Tumorske ćelije koje su podlegle potpunoj ili delimičnoj EMT migriraju i invadiraju stromu, bilo kao pojedinačne ćelije koje se odvajaju od primarnog tumora ili kao predvodnici klastera u kojima većina ćelija zadržava pretežno epitelni fenotip. Samo ćelije na invazivnom frontu mogu ispoljavati karakteristike EMT, zajedno sa ekspresijom integrina koji favorizuju migraciju i proteolitičkih enzima koji mogu narušiti barijere za migraciju sačinjene od proteina ECM. Tada ćelije tumora mogu da utiču na ćelije strome da luče angiogene faktore, proteolitičke enzime i proteine ECM na taj način izazivajući angiogenezu, limfangiogenezu i preuređivanje tkiva [24].

Nakon lokalne invazije, dolazi do intravazacije koja podrazumeva ulazak metastatskih ćelija, pojedinačnih ili u vidu klastera, u postojeće i novonastale limfne i krvne sudove. Proces intravazacije zahteva bar delimičnu degradaciju ECM i bazalne membrane ispod endotelnih ćelija, pri čemu se integritet endotelne barijere ne narušava u velikom meri [25,26]. Nedavno je rasvetljen mehanizam posredovan mitozom kojim ćelije kancera koje se nalaze duž krvnih sudova narušavaju endotelnu barijeru putem ćelijske deobe, a zatim se odvajaju u cirkulaciju [27].

Po ulasku u transportni sistem, metastatske ćelije putuju do udaljenog mesta direktno kroz krvotok ili kroz limfni čvor koji se nalazi u blizini primarnog mesta tumora. Kretanje kroz cirkulaciju može biti aktivan ili pasivan proces što zavisi od vrste tumora, mikrookoline i same vaskulature [17,28]. Osim toga, dokazano je da tumorske ćelije mogu migrirati i duž nerava [29,30] ili bazalne strane endotelnih ćelije ne ulazeću u lumen suda [31]. Ove ćelije, koje se sada označavaju kao cirkulišuće tumorske ćelije (engl. *Circulating Tumor Cells*, CTC) mogu cirkulisati pojedinačno ili u klasterima, gde klasteri čine ćelije koje ispoljavaju različit stepen EMT, dok druge predominantno ispoljavaju epitelne karakteristike [32]. Iako su klasteri ređe prisutni od pojedinačnih CTC, oni su 20 – 50 puta efikasniji u formiranju metastaza [33]. Cirkulacija CTC u klasterima ukazuje na potencijalnu potrebu ćelija tumora za međusobnom saradnjom, ne samo da bi inicirale metastatski rast već i da bi obezbedile zaštitu od mehaničkog uništavanja i napada imunskog sistema koja im pretil tokom cirkulacije [34,35].

Po dolasku na sekundarno mesto, CTC mogu da dožive različit scenario: ili se zaglave u kapilarima zbog malog dijametra sudova ili adheriraju i izlaze iz cirkulacije transendotelnom migracijom ili

rastu unutar krvnog suda dovodeći do njegovog pucanje pre eventualne ekstravazacije i kolonizacije svoje nove niše. Ekstravazacija je složen proces koji uključuje interakcije ligand-receptor, hemokine i cirkulišuće netumorske ćelije [17,36]. Izlazak tumorskih ćelija iz cirkulacije se može desiti na najmanje dva načina. Jedan način podrazumeva da ćelije tumora adheriraju za endotel eksprimiranjem adhezivnih receptora koji prepoznaju srodne ligande na endotelnim ćelijama [37]. Nakon adhezije, CTC napuštaju krvni sud putem transendotelne migracije u čemu im mogu pomoći mijeloidne ćelije koje povećavaju vaskularnu propustljivost [38]. Međutim, CTC se takođe mogu zaustaviti u kapilarima sekundarnih organa, gde se mogu lokalno razmnožavati i rasti unutar krvnog suda uzrokujući pucanje zida kapilara i izbijajući u sekundarni organ. Poslednjih godina pokazano je da ćelije tumora mogu da indukuju programiranu nekrozu endotelnih ćelija, dovodeći tako do sopstvene ekstravazacije [39]. CTC koje napuštaju krvni sud putem transendotelne migracije mogu pokazivati delimičnu EMT, dok CTC koji se razmnožavaju unutar kapilara najverovatnije održavaju svoj epitelni fenotip ili podležu mezenhimalno-epitelnoj tranziciji (engl. *Mesenchymal-Epithelial Transition*, MET). Organi kao što su jetra i kosti imaju visoko propustljive sinusoidne sudove pa CTC pokazuju visoku stopu metastaziranja ka ovim organima. U drugim organima, tumorske ćelije su suočene sa čvrstim preprekama i bazalnim membranama i njima je potrebno genetsko i molekularno posredovanje kako bi bile sposobne za transmigraciju [22].

Kolonizacija sekundarnog mesta je poslednji korak u progresiji malignog tumora i zavisi od sposobnosti kancerskih ćelija da se prilagode svojoj novoj mikrookolini. Interakcije između tumorskih ćelija i ćelija sekundarnog mesta kao i uspostavljanje vaskularne mreže su važni faktori za pravilnu metastatsku kolonizaciju [17]. Smatra se da primarni tumori mogu indukovati stanja u udaljenim organima koja favorizuju preživljavanje kancerskih ćelija i stvaranje kolonija. Ti uslovi se nazivaju premetastatskim nišama i predstavljaju dokaz da ovaj proces nije nasumičan, kako se dugo verovalo. Razvoj premetastatskih niša je višestepeni proces koji uključuje brojne sekretovane faktore i vanćelijske vezikule poreklom iz tumora kao i ćelije poreklom iz koštane srži koji zajedno indukuju vaskularno curenje, preuređivanje ECM i imunosupresiju [40]. Stvaranje novih kolonija može se desiti u toku samo nekoliko dana u eksperimentalnim modelima, ali kod humanih tumora ovaj proces može zahtevati mesece, čak i godine. Određeni karcinomi, posebno dojke i prostate, kao i melanom poznati su po razvoju metastaza godinama i decenijama nakon uklanjanja primarne tumorske mase bez očigledne rezidualne bolesti [41–43]. Ova zapažanja su u skladu sa pretpostavkom da ćelije tumora nastanjuju metastatska mesta dok je primarni tumor još uvek prisutan, ali ostaju u stanju mirovanju (uspavanosti) tokom dužeg vremenskog perioda i ponovo se aktiviraju u nekoj kasnijoj fazi, verovatno kao rezultat promena u lokalnoj mikrookolini, formirajući klinički detektabilne kolonije [44]. To nas dalje podseća na ograničenja postojećih eksperimentalnih modela u razumevanju aspekata koji su iz njih izuzeti, što objašnjava neretko uočenu diskrepancu između pretkliničkih i kliničkih istraživanja.

Metastaziranje nije jednosmeran fenomen. Tumorske ćelije iz metastatskih lezija mogu ponovo ući u krvotok i/ili limfotok i izvršiti kolonizaciju drugih organa. Ćelije iz metastatskih kolonija mogu takođe ponovo cirkulisati nazad u primarni tumor, koji shodno tome može biti sastavljen od primarnih tumorskih ćelija i ćelija izvedenih iz metastaza. Metastaze stoga mogu biti mono-, oligo- ili poliklonalne. Klinička posmatranja sugerišu da većina tumora metastazira na određene ciljne organe, što je poznato kao metastatski organotropizam [35].

I pored značajnih iskoraka u proučavanju ovog fenomena, proces metastaziranja ostaje i dalje nedovoljno shvaćen. Razumevanje bioloških mehanizama metastatskog procesa je presudno za pronalaženje novih pristupa u terapiji malignih bolesti [17]. Opstrukcija bilo kog aspekta metastaziranja mogla bi dovesti do lokalizovanja primarnog tumora i značajno doprineti smanjenju rizika od smrtnosti povezane sa kancerom. Uprkos opsežnim terapijskim protokolima, stopa lečenja invazivnih oblika tumora je još uvek poražavajuće niska i povezana je sa brojnim neželjenim efektima [2,16].

1.2. Melanom

Melanom je maligni tumor koji nastaje usled neoplastične transformacije melanocita, ćelija kože koje potiču od prekursora poreklom iz nervne kreste i odlikuju se sposobnošću produkcije pigmenta melanina. Melanom takođe može nastati iz nekutanih melanocita koji se nalaze u horioidi oka, meningama, gastrointestinalnom i genitourinarnom traktu [45]. Među više od 100 različitih tipova humanih kancera poznatih do sada [11], maligni melanom se smatra najagresivnijim tipom raka kože. Iako čini samo 5% svih kožnih maligniteta, uzrokuje čak 50% smrtnosti od kancera kože [46]. Učestalost melanoma u svetu i Evropi raste zabrinjavajućom stopom. Prema podacima iz 2018. godine, procenjena stopa incidence melanoma u Evropi iznosila je 15 slučajeva na 100 000 stanovnika, dok je stopa mortaliteta bila 2,5/100 000. Iste godine, u Srbiji je melanom bio zastupljen sa 9,7 slučajeva kod muškaraca odnosno 8,4 slučajeva kod žena na 100 000 stanovnika u odnosu na standardnu svetsku populaciju [3,47]. Najnovija globalna statistika kancera pokazuje da je bilo 324 635 novih slučajeva i 57 043 smrti od melanoma 2020. godine, što predstavlja 1,7% odnosno 0,6% svih slučajeva i smrti od kancera, respektivno [48].

Kao faktori rizika za nastanak melanoma navode se ultraljubičasto zračenje [49], tip kože [50], geografska pozicija [51], pol [52], tip, veličina i brojnost nevusa na koži [53], kao i lična i porodična istorija bolesti [54]. Većina melanoma nastaje kao pojedinačne lezije na koži. Melanomi mogu metastazirati na regionalna i udaljena mesta. Najčešća mesta regionalnih metastaza su koža, potkožno tkivo i limfni čvorovi, dok su udaljeni organi koje melanom najpre kolonizuje pluća, jetra, mozak, kosti i creva [55,56]. Na osnovu mesta nastanka i morfoloških karakteristika jedne od faza razvoja melanoma, postoji podela na 4 osnovna podtipa kutanog melanoma: melanom sa površinskim širenjem, nodularni melanom, lentigo maligni melanom i akralni lentiginozni melanom. Pored melanoma kao najagresivnije forme raka kože, postoje još dva tipa nemelanomskih malignih tumora kože: bazocelularni i skvamocelularni karcinomi [57].

1.2.2. Terapija melanoma

Terapija melanoma podrazumeva angažman različitih vidova lečenja, kao što su hirurško odstranjivanje, radio-, hemio-, imunoterapija i ciljana terapija.

Ukoliko se melanom dijagnostikuje u ranoj fazi bolesti, hirurško odstranjivanje kao vid terapije dovodi do izlečenja u čak 90% slučajeva [58]. Ipak, za pacijente sa uznapredovalim metastatskim melanomom, hirurška ekscizija nije efikasna, dok se radioterapija koristi samo u kontekstu palijativne nege. Tada se primenjuju drugi tipovi terapija kao što su hemioterapija, ciljana i imunoterapija. Već nekoliko decenija je hemioterapija citostaticima, koja uključuje temozolomid, nab-paklitaksel, cisplatinu, karboplatinu, hidorksiureu i konačno dakarbazin kao zlatni standard, primenjivana za sistemsko lečenje uznapredovalog melanoma [59]. Iako su ovi lekovi i dalje okosnica aktuelne terapije, ograničeni su malim terapijskim indeksom, neželjenim dejstvima i lako stečenom rezistencijom [60]. Tako je maligni melanom u velikoj meri rezistentan na ovaj vid terapije i ima jako lošu prognozu, sa medijanom preživljavanja od 6-9 meseci i petogodišnjom stopom preživljavanja manjom od 5% [61,62]. Nova saznanja o molekularnim mehanizmima koji leže u osnovi melanoma kao i prirodi imunskog odgovora otvaraju vrata za razvoj ciljane terapije i imunoterapije. Upravo su ova dva vida lečenja poslednjih desetak godina dovela do rasta srednje stope preživljavanja od melanoma sa 9 na 20 – 30 meseci [63]. Blokada signalnih puteva uključenih u inicijaciju i progresiju melanoma i upotreba visoko specifičnih malih molekula inhibitora, samostalno ili u kombinaciji sa terapeutičkim neselektivne toksičnosti, podigla je efikasnost terapije. Tako je u postoperativnoj terapiji malignih melanoma primena kinaznih inhibitora, BRAF (engl. *B-type Raf kinase*) i MEK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase*) kao deo ciljane terapije, i upotreba

antitela anti-CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4*) i anti-PD-1 (engl. *Programmed Death 1*) kao deo imunoterapije dala optimistične rezultate u kliničkim ispitivanjima kod obolelih pacijenata [64–72]. Analiza prednosti i mana ciljane i imunoterapije ukazuje da oba pristupa imaju komplementarne uloge u terapiji kancera, pa su stoga opcije lečenja za pacijente sa melanomom koji koriste kombinovane pristupe sa imuno-modulatornim agensima i hemioterapijom ili ciljanom terapijom potencijalni načini za poboljšanje odgovora pacijenata [72].

Uprkos velikim istraživačkim naporima u oblasti terapije kancera i novim otkrićima, nedostatak efikasne terapije metastatskog melanoma je i dalje evidentan. Imajući u vidu da je udružen sa visokom stopom smrtnosti, ovaj tip malignog kancera kože predstavlja veliki izazov za naučnike u dizajniranju novih terapijskih strategija.

1.3. Upotreba prirodnih proizvoda u terapiji kancera

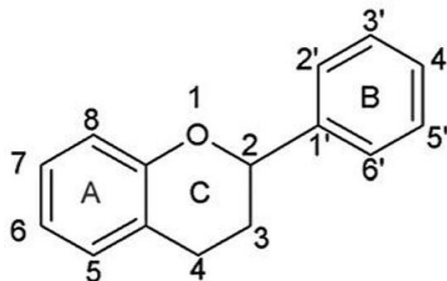
U cilju povećanja efikasnosti i smanjenja toksičnosti konvencionalnih terapija, standardni terapijski protokoli se često kombinuju sa komplementarnom medicinom. Vodeću poziciju na listi komplementarnih lekova zauzimaju prirodni proizvodi poreklom iz biljaka. Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, čak 80% svetske populacije koristi lekovito bilje kao dopunu zvanične medicine ili kao alternativnu medicinu [73]. Poslednjih godina raste broj studija o interakcijama biljaka i konvencionalnih terapeutika, posebno u oblasti kancera [74]. Velika biološka aktivnost jedinjenja izolovanih iz biljaka u stanju je da modulira dostignuća aktuelnih terapija, a kombinacija ovakvih tretmana može rezultirati u interakcijama tipa potencijacije, adicije, sinergizma ili antagonizma, čime se naglašava neophodnost postojanja izvesnog opreza pri njihovoj paralelnoj primeni i uvođenju ovako dizajniranog pristupa u terapiju kancera. Ukoliko interakcija prirodnih produkata i standardnih terapeutika rezultira sinergizmom, omogućava se upotreba nižih doza konvencionalnih lekova kojima se postiže terapijski efekat, a time se sprečavaju neželjena dejstva i sticanje rezistencije, ali i pojačava blagotvorno delovanje samog leka. Osim toga, potencijalno se ostvaruju i novi efekti koje nijedno od kombinovanih agenasa ne ispoljava pri samostalnoj primeni [75]. Brojne pretkliničke i kliničke studije ukazale su na plejotropne efekte biljnih lekova na tumorske ćelije. Proizvodi izolovani iz biljaka ostvaruju blagotvorni uticaj na preživljavanje i poboljšanje kvaliteta života pacijenata različitim mehanizmima putem kojih suzbijaju progresiju tumora, povećavaju osetljivost na hemio- i radioterapeutike, poboljšavaju funkciju imunskog sistema i ublažavaju tegobe uzrokovane primarnom bolešću ali i konvencionalnom terapijom [76–79].

Ogromna strukturna raznolikost prirodnih jedinjenja nastala tokom evolucije kao i njihova bioaktivnost čini ih bogatim izvorom komponenata sa antitumorskim potencijalom. Brojne biljne vrste se od davnina koriste u lečenju kancera, a sve više raste tendencija ka upotrebi i proceni terapijskih efekata prirodnih proizvoda izolovanih iz biljaka i njihovih derivata kao potencijalnih novih lekova [80]. Tako, u proteklih pola veka, medikamenti koji potiču iz prirodnih resursa čine značajan segment farmaceutske industrije, u poređenju sa nasumično sintetisanim jedinjenjima. Naime, čak 65% svih antikancerskih lekova koji su u kliničkoj upotrebi su upravo neizmenjeni prirodni proizvodi i njihovi derivati, bilo da se radi o polusintetskim analogima ili sintetskim jedinjenjima zasnovanim na farmakofori prirodnog produkta [81,82]. Kao primeri jedinjenja biljnog porekla koja se koriste kao komercijalni lekovi i predstavljaju prvu i drugu liniju hemioterapije velikog broja različitih tipova tumora navode se paklitaksel, vinkristin, vinblastin, etopozid, bruceantin, i dr. Oni pripadaju različitim grupama jedinjenja kao što su vinka alkaloidi, taksani, kamptotecini i epipodofilotoksini [83–85]. Pored hemioterapeutika koji su deo standardnih terapija, veliki broj jedinjenja prirodnog porekla se nalazi u pretkliničkim ili u nekoj fazi kliničkih studija za lečenje kancera, kao što su kurkumin, genistein i rezveratrol [86–91].

Polifenolna jedinjenja, poput flavonoida, poseduju širok spektar bioloških svojstava, uključujući antikancersku aktivnost [92]. Osim ispoljavanja niske toksičnosti u biološkim sistemima, sposobnost flavonoida da blokiraju ćelijski ciklus, indukuju apoptozu, remete formiranje mitotskog vretena, inhibiraju angiogenezu, moduliraju višestruku rezistenciju na lekove ili deluju antioksidativno, čini ih perspektivnim agensima u terapiji kancera. Štaviše, mnogi flavonoidi su već deo opsežnih kliničkih ispitivanja [93–96]. Ova jedinjenja su pokazala izvanredan antitumorski potencijal protiv različitih tipova kancera, uključujući melanom. U protekle dve decenije, ispitivana su svojstva oko 100 flavonoida u potencijalnoj terapiji melanoma, primenom različitih *in vitro* ili *in vivo* modela. Neki od najistaknutijih su apigenin, diosmin, fisetin, luteolin, kvercetin, galangin, daidzein i genistein [86,92,96].

1.4. Flavonoidi

Flavonoidi ili bioflavonoidi (lat. *flavus* = žuto) čine jednu od najvećih klasa sekundarnih biljnih metabolita. Njihov originalni naziv bio je vitamini P, mada se u današnje vreme ovaj termin retko koristi [97,98]. Hemijsku strukturu flavonoida predstavlja skelet sa 15 ugljenikovih atoma koji se sastoji od dva benzenova prstena (A i B) i jednog heterocikličnog (piranskog) prstena (C) koji sadrži kiseonik, pa se stoga ova karbonska struktura kraće obeležava sa C₆-C₃-C₆ (Slika 3) [99]. Iako je B prsten najčešće vezan za drugi ugljenikov atom C prstena, on se može vezati i za treći i četvrti atom ugljenika. Ova mogućnost, zajedno sa strukturnim karakteristikama B prstena i obrascima glikozilacije i hidroksilacije sva tri prstena čini flavonoide jednom od najvećih i najraznovrsnijih grupa, ne samo među polifenolima već i među svim biljnim produktima u prirodi. Prema tome, mnoga biološka svojstva flavonoida zavise upravo od strukturnih karakteristika ali i obrazaca glikozilacije i hidroksilacije njihovih prstenova. Strukturna raznolikost flavonoida direktno utiče na njihove hemijske, fizičke i farmakološke osobine [99–104].



Slika 3. Osnovna hemijska struktura flavonoida. Preuzeto i modifikovano (Panche AN i saradnici, 2016) [99]

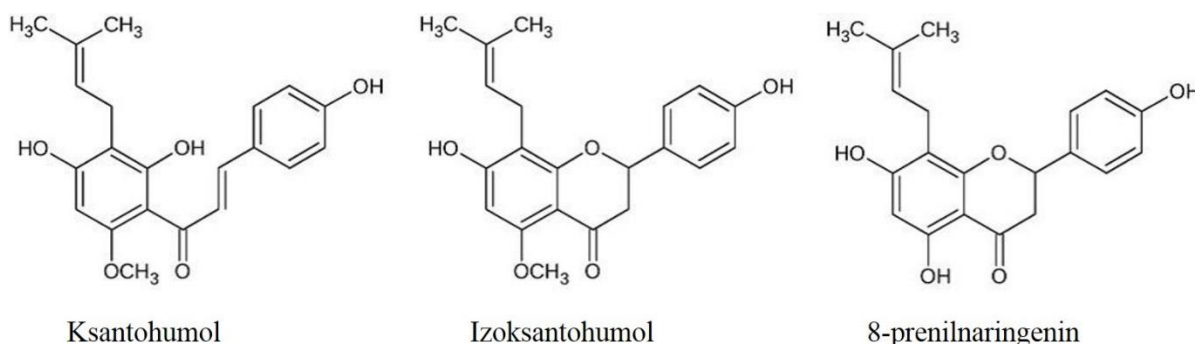
Do sada je identifikovano preko 8000 prirodnih flavonoida izolovanih iz različitih biljaka. U zavisnosti od toga za koji se ugljenikov atom C prstena vezuje B prsten kao i od stepena nezasićenosti i oksidacije C prstena, izvršena je klasifikacija flavonoida. Po IUPAC nomenklaturi, šira klasifikacija podrazumeva 3 grupe: izoflavonoide (vezivanje B prstena za 3. C atom), neoflavonoide (vezivanje B prstena za 4. C atom) i flavonoide (vezivanje B prstena za 2. C atom). Poslednje pomenuti, u zavisnosti od strukturnih osobina C prstena, dalje se dele na manje podgrupe: antocijanide, flavone, flavonole, flavanone, flavanonole i flavane (flavan-3-ole ili flavanole, flavan-4-ole i flavan-3,4-diole). Konačno, flavonoidi sa otvorenim C prstenom se nazivaju halkoni i oni se svrstavaju u ovu grupu biljnih derivata jer imaju slične puteve sinteze [100–102,105].

Flavonoidi su prisutni u voću, povrću, žitaricama, kori, korenu, stabljikama i cvetovima različitih biljaka, kao i u čaju, vinu i pivu. Njihova osnovna uloga je da daju boju, ukus i miris biljkama, a igraju i važnu ulogu u mehanizmima zaštite od patogena, ultraljubičastog zračenja i biljojeda

[99]. Široka rasprostranjenost flavonoida, njihova raznolikost i relativno niska toksičnost u poređenju sa drugim aktivnim biljnim komponentama (kao na primer alkaloidima) podrazumevaju da mnoge životinje, uključujući i ljude, unose u svoj organizam značajne količine ovih jedinjenja kao deo svakodnevne ishrane. Tako, od svih polifenola, flavonoidi predstavljaju najzastupljeniju grupu polifenolnih jedinjenja u ishrani kod ljudi [106]. Pored prehrambene primene, flavonoidi se smatraju nezamenjivom komponentom i u farmaceutskoj, medicinskoj i kozmetičkoj industriji [99].

1.5. Prenilflavonoidi

Kao najatraktivniji među svim flavonoidima izdvajaju se prenil halkoni i prenilflavonoidi, sa svojim predstavnicima ksantohumolom (XN), izoksanthumolom (IXN) i 8-prenilnaringeninom (8-PN) (Slika 4) [107]. Ova jedinjenja poseduju jednu ili više prenilnih grupa kovalentno vezanih za osnovnu strukturu flavonoida. Pretpostavlja se da se sa povećanjem broja hidrofobnih prenilnih grupa u molekulu povećava njegova lipofilnost, olakšava vezivanje supstance za ćelijsku membranu i povećava transmembranski transport, i da na taj način prenilacija potencijalno povećava biološku aktivnost izvornog flavonoida [108,109]. Zahvaljujući svojim raznovrsnim biološkim svojstvima, prenilflavonoidi su postali važna tema u današnjoj naučnoj zajednici i, shodno tome, sve intenzivnije se istražuje njihova uloga, kako u ishrani tako i u prevenciji i terapiji kancera. Čini se da je upravo prenilna grupa presudna za antitumorsku aktivnost prenilflavonoida, s obzirom da može dovesti do efikasnije internalizacije, a time i povećane aktivnosti u samoj ćeliji [110].



Slika 4. **Hemijska struktura XN, IXN i 8-PN.** Preuzeto i modifikovano (Seliger JM i saradnici, 2018) [107]

Za razliku od velike grupe flavonoida koji su široko rasprostranjeni u biljnom svetu, prenil halkone i prenilflavonoide proizvode samo mali broj porodica biljaka, a 80% od približno 1100 do sada identifikovanih prenilflavonoida se može naći u tri biljne familije: *Asteraceae*, *Cannabaceae* i *Leguminosae* (*Fabaceae*). Prenilflavonoidi su najzastupljeniji u biljci *Humulus lupulus L.* iz porodice *Cannabaceae*, poznatijoj kao hmelj, iako je njihov jedini izvor u ishrani ljudi najčešće konzumirano alkoholno piće na svetu – pivo [108,111].

Hmelj je višegodišnja biljka sa žućkasto-zelenim ženskim cvetovima iz kojih se razvijaju šišarke jajastog oblika koje predstavljaju plodove. Šišarke hmelja imaju jak aromatičan miris i gorak ukus. Za to su zaslužne materije koje ulaze u njegov sastav, među kojima su tanini (humulo-taninska kiselina), pektinske materije, kalijumove soli, alfa i beta hmeljne gorke kiseline kao i lupulin. Lupulin sadrži oko 50% smole ali i eterična ulja, vosak, tanin, bazna jedinjenja i dr. Imajući u vidu da je proizvodnja piva najčešći vid upotrebe ove biljke, svaka od njenih komponenti u određenoj meri doprinosi pravljenju ovog napitka. Smola lupulina konzervira pivo sprečavajući razvoj

mlečno-kiselinskih bakterija, eterična ulja mu daju prijatan miris, gorke materija gorčinu, a tanin ga bistri taložeći belančevine ječmenog slada [112]. Lupulinske žlezde ženskih cvetova hmelja luče prenilflavonoide, zajedno sa gorkim kiselinama i eteričnim uljima. Budući da ove žlezde ne poseduju enzim koji je neophodan za konverziju halkona u flavanone, one gotovo isključivo proizvode flavonoide tipa halkona, pri čemu prenil halkon XN čini 82-89% svih prenilflavonoida produkovanih u evropskim vrstama hmelja [108,113]. Međutim, tokom procesa pravljenja piva, XN se skoro u potpunosti (čak 98%) termički izomerizuje u IXN, dominantni prenilflavonoid u pivu. Smatra se da 8-PN nastaje neenzimskim putem tokom sušenja, skladištenja i ekstrakcije hmelja, ali su količine ovog prenilflavonoida u pivu prilično male i najverovatnije nastaju usled izomerizacije dezmetilksantohumola (DMX) prilikom pravljenja piva [108,111]. Osim tokom procesa pravljenja piva, do konverzije XN u IXN može doći i hemijskom izomerizacijom u baznim uslovima [114–117], ali i enzimskom ciklizacijom metodom mikrobne biotransformacije kojom se na mikrobima ispituje metabolička konverzija supstanci u cilju predviđanje ksenobiotskog metabolizma organskih jedinjenja u sisarskim sistemima [118]. Sa druge strane, *in vivo* konverzija XN u IXN podrazumeva ciklizaciju XN koja je katalizovana kiselinama u gornjem delu gastrointestinalnog trakta [119]. Osim toga, IXN se dalje može enzimski konvertovati u 8-PN putem *O*-demetilacije u jetri pomoću CYP1A2 (engl. *Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2*), člana citohrom P450 superfamilije enzima jetre uključenih u metabolizam lekova. Pored toga, kod nekih pojedinaca, crevne bakterije mogu da konvertuju IXN u 8-PN, što uglavnom zavisi od izražene individualne varijabilnosti u rasponu od 0% do 80% u posedovanju *Eubacterium limosum*, anaerobne gram pozitivne bakterije za koju se pretpostavlja da najviše doprinosi ovoj konverziji [108,120–124].

Pivo je jedno od najpopularnijih fermentisanih alkoholnih pića na svetu i u Evropi, gde čini čak 40% ukupnog konzumiranog alkohola [125]. Pored vode i kvasca, sadrži ugljene hidrate, B vitamine, peptide, aminokiseline, amine, minerale kao što su kalijum, magnezijum i natrijum, kao i fenolna jedinjenja. Većina fenolnih jedinjenja u pivu potiče od dodatog slada (70–80%) i hmelja (20–30%), a uglavnom su to prenilflavonoidi i fenolne kiseline [126,127]. Ukupan sadržaj fenola u pivu je nešto veći nego u belom i niži nego u crvenom vinu, ali može varirati u zavisnosti od sirovih materija i različitih parametara procesa pravljenja piva. Istovremeno, njegov sadržaj alkohola je niži u poređenju sa drugim popularnim alkoholnim pićima [128]. Različiti fiziološki efekti i zdravstvene beneficije kod kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, specifičnih tipova kancera, postmenopauzalnih valunga i osteoporoze su povezani sa konzumacijom piva [108,111,126,129,130]. U proteklih deset godina, potvrđene su mnogobrojne biološke aktivnosti sastojaka piva, ali su epidemiološki podaci u nekim slučajevima u suprotnosti. Rezultati različitih studija ukazali su na povećanje rizika za neke tipove tumora sa visokom konzumacijom piva, dok je u drugim slučajevima uočen blagotvoran efekat umerenog unosa ovog napitka [131–136]. Nekoliko istraživanja na eksperimentalnim životinjama potvrdilo je koristan efekat piva u prevenciji razvoja kancera [137–139]. Postoje dokazi koji sugerišu da koristan zdravstveni učinak piva nastaje kao posledica aditivnog efekta između sadržaja alkohola u pivu i njegovih fenolnih jedinjenja. Takođe, smatra se da se blagotvorno dejstvo piva može pripisati sposobnosti prenilflavonoida da menjaju signalne puteve u ćeliji [140].

Brojne studije su pokazale raznorodno prisustvo prenil halkona XN i prenil flavanona IXN i 8-PN u pivu. Njihova zastupljenost u hmelju i pivu prikazana je u Tabeli 1 [111,115,128,141,142].

Tabela 1. Zastupljenost XN, IXN i 8-PN u hmelju i pivu.

Prenilflavonoid	Hmelj % suve supstance	Pivo mg/l
XN	0,1 – 1	0,002 – 1,20
IXN	0,008	0,04 – 3,44
8-PN	0,002	0,001 – 0,24

*XN – ksantohumol; IXN – izoksantohumol; 8-PN – 8-prenilnaringenin

1.6. Izoksantohumol

U zavisnosti od hemijske strukture, prenilflavonoidi su podeljeni u nekoliko potklasa, a prenilflavoni, prenilflavonoli i prenilflavanoni se izdvajaju kao važni predstavnici. Izoksantohumol (5-*O*-metil-8-prenilnaringenin) je klasifikovan kao flavanon sa prenil grupom. Središnji deo molekula je heterociklični flavon sa dve hidroksilne grupe na C7 i C4' atomu ugljenika i prenil grupom na C8 ugljenikovom atomu. Hemijska formula ovog organskog jedinjenja koje sadrži 21 atom ugljenika je C₂₁H₂₂O₅, a molarna masa iznosi 354,396 g/mol. U čistoj formi predstavlja kristalni bledo-žuti prah koji je, kao i XN i 8-PN, slabo rastvorljiv u vodi ali dobro rastvorljiv u organskim rastvaračima [143].

Glavni prirodni izvor ovog flavanona je koren biljke *Sophora flavescens* [144], grma koji raste u severnom delu Kine i Mongolije. Lokalne zajednice ovu biljku nazivaju „Shen Ku“, sa značenjem gorki koren, verovatno zbog prisustva mnogih flavonoida i alkaloida u njenom korenu. *S. flavescens* se od davnina koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje različitih stanja i oboljenja poput groznice, upale, čireva, apscesa, ekcema, svraba i opekotina na koži [145,146]. Pored *S. flavescens*, još jedan važan prirodni izvor izoksantohumola je biljka hmelj, iako je njegov jedini izvor u ishrani ljudi pivo, u kome je daleko zastupljeniji u odnosu na prirodne izvore, kako je već i pomenuto [108,111]. Osim hmelja i piva, dijetetski suplementi (engl. *nutraceuticals*) koji sadrže hmelj, a koriste se kao hormonska zamena u menopauzi, kao sredstva za relaksaciju, olakšavanje bola, pomoć pri spavanju, u estetskoj medicini, za smanjenje anksioznosti takođe predstavljaju značajan izvor IXN [147].

1.6.1. Metabolizam IXN

Glavni metabolički putevi XN, IXN i 8-PN su opsežno okarakterisani *in vitro*, korišćenjem mikrozoma pacova i čoveka [111,119,122,148–150] i *in vivo*, na modelima miša, pacova i čoveka [120,123,124,151,152].

Kao što je već rečeno, *in vivo* biotransformacija IXN dešava se u gastrointestinalnom traktu ili, manjim delom, u jetri. U gastrointestinalnom traktu konverzija IXN u 8-PN se odvija pomoću mikroorganizama. Studije bazirane na simulatoru humanog intestinalnog mikrobnog ekosistema (engl. *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem*, SHIME) pokazale su da IXN i drugi prenilflavonoidi ostaju nepromenjeni nakon prolaska kroz želudac i tanko crevo, a da se transformacija dešava u debelom crevu, uz maksimalni prinos od 80% [121,122]. Otkriveno je da postoji izuzetno visoka varijabilnost između različitih osoba u sposobnosti konverzije IXN pomoću intestinalnih bakterija. Procenjuje se da samo jedna trećina populacije ima visoku ili srednju sposobnost da konvertuje IXN u 8-PN, što i nije iznenađujuće uzimajući u obzir činjenicu da je više od 160 sojeva bakterija izolovano iz humanog gastrointestinalnog trakta [153]. Jedan od tih sojeva

je i *Eubacterium limosum*, anaerobna gram pozitivna bakterija za koju se pretpostavlja da najviše doprinosi ovoj konverziji [123,154]. Postoje i dokazi da se biotransformacija IXN u 8-PN može vršiti i pomoću gljiva [155].

Manjim delom, IXN se biotransformiše u jetri, gde se putem *O*-demetilacije vrši konverzija u kojoj učestvuju enzimi citohrom P450 superfamilije. Većina IXN se prvo apsorbuje u krv, a zatim se iz jetre izlučuje kao glukuronid nazad u crevo, slično kao i kod drugih flavonoida. Oko 30% IXN se izlučuje urinom u obliku aglikona ili glukoronid konjugata, dok primarni način izlučivanja ovog flavanona iz organizma ne podrazumeva put preko bubrega [120,123]. Važno je napomenuti da, zbog slabe apsorpcije nakon oralne primene kao i enterohepatičke recirkulacije, poluživot ovog jedinjenja dostiže i 20 h. Osim glukuronidacije, drugi procesi koji se odvijaju u jetri uključuju demetilaciju IXN do 8-PN i hidroksilaciju prenil grupa što rezultira u formiranju *cis* i *trans* alkohola. Ove dve transformacije su posredovane enzimima citohrom P450 superfamilije; hidroksilacija je posredovana izoformama CYP2C19 (engl. *Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19*) i CYP2C8 (engl. *Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8*), a demetilacija izoformom CYP1A2. Međutim, treba napomenuti da se enzim CYP1A2 karakteriše izraženim polimorfizmom kod ljudi. Osim toga, njegova aktivnost se može regulisati i ekološkim i genetskim faktorima. Ekološki faktori koji mogu aktivirati ili inhibirati CYP1A2 enzim podrazumevaju brojne lekove, ishranu, konzumiranje alkohola i pušenje. Sve navedeno može doprineti razlikama između individua u mogućnosti konverzije IXN u 8-PN koja je posredovana CYP1A2 enzimom [124,156,157].

Dakle, sposobnost konverzije IXN u 8-PN je fenotip koji se u velikoj meri pripisuje interindividualnim razlikama u sastavu mikrobiote creva kao i faktorima ishrane koji utiču na crevni mikrobiom, a potencijalno, i u manjoj meri razlikama u enzimu CYP1A2, pa se smatra da se tek oko 40% opšte populacije odlikuje ovim fenotipom [158].

1.6.2. Uloga IXN

Iako nije proučavan u tolikoj meri kao njegov prekursor XN, ili produkt njegove konverzije snažni fitoestrogen 8-PN, IXN je privukao značajnu pažnju zbog obilja svojih farmakoloških svojstava. Ovaj derivat hmelja i piva ističe se raznolikim spektrom bioloških aktivnosti, kao što su proestrogenska, antimikrobna, antioksidantna, antiinflamatorna i antiangiogena svojstva [143,146]. Ipak, njegov antitumorski potencijal je zaista vredan pažnje i potvrđen je velikim brojem *in vitro* studija.

IXN je realizovao antitumorski potencijal inhibirajući proliferaciju ćelijskih linija koje vode poreklo od različitih tipova kancera, npr. kolona (HT-29, CaCo-2, HCT115, SW480, SW620 i LoVo), prostate (DU145 i PC-3), jajnika (A-2780), sarkoma materice (MES-SA), dojke (MCF-7, T-47D, MDA-MB-231 i Sk-Br-3), pluća (A-549), glioblastoma (U-118 MG), promijelocitne leukemije (HL-60), akutne T limfocitne leukemije (Jurkat), kao i nekih humanih tumorskih ćelija otpornih na terapijike (kolon LoVo/DX, sarkom materice MESSA/DX5, ovarijum A2780cis i dojka MCF-7/ADR) [142,143,159–169]. Pored toga, IXN je pokazao direktan citocidni efekat na Ca-Co ćelije kancera kolona i Sk-Br-3 ćelije kancera dojke putem blokade progresije ćelijskog ciklusa i indukcije apoptoze [159,166]. Nedavno je u jednoj studiji pokazano da IXN dovodi do povećanja kaspazne aktivnosti u SW620 ćelijama kancera kolona indukujući tako apoptozu [161]. U drugom istraživanju je smrt ćelija kancera prostate PC-3 i DU145 izazvana IXN definisana kao forma ćelijske smrti nezavisne od kaspaza koja podseća na autofagiju [168]. Takođe, podaci iz literature su pokazali da IXN može da pokrene smrt ćelija tipa apoptoze kod mišjih 3T3-L1 zrelih adipocita preko mitohondrijskog puta, kao i da inhibira diferencijaciju i sazrevanje preadipocita [170]. Osim toga, prethodna istraživanja su ukazala na to da antitumorski potencijal IXN može biti

posredovan diferencijacijom tumorskih ćelija, kako je i primećeno na HT-29 i SW620 ćelijama kancera kolona [143,166].

Mnogobrojne studije impliciraju da prenilflavonoidi mogu da deluju na različite tipove invazivnih tumora [171–173], jednim delom ometajući i Wnt signalni put, za koji je pokazano da je njegova povećana regulacija povezana sa metastatskim profilom melanoma [174–177]. Sposobnost IXN da inhibira invaziju kroz vanćelijski matriks je takođe uočena na HT115 ćelijama raka debelog creva [143,166].

Pored ometanja invazije, važan aspekt u ograničavanju progresije tumora i formiranja metastaza je svakako interferencija sa inflamacijom, angiogenezom ali i vaskulogenom mimikrijom, koja, za razliku od angiogeneze u kojoj endotelne ćelije formiraju nove krvne sudove, podrazumeva proces u kome agresivne ćelije kancera formiraju strukture slične kapilarima bez prisustva endotelnih ćelija. Angiogeneza i vaskulogena mimikrija predstavljaju dva važna aspekta neovaskularizacije pa time važe za obeležja malignog kancera i igraju ključnu ulogu u metastaziranju i progresiji različitih tipova tumora. Vaskulogena mimikrija je inače prvi put opisana u malignim i metastatskim ćelijama humanog melanoma 1999. godine [178]. Dokazano je da IXN inhibira angiogenezu, vaskulogenu mimikriju i inflamaciju i na taj način indirektno ostvaruje antitumorski efekat. Jedan od prvih podataka o antiangiogenim svojstvima prenilnih flavonoida, u kome je korišćen humani angiogeni test sistem, pokazao je smanjenje rasta novoformiranih kapilara nakon tretmana XN i IXN *in vitro*. Pored toga, oba derivata hmelja su efikasno inhibirala migraciju/proliferaciju HMEC-1, imortalizovanih humanih mikrovaskularnih endotelnih ćelija, u testu zarastanja rana [142,179,180]. Negrão i saradnici su otkrili da XN i IXN, ali ne i 8-PN, ostvaruju kako antiangiogeni tako i antiinflamatorni efekat na vaskularne ćelije *in vitro*. Naime, ova dva prirodna derivata hmelja su inhibirala rast endotelnih i glatko-mišićnih ćelija, njihovu pokretljivost, invaziju i formiranje struktura nalik kapilarima. Testom zarastanja rana pokazano je da je tretman XN i IXN doveo do smanjenja broja krvnih sudova, enzimske aktivnosti serumskih makrofaga i nivoa inflamatornog IL-1 β (engl. *Interleukin 1 beta*) u serumu [181]. Druga studija iste grupe naučnika je pokazala da su navedene supstance promovisale programiranu ćelijsku smrt humanih endotelnih ćelija pupčane vene (HUVEC) i humanih glatko-mišićnih ćelija aorte (HASMC) i blokirale formiranje struktura nalik kapilarima. Antiinflamatorni i antiangiogeni efekti IXN postignuti su inhibicijom inflamatornih signala TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*) i NF- κ B (engl. *Nuclear Factor kappa B*), kao i angiogenih regulatora – VEGFR2 (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*), Tie 2 (engl. *Tyrosine-protein kinase receptor 2*), angiopoetina 1 i angiopoetina 2. Ista studija je ukazala na to da IXN može da reguliše *in vivo* vaskularnu proliferaciju i stabilizaciju, kao i uzajamnu inflamatornu interkciju između endotelnih ćelija i vaskularnih glatko-mišićnih ćelija [182]. Slično tome, *in vitro* esej angiogeneze ukazao je na sposobnost IXN da smanji formiranje tubula nalik kapilarima nastalih od MDA-MB-231 ćelija na ekstraćelijskom matriksu, ali i njegov potencijal da ukine ekspresiju TGF- β (engl. *Transforming Growth Factor beta*) u ovoj invazivnoj ćelijskoj linije kancera dojke. Štaviše, ovaj sastojak piva je blokirao IFN- γ (engl. *Interferon gamma*), IL-4 (engl. *Interleukin 4*) i IL-6 (engl. *Interleukin 6*) zavisin JAK/STAT (engl. *Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) signalni put i suprimirao ekspresiju proinflamatornih gena u ćelijskoj liniji monoblastne leukemije MonoMac6 [183].

Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala može da doprinese antitumorskom potencijalu. Kao i većina fenola, prenilflavonoidi poseduju antioksidativna svojstva [142]. Da IXN deluje kao snažan “sakupljač” (engl. *scavenger*) radikala potvrđeno je mnogobrojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima [108,143,162,184–186].

Osim toga, IXN je ispoljio i hemopreventivna svojstva, jednim delom zbog sposobnosti interakcije sa CYP superfamilijom metaboličkih enzima koji su uključeni u oksidativnu, peroksidativnu i reduktivnu transformaciju ksenobiotika i endogenih supstanci. Tako ovaj prenilflavonoid može da

dovede do modulacije metabolizma kancerogena putem selektivne inhibicije nekolicine citohrom P450 enzima, humanih enzima jetre odgovornih za biotransformaciju koji igraju ključnu ulogu u hemijski izazvanoj kancerogenezi. U literaturi se navodi njegovu sposobnost da efikasno inhibira CYP1A2 acetanilid 4-hidorksilaznu aktivnost, zajedno sa snažnim ukidanjem CYP1A2 posredovanog metabolizma heterocikličnog amina 2-amino-3-metilimidazola[4,5-f] kinolina (IQ) i aflatoksina B1. Prema tome, ovaj flavanon može značajno da menja aktivnost enzima koji su uključeni u metabolizam kancerogena i procese detoksikacije. Efikasnost sistema detoksikacije je povezana sa podložnošću razvoja tumora. Osim toga, inhibicijom humanih citohrom P450 enzima, IXN može da utiče na efikasnost i bezbednost primene nekih lekova koji su njihovi supstrati, u slučajevima kada se IXN i ti lekovi primene zajedno u terapiji [156,187–190].

Specifično svojstvo IXN da interferira sa metabolizmom lekova i na taj način menja njihovu efikasnost opisano je u literaturi i ima poseban značaj kada je u pitanju terapija kancera. ABC proteini (engl. *ATP-Binding Cassette proteins*) su membranske transportne pumpe odgovorne za apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lekova. Ovi transporteri vrše izbacivanje hemioterapeutskih agenasa, čime se sprečava unutarćelijska akumulacija terapeutika i omogućava višestruka rezistencija na lekove (engl. *Multi-Drug Resistance*, MDR). Upravo MDR predstavlja glavnu prepreku kliničke efikasnosti lekova koji se primenjuju u terapiji različitih vrsta kancera. Stoga, inhibicija ABC transportera, bilo kompetitivnim ili nekompetitivnim mehanizmom, u tumorskim ćelijama može biti efikasan način kojim se ostvaruje ukidanje MDR [163]. Prethodno objavljeni podaci otkrili su da IXN deluje kao inhibitor/supstrat nekih transportera za lekove, prevashodno ABCG2 (engl. *ATP-Binding Cassette subfamily G member 2*), što ukazuje na mogućnost njegovog uticaja na efikasnost terapeutika [191,192]. Slično tome, ponašajući se kao kompetitivni inhibitor ABCB1 (engl. *ATP-Binding Cassette subfamily B member 1*) transportera, ovaj flavanon bio je odgovoran za ukidanje rezistencije na doksorubicin posredovane navedenom efluks pumpom u MCF-7/ADR, ćelijama tumora dojke rezistentnim na lekove, i na taj način ih je učinio osetljivim na citotoksičnost pomenutog hemioterapeutika [163].

Nažalost, i dalje je prilično mali broj podataka o efikasnosti prenilflavonoida protiv tumora *in vivo*. Do sada se ovom temom bavila samo nekolicina studija koje su podrazumevale upotrebu animalnih modela, i to mišjih modela kancera dojke, adenokarcinoma prostate, akutne limfocitne leukemije B ćelija i limfoma T ćelija [193–197]. Ipak, *in vivo* istraživanja mogu da pruže neosporne, čvrste dokaze o stvarnim svojstvima ispitivanih supstanci i od izuzetnog su značaja za razvoj budućih lekova, pa su stoga ne samo poželjna već i neophodna.

Još jedan važan podatak na koji treba obratiti pažnju kada se govori o dejstvu lekova jeste toksičnost ispitivanih supstanci za normalne ćelije i zdrava tkiva. Imajući u vidu da IXN nije pokazao značajan toksični efekat prema različitim netumorskim ćelijskim linijama kao što su primarni hepatociti pacova, epitelne ćelije creva pacova (IEC-6), embrionski fibroblasti miša (NIH/3T3), humane epitelne ćelije pupčane vene (HUVEC), humani fetalni hepatociti (L-02), humane epitelne ćelije želuca (GES-1), kao i prema nekim animalnim modelima, može se reći da ovo prirodno jedinjenje ispunjava kriterijum bezbedne primene [163,164,167].

Obilje podatka u literaturi o antitumorskom potencijalu IXN i nepostojanje adekvatnog pristupa u lečenju melanoma, stavilo je u fokus istraživanja pomenuti prenilflavonoid u kontekstu eventualne terapije melanoma. Zbog toga je bilo neophodno ispitati efekte koje IXN ispoljava na ćelijama melanoma različitog porekla i stepena invazivnosti kao i u solidnom i metastatskom *in vivo* modelu pomenute bolesti.

2. Ciljevi istraživanja

Nedostatak podataka o uticaju izoksantohumola na maligni melanom različite invazivnosti nameće potrebu za dodatnim istraživanjem njegovog potencijala i mehanizama dejstva kao i sadejstva sa konvencionalnom terapijom u različitim fazama i modalitetima ove bolesti *in vitro* i *in vivo*.

Na osnovu navedenog, postavljeni su sledeći naučni ciljevi ovog istraživanja:

1. Ispitivanje antitumorskog potencijala IXN na ćelijskim linijama primarnog (B16) i metastatskog (B16-F10) melanoma mišjeg porekla i visoko invazivnog melanoma humanog porekla (A-375) *in vitro*.
2. Definisane mehanizama direktnog delovanja IXN na ćelije melanoma različite invazivnosti.
3. Definisane uticaja IXN na metastatski potencijal ćelija melanoma.
4. Ispitivanje interakcija IXN sa konvencionalnim hemioterapeuticima na ćelijskim linijama melanoma različite invazivnosti *in vitro*.
5. Ispitivanje terapijskog potencijala IXN i potencijalnih interakcija sa konvencionalnim citostatikom paklitakselom na singenom modelu solidnog melanoma *in vivo*.
6. Ispitivanje terapijskog potencijala IXN i potencijalnih interakcija sa konvencionalnim citostatikom paklitakselom na singenom modelu metastatskog melanoma *in vivo*.

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći reagensi:

Medijum za kultivaciju ćelija RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Biowest, Riversajd, SAD); HEPES (Biological Industries, Kromvel, SAD); penicilin/streptomycin (PAA Laboratories, Pašing, Austrija); serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS), fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS), tripsin, kristal violet (CV), dimetil sulfoksid (DMSO), *N,N*-dimetilformamid (DMF), doksorubicin hidrohlorid (DOXO), 5(6)-karboksifluorescein diacetat *N*-sukcinimidil estar (CFSE), etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), aprotinin, trisaminometan hidrohlorid (TRIS-HCl), bromfenol plavo, ditiotreitrol (DTT), 3-metiladenin (3-MA), 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-dopa), natrijum azid (NaN_3) (svi Sigma Aldrich, Sent Luis, SAD); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT), albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA), natrijum dodecil sulfat (SDS), amonijum persulfat (APS), β -merkaptioetanol, Tween-20, saharoza (svi AppliChem, Darmštat, Nemačka); paraformaldehid (PFA), glicin, *N,N,N',N'*-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED), akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka); Folin-Ciocalteu reagens, dinatrijum hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmštat, Nemačka); natrijum dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Analytika, Prag, Češka Republika); natrijum hlorid (NaCl) (ICN, Aurora, SAD); natrijum karbonat (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Milano, Italija); trinatrijum fosfat (Na_3PO_4) (ICN Biomedicals, Irvin, SAD); natrijum hidroksid (NaOH), natrijum nitrit (NaNO_2), kalijum hlorid (KCl), kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), glicerol (LachNer, Neratovice, Češka Republika); kalijum natrijum tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); kalcijum hlorid (CaCl_2), bakar sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), sirćetna kiselina (CH_3COOH), metanol (CH_3OH), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), vodonik peroksid (H_2O_2) (Zorka, Šabac, Srbija); fosforna kiselina (H_3PO_4) (Centrohem, Stara Pazova, Srbija); tripan plavo, TRIS, Triton X-100 (Fluka, Selze, Nemačka); dihidrorodamin 123 (DHR 123), 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM diacetat) (Molecular Probes, Judžin, SAD); propidijum jodid (PI) (BD Pharmingen, San Dijego, SAD); aneksin V konjugovan FITC (engl. *Fluorescein IsoThioCyanate*) (Ann V-FITC) (BioLegend, San Dijego, SAD); pan-kaspazni inhibitor konjugovan FITC (ApoStat) (R&D Systems, Mineapolis, SAD); akridin-oranž (AO) (Labo-Moderna, Pariz, Francuska); nemasno mleko u prahu (engl. *Blotto non-fat dry milk*) (ChemCruz Biochemicals, Santa Cruz, SAD); reagens za detekciju hemiluminescencom (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija); paklitaksel (PCT) za *in vitro* eksperimente (Cell Signaling Technology, Denver, SAD); PCT za *in vivo* eksperimente, nistatin (Galenika, Beograd, Srbija); Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija); Eozin Y (Molar Chemicals, Budimpešta, Mađarska); diaminobenedin (DAB) (Dako North America, Karpinterija, SAD); DPX medijum za montiranje mikroskopskih preparata (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD); medijum za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata sa DAPI bojom (DAPI Fluoromount-G) (Southern Biotech, Birmingen, SAD); medijum za montiranje tkiva za sečenje na aparatu Tissue-Tek® O.C.T. (engl. *Optimum Cutting Temperature*) (Sakura Finetek, Torans, SAD); Matrigel® (BD Bioscience, Bedford, SAD); izoksantohumul, ksantohumul, 8-prenilnaringenin (Orgentis, Gatersleben, Nemačka).

U imunoblot metodi upotrebljen je marker definisanih molekulskih težina proteina PageRuler (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD). Pregled primarnih i sekundarnih antitela korišćenih za imunoblot analizu proteina je prikazan u Tabeli 2.

Tabela 2. Antitela korišćena za imunoblot analizu

Primarna antitela	Poreklo	Proizvođač
p-Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-p44/p42 MAPK (ERK1/2)(Thr202/Tyr204)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p44/p42 MAPK (ERK1/2)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p38 MAPK	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-p70S6 kinaza (Thr389)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p70S6 kinaza	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
p-S6 ribozomski protein (Ser240/244)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
S6 ribozomski protein	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
β -katenin	kunić	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Notch 1	kunić	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Oct-3/4	kunić	Santa Cruz Biotechnology, SAD
β -aktin	kunić	Abcam, Velika Britanija
Integrin α -6	kunić	Abcam, Velika Britanija
Rho (Y486)	kunić	Abcam, Velika Britanija
FAK	kunić	Sigma Aldrich, SAD
Vinkulin	miš	Sigma Aldrich, SAD
α -SMA	miš	Sigma Aldrich, SAD
α -tubulin (11H10)	kunić	Cell Signaling Tehnology, SAD
Sekundarna antitela	Poreklo	Proizvođač
Anti-kunić, obeleženo peroksidazom rena	koza	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Anti-kunić, obeleženo peroksidazom rena	koza	Cell Signaling Tehnology, SAD
Anti-miš, obeleženo peroksidazom rena	koza	Santa Cruz Biotechnology, SAD

Za imunohistohemiju korišćena su primarna antitela: anti-HMGB1 (GT383) (engl. *High Mobility Group Box 1*) (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD) i anti-S100 (4B3) (Abcam, Kembridž, Velika Britanija) u razblaženju 1:100. Za detekciju HMGB1 korišćen je pojačivač primarnog antitela i peroksidaza rena (engl. *HorseRadish Peroxidase*, HRP) polimer iz Lab Vision™ UltraVision™ LP detekcionog sistema: HRP polimer/DAB Plus hromogen dok je za detekciju primarnog anti-S100 antitela upotrebljeno sekundarno Lab Vision™ kozje anti-polivalentno antitelo obeleženo biotinom i tercijarno antitelo Lab Vision™ streptavidin HRP (svi Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD).

Za imunofluorescencu korišćeno je Ki-67 (M-19) antitelo konjugovano FITC (Santa Cruz Biotechnology, Dalas, SAD) u razblaženju 1:100.

3.2. Rastvori

Za uzgajanje i pasažiranje ćelijskih linija melanoma poreklom od miša (B16 i B16-F10) i čoveka (A-375) korišćen je RPMI-1640 medijum suplementiran sa 20 mM HEPES puferom, 2 mM L-glutaminom i 0,01% natrijum piruvatom. U takav medijum su dodavani: 10% FBS, antimikotik nistatin (100 IJ/ml) i antibiotici penicilin (100 IJ/ml) i streptomycin (100 µg/ml), što je u daljem tekstu označeno kao medijum za kultivaciju. Medijum za kultivaciju makrofaga sadržao je 5% FBS. Pre dodavanja u medijum, FBS je zagrevan na 56 °C u trajanju od 30 minuta kako bi se inaktivirale komponente komplemента. PBS koji je u eksperimentalnom radu korišćen za ispiranje ćelija, pravljen je od: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O i 1,76 KH₂PO₄, sa pH vrednošću od 7,4 na sobnoj temperaturi.

Za tripsinizaciju adherentnih ćelijskih linija upotrebljivan je 0,25% tripsin-0,02% EDTA rastvor u PBS.

Za brojanje ćelija korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo u PBS.

U protočnoj citofluorimetriji, za potrebe bojenja ćelija aneksinom V obeleženim FITC korišćen je pufer za vezivanje aneksina (engl. *Annexin Binding Buffer*, ABB), koji je napravljen od 10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl i 2,5 mM CaCl₂.

Za detekciju aktivnosti enzima tirozinaze, pravljen je rastvor za liziranje ćelija: 1% Triton X-100 u PBS pH 6,8. Za potrebe merenja količine melanina, ćelije su lizirane 1 M rastvorom NaOH u destilovanoj vodi (dH₂O).

Za merenje koncentracije proteina metodom po Loriju pravljeni su tri rastvora: 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH, 1% CuSO₄ × 5H₂O i 2% K-Na-tartarat u dH₂O, koji su mešani u razmeri 98:1:1.

Za imunoblot analizu proteina pravljeni su sledeći rastvori: rastvor za liziranje ćelija (62,5 mM TRIS-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT u dH₂O) koji je neposredno pre korišćenja suplementiran inhibitorima proteaza (10 µg/mL aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF); 4 × Lemlijev pufer – standardni pufer za nalivanje uzoraka proteina na gel za elektroforetsko razdvajanje (1 M TRIS-HCl pH 6,8, 20% SDS, 20% glicerol, 0,2 M β-merkaptetanol i 0,004% bromfenol plavo); 5 × TGB (engl. *Tris-Glycine Buffer*) – pufer za elektroforezu (125 mM TRIS, 0,5% SDS, 1,25 M glicin u dH₂O); pufer za transfer proteina na membranu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10% metanol, 0,1% SDS u dH₂O); 5 × PBS bez kalijuma (400 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄ × 2H₂O u dH₂O); rastvor za ispiranje membrana (0,1% Tween 20 u PBS (PBSTw)); rastvor za blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela (5% BSA ili 5% mleko u prahu u 0,1% PBSTw); odgovarajuća razblaženja antitela pravljeni su u 0,1% PBSTw sa 1% BSA ili 3% mleka u prahu.

Za imunohistohemijsko bojenje pravljene su sledeći rastvori: rastvor za blokiranje endogenih peroksidaza (3% H₂O₂-10% metanol u 0,5% Triton X-100-PBS); rastvor za blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja antitela (10% FBS u PBS); rastvor za demaskiranje antigena (10 mM Na-citrat dihidrat sa 0,05% Tween 20, pH 6); odgovarajuća razblaženja antitela pravljena su u PBS; supstrat za ekstravidin peroksidazu bio je DAB rastvoren u svom rastvaraču po preporuci proizvođača (1 kap na 1 ml).

Izoksantohumol (MW = 354,396 g/mol), ksantohumol (MW = 354,396 g/mol) i 8-prenilnaringenin (MW = 340,375 g/mol) su kupljeni u Orgentisu (Gatersleben, Nemačka). Prema uputstvu proizvođača, sva tri ispitivana jedinjenja pravljena su kao 100 mM koncentrovani rastvori koji su pripremani u DMSO i čuvani na -20 °C. Radni rastvori (1,6 – 100 μM) za tretman *in vitro* su pravljene u medijumu za kultivaciju neposredno pre upotrebe. Za tretman *in vivo*, IXN je pravljen u dozi 20 mg/kg u 2% DMSO-PBS, neposredno pre tretmana životinja. Procenat DMSO u najvećoj koncentraciji eksperimentalnih agenasa u ćelijskoj kulturi nije prelazio 0,1%.

Cisplatina (cisPt) je, zbog nestabilnosti u DMSO, rastvarana u DMF u vidu 10 mM rastvora neposredno pred upotrebu kada su pravljene i radni rastvori (0,94 – 15 μM) u medijumu za kultivaciju. Doksorubicin hidrohlorid (DOXO) je rastvoren u dH₂O, a 20 mM rastvor je čuvan na +4 °C, dok su radni rastvori (0,04 – 1 μM) pravljene u medijumu za kultivaciju neposredno pred tretman ćelija. Paklitaksel (PCT) je rastvoren u DMSO i 1 mM rastvor je čuvan na -20 °C, a radni rastvori (3,125 – 25 nM) za tretman *in vitro* pravljene su u medijumu za kultivaciju ćelija neposredno pre upotrebe. Procenat DMSO nije bio veći od 0,1% u najvećoj radnoj koncentraciji PCT. Za tretman *in vivo*, PCT je pravljen u radnoj koncentraciji 3 mg/kg u PBS neposredno pre upotrebe.

3.3. Kulture ćelija

U eksperimentima su korišćene tri različite ćelijske linije melanoma – miške (B16 i B16-F10) i humane (A-375), kao i jedna primarna kultura ćelija – makrofagi izolovani iz peritoneuma miša.

3.3.1. B16 linija mišjeg melanoma

B16 ćelijska linija mišjeg melanoma je uspostavljena iz hemijski indukovanoog tumora u C57BL/6 miševima [198]. Ovo je adherentna ćelijska linija koja vodi poreklo od epitelnih ćelija miša koje proizvode melanin. B16 ćelijska linija je jedna od retkih pigmentisanih linija melanoma dostupna za korišćenje u miševima i, shodno izraženoj pigmentaciji, laka je za praćenje *in vivo* nakon inokulacije u singene miševе te predstavlja pogodan model za istraživanje melanoma. Ono što karakteriše ovu liniju je nizak nivo Mek1-ERK1/2 aktivnosti, kao i to da je iNOS (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*) negativna. Radi se o ćelijama koje pokazuju slabu sposobnost invazije, nizak metastatski potencijal, i, stoga, poseduje viši stupanj diferencijacije. Postoji mnogo podtipova B16 ćelijske linije, a glavne razlike među njima su u metastatskom potencijalu i podložnosti imunskoj destruktiji. Neke od najčešće korišćenih izvedenih klonova ove linije u istraživanjima su B16-F10, B16-BL6, B164A5, B16GMCSF i B16FLT3 [199].

B16 ćelijska linija mišjeg melanoma korišćena u ovom istraživanju je ljubazni poklon dr Siniše Radulovića (Institut za onkologiju i radiologiju, Beograd, Srbija), a originalno potiče iz Američke kolekcije kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection, ATCC*) (Rokvil, SAD).

3.3.2. B16-F10 linija mišjeg melanoma

B16-F10 ćelijska linija mišjeg melanoma je selektivno izvedena iz parentalne B16 linije ćelija koja formira plućne metastaze po intravenskoj inokulaciji u C57BL/6 miševе. Nastala je uzastopnim transferom tumorskih ćelija izolovanih iz plućnih metastaza u 10 ponovljenih ciklusa [200–202]. *In vitro*, ove ćelije rastu kao adherentna ćelijska kultura koju čine vretenaste i ćelije sa epitelijalnom morfologijom. Radi se o posebno agresivnoj i veoma invazivnoj liniji sa izrazito visokom stopom proliferacije i vremenom umnožavanja od samo 14 – 20 h [203,204]. Ukoliko se ove ćelije ubrizgaju subkutano u C57BL/6 miševе, formira se subkutani solidni tumor rastresite strukture sa jasnom tendencijom ćelija da invadiraju u peritoneum i potencijalom da metastaziraju na pluća [205,206]. Inokulacija u repnu venu dovodi do direktne kolonizacije pluća i formiranja plućnih metastaza [205–208]. Zbog posedovanja ovakvog ćelijskog fenotipa, B16-F10 linija je izuzetno koristan model za proučavanje fenomena metastaziranja, pa je i najčešće korišćen klon parentalne B16 ćelijske linije.

B16-F10 linija mišjeg melanoma poklon je prof. Barbare Seliger (Martin Luter Univerzitet, Hale, Nemačka), a originalno potiče iz ATCC.

3.3.3. A-375 linija humanog melanoma

A-375 ćelijska linija humanog melanoma je nastala eksplantacijom kulture solidnog melanoma čoveka [209]. Ovo je adherentna ćelijska linija koja se odlikuje epitelijalnom morfologijom. Iako se radi o ćelijama melanoma, za razliku od linija mišjeg melanoma, A-375 linija je amelanotična. Pored toga, karakteriše se visokim nivoom Mek1-ERK1/2 aktivnosti i konstitutivno eksprimira iNOS koja je odgovorna za produkciju azot-monoksida (engl. *Nitric Oxide*, NO) kao njenog endogenog faktora rasta. Reč je o anaplastičnoj, visoko agresivnoj malignoj ćelijskoj liniji, sa velikim potencijalom da invadira okolna tkiva i formira metastaze. Stoga, ćelije humanog melanoma poseduje niži stupanj diferencijacije i karakteriše ih „stem“ fenotip. Ove ćelije imaju sposobnost formiranja tumora nakon implantacije u imunokompromitovane miševе. S obzirom na visok maligni kapacitet, u zavisnosti od načina implantacije ćelija u miševе koji može biti intradermalno, subkutano, intravenski ili intrakardijačno, A-375 ćelijska linija formira dermalne tumore sa mikrometastazama na plućima i mozgu [210], subkutane tumore [211], samo plućne metastaze [212] ili metastaze na plućima, jetri, kostima i limfnim čvorovima [213].

A-375 ćelijska linija humanog melanoma originalno potiče iz ATCC, a dobijena je ljubaznošću prof. Ferdinanda Nikoletija (Univerzitet u Kataniji, Sicilija, Italija).

3.3.4. Ćelije peritonealnog eksudata miša

Ćelije peritonealnog eksudata (engl. *Peritoneal Exudate Cells*, PEC) miša su dobijene ispiranjem peritoneuma hladnim rastvorom PBS. Naime, u trbušne šupljine životinja je ubrizgavan sterilan hladan rastvor PBS, tečnost je aspirirana pipetiranjem, a zatim su sakupljane ćelije peritonealnog ispirka. Moguće prisustvo eritrocita, usled povređivanja krvnih sudova peritonealne šupljine, eliminisano je primenom pufera za liziranje istih u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja eritrocita, uzorci PEC su centrifugirani na 500 g u trajanju od 5 minuta, a zatim je ćelijski talog resuspendovan u medijumu za kultivaciju koji sadrži 5% FBS. Ćelije peritonealnog ispirka su posađene u ploče za sadnju i ostavljene da adheriraju tokom minimalno 4 h. Radi uklanjanja neadheriranih limfocita, bunarići ploča za sadnju su ispirani PBS i na taj način je dobijena populacija primarne ćelijske kulture makrofaga.

3.3.5. Uslovi kultivacije

Sve korišćene ćelijske linije formiraju adherentnu kulturu i gajene su u monosloju u sterilnim plastičnim flaskovima za kultivaciju adherentnih ćelijskih kultura, veličine 25 cm² ili 75 cm² (Sarstedt, Njuton, SAD), u zavisnosti od uslova eksperimenata. Gajenje ćelija vršeno je u 5 ml odnosno 10 ml medijuma za kultivaciju, u precizno definisanim uslovima u inkubatoru koji podrazumevaju vlažnu atmosferu, temperaturu od 37 °C i koncentraciju CO₂ od 5% (u daljem tekstu označeno kao inkubacija). Na svaka 2 – 3 dana obnavljan je medijum za kultivaciju, a ćelije su rutinski presađivane po dostizanju 80% konfluentnosti ili su korišćene u eksperimentima.

3.4. Eksperimentalne životinje

Eksperimentalne životinje korišćene u ovom istraživanju su miševi ženskog pola soja C57BL/6, starosti 8 – 12 nedelja. Životinje su dobijene iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima (bez patogena) sa *ad libidum* režimom uzimanja hrane i vode.

Svi *in vivo* eksperimenti u kojima su korišćene eksperimentalne životinje su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (br. 01-02/15 i br. 07-10/15).

3.5. Primenjene metode

3.5.1. Tripsinizacija ćelija

Prvi korak u eksperimentalnom radu sa adherentnim ćelijskim linijama je njihovo fizičko odvajanje od podloge laboratorijskog suda u kome su gajene što se postiže postupkom tripsinizacije. Ovaj postupak podrazumeva isecanje adhezivnih molekula odgovornih za međućelijske veze i veze ćelija sa podlogom od strane proteolitičkog enzima tripsina. Nakon što se vizuelno procenilo da su kulture ćelijskih linija melanoma dostigle 80% konfluentnosti, medijum u kome su gajene je odlivan, a flaskovi sa adherentnim ćelijama ispirani sa 5 ml ili 10 ml PBS kako bi se uklonile mrtve ćelije i zaostali medijum sa FBS koji bi inhibirao proces tripsinizacije. Odlepljivanje ćelija od podloge je započeto dodavanjem 500 µl ili 1 ml rastvora za tripsinizaciju i inkubacijom na 37 °C u trajanju od 3 minuta. Enzimska reakcija je prekidana dodavanjem svežeg medijuma za kultivaciju koji sadrži FBS, nakon čega je suspenzija ćelija centrifugirana 3 minuta na 2000 rpm. Dobijeni ćelijski talog je resuspendovan u svežem medijumu za kultivaciju nakon čega se pristupilo određivanju broja vijabilnih ćelija.

3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija

Za određivanje broja živih ćelija u suspenziji korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo u PBS. Ovo bojenje omogućava razlikovanje živih od mrtvih ćelija zahvaljujući tome što je tripan plavo negativno naelektrisana hromofora koja kao takva može selektivno da boji u plavo samo mrtve ćelije čija je membrana oštećena, dok žive ćelije ostaju nebojene usled očuvanog integriteta njihovih membrana. Rastvor tripan plavo boje je mešan sa suspenzijom ćelija u odnosu 1:1, a zatim nanošen na komoru po Bürker-Türku sa ugraviranim poljima i posmatran pod svetlosnim mikroskopom. Broj vijabilnih ćelija po ml suspenzije određivan je po formuli: broj ćelija / broj polja × 0,5 × 10⁶. Nakon utvrđivanja broja ćelija, razblaživanjem suspenzije podešavana je željena gustina ćelija neophodna za kultivaciju ili dalji eksperimentalni rad.

3.5.3. Priprema ćelijskih kultura za eksperimentalni rad

Za potrebe određivanja vijabiliteta, postojanosti efekta, autofagije sa 3-MA i hemosenzitizacije, ćelije su ravnomerno sađene u sterilne plastične ploče sa 96 bunarića ravnog dna za adherentne kulture (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka). Sve tri ćelijske linije melanoma sađene su u gustini 5×10^3 u 100 μ l medijuma za kultivaciju po bunariću, dok su ćelije peritonealnog eksudata sađene u gustini 2×10^5 /bunariću u 100 μ l medijuma. Za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija *in vitro*, B16-F10 ćelijska linija je sađena u pomenute sterilne ploče u gustini 3×10^4 u 200 μ l medijuma za kultivaciju po bunariću.

Za potrebe svetlosne mikroskopije, protočne citofluorimetrije, detekcije markera diferencijacije i imunoblot analize korišćene su sterilne plastične ploče sa 6 bunarića za adherentne kulture (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka) u koje je ravnomerno sađeno $2,5 \times 10^5$ ćelija melanoma u 1 ml medijuma za kultivaciju po bunaru. Za određivanje proliferativne sposobnosti ćelija pomoću klonogenog eseja, B16-F10 ćelije su sađene u pomenute ploče u gustini 1×10^3 u 2 ml medijuma za kultivaciju po bunaru, dok su za test zarastanja rana iste ćelije sađene u pomenute ploče u gustini 5×10^5 /bunaru u 1 ml medijuma za kultivaciju.

Za potrebe kvantifikovanja migracije i invazije ćelija *in vitro*, upotrebljene su posebne komorice (engl. *Transwell inserts*, BD Bioscience, Bedford, SAD) čije je dno u vidu prozirne PET membrane, prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 μ m, koje su stavljene u sterilne plastične ploče sa 24 bunarića ravnog dna za adherentne kulture (Sarstedt, Nimbrecht, Nemačka). B16-F10 ćelije su ravnomerno sađene u komorice u gustini 2×10^5 u 200 μ l RPMI 1640 medijuma sa 0,1 % BSA.

Kulture ćelija su inkubirane nekoliko sati ili preko noći kako bi se ćelije zalepile za podlogu i oporavile od tripsinizacije, nakon čega su dodavani rastvori ispitivanih jedinjenja do finalne zapremine od 200 ml za ploče sa 96 bunarića, odnosno 2 ml za ploče sa 6 bunarića i kultivisane kako je naznačeno u eksperimentima.

3.5.4. Testovi vijabiliteta

3.5.4.1. MTT test

MTT test je kolorimetrijski test kojim se određuje metabolička aktivnost ćelije, a time i njena vijabilnost. Ovaj esej se zasniva na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju tetrazolijumovu so (MTT) žute boje u precipitat ljubičaste boje – formazan. Količina stvorenog formazana odnosno intenzitet boje direktno reflektuje broj vijabilnih ćelija.

Sa ćelijske kulture, nakon završetka tretmana, uklanjan je supernatant i dodavano je 50 μ l/bunariću toplog rastvora MTT boje u medijumu za kultivaciju u finalnoj koncentraciji 0,5 mg/ml. Ćelije su zatim inkubirane 30 min – 1 h na 37 °C, nakon čega je MTT rastvor uklanjan, a formirani kristali formazana rastvarani u 50 μ l/bunariću DMSO. Intenzitet rastvorene boje određivan je merenjem apsorbance svetlosti na 540 nm sa korekcijom na 670 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB 5060-006, LKB, Beč, Austrija). Vijabilitet tretiranih ćelija je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%.

3.5.4.2. Kristal violet test

Kristal violet (engl. *Crystal violet*, CV) test je kolorimetrijski test kojim se određuje vijabilitet adherentnih ćelija u kulturi, a koji se zasniva na vezivanju bazne boje kristal violet za negativno

naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline ćelije. Količina vezane boje direktno je proporcionalna broju vijabilnih ćelija u kulturi.

Po završetku tretmana, supernatanti su uklanjani i vršeno je fiksiranje ćelija za podlogu dodavanjem 50 μ l/bunariću 4% PFA u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je PFA uklanjan, a ploča sa ćelijama ostavljena da se suši na vazduhu. Nakon toga su fiksirane ćelije obojene 0,02% rastvorom CV u PBS i ostavljene 15 min na sobnoj temperaturi. Višak nevezane boje uklanjan je intenzivnim ispiranjem tekućom vodom. Kada su se ploče sa obojenim ćelijama osušile na vazduhu, vezana boja rastvarana je dodavanjem 50 μ l/bunariću 33% sirćetne kiseline. Intenzitet rastvorene boje određivan je merenjem apsorbance svetlosti na 540 nm sa referentnom talasnom dužinom 670 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Vijabilitet tretiranih ćelija je prikazan kao procenat vrednosti apsorbance izmerene kod kontrolne (netretirane) kulture, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%.

3.5.5. Protočna citofluorimetrija

Protočna citofluorimetrija ili ćelijsko sortiranje aktivirano fluorescencom (engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) predstavlja brzu i pouzdanu metodu kojom se sa visokom osetljivošću vrši detekcija diskretnih subpopulacija ćelija u velikim uzorcima, a koja se bazira na fluorescentnom obeležavanju ćelija i merenju intenziteta fluorescence. Mogućnost obeležavanja različitih markera na i unutar pojedinačnih ćelija fluorescentnim bojama (fluoroforama), mogućnost istovremene primene više različitih fluorofora kao i mogućnost merenja intenziteta fluorescence, a da se tom prilikom ne oštećuje ispitivani uzorak, glavne su prednosti ovakvih visoko senzitivnih metoda baziranih na detekciji fluorescence [214].

U eksperimentalnom radu su korišćene sledeće fluorescentne boje: CFSE, PI, Ann V-FITC, FITC-konjugovani ApoStat, AO, DAF-FM diacetat i DHR 123. Ekscitacioni i emisioni maksimumi ovih fluorofora su dati u Tabeli 3.

Tabela 3. Fluorescentne boje korišćene za protočnu citofluorimetriju

Fluorescentna boja	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
CFSE	492	517
PI	536	617
FITC	494	518
AO	488	530/640
DAF-FM diacetat	495	515
DHR 123	500	536

λ_{ex} (nm) – talasna dužina maksimuma apsorpcije; λ_{em} (nm) – talasna dužina maksimuma emisije

Merenje intenziteta fluorescence obeleženih uzoraka ćelija vršeno je pomoću CyFlow[®] Space protočnog citofluorimetra (Partec, Minster, Nemačka) i BD FACSAria[™] III ćelijskog sortera (BD Biosciences, San Hoze, SAD), a analiza dobijenih rezultata je rađena upotrebom softverskih programa PartecFloMax[®] i BD FACSDiva[™].

3.5.5.1. Detekcija ćelija u apoptozi

Jedno od ranih morfoloških obeležja koje se uočava kod ćelija koje ulaze u proces programirane ćelijske smrti – apoptoze, jeste translokacija fosfatidilserina koji je normalno smešten sa

citoplazmatske strane, na spoljašnju stranu ćelijske membrane [215]. Ovu eksternalizaciju fosfatidilserina je moguće detektovati na jednostavan način upotrebom fluorescentno obeleženog rekombinantnog aneksina V (Ann V-FITC), proteina koji se u prisustvu jona kalcijuma snažnim afinitetom vezuje za fosfatidilserine [216]. Na ovaj način moguća je identifikacija populacije rano-apoptotičnih ćelija čiji je membranski permeabilitet još uvek intaktan. Kako odmiče proces apoptoze, selektivna propustljivost membrane se narušava i ćelija ulazi u kasnu fazu apoptoze ili pak u inicijalnu fazu nekroze. Ovaj fenomen je specifičan za ćelijsku kulturu, s obzirom da, u živom sistemu, apoptotična ćelija biva uklonjena pre nego podlegne procesu razgradnje i gubitka funkcionalnosti membrane. Upotrebom propidijum jodida kao kontrastne boje omogućava se pravljenje distinkcije između ćelija u ranoj spram onih u kasnoj fazi apoptoze koja se izjednačava sa nekrotskim fenotipom, a sve to usled činjenice da PI ulazi samo u ćelije narušenog integriteta ćelijske membrane gde se vezuje za nukleinske kiseline u citoplazmi i nukleusu ćelije. Ovakav postupak dvostrukog bojenja u protočnoj citofluorimetriji iskorišćen je kao pokazatelj da su ćelije koje su obojene samo Ann V-FITC (Ann V⁺/PI⁻) rano-apoptotične ćelije, dok su dvostruko obojene ćelije (Ann V⁺/PI⁺) smatrane kasno-apoptotičnim/nekrotičnim ćelijama.

Po isteku predviđenog vremena tretmana, supernatanti iz bunarića ploča sa ćelijskim kulturama su sakupljeni, a potom spajani sa odgovarajućom ćelijskom suspenzijom dobijenom tripsinizacijom. Po ispiranju PBS i centrifugiranju na 750 g u trajanju od 3 minuta, ćelije su obojene smešom 1,5 µl Ann V-FITC i 1,5 µl 1 mg/ml PI u 100 µl ABB pufera. Inkubacija je trajala 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, a prekinuta je dodavanjem 900 µl ABB. Fluorescenca je očitana na FL1 i FL2 kanalima CyFlow® Space protočnog citofluorimetra i BD FACSAria™ III ćelijskog sortera, a analiza je urađena pomoću softverskih programa PartecFloMax® i BD FACSDiva™.

3.5.5.2. Detekcija aktiviranih kaspaza

Detekcija aktiviranih kaspaza pomoću protočne citofluorimetrije je brz metod za identifikaciju ćelija u apoptozi. Za identifikaciju i kvantifikaciju kaspazne aktivnosti korišćen je pan-kaspazni inhibitor konjugovan FITC, ApoStat, koji pasivno difunduje kroz ćelijsku membranu i ireverzibilno se vezuje za aktivirane forme pomenutih enzima. Intenzitet zelene fluorescence direktan je pokazatelj kaspazne aktivnosti u ćelijama.

Nakon završetka tretmana, supernatanti su sakupljeni i spajani sa odgovarajućom suspenzijom ćelija dobijenom tripsinizacijom. Po ispiranju PBS i centrifugiranju na 750 g u trajanju od 3 minuta, ćelije su resuspendovane u 100 µl rastvora 5% FBS-PBS kome je dodat 1 µl ApoStata. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C, posle čega je nevezana boja uklonjena ispiranjem PBS. Intenzitet zelene fluorescence očitana je na FL1 kanalu CyFlow® Space protočnog citofluorimetra i BD FACSAria™ III ćelijskog sortera, dok je analiza dobijenih rezultati urađena u softverskim programima PartecFloMax® i BD FACSDiva™.

3.5.5.3. Detekcija autofagije

Kako bi se detektovala autofagija korišćen je akridin-oranž (engl. *Acridine Orange*, AO), fluorofora koja se sa visokim afinitetom vezuje za acidofilne strukture u citoplazmi, kao što su autofagozomi. Autofagozomi su vezikule sa dvostrukom membranom koje okružuju delove citoplazme i/ili ćelijske organele predodređene za degradaciju u lizozomima i predstavljaju karakterističan marker autofagije [217]. Po ulasku u autofagozome, AO emituje crvenu fluorescencu odgovarajućeg intenziteta u zavisnosti od zapremine i kiselosti vezikula. Stoga je intenzitet crvene fluorescence u korelaciji sa brojem prisutnih autofagozoma. Ukoliko se veže za DNK, AO emituje zelenu fluorescencu.

Po završetku tretmana, suspenzija ćelija dobijena nakon tripsinizacije je isprana PBS i centrifugirana 3 minuta na 750 g. Talog ćelija je inkubiran sa 500 μ l rastvora 10 μ M AO boje u PBS na temperaturi 37 °C u trajanju od 15 minuta. Višak boje je uklanjan ispiranjem ćelija PBS. Intenzitet crvene fluorescence očitana je na FL3 kanalu CyFlow® Space protočnog citofluorimetra i BD FACSAria™ III ćelijskog sortera, a rezultati su analizirani pomoću softverskih programa PartecFloMax® i BD FACSDiva™.

3.5.5.4. Analiza stope proliferacije

Za analizu stope ćelijske deobe korišćen je 5(6)-karboksifluorescein diacetat N-sukcinimidil estar (CFSE). CFSE je nefluorescentni molekul koji, nakon pasivne difuzije kroz membranu ćelije, prelazi u fluorescentni karboksifluorescein sukcinimidil estar, aktivnošću unutarćelijskih esteraza koje isecaju njegove acetatne grupe. Kao takav, on se posredstvom sukcinimidil grupe kovalentno vezuje za unutarćelijske molekule, prvenstveno lizinske ostatke, kao i druge izvore amina, obeležavajući na taj način proteine citoplazme. Ovo obeležavanje ne remeti funkcije ćelije niti njenu sposobnost deobe. Intenzitet fluorescence postaje duplo slabiji svakom deobom, što omogućava praćenje stope ćelijske proliferacije. Ovom metodom je moguće identifikovati od 7 do 10 sukcesivnih generacija ćelija [218].

Pre sadnje, ćelije melanoma su inkubirane u 1 ml rastvora 1 μ M CFSE u 0,1% FBS-PBS u trajanju od 10 minuta na 37 °C. Reakcija bojenja je stopirana dodavanjem medijuma za kultivaciju sa 10% FBS, nakon čega je ćelijska suspenzija centrifugirana na 1000 rpm 3 minuta. Zatim je boja koja nije difundovala u ćeliju uklonjena ispiranjem PBS, a ćelije su posađene i tretirane. Po isteku vremena tretmana, supernatanti iz bunarića su odbačeni, a ćelije tripsinizirane i 2 puta isprane PBS. Intenzitet zelene fluorescence meren je na FL1 kanalu CyFlow® Space protočnog citofluorimetra i BD FACSAria™ III ćelijskog sortera i analiziran softverskim programima PartecFloMax® i BD FACSDiva™.

3.5.5.5. Merenje količine unutarćelijskog azot-monoksida

Za detekciju unutarćelijske koncentracije azot-monoksida korišćena je supstanca 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM) diacetat. Zahvaljujući acetil grupama, ovo jedinjenje pasivno difunduje kroz membranu ćelije a dejstvom esteraza u citoplazmi vrši se deacetilacija čime se oslobađa slabo fluorescentni DAF-FM [219]. To jedinjenje ima sposobnost da veže unutarćelijski NO i time nastaje fluorescentni derivat benzotriazol.

Po završetku tretmana, A-375 ćelije su isprane 2 puta PBS, a potom im je dodat 1 ml/bunaru 5 μ M DAF-FM diacetata rastvorenog u RPMI 1640 medijumu bez fenol crvene boje obogaćenom sa 10% FBS. Inkubacija je trajala 1 h na 37 °C, nakon čega su ćelije ponovo 2 puta isprane PBS. Potom je ćelijama dodat 1 ml/bunaru svežeg medijuma bez fenol crvene boje i bez FBS i one su dodatno inkubirane 15 minuta na 37 °C u cilju završavanja reakcije deacetilacije ćelijskim esterazama. Ćelije su nakon toga tripsinizirane, isprane 2 puta PBS i centrifugirane na 750 g u trajanju od 3 minuta između oba ispiranja. Intenzitet zelene fluorescence očitana je na FL1 kanalu CyFlow® Space protočnog citofluorimetra i analiziran pomoću PartecFloMax® softverskog programa.

3.5.5.6. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota

Produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, ROS/RNS) u ćelijama melanoma nakon tretmana detektovana je pomoću redoks-senzitivnog dihidrorodamina 123 (DHR 123). Ova nefluorescentna boja pasivno ulazi u ćeliju gde se, usled reakcije sa ROS/RNS, oksiduje u fluorescentni rodamin 123. Ovom metodom se meri ukupna produkcija ROS/RNS u ćelijama u toku celokupnog tretmana sa ispitivanim jedinjenjem.

Ćelije melanoma, B16 i A-375, su inkubirane 20 minuta na 37 °C u 2 µM rastvoru DHR 123 u medijumu za kultivaciju, potom posađene u ploče nakon čega je, dodavanjem tretmana, rastvor DHR 123 boje finalno razblažen do koncentracije 1 µM. Po isteku vremena tretmana, ćelije su tripsinizirane i isprane 2 puta PBS. Između ispiranja, ćelijske suspenzije su centrifugirane na 750 g u trajanju od 3 minuta. Intenzitet zelene fluorescence (FL1 kanal) meren je na CyFlow® Space protočnom citofluorimetru, a analiza dobijenih rezultata je vršena pomoću softverskog programa PartecFloMax®.

3.5.6. Detekcija markera diferencijacije

Melanin je pigment koji je specifičan za melanocyte i pigmentne epitelne ćelije mrežnjače oka. Reč je o kompleksnom pigmentu čija se biosinteza odvija u specifičnim membranskim organelama – melanozomima. Melanin se formira iz amino kiseline L-tirozin u seriji enzimskih i hemijskih reakcija katalizovanih prvenstveno enzimom tirozinazom. S obzirom da je tirozinaza ključan enzim u melanogenezi, njena aktivnost se, pored količine melanina, koristi kao marker diferencijacije ćelija melanoma u melanocyte [220,221].

Aktivnost tirozinaze određivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance produkta nastalog oksidacijom 3,4-dihidroksi-L-fenilalanina (L-dopa) supstata, koju katalizuje tirozinaza. Po završetku tretmana, B16 ćelije su isprane PBS i tripsinizirane. U svim uzorcima je izjednačen broj ćelija ($1,5 \times 10^6$), nakon čega su uzorci isprani 2 puta PBS i centrifugirani na 2000 rpm u trajanju od 5 minuta. Liziranje je izvršeno dodavanjem 100 µl PBS pH 6,8 sa 1% Triton X-100 talogu svakog uzorka. Ćelije su potom centrifugirane na 10 000 rpm tokom 5 minuta. Po 80 µl lizata iz svakog uzorka je mešano sa 200 µl svežeg rastvora L-dopa supstrata (2 mg/ml) u PBS pH 6,8, a zatim su uzorci inkubirani 15 – 30 minuta na 37 °C. Intenzitet braon boje određivan je merenjem apsorbance na 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče.

Za određivanje količine melanina, B16 ćelije su tretirane, a nakon isteka perioda tretmana, isprane PBS i sakupljane tripsinizacijom. U svim uzorcima je izjednačen broj ćelija ($1,5 \times 10^6$). Ćelije su isprane PBS i centrifugirane 5 minuta na 2000 rpm. Talog ćelija je liziran sa 100 µl svežeg rastvora 1 M NaOH u dH₂O. Nakon snažnog vorteksiranja, ćelijskim lizatima je dodato po 400 µl dH₂O i isti su inkubirani 1 h na 60 °C. Količina melanina je određivana kolorimetrijski, merenjem apsorbance svetlosti na 492 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče.

3.5.7. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Za merenje koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija korišćena je metoda po Loriju. Ova metoda se zasniva na reakciji jona bakra (Cu²⁺) sa peptidnim vezama ispitivanih proteina u alkalnoj sredini, kao i na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa sa bočnim ostacima tirozina i triptofana prisutnim u testiranom uzorku [222].

Po 20 μ l svakog uzorka liziranih ćelija razblaženog 10 puta u dH₂O mešano je sa 300 μ l rastvora 3 jedinjenja (2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH, 1% CuSO₄ × 5H₂O i 2% K-Na-tartarat u dH₂O) pomešanih u razmeri 98:1:1. Inkubacija je rađena na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, nakon čega je uzorcima dodavano po 60 μ l Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u dH₂O. Narednih 30 minuta uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi do razvijanja plave boje. Apsorbanca uzoraka je merena na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče. Nepoznate koncentracije proteina u uzorcima su određene na osnovu standardne krive dobijene merenjem apsorbanci poznatih koncentracija (0,1 – 1 mg/ml) rastvora BSA u dH₂O.

3.5.8. Imunoblot analiza

Imunoblot analiza je metoda za detekciju i kvantifikaciju proteina u ćeliji. U ovoj studiji je ispitivana relativna ekspresija sledećih proteina: Akt, ERK1/2, p38 MAPK, p70S6K i S6 (fosforilisane i ukupne forme), β -katenina, Notch 1, Oct-3/4, integrina α -6, FAK, Rho, vinkulina, α -SMA, β -aktina i α -tubulina.

Ćelijske linije melanoma su tretirane IC₅₀ dozom IXN i tretman je prekidan u tačno definisanim vremenskim tačkama. Svi koraci tokom pripreme uzoraka proteina su rađeni na ledu, a korišćeni rastvori su bili hladni. Ćelije su lizirane dodavanjem hladnog rastvora za liziranje ćelija, nakon čega su sakupljeni lizati denaturisani 5 minuta na 95 °C, a potom centrifugirani 20 minuta na 4 °C pri brzini od 20 000 g. Talog sa ćelijskim debrisom i DNK je odbačen, dok su supernatanti sa rastvorenim proteinima prebačeni u čiste epruvete i čuvani na -20 °C do dalje upotrebe. Nakon određivanja koncentracije proteina metodom po Loriju, uzorci (30 μ g proteina) su mešani sa 4 × Lemlijevim puferom – standardnim puferom za nalivanje uzoraka proteina na gel za elektroforezu [223], a potom denaturisani 5 minuta na 95 °C. Po nalivanju uzoraka proteina u bunariće, isti su razdvajani elektroforezom na 10 – 12% SDS-poliakrilamidnom gelu, paralelno sa obojenim markerom definisanih molekulskih težina proteina. Usledio je transfer proteina sa gela na polivinil difluoridnu membranu (EMD Millipore, Bilerika, SAD) upotrebom polusuvog sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka), primenom struje od 5 mA/cm² gela. Nespecifično vezivanje antitela blokirano je 5% BSA ili 5% nemasnim mlekom u prahu u PBSTw u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Zatim su membrane inkubirane u toku noći na 4 °C, najpre sa primarnim antitelima specifičnim za proteine date u Tabeli 2, a potom 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelima konjugovanim sa peroksidazom rena, specifičnim za IgG kunića ili miša (Tabela 2). Po isteku vremena inkubacije, membrane su ispirane 5 puta po 5 minuta PBSTw u cilju odstajivanja nevezane količine antitela. Vezana antitela su detektovana hemiluminescentnim reagensom (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija). Količina proteina merena je denzitometrijski upotrebom softverskog programa ImageJ (Nacionalni institut za zdravlje, SAD) i preračunata u odnosu na količinu totalnih, nefosforilisanih formi proteina ili β -aktina odnosno α -tubulina, a rezultati su prikazani grafički.

3.5.9. Klonogeni esej

Klonogeni esej ili test formiranja kolonija je metoda za određivanje preživljavanja i klonogenog potencijala adherentnih ćelija *in vitro* koja se zasniva na sposobnosti pojedinačne ćelije da formira koloniju nakon tretmana citotoksičnim agensom. Kolonija je definisana kao skup od najmanje 50 ćelija [224,225].

Sposobnost B16-F10 ćelija da nakon tretmana IXN formiraju kolonije *in vitro* je procenjivana upotrebom ovog eseja. Ćelije, uzgajane u monosloju u 75 cm² flaskovima, su tretirane IC₂₅ dozom IXN u trajanju od 48 h. Po završetku tretmana, ćelije su tripsinizirane, izbrojane i zasađene u ploče

za gajenje adherentnih ćelijskih kultura sa 6 bunarića u gustini od 1×10^3 ćelija/bunaru. Ćelijama je dopušteno da rastu i formiraju kolonije inkubacijom u medijumu za kultivaciju na 37°C u trajanju od 7 dana, s tim što je četvrtog dana medijum zamenjen svežim. Nakon isteka inkubacionog perioda, medijum za kultivaciju ćelija je uklonjen, formirane kolonije su isprane PBS, a potom fiksirane 4% PFA 30 minuta na sobnoj temperaturi. Kolonije ćelija su zatim bojene 0,02% rastvorom CV na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Ćelije su dva puta isprane PBS u cilju uklanjanja viška boje. Kolonije su posmatrane i fotografisane pod svetlosnim mikroskopom DM RB Photomicroscope (Leica, Veclar, Nemačka) opremljenim DFC 320 CCD kamerom (Leica). Kvantifikacija kolonija urađena je korišćenjem softverskog programa za analizu slika ImageJ. U cilju izračunavanja efikasnosti sađenja (engl. *Plating Efficiency*, PE) i frakcije preživljavanja (engl. *Surviving Fraction*, SF) upotrebljena je srednja vrednost broja kolonija dobijena iz tri bunarića. PE, koja predstavlja meru broja kolonija nastalih od pojedinačnih ćelija, je računata kao broj prebrojanih kolonija / broj posađenih ćelija $\times 100$. SF je izračunata kao PE tretiranih ćelija / PE kontrolnih ćelija $\times 100$ i grafički predstavljena u procentima.

3.5.10. Esej za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija *in vitro*

Ćelijska adhezija podrazumeva vezivanje ćelije za vanćelijski matriks, druge ćelije ili specifičnu površinu i neophodna je za rast, preživljavanje i komunikaciju ćelije sa drugim ćelijama i sopstvenim okruženjem. Ispitivanjem adhezivnosti ćelije može se evaluirati njen metastatski potencijal. Određivanje uticaja IXN na adhezivnost B16-F10 tumorskih ćelija vršeno je korišćenjem *in vitro* modela ekstraćelijskog matriksa – Matrigel®. Po svom sastavu i karakteristikama, on je sličan kompleksnom vanćelijskom okruženju u mnogim tkivima, zbog čega se koristi kao supstrat za kultivaciju ćelija [226].

B16-F10 ćelije melanoma su gajenje u 75 cm^2 flaskovima u medijumu za kultivaciju i tretirane IC₂₅ dozom IXN u trajanju od 48 h. Nakon završetka tretmana, ćelije su tripsinizirane, sakupljene i ostavljene 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se rekonstruisale ćelijske membrane. Sterilne ploče za gajenje ćelija sa 96 bunarića ravnog dna su prethodno obložene sa $20\ \mu\text{g/ml}$ Matrigel® ($50\ \mu\text{l/bunariću}$) i ostavljene na 4°C preko noći u cilju polimerizacije gela. Bunarići obloženi gelom su isprani 3 puta PBS, a zatim su posađene ćelije u gustini 3×10^4 ćelija/bunaru. Nakon toga, ćelijama je dozvoljeno da adheriraju za ekstraćelijski matriks inkubacijom na 37°C u trajanju od 1 h. Ćelije koje se nisu vezale za komponente vanćelijskog matriksa uklonjene su ispiranjem PBS, dok je broj preostalih adheriranih ćelija određen CV testom. Relativna ćelijska adhezija je kvantifikovana merenjem apsorbance na 570 nm sa referentnom talasnom dužinom od 670 nm pomoću automatskog čitača za mikrotitarske ploče.

3.5.11. Test zarastanja rana

Test zarastanja rana (engl. *Wound healing test*) je metoda za ispitivanje ćelijske pokretljivosti *in vitro*. Reč je o 2D tehnici kojom se meri stopa kojom ćelije u ćelijskom monosloju migriraju kako bi popunile površinu bez ćelija [227].

Uticaj IXN na pokretljivost B16-F10 ćelija *in vitro* je izučavan korišćenjem ovog testa. Ćelije su kultivisane do 80% konfluentnosti u pločama za uzgajanje adherentnih kultura sa 6 bunarića, nakon čega je formirana „rana“ povlačenjem ravne linije vrhom sterilnog nastavka za pipete od 1 ml. Kako bi se uklonile oštećene ćelije, ploče su isprane PBS. One su potom inkubirane u prisustvu IC_{12.5} i IC₂₅ doza IXN na 37°C u trajanju od 48 h. Po isteku vremena tretmana, ćelije su isprane PBS, fiksirane 4% PFA u trajanju od 10 min, a potom bojene 0,02% rastvorom CV 1 min na sobnoj temperaturi. Određen je dijametar „rana“ koje su posmatrane i fotografisane pod svetlosnim

mikroskopom DM RB Photomicroscope opremljenim DFC 320 CCD kamerom (Leica, Veclar, Nemačka).

3.5.12. Eseji za kvantifikovanje migracije i invazije ćelija *in vitro*

Metastatski potencijal tumorske ćelije ogleda se, između ostalog, i u njenoj sposobnosti da se kreće ka izvoru hemijskog ili fizičkog stimulusa (migracija) i da tom prilikom enzimatski razgradi prepreke u vidu proteina ekstraćelijskog matriksa ili bazalne membrane (invazija) [16].

Za kvantitativnu procenu uticaja IXN na migracioni i invazioni potencijal B16-F10 ćelija melanoma *in vitro*, upotrebljeni su transmigracioni i invazioni eseji. U te svrhe su korišćene komorice čije je dno u vidu membrane, prečnika 6,4 mm i dijametra pora 8 μm , koje su stavljane u sterilne ploče za gajenje ćelija sa 24 bunarića ravnog dna. Za potrebe invazionog eseja, gornja površina membrane ovih komorica je obložena tankim slojem Matrigel® (500 $\mu\text{g/ml}$ u PBS, 10 $\mu\text{l/membrani}$) kome je dozvoljeno da polimeriše na 4 °C preko noći, dok je za potrebe migracionog eseja membrana ostala neobložena. Komorice obložene polimerizovanim gelom su isprane 2 puta PBS pre sadnje ćelija. Ćelije melanoma su gajene u medijumu za kultivaciju u 75 cm^2 flaskovima i tretirane IC₂₅ dozom IXN. Nakon 48 h tretmana, ćelije su sakupljene tripsinizacijom, a zatim je 2×10^5 ćelija resuspendovano u 200 μl 0,1% BSA-RPMI 1640 i posađeno u gornji deo svake komorice. Kao hemoatraktant za ćelije poslužio je medijum za kultivaciju ćelija sa 10% FBS koji je sipan sa spoljne strane komorica, tačnije u bunariće ploče za gajenje ćelija. Ploče su potom inkubirane na 37 °C u trajanju od 12 h za procenu invazivnosti, odnosno 24 h za procenu migratornosti. Ćelije koje nisu migrirale kroz pore membrane (kod migracionog eseja) ili sloj ekstraćelijskog matriksa (kod invazionog eseja), pažljivo su uklonjene pamučnom vatom. Sa druge strane, ćelije koje su invadirale ili migrirale su fiksirane 4% PFA 10 minuta i bojene Majerovim hematoksilinom 3 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon bojenja, ćelije su isprane H₂O i sušene na vazduhu pre nego su membrane isečene iz komorica i montirane na mikroskopske pločice. Ćelije su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom DM RB Photomicroscope i fotografisane DFC 320 CCD kamerom (Leica, Veclar, Nemačka) pri uvećanju 40 \times . Prikazan je prosečan broj ćelija iz 5 nasumično izabranih nezavisnih polja po membrani. Svaki eksperiment je izvođen u triplikatu.

3.5.13. Analiza izobologramom

Za utvrđivanje efekata kombinovane primene IXN i citostatika (cisPt, DOXO i PCT) na ćelije melanoma korišćena je analiza izobologramom. Izobologram analiza omogućava praćenje interakcija dva agensa pri čemu njihov odnos može biti aditivan, sinergistički ili antagonistički [228].

Ćelijske linije melanoma su tretirane 48 h različitim koncentracijama IXN (5,75, 12,5 i 23 μM za B16 i A-375 odnosno 7,5, 15 i 30 μM za B16-F10), cisPt (0,94 – 7,5 μM za B16 i B16-F10 odnosno 1,88 – 15 μM za A-375), DOXO (0,04 – 0,32 μM za B16 i B16-F10 odnosno 0,125 – 1 μM za A-375) i PCT (3,125 – 25 nM za sve tri linije) pojedinačno ili u kombinaciji. Po isteku perioda tretmana, vijabilitet ćelija je određivan CV testom. Kombinacije agenasa koje su indukovale $30 \pm 5\%$ citotoksičnosti su prikazane kao procenat svakog pojedinačnog agensa koji je rezultirao istim procentom citotoksičnosti. Ove vrednosti se nazivaju F.I.C. (engl. *Fractional Inhibitory Concentration*). Kada je suma F.I.C. jednaka jedinici, smatra se da je efekat dva kombinovana agensa aditivan, što je na grafiku geometrijski pokazano kao prava linija. Ukoliko je F.I.C. < 1, agensi u kombinaciji deluju sinergistički i grafik pokazuje konveksnu krivu, dok kada je F.I.C. > 1, kombinacija ispitivanih agenasa rezultira u antagonizmu i kriva na grafiku je

konkavnog oblika. F.I.C. je računat iz tri posebna eksperimenta, a izobologramske krive predstavljaju jedan reprezentativan od tri nezavisna eksperimenta.

3.5.14. Indukcija solidnog melanoma i tretman životinja

Subkutani model je široko korišćen model za evaluaciju raznih terapija na mnogim modelima tumora, uključujući B16 mišji model melanoma [198,199]. Upravo je ovaj model poslužio za ispitivanje antitumorskog potencijala IXN na melanomu kao i efekta kombinovanog tretmana sa PCT *in vivo*.

B16 ćelije ($2,5 \times 10^5$ u 100 μ l PBS) su ubrizgane subkutano u desni dorzalni lumbosakralni region singenih C57BL/6 miševa. Desetog dana nakon inokulacije ćelija, kada su tumori postali palpabilni, životinje su nasumično podeljene u 4 grupe (kontrola, IXN, PCT, IXN/PCT) od po 6 jedinki i tretman je otpočet. IXN je aplikovan intraperitonealno (i.p.) svakog dana tokom 10 dana u dozi 20 mg/kg u 2% DMSO-PBS. PCT je primenjivan i.p. u subtoksičnoj dozi (3 mg/kg u PBS) svakog drugog dana tokom 10 dana, dok je kontrolna grupa životinja intraperitonealno primala rastvarač ispitivane supstance (2% DMSO-PBS) u istom eksperimentalnom režimu kao i IXN. Rast tumora je praćen svakodnevno, a miševi su eutanazirani dvadesetog dana nakon indukcije tumora. Tumori su hirurški izvađeni i dobro isprani PBS. Veličina tumora je merena u tri dimenzije pomoću kalipera. Volumen tumora (mm^3) je računat po obrascu: $a \times b^2 \times 0,52$, gde je a najduži, a b najkraći izmereni dijametar. Tokom čitavog eksperimenta redovno je kontrolisano opšte stanje i vijabilnost životinja.

U cilju određivanja kinetike rasta tumora, volumen tumora je meren u definisanim vremenskim intervalima i to 10., 15. i 20. dana nakon inokulacije ćelija u životinje. Volumen tumora (mm^3) je izražen kao srednja veličina tumora po grupi od 6 životinja i predstavljen kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD).

3.5.15. Ispitivanje akutne toksičnosti *in vivo*

Za potrebe evaluacije akutne toksičnosti IXN *in vivo*, formirane su 2 grupe životinja (kontrola, IXN) od po 6 jedinki po grupi. IXN je aplikovan i.p. u jednoj dozi od 200 mg/kg u 4% DMSO-PBS, što predstavlja ukupnu količinu IXN koju je svaka životinja primila za 10 dana u modelu solidnog melanoma. Kontrolne životinje su primile intraperitonealno rastvarač ispitivane supstance (4% DMSO-PBS). Miševi su praćeni svakodnevno narednih 14 dana radi procene potencijalnih znakova toksičnosti kao što su gubitak u težini, opadanje dlake, promene na koži, promene u ponašanju, dijareja i povraćanje.

3.5.16. Indukcija plućnih metastaza melanoma i tretman životinja

Pluća su, pored mozga, jetre, kostiju, limfnih čvorova i creva najčešće mesto metastaziranja melanoma. Stoga su za evaluaciju antitumorskog potencijala novih supstanci od velikog značaja modeli koji simuliraju proces metastaziranja, poput singenog modela metastatskog melanoma u kome se intravenskim ubrizgavanjem imunokompatibilnog klona B16-F10 indukuju metastaze na plućima C57BL/6 miševa [199,229,230]. Upravo ovakav model pružio je mogućnost sagledavanja uticaja IXN na kolonizaciju pluća ćelijama melanoma kao i ispitivanja interakcije ovog jedinjenja sa citostatskom terapijom *in vivo*.

U ovoj studiji, eksperimenti rađeni na gore opisanom *in vivo* modelu dizajnirani su sa ciljem da se ispita terapijski uticaj samog IXN na formiranje metastaza, ali i na efikasnost terapije PCT kada se aplikuje istovremeno ili vremenski odvojeno od njega, u pretretmanu, bez promena u doznom režimu. B16-F10 ćelije (5×10^5 u 200 μ l PBS) su ubrizgane u repnu venu singlenih C57BL/6 miševa. U prvoj etapi istaživanja, drugog dana po inokulaciji ćelija, životinje su nasumično podeljene u 2 (kontrola, IXN) odnosno 4 (kontrola, IXN, PCT, IXN/PCT) grupe od po 8 jedinki. Potom je otpočet tretman, po režimu identičnom onom kod subkutanog melanoma, podrazumevajući paralelnu aplikaciju IXN i PCT u kombinovanom tretmanu. U sledećoj etapi istaživanja, takođe drugog dana po inokulaciji ćelija, životinje su podeljene u 4 grupe (kontrola, IXN, PCT_{7.dan}, IXN/PCT_{7.dan}) od po 8 jedinki. Životinjama koje su primale oba agensa, promenjen je režim davanja ali ne i doze. Naime, miševi su tretirani IXN 7 dana svakodnevno, a potom je otpočet tretman PCT svaki drugi dan. U svim navedenim eksperimentima, tretmani su okončani nakon 18 dana. Životinje su žrtvovane 21. dana od indukcije bolesti. Pluća su izolovana, a potom izbeljivana 3% H₂O₂. Broj metastatskih nodusa na plućima svakog miša određivan je brojanjem.

3.5.17. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom

Urin kontrolnih i životinja tretiranih eksperimentalnim agensima je sakupljan nultog i 21-og odnosno nultog, 9-og i 18-og dana od inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševima. Biohemijski parametri prikupljenih uzoraka urina (glukoza, bilirubin, ketoni, specifična težina, eritrociti, pH, proteini, urobilinogen, nitriti, leukociti) su određivani pomoću Multistix 10 SG test traka za analizu urina (Bayer, Leverkusen, Nemačka). Navedeni parametri su procenjivani nakapavanjem uzoraka urina na test trake i poređenjem istih sa referentnim vrednostima.

3.5.18. Histologija

3.5.18.1. Histochemija (H&E bojenje)

Hematoksilin-eozin (H&E) bojenje omogućava histopatološku analizu tkiva od interesa. Hematoksilin je bazna, katjonska boja koja boji nukleuse ćelija, tačnije hromatin i membranu jedra u plavo/ljubičastu boju dok je eozin kisela, anjonska boja koja boji citoplazmu ćelije i ekstraćelijski matriks u roze/crvenu boju [231].

Pluća sa metastazama su hirurški izolovana iz 8 različitih životinja iz kontrolne i IXN grupe u približno sterilnim uslovima. Organi su prvo hemijski izbeljivani 3% H₂O₂, a potom ispirani PBS. Izolovana pluća sa metastazama su fiksirana 4% PFA na 4 °C u trajanju od 24 h, zatim isprana PBS, a nakon toga su uzorci prebačeni u 30% rastvor saharoze u PBS i ostavljeni na 4 °C narednih 7 dana. Tkiva su prvo obložena medijumom za montiranje tkiva za sečenje (Tissue-Tek[®] O.C.T. medijum), a potom sečena na -22 °C u aparatu za pravljenje kriopreseka. Preseci debljine 14 μ m su odmah zatim stavljeni na „superfrost“ mikroskopske pločice u cilju hematoksilin-eozin bojenja. Kriopreseci su zatim isprani PBS, bojeni Majerovim hematoksilinom 4 minuta, isprani tekućom vodom, a potom bojeni eozinom u trajanju od 3 minuta na sobnoj temperaturi. Višak nevezane boje je uklonjen kratkotrajnim ispiranjem tekućom vodom. Dehidracija tkiva je vršena kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (75 %, 96 % i 100 %), nakon čega su preparati tretirani ksilolom, dva puta po 10 minuta. Usledilo je montiranje kriopreseka DPX medijumom za montiranje mikroskopskih preparata (Thermo Fisher Scientific, Valtam, SAD), nakon čega su isti posmatrani pod svetlosnim mikroskopom DM RB Photomicroscope (Leica, Veclar, Nemačka) i fotografisani DFC 320 CCD kamerom (Leica) pri uveličanju od 5 \times .

3.5.18.2. Imunohistohemija i imunofluorescenca

Imunohistohemija je metoda zasnovana na specifičnoj interakciji antigen-antitelo koja omogućava lokalizaciju i detekciju tkivnih konstituenata (antigena) u preparatu *in situ*. Ova metoda je primenjena za detekciju i procenu promene nivoa ekspresije HMGB1 i S100 proteina na parafinskim presecima pluća životinja tretiranih IXN.

Izolovana pluća sa metastatskim nodusima su fiksirana u 4% formalinu tokom 24 h, a potom su standardnom procedurom dobijeni preseci u parafinu debljine 4 μ m. Nakon sečenja parafinom kalupljenih uzoraka na mikrotomu i stavljanja preseka na mikroskopske pločice, urađena je deparafinizacija ksilolom, rehidratacija tkiva u seriji alkohola opadajuće koncentracije (100 %, 96 % i 75 %) i pranje dH₂O. Demaskiranje antigena vršeno je citratnim puferom pH 6, kuvanjem na 98 °C u trajanju od 20 minuta. Preparati su ohlađeni tokom 20 minuta i ispirani dH₂O i PBS. Inaktivacija endogenih peroksidaza je izvršena 3% H₂O₂-10% metanolom rastvorenim u 0,5% Triton X-100-PBS u trajanju od 10 minuta, dok je 10% FBS-PBS upotrebljen za blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela inkubacijom u vlažnoj komori tokom 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja PBS 2 puta po 5 minuta, preseci su inkubirani sa specifičnim primarnim antitelima anti-HMGB1 (GT383) i anti-S100 (4B3), oba u razblaženju 1:100, u vlažnoj komori u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi. Za detekciju HMGB1 primarnog antitela korišćen je pojačivač primarnog antitela i HRP polimer, dok je za detekciju primarnog anti-S100 antitela upotrebljeno sekundarno kozje antitelo obeleženo biotinom i tercijarno antitelo obeleženo streptavidinom i HRP. Preparati su inkubirani sa svakim od navedenih antitela u vlažnoj komori 10 minuta na sobnoj temperaturi. Preseci su prani 3 puta po 5 minuta PBS nakon isteka tretmana svakog koraka metode. Kao supstrat peroksidaze rena, tkivnim preparatima je ponuđen DAB sve do momenta razvijanja boje, što je prekinuto potapanjem u vodi, a kontrastno bojenje je urađeno Majerovim hematoksilinom u trajanju od 3 minuta. Potom su mikroskopske pločice sa presecima montirane i analizirane pod fluorescentnim mikroskopom Olympus BX50 (Olympus, Tokijo, Japan) i fotografisani Olympus DP70 kamerom pri uveličanju od 200 \times .

U cilju detekcije ekspresije Ki-67 proteina na parafinskim presecima pluća eksperimentalnih životinja, izvršeno je imunofluorescentno bojenje. Nakon deparafinizacije, rehidratacije tkiva, demaskiranja antigena i blokiranja nespecifičnih mesta vezivanja antitela, preseci su inkubirani sa Ki-67 (M-19) antitelom konjugovanim FITC u razblaženju 1:100 u PBS na 4 °C u vlažnoj komori preko noći. Nakon ispiranja PBS, preparati su montirani u medijumu za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata sa DAPI bojom i analizirani pod Zeiss AxioObserver Z1 invertnim fluorescentnim mikroskopom (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Nemačka) pri uveličaju od 200 \times .

3.5.19. Statistička obrada podataka

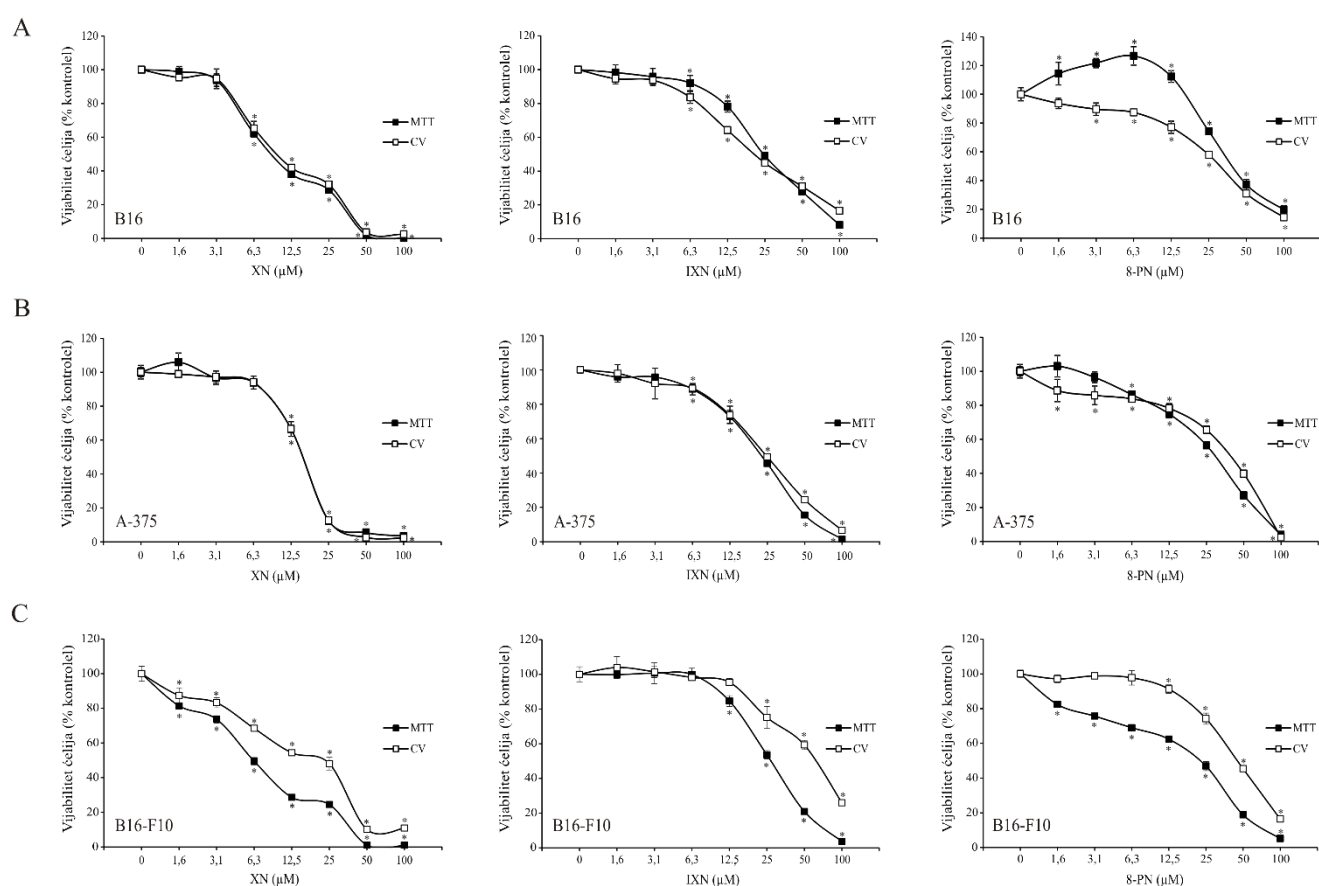
Rezultati *in vitro* eksperimenata su prikazani kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD) triplikata kultura jednog, reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri nezavisno izvedena eksperimenta. Za procenu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA), praćena Student *t*-testom za višestruka poređenja. U *in vivo* eksperimentima, statistička značajnost rezultata određivana je Man-Vitnijevim U testom (engl. *Mann-Whitney U test*). Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. Rezultati

4.1. Direktan uticaj IXN na vijabilitet i prisustvo smrti ćelija primarnog i metastatskog melanoma *in vitro*

4.1.1. Prenilflavonoidi inhibiraju rast ćelija melanoma *in vitro*

U cilju ispitivanja potencijalnog antitumorskog kapaciteta prenilflavonoida IXN i poređenja sa parentalnim jedinjenjem XN i metabolitom 8-PN, odabrane su tri ćelijske linije melanoma različitog porekla, karakteristika i stepena invazivnosti. Mišje (B16 i B16-F10) i humane (A-375) ćelije melanoma su izložene širokom opsegu koncentracija (1,6 – 100 μM) svake supstance ponaosob u trajanju od 48 h. Po isteku inkubacionog perioda, procena vijabiliteta ćelija je vršena pomoću MTT i CV testova. Kao što se može videti na Slici 5, sva tri testirana jedinjenja su dovela do smanjenja broja živih ćelija u svim navedenim ćelijskim kulturama na dozno-zavisnan način.



Slika 5. Prenilflavonoidi smanjuju vijabilitet ćelija melanoma *in vitro*. Vijabilitet ćelija melanoma (A) B16, (B) A-375 i (C) B16-F10 tretiranih različitim koncentracijama prenilflavonoida XN, IXN i 8-PN tokom 48 h određen je MTT i CV testovima. Vijabilitet je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%. Rezultati predstavljaju $\text{SV} \pm \text{SD}$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Kolorimetrijski testovi su pokazali da su dobijene IC₅₀ vrednosti, koje predstavljaju koncentracije supstanci koje smanjuju rast ćelija melanoma u kulturi za 50%, bile u mikromolarnom opsegu (Tabela 4).

Tabela 4. IC₅₀ vrednosti prenilflavonoida na ćelijskim linijama melanoma izračunate iz MTT i CV testova

Ćelijska linija	Esej	IC ₅₀ (μM)		
		XN	IXN	8-PN
B16	MTT	8,70 ± 0,99	22,15 ± 4,05	40,85 ± 0,78
	CV	9,97 ± 2,32	21,88 ± 5,19	38,55 ± 8,84
A-375	MTT	15,00 ± 1,15	22,90 ± 0,78	27,80 ± 3,82
	CV	15,77 ± 1,74	24,18 ± 1,43	48,30 ± 11,60
B16-F10	MTT	6,35 ± 0,21	30,30 ± 2,40	17,50 ± 4,34
	CV	18,50 ± 3,82	57,70 ± 8,77	50,35 ± 6,15

*XN – ksantohumol; IXN – izoksantohumol; 8-PN – 8-prenilnaringenin

**IC₅₀ vrednosti predstavljaju SV ± SD tri nezavisno izvedena eksperimenta

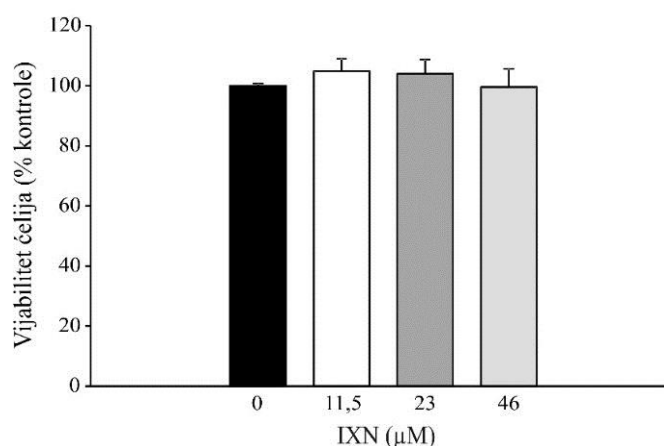
Poređenjem citotoksičnih vrednosti prenilflavonoida prikazanih u Tabeli 4, ustanovljeno je da je metabolička transformacija XN u IXN ili u 8-PN dovela do slabljenja efikasnosti testiranih supstanci na svim ćelijskim linijama melanoma, ukazujući na gubitak bioaktivnosti istih. Takođe, uočena je neusklađenost rezultata dobijenih primenom dva testa za određivanje vijabiliteta u kulturi visoko metastatskog kлона B16-F10, što nije bio slučaj u kulturama druge dve ćelijske linije melanoma, B16 i A-375, gde nije bilo razlika u osetljivosti primenjenih kolorimetrijskih metoda. Naime, koncentracije svih testiranih jedinjenja koje su neophodne za inhibiciju rasta 50% ćelija u kulturi B16-F10 izračunate MTT testom bile su značajno niže u odnosu na one dobijene pomoću CV eseja, što je potvrđeno i svetlosnom mikroskopijom. Ovim putem uočena je i promena u veličini ćelija obojenih kristal violet bojom, što je objasnilo veću količinu vezane boje i time diskreditovalo ovaj test u proceni realnih IC₅₀ koncentracija pod eksperimentalnim agensima. Stoga su, u slučaju B16-F10 ćelija, IC₅₀ vrednosti dobijene MTT testom uzete za relevantne i korišćene u daljim eksperimentima.

Iz svega navedenog, moglo bi se zaključiti da prenilflavonoidi izolovani iz hmelja, XN, IXN i 8-PN, inhibiraju rast ćelija melanoma *in vitro* na dozno-zavisan način, što se manifestuje redukcijom broja ćelija u kulturama sve tri tumorske linije. Takođe treba naglasiti da je B16-F10 ćelijska linija pokazala manju osetljivost na IXN u odnosu na druge dve linije melanoma, što je u skladu sa njenim stepenom invazivnosti.

Iako je među testiranim prenilflavonoidima XN ispoljio najjače dejstvo, on se u gastrointestinalnom traktu vrlo lako konvertuje u IXN, a imajući u vidu da 8-PN u organizmu ne nastaje abiotičkom transformacijom već zavisi od mikrobioma svake individue, fokus ovog istraživanja nadalje bio je IXN i njegovo dejstvo na ćelije melanoma.

4.1.2. IXN ne smanjuje vijabilitet primarne kulture makrofaga izolovanih iz miša

S obzirom da su prethodno dobijeni rezultati ukazali na visok citotoksični potencijal IXN, stvorila se potreba za proverom njegovog toksičnog efekta na primarne ćelije *in vitro*. Tako je paralelno sa ispitivanjem uticaja na ćelijske linije melanoma, testirana i osetljivost netransformisanih ćelija na pomenuto jedinjenje. U tu svrhu, makrofagi izolovani iz peritonealnog eksudata miša su tretirani različitim dozama IXN, i to prethodno utvrđenom IC₅₀ vrednošću na tumorskim ćelijama i dodatnim dvema dozama, duplo manjom odnosno duplo većom od vrednosti koncentracije koja redukuje broj živih tumorskih ćelija za 50%. Nakon 48 h inkubacije, broj živih makrofaga je određen CV testom za detekciju vijabiliteta u adherentnim kulturama. Dobijeni rezultati su pokazali da vijabilitet ovih ćelija urođene imunosti nije bio narušen čak ni kada su ćelije bile izložene dvostrukoj IC₅₀ dozi IXN, utvrđenoj za sve tri ćelijske linije melanoma (Slika 6).



Slika 6. **IXN nema inhibitorni efekat na vijabilitet makrofaga *in vitro***. Vijabilitet makrofaga izolovanih iz peritonealnog eksudata miša nakon 48 h tretmana indikovanim dozama IXN određen je CV testom. Vijabilitet je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%. Rezultat predstavlja $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Iz prethodno opisanih eksperimenata može se zaključiti da IXN poseduje izraženu selektivnost za maligni fenotip, s obzirom da značajno smanjuje vijabilitet ćelijskih linija melanoma ali da u istim ili čak većim koncentracijama ne ispoljava inhibitorni efekat na vijabilitet primarnih ćelija *in vitro*.

4.1.3. IXN indukuje smrt ćelija primarnog melanoma *in vitro*

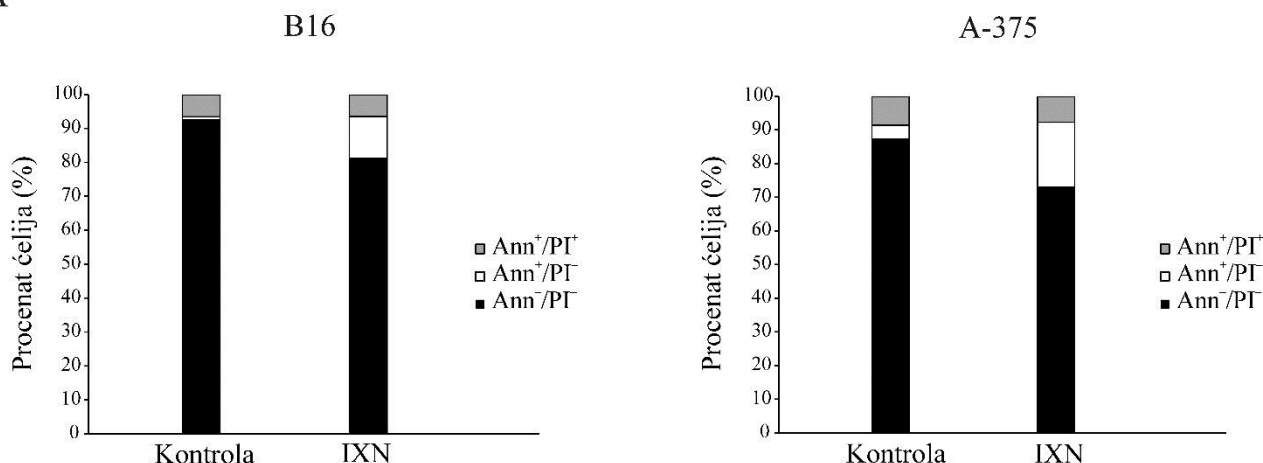
4.1.3.1. IXN indukuje apoptozu nezavisnu od aktivacije kaspaza u kulturama B16 i A-375 ćelija

Pošto je prethodno pokazano da IXN smanjuje broj živih ćelija mišjeg i humanog melanoma, dalji tok istraživanja usmeren je ka rasvetljavanju mehanizama njegovog antitumorskog delovanja. Smanjen vijabilitet može biti posledica citocidnog ili citostatskog efekta ispitivane supstance, odnosno indukcije različitih formi ćelijske smrti i/ili gubitka deobnog potencijala. Stoga je najpre procenjivano prisustvo najčešćeg tipa programirane ćelijske smrti u fiziološkim ali i patofiziološkim uslovima – apoptoze, na *in vitro* modelu solidnog melanoma. U tu svrhu, B16 i A-375 ćelije su tretirane IC₅₀ dozom eksperimentalnog agensa u trajanju od 48 h, a potom

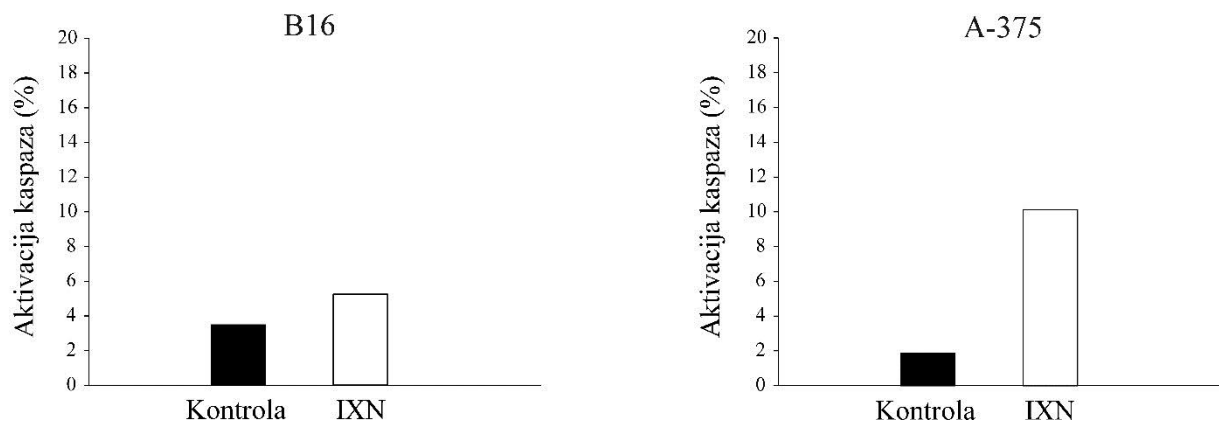
dvostruko bojene Ann V-FITC/PI (Ann/PI) i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati ove analize su pokazali da u kulturi obe ćelijske linije melanoma, u poređenju sa kontrolnim uzorcima, pod tretmanom dolazi do značajnog povećanja procenta ćelija označenih kao rano-apoptotične i prepoznatih po Ann⁺/PI⁻ profilu. Takođe, može se primetiti da je efekat indukcije apoptoze izraženiji na A-375 ćelijskoj liniji u odnosu na B16 liniju, što može biti od značaja s obzirom da se radi o visoko invazivnim tumorskim ćelijama (Slika 7A).

Iako kaspaze predstavljaju važne medijatore apoptoze, ovaj tip ćelijske smrti može se odigrati i bez njihovog učešća [232]. Stoga se paralelno pristupilo ispitivanju uloge kaspaza u realizaciji apoptotskog procesa. Tako su obe ćelijske linije melanoma, B16 i A-375, bile inkubirane sa IC₅₀ dozom ispitivane supstance tokom 48 h, da bi nakon toga bile obeležene pan-kaspaznim inhibitorom konjugovanim sa FITC (ApoStat) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Kao što je prikazano na Slici 7B, u poređenju sa kontrolom, eksperimentalni agens nije uticao na značajno povećanje procenta ćelija sa aktiviranim kaspazama u obe kulture ćelija melanoma. Neznatan procenat ćelija sa aktiviranim kaspazama (1,76% u B16 i 8,24% u A-375 ćelijskim kulturama) sugerisao je da IXN indukuje ćelijsku smrt tipa apoptoze nezavisne od aktivacije ovih proteaza.

A



B



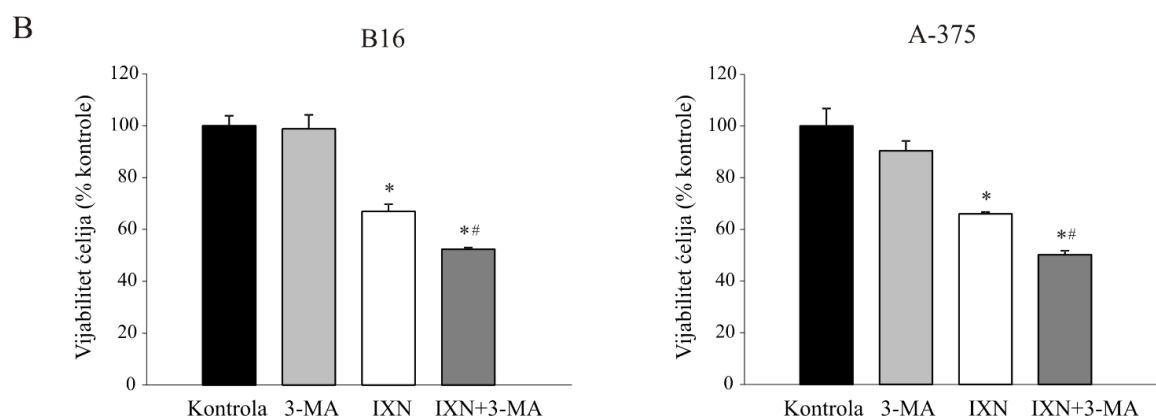
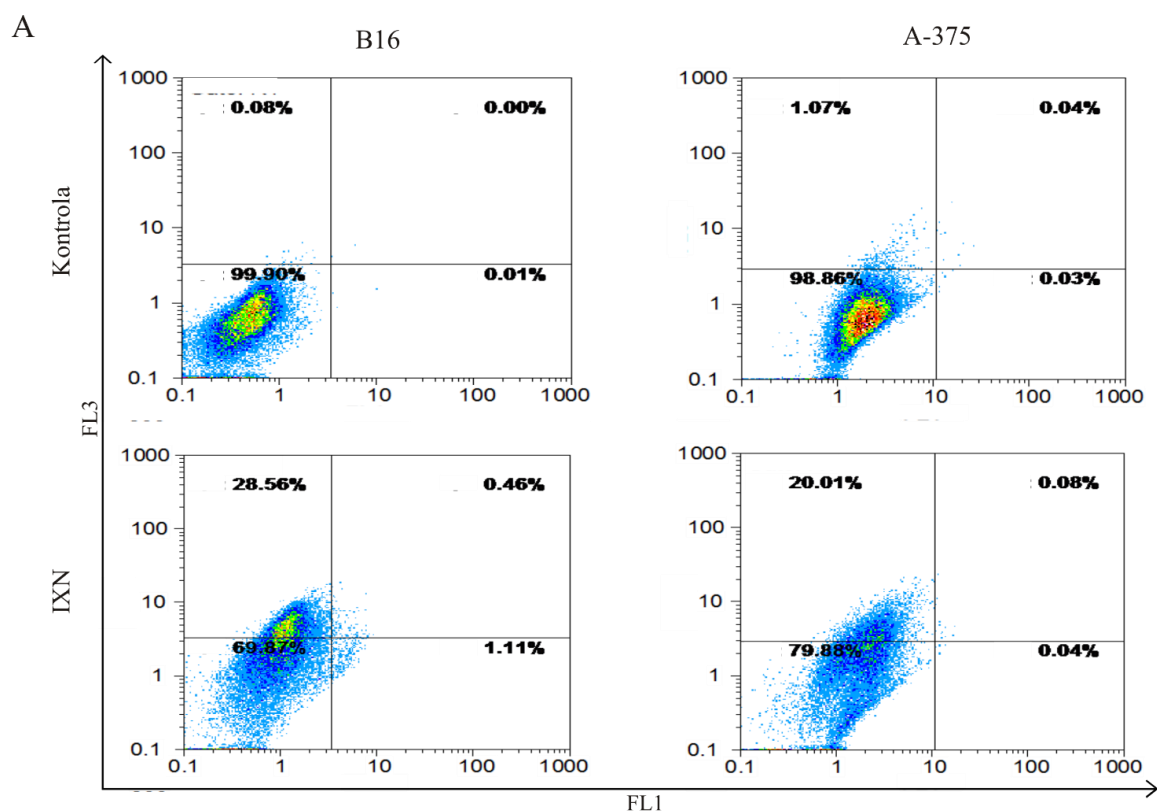
Slika 7. IXN indukuje apoptozu bez aktivacije kaspaza u kulturama B16 i A-375 ćelija. A) Procenat rano-apoptotičnih (Ann⁺/PI⁻) i kasno-apoptotičnih/nekrotičnih (Ann⁺/PI⁺) ćelija i B) procenat ćelija sa aktiviranim kaspazama u B16 i A-375 kulturama ćelija melanoma nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određeni su metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta.

Iz navedenih rezultata se može zaključiti da na ćelijskim linijama mišjeg i humanog melanoma IXN ostvaruje svoj antitumorski potencijal citocidnim načinom delovanja, indukujući apoptozu koja nije posredovana kaspazama, pri čemu je ovaj efekat nešto izraženiji na A-375 ćelijama.

4.1.3.2. IXN indukuje autofagiju citoprotektivnog karaktera u kulturama B16 i A-375 ćelija

Imajući u vidu da melanociti potiču od prekursora poreklom iz nervne kreste kod kojih autofagija predstavlja veoma važan fiziološki proces uključen u održavanje tkivne homeostaze, naredni korak je bio ispitivanje prisustva autofagije i definisanje njenog udela u smanjenju vijabiliteta ćelija melanoma nakon tretmana eksperimentalnim agensom. Sa tim u vezi, B16 i A-375 ćelije su izložene IC_{50} dozi supstance IXN tokom 48 h, a zatim bojene supravitalnom bojom akridin-oranž koja markira lizosome i autofagolizosome u citoplazmi ćelija. Rezultati protočne citofluorimetrije su ukazali na povećano prisustvo autofagozoma u citoplazmi ćelija tretiranih eksperimentalnim jedinjenjem u obe ćelijske kulture, u odnosu na kontrolne (netretirane) ćelije (Slika 8A).

Dobro je poznato da se autofagijom mogu ukloniti oštećeni delovi ćelije lizozomskom digestijom ili suprotno, u nekim specifičnim okolnostima, ona može biti mehanizam ćelijske eliminacije. U cilju definisanja uloge autofagije pokrenute delovanjem agensa IXN, obe ćelijske linije su tretirane IC_{50} dozom testirane supstance u prisustvu specifičnog inhibitora autofagije, 3-MA. Ovo jedinjenje je inhibitor fosfatidilinozitol 3-kinaze (engl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, PI3K), enzima esencijalnog za inicijaciju autofagije. Farmakološka inhibicija procesa autofagije od strane 3-MA se postiže blokiranjem formiranja autofagozoma [233]. Po završetku inkubacionog perioda u trajanju od 48 h, vijabilitet ćelija je određen pomoću CV testa. Očekivano, tretman IXN smanjio je broj živih ćelija u uzorku, dok je kombinovani tretman IXN i 3-MA doveo do dodatnog, premda umerenog, smanjenja vijabiliteta ćelija (oko 10%) u obe tumorske kulture u poređenju sa kulturama tretiranim samim eksperimentalnim agensom. Dobijeni rezultati prikazani na Slici 8B sugerisali su citoprotektivnu ulogu procesa autofagije.



Slika 8. IXN indukuje citoprotektivnu autofagiju u kulturama B16 i A-375 ćelija. A) Procenat ćelija u autofagiji u B16 i A-375 kulturama ćelija melanoma nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određen je metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. B) Vijabilitet B16 i A-375 ćelija melanoma nakon kombinovanog tretmana IXN i inhibitorom autofagije 3-MA u trajanju od 48 h određen je CV testom. Vijabilitet je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%. Rezultat predstavlja $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke, # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane IXN

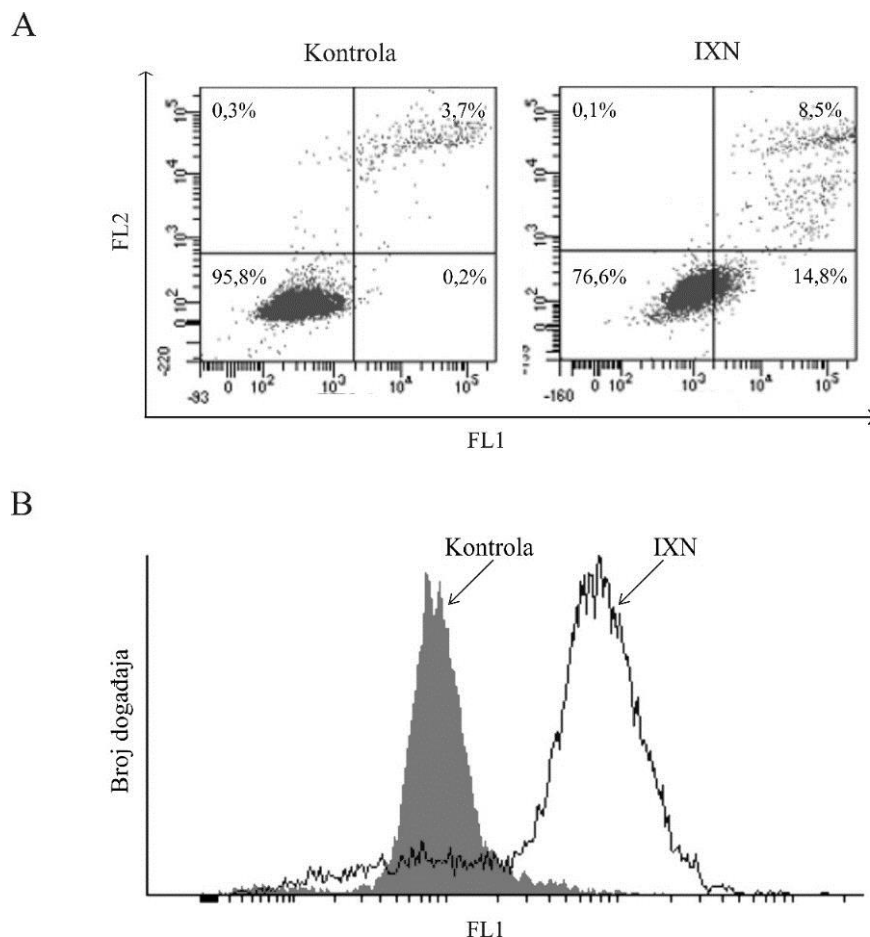
Uzimajući u obzir sve navedeno, može se izvesti zaključak da je autofagija u B16 i A-375 ćelijama pokrenuta tretmanom IXN oponirala apoptozi, i pod takvim okolnostima parcijalno neutralisala delovanje eksperimentalnog terapeutika.

4.1.4. IXN indukuje smrt ćelija metastatskog melanoma *in vitro*

4.1.4.1. IXN indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza u kulturi B16-F10 ćelija

Prethodnim eksperimentima je pokazano da IXN inhibira rast ćelija mišjeg (B16) i humanog (A-375) melanoma, kao i da je u osnovi njegovog citocidnog dejstva na ove ćelije programirana ćelijska smrt tipa I koja nije zavisna od aktivacije kaspaza, dok je autofagija imala isključivo citoprotektivnu ulogu. Imajući u vidu da je ispitivana supstanca takođe dovela do dozno-zavisnog smanjenja vijabiliteta visoko invazivnog klon melanoma, B16-F10 ćelija, od interesa je bilo ispitati mehanizam njegovog dejstva i na ovom *in vitro* metastatskom modelu melanoma. Kako bi bio proveren citocidni učinak ispitivanog agensa na navedenoj ćelijskoj liniji, najpre je analizirano prisustvo ćelijske smrti apoptozom. Kao i kod ćelija primarnog melanoma, izvršeno je Ann/PI dvostruko bojenje B16-F10 ćelija prethodno tretiranih IC_{50} dozom eksperimentalnog jedinjenja. Analiza na protočnom citofluorimetru je potvrdila da je tretman IXN u trajanju od 48 h izazvao porast procentualne zastupljenosti rano-apoptotičnih (Ann^+/PI^-), a u manjoj meri, i kasno-apoptotičnih/nekrotičnih ćelija (Ann^+/PI^+), u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 9A). Efekat indukcije apoptoze na ovoj visoko metastatskoj liniji bio je skoro ekvivalentan onom izraženom na A-375 ćelijskoj liniji, što se moglo i očekivati s obzirom da se radi o dvema invazivnim linijama melanoma.

Paralelno, ispitivan je i doprinos kaspaza apoptotskom procesu izazvanom IXN. U tu svrhu, B16-F10 ćelije su nakon 48-časovne inkubacije sa IC_{50} dozom testiranog prenilflavonoida obeležene ApoStat-om i analizirane na protočnom citofluorimetru. Za razliku od rezultata dobijenih na linijama primarnog melanoma gde između netretirane i kultura tretiranih eksperimentalnim agensom nije bilo značajne razlike u procentu ćelija sa aktiviranim kaspazama, na *in vitro* metastatskom modelu je utvrđena intenzivna aktivacija ovih proteaza nakon tretmana, što sugerise da je u ovom slučaju apoptoza verovatno realizovana kroz tipične puteve koju uključuju aktivnost pomenutih enzima (Slika 9B).



Slika 9. IXN indukuje apoptozu posredovanu kaspazama u kulturi B16-F10 ćelija. A) Procenat rano-apoptotičnih (Ann^+/PI^-) i kasno-apoptotičnih/nekrotičnih (Ann^+/PI^+) ćelija u B16-F10 kulturi ćelija melanoma i B) intenzitet fluorescence B16-F10 ćelija obeleženih ApoStat nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određeni su metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta.

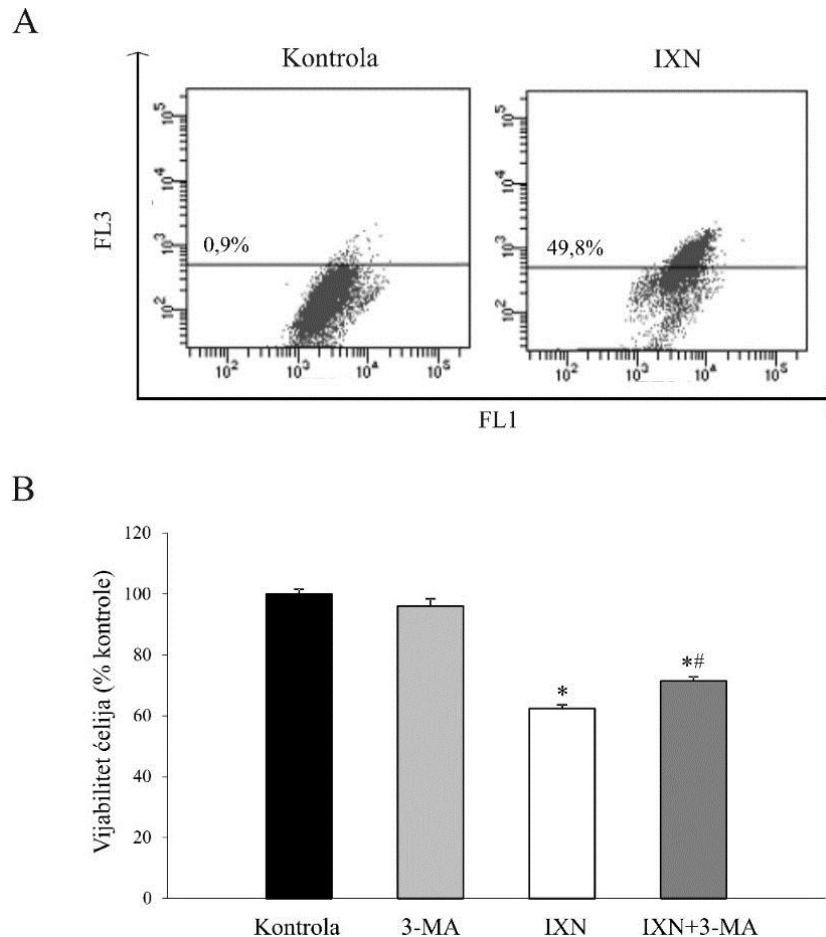
U skladu sa svim navedenim, može se zaključiti da IXN ostvaruje svoj antitumorski efekat na ćelije metastatskog modela melanoma indukujući apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza.

4.1.4.2. IXN indukuje snažnu autofagiju u kulturi B16-F10 ćelija

Nakon što je pokazano da je ćelijska smrt apoptozom delom odgovorna za smanjenje broja vijabilnih metastatskih ćelija melanoma, bilo je značajno ispitati i potencijalni doprinos autofagije antitumorskoj aktivnosti testiranog jedinjenja IXN. Tako su B16-F10 ćelije izložene IC_{50} dozi eksperimentalnog prenilflavonoida tokom 48 h, a potom bojene akridin-oranž bojom. Eventualno prisustvo autofagozoma, glavnih markera autofagije, detektovano je protočnom citofluorimetrijom merenjem intenziteta fluorescence u crvenom delu spektra. Kao što je prikazano na Slici 10A, povećano prisustvo autofagozoma u citoplazmi ćelija nakon izlaganja IXN ukazalo je na intenziviran proces autofagije u odnosu na kontrolne ćelije gajene u medijumu bez eksperimentalnog agensa.

Sa ciljem da se definiše uloga detektovane autofagije indukovane delovanjem agensa IXN i odredi da li ona doprinosi citocidnom efektu ili ima samo odbrambenu ulogu, upotrebljen je 3-MA. U tu svrhu su B16-F10 ćelije tretirane IC_{50} dozom IXN u prisustvu navedenog specifičnog inhibitora

autofagije tokom 48 h, nakon čega je broj vijabilnih ćelija određen MTT testom. Dobijeni rezultati prikazani na Slici 10B pokazali su očekivano smanjenje broja živih ćelija inkubiranih u prisustvu IXN, dok je kombinovani tretman IXN i 3-MA doveo do delimičnog (oko 10%) oporavka vijabiliteta njemu izloženih ćelija u poređenju sa kulturom ćelija tretiranom samim eksperimentalnim agansom. Ovim je jasno pokazano da inhibicija autofagije može bar delimično da neutrališe aktivnost IXN, što nedvosmisleno ukazuje na doprinos programirane ćelijske smrti tipa II ukupnom efektu eksperimentalnog terapeutika.



Slika 10. **IXN indukuje autofagiju u kulturi B16-F10 ćelija.** A) Procenat ćelija u autofagiji u B16-F10 kulturi ćelija melanoma nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određen je metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. B) Vijabilitet B16-F10 ćelija melanoma nakon kombinovanog tretmana IXN i inhibitorom autofagije 3-MA u trajanju od 48 h određen je MTT testom. Vijabilitet je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%. Rezultat predstavlja $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke, # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane IXN

Sumarno, može se zaključiti da IXN deluje citocidno na ćelije metastatskog melanoma, pri čemu se indukcija autofagije združena sa apoptozom zavisnom od aktivacije kaspaza nalazi u osnovi antitumorskog delovanja opisanog agensa.

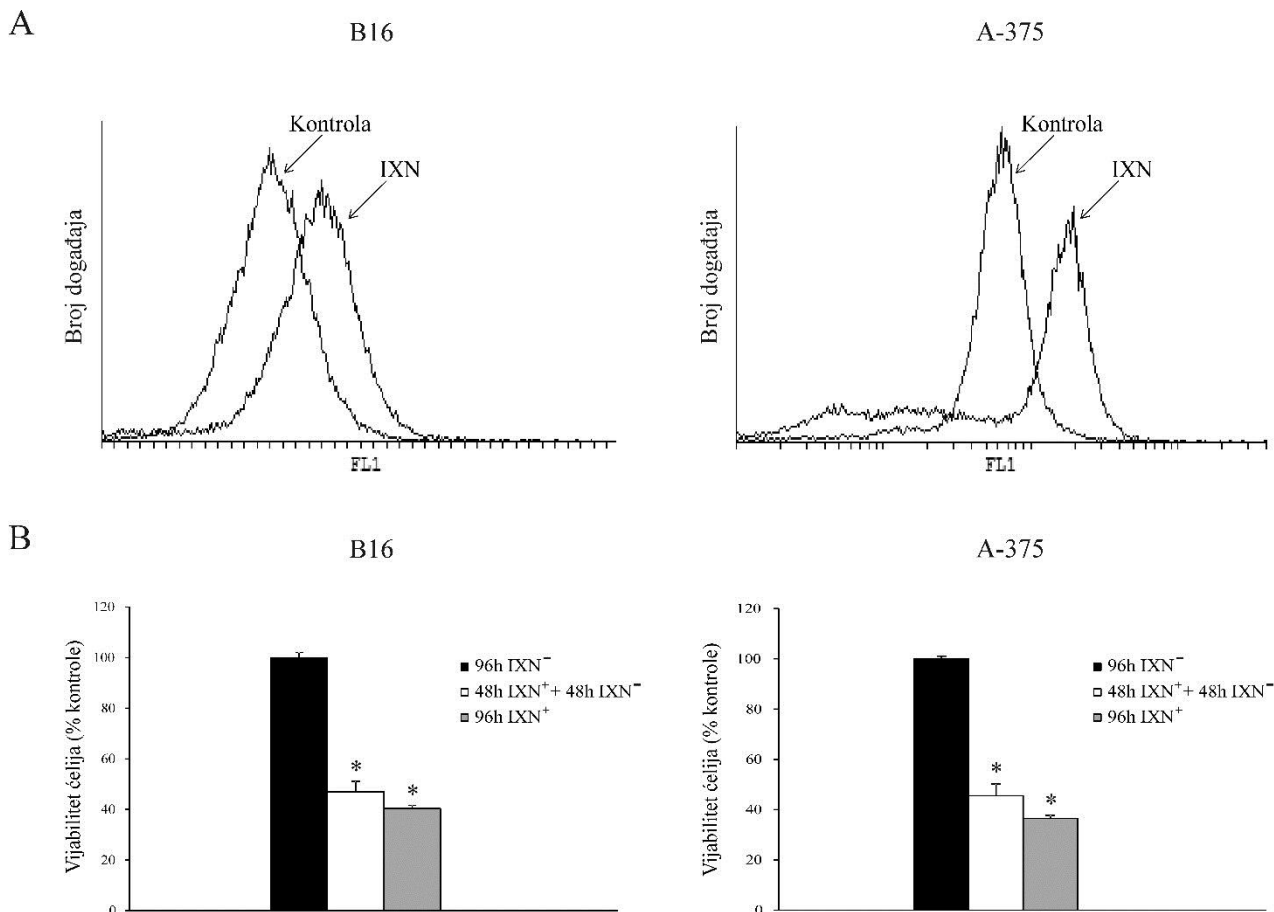
4.2. Definisanje mehanizama delovanja IXN na ćelije primarnog i metastatskog melanoma *in vitro*

4.2.1. IXN inhibira proliferaciju i indukuje fenotipsku promenu ćelija primarnog melanoma

4.2.1.1. IXN inhibira proliferaciju i ostvaruje permanentan efekat u kulturama B16 i A-375 ćelija

Imajući u vidu da prethodno pokazano smanjenje broja vijabilnih ćelija nastalo kao odgovor na tretman IXN, osim citocidnog, može biti posledica i citostatskog efekta eksperimentalne supstance, od interesa je bilo ispitati uticaj pomenutog jedinjenja na deobu tumorskih ćelija. U cilju ispitivanja efekta agensa IXN na proliferativni kapacitet mišjih B16 i humanih A-375 ćelija, one su najpre obeležene vitalnom CFSE bojom, a potom izložene IC₅₀ dozi eksperimentalnog jedinjenja u trajanju od 48 h. Analizom protočnom citofluorimetrijom otkriveno je da je procenat podeljenih ćelija u obe kulture tretirane IXN bio znatno manji u poređenju sa istim kod netretiranih kultura, što je sugerisalo da je IXN značajno smanjio stopu ćelijske deobe i doveo do gubitka proliferativnog potencijala obe testirane ćelijske linije. Citostatski efekat eksperimentalnog agensa bio je naročito izražen na visoko invazivnoj amelanotičnoj ćelijskoj liniji A-375 (Slika 11A). Ovakav podatak nedvosmisleno potvrđuje da je za redukciju broja B16 i A-375 ćelija pod tretmanom IXN odgovorna snažna inhibicija proliferacije indukovana pomenutom supstancom.

Kako bi se proverila postojanost efekta IXN i ispitalo da li je isti nezavisan od stalnog prisustva supstance, prethodno pomenute ćelijske linije melanoma su tretirane IC₅₀ dozom eksperimentalnog agensa u trajanju od 48 h, nakon čega je supstanca uklonjena, a po isteku dodatnih 48 h kultivacije u njenom odsustvu meren je vijabilitet ćelija CV esejom. Alternativno, tumorske ćelije su inkubirane 96 h u prisustvu ili odsustvu (kontrolni uzorci) testiranog prenilflavonoida. Dobijeni rezultati prikazani na Slici 11B pokazuju da je vijabilitet ćelija ostao snižen odnosno da je inhibitorni efekat IXN na njihov rast perzistirao čak i kada je jedinjenje uklonjeno nakon 48 h inkubacije, u obe ćelijske kulture. Nakon dodatnih 48 h kultivacije u odsustvu eksperimentalnog agensa, broj vijabilnih ćelija bio je skoro ekvivalentan onom detektovanom u kulturama kontinuirano inkubiranim u prisustvu IXN tokom 96 h. Navedeni rezultat sugerise da IXN promovise permanentne promene na unutraćelijskom nivou, dovodeći do trajnih promena fenotipa ćelija.



Slika 11. IXN inhibira ćelijsku proliferaciju uz ostvarivanje permanentnog efekta u kulturama B16 i A-375 ćelija. A) Intezitet fluorescence B16 i A-375 ćelija obojenih CFSE bojom nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određen je metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. B) Vijabilitet B16 i A-375 ćelija melanoma nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h i 96 h određen je CV testom. Vijabilitet je predstavljen kao procenat vrednosti apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%. Rezultat predstavlja SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Na osnovu do sada navedenih rezultata može se zaključiti da, osim citocidnog načina delovanja na B16 i A-375 ćelije, IXN dovodi do trajne transformacije fenotipa preživelih ćelija praćene gubitkom deobnog kapaciteta.

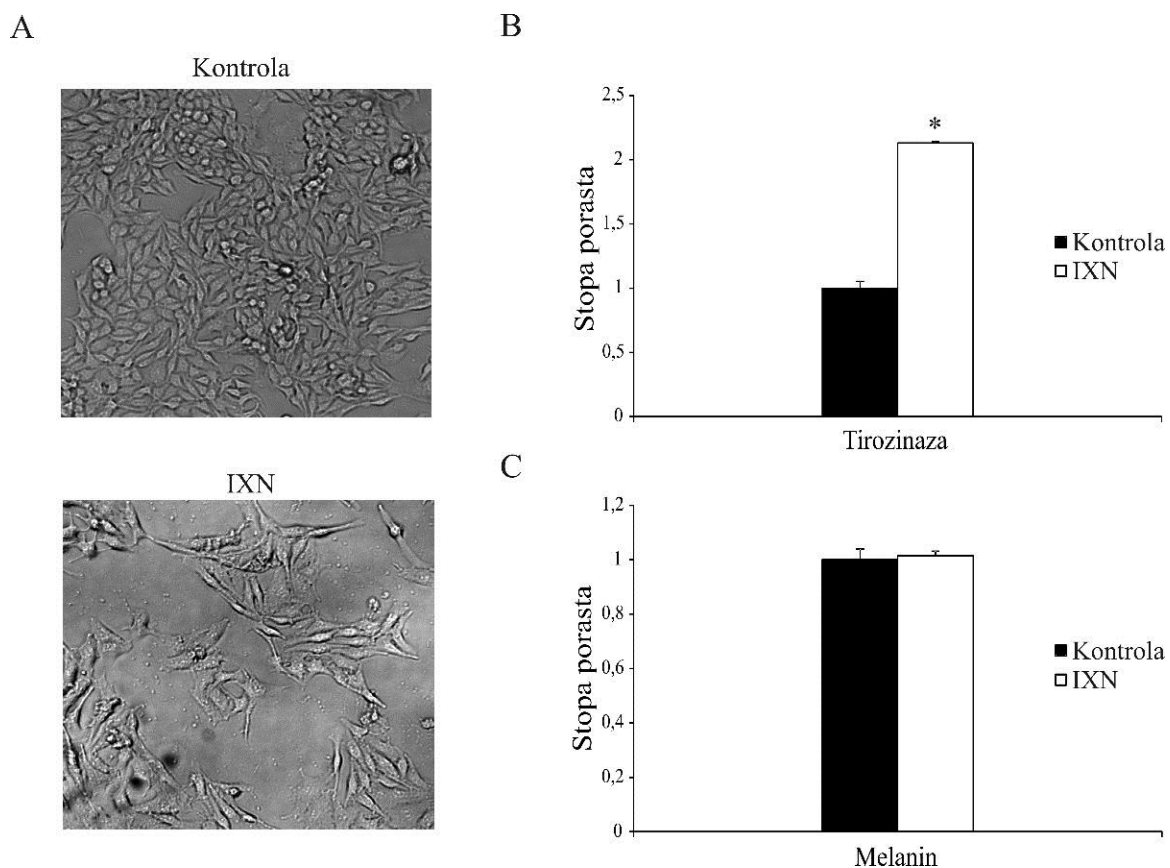
4.2.1.2. IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija ka melanocitima i redukuje „stem“ profil A-375 ćelija

Prethodno uočen gubitak proliferativnog potencijala nakon tretmana IXN i postojanost njegovog efekta sugerisali su da su obe ćelijske linije melanoma, mišje B16 i humane A-375, podlegle promenama koje su dovele do gubitka njihovih malignih svojstava i fenotipske alteracije. U skladu sa tim, prvenstveno je izvršena evaluacija potencijalne morfološke transformacije tretiranih ćelija na nivou svetlosne mikroskopije. U tu svrhu, B16 ćelije su tretirane IC₅₀ dozom eksperimentalne supstance u trajanju od 48 h, nakon čega je procenjivan njihov izgled. Mikroskopska analiza ćelija izloženih IXN, osim očekivane redukcije u broju ćelija, ukazala je na značajnu morfološku transformaciju. Kao što se vidi na Slici 12A, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, nakon

48-časovnog izlaganja testiranoj supstanci B16 ćelije pokazuju promenjenu, spljoštenu morfologiju sa sitnim nastavcima nalik dendritima.

Da bi se utvrdilo da li promenjena morfologija korelira sa biohemijskim karakteristikama diferencijacije u smeru melanocita, ispitivani su markeri diferencijacije ćelija melanoma. Naime, B16 ćelije bile su izložene IC₅₀ dozi IXN tokom 48 h, nakon čega je spektrofotometrijski izmerena aktivnost tirozinaze, ključnog enzima koji učestvuje u procesu melanogeneze, kao i sadržaj pigmenta melanina. Rezultati predstavljeni na Slici 12B nedvosmisleno pokazuju da je efekat morfološke transformacije ćelija bio praćen dvostruko povećanom aktivnošću tirozinaze nakon tretmana pomenutim agensom, u odnosu na netretirane ćelije. Ovaj podatak ukazao je na pojačan proces melanogeneze, što jeste biohemijski marker diferencijacije ka melanocitima. Zanimljivo je pak da pomenuti fenomen nije bio praćen očekivanim uvećanjem količine oslobođenog melanina iz liziranih ćelija u odgovoru na IXN, što je sugerisalo da, iz nekog razloga, proces melanogeneze nije bio kompletiran (Slika 12C).

Iz navedenih eksperimenata proizilazi zaključak da tretman IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija koja nije bila praćena kompletnom sintezom pigmenta melanina.



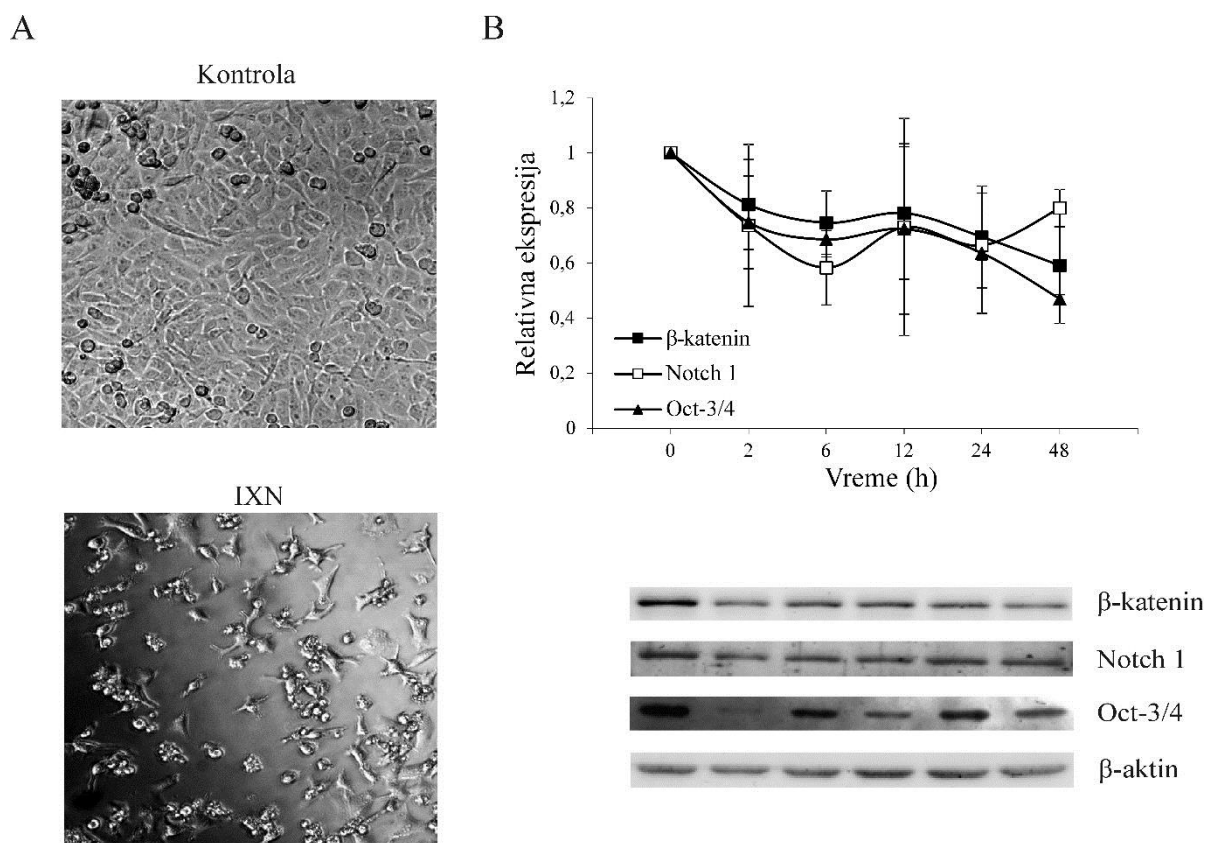
Slika 12. **IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija ka melanocitima.** A) Morfološka transformacija B16 ćelija nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određena je svetlosnom mikroskopijom. Prikazane su reprezentativne mikrografije. B) Aktivnost tirozinaze i C) količina melanina u B16 ćelijama nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određeni su spektrofotometrijski. Rezultati su predstavljeni kao stopa porasta u odnosu na kontrolnu kulturu ćelija gajenu u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Uporedo je vršeno ispitivanje potencijalne fenotipske promene A-375 ćelija, gde je najpre evaluirana morfologija svetlosnom mikroskopijom nakon 48-časovne inkubacije u prisustvu

eksperimentalnog agensa. Slično mišjim ćelijama, tretman IXN doveo je do jasne morfološke transformacije humanih A-375 ćelija u odnosu na kontrolne ćelije. Kao što je predstavljeno na Slici 13A, pored smanjenja u broju ćelija koje su inkubirane u prisustvu testiranog jedinjenja, svetlosnom mikroskopijom su zabeleženi uvećani romboidni oblici ćelija sa brojnim zaobljenim formama koje plutaju u medijumu.

S druge strane, A-375 ćelijska linija humanog melanoma je poznata kao amelanotična pa, suprotno B16 ćelijama, njena morfološka transformacija nije praćena ispoljavanjem melanocitnih markera. Nizak nivo diferencijacije ovih ćelija povezan je sa njihovom invazivnošću i „stem“ fenotipom odnosno ekspresijom markera matičnih ćelija kancera [234]. Stoga je, kako bi se ispitala potencijalna fenotipska alteracija, analizirana ekspresija markera niskodiferentovanog fenotipa – proteina ključnih aktera Wnt/ β -katenin, Notch i OCT signalnih puteva. Za potrebe eksperimenta, A-375 ćelije su inkubirane sa IC₅₀ dozom eksperimentalnog prenilflavonoida u određenim vremenskim intervalima, nakon čega je ekspresija β -katenina, Notch 1 i Oct-3/4 proteina određivana imunoblot metodom. Kao što se može videti na Slici 13B, uočeno je da je već nakon prvih nekoliko sati tretman ćelija IXN smanjio ekspresiju navedenih proteina. Dodatno, inhibicija ekspresije se održala tokom 48 h tretmana, što ukazuje da je IXN sposoban da ograniči progresiju anaplastičnih melanoma.

Iz pomenutih oglada se može zaključiti da je morfološka transformacija A-375 ćelija sinhronizovana sa smanjenim proliferativnim kapacitetom i praćena deprivacijom „stem“ markera nakon tretmana IXN, ukazujući na gubitak „stem“ fenotipa i pluripotentnih osobina ovih ćelija.



Slika 13. **IXN redukuje „stem“ profil amelanotičnih A-375 ćelija.** A) Morfološka transformacija A-375 ćelija nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određena je svetlosnom mikroskopijom. Prikazane su reprezentativne mikrografije. B) Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije „stem“ markera i njihovi reprezentativni imunoblotovi. Relativna ekspresija proteina β -katenina, Notch 1 i Oct-3/4 u A-375 ćelijama tretiranim IXN u naznačenim vremenskim intervalima određena je pomoću imunoblot metode. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

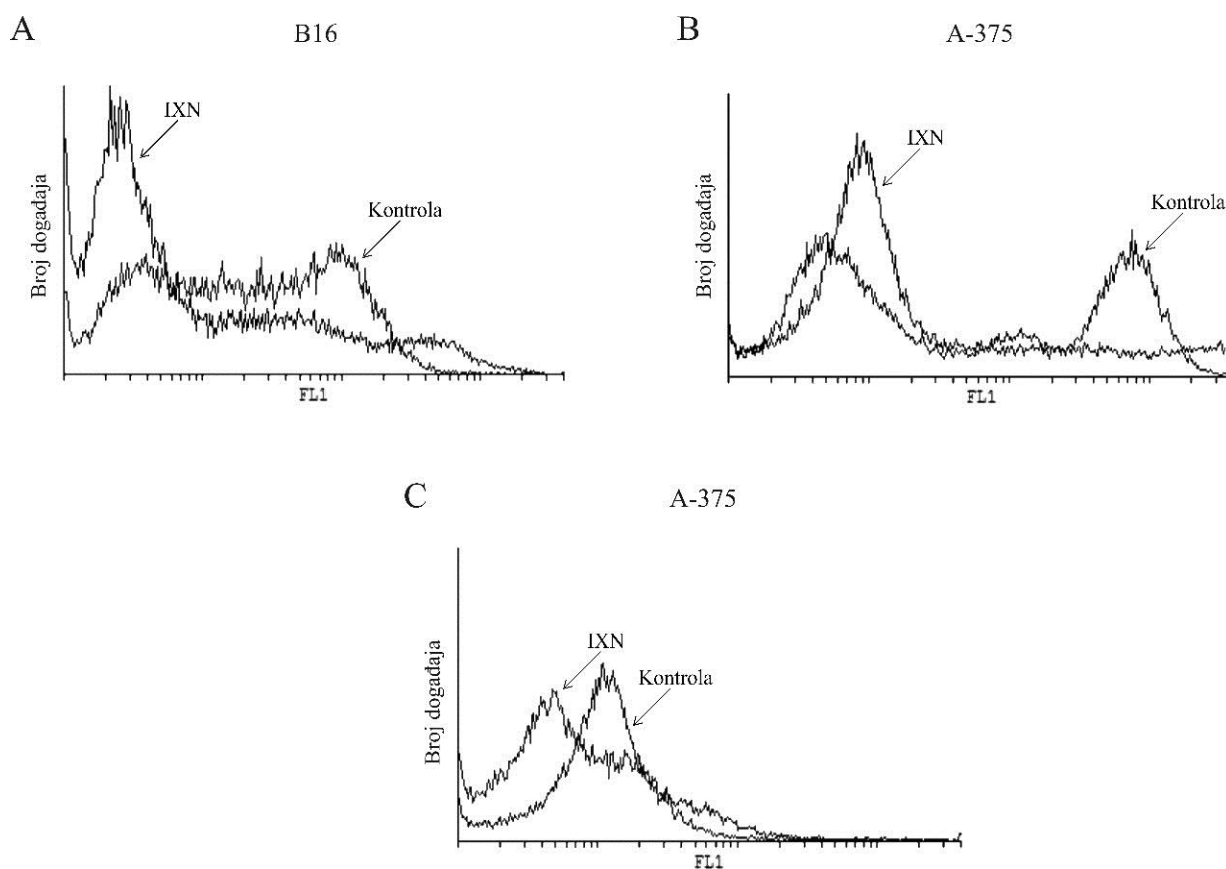
Sumirajući sve navedeno, IXN indukuje fenotipsku transformaciju ćelija primarnih i metastatskih melanoma. Dok je tretman pomenutim agensom doveo do pojačane aktivnosti tirozinaze bez uvećanja količine melanina u morfološki transformisanim B16 ćelijama podvrgavajući ih atipičnoj diferencijaciji ka melanocitima, kod amelanotičnih A-375 ćelija došlo je do gubitka pluripotentnih karakteristika što je potvrđeno inhibicijom „stem“ markera – β -katenina, Notch 1 i Oct-3/4.

4.2.1.3. IXN suprimira produkciju ROS/RNS u kulturama B16 i A-375 ćelija i smanjuje količinu unutarćelijskog NO u kulturi A-375 ćelija

Budući da su reaktivne vrste kiseonika i azota važni modulatori unutarćelijskih signala, a u zavisnosti od količine, mesta produkcije i karakteristika jedinjenja posreduju u regulaciji osnovnih ćelijskih procesa poput diferencijacije, proliferacije i umiranja, pristupilo se procenjivanju uticaja IXN na produkciju slobodnih radikala u B16 i A-375 ćelijskim linijama melanoma. Radi detekcije i kvantifikacije produkcije ROS/RNS, ćelije su najpre bojene redoks-senzitivnom DHR 123 bojom, a zatim inkubirane u prisustvu IC_{50} doze eksperimentalnog agensa. Po isteku 48 h, urađena je analiza rezultata na protočnom citofluorimetru. Intenzitet zelene fluorescence kao odraz proizvodnje

reaktivnih vrsta kiseonika i azota u B16 ćelijama ukazao je na smanjenu produkciju vodonik-peroksida, peroksinitrita i hipohloraste kiseline u odgovoru na tretman IXN, potvrđujući njegov potencijal „sakupljača“ slobodnih radikala (Slika 14A). U skladu s tim, i u kulturi A-375 ćelija primećen je isti fenomen gde je tretman IXN rezultirao u generisanju ekvivalentno niskih koncentracija reaktivnih vrsta kiseonika i azota (Slika 14B).

Konstitutivna ekspresija enzima iNOS predstavlja izvor endogenog NO koji deluje kao faktor rasta humanih ćelija melanoma [235]. Budući da je produkcija azot-monoksida karakteristika A-375 ćelija, paralelno je procenjivan uticaj IXN na njegovo generisanje. Kako bi se izmerila količina unutraćelijskog NO, A-375 ćelije su, nakon 48-časovnog tretmana IC₅₀ dozom IXN, bojene DAF-FM diacetatom, a potom analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Kao što se može videti na Slici 14C, u kulturi tretiranih ćelija došlo je do smanjenja količine NO, u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Dakle, tretman A-375 ćelija IXN rezultirao je smanjenom stopom produkcije unutraćelijskog NO i time značajno urušio vitalnost i proliferativni kapacitet ovih ćelija.



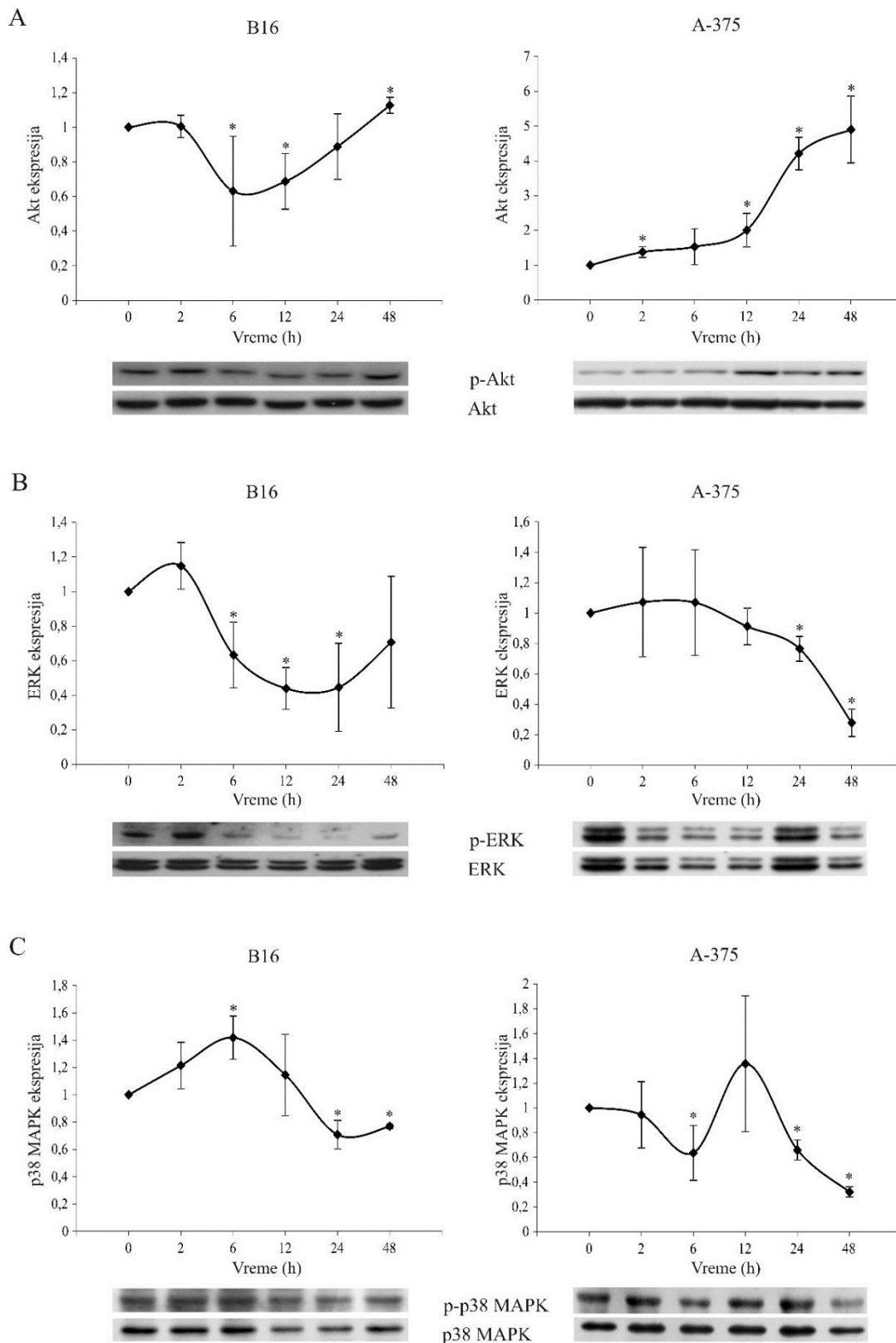
Slika 14. IXN suprimira produkcija ROS/RNS u B16 i A-375 ćelijama i smanjuje količinu unutraćelijskog NO u A-375 ćelijama. Intezitet fluorescence A) B16 i B) A-375 ćelija obojenih DHR 123 bojom i C) A-375 ćelija obeleženih DAF-FM diacetatom nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određen je metodom protočne citofluorimetrije. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta.

Iz opisanih eksperimenata se može izvesti zaključak da IXN poseduje snažan potencijal „sakupljača“ slobodnih radikala koji može doprineti njegovom antitumorskom delovanju na B16 i A-375 ćelijskim linijama.

4.2.1.4. IXN različito utiče na signalne puteve PI3K/Akt i MAPK u B16 i A-375 ćelijama

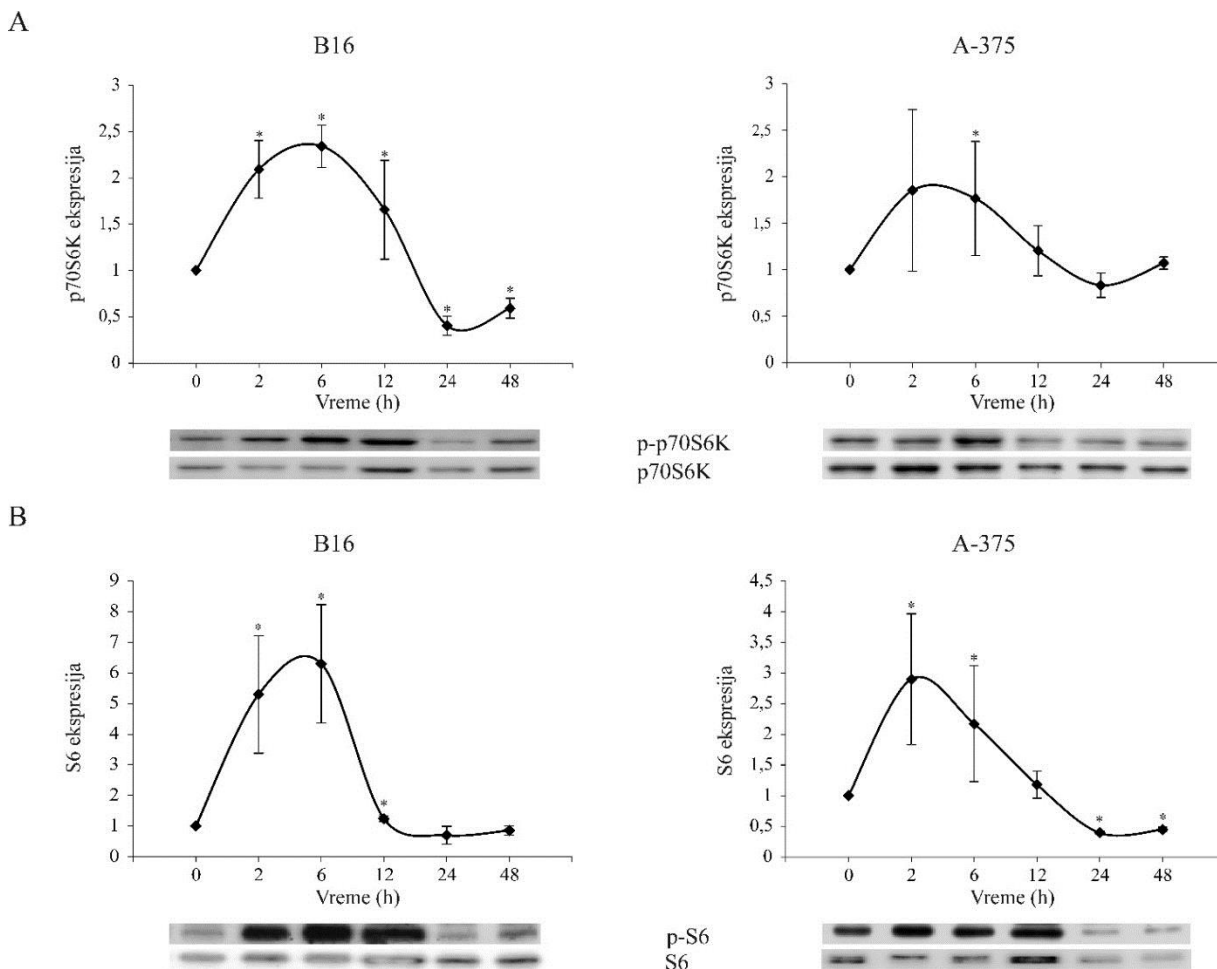
Dalji tok istraživanja bio je usmeren na analizu unutraćelijskog odgovora ćelija melanoma na tretman IXN. S obzirom da je prethodno pokazano da je mehanizam dejstva pomenutog prenilflavonoida u mišjim B16 i humanim A-375 ćelijama melanoma indukcija apoptoze nezavisne od aktivacije kaspaza združena sa snažnom inhibicijom proliferacije i diferencijacijom, od interesa je bilo opisati događaje na molekularnom nivou koji se nalaze u pozadini zapaženih fenomena. S tim u vezi, pristupilo se analizi ekspresije ključnih molekula PI3K/Akt i MAPK signalnih puteva koji su uključeni u regulaciju ćelijske smrti, deobe i diferencijacije.

Kako bi se definisale molekularne mete IXN u navedenim ćelijama melanoma, ekspresija ključnih proteina PI3K/Akt i MAPK signalnih puteva procenjavana je imunoblot analizom. U tu svrhu, obe ćelijske linije bile su izložene IC_{50} dozi eksperimentalnog terapeutika u trajanju 2, 6, 12, 24 i 48 h, nakon čega je određivana ekspresija Akt, ERK1/2 i p38 MARK, a potom i p70S6K i S6 proteina. Aktivacija navedenih proteina je analizirana iz odnosa njihove fosforilisane (aktivirane) forme i ukupne količine svakog proteina ponaosob. Iz imunoblotova prikazanih na Slici 15A i B, uočava se da je u B16 ćelijama IXN prolazno suprimirao ekspresiju Akt i ERK1/2, dok su u A-375 ćelijama otkriveni različiti obrasci ekspresije ta dva proteina. Naime, analiza ekspresije Akt ukazala je na njegovu kontinuiranu aktivaciju, dok je ERK1/2 bio recipročno inhibiran usled dejstva eksperimentalnog agensa na ćelije humanog melanoma. Imajući u vidu da se kod humanog melanoma prekomerna aktivnost ERK1/2 dovodi u vezu sa proliferacijom, preživljavanjem ćelija i rastom tumora [236], pokazani pad aktivnosti ERK1/2 indukovani IXN mogao bi biti uzrok ili posledica započete apoptoze, što je u skladu sa rezultatima dobijenim protočnom citofluorimetrijom. Sa druge strane, imunoblot analiza ekspresije p38 MAPK ukazala je na to da je tretman IXN doveo samo do privremenog povećanja ekspresije ove kinaze u obe ćelijske linije melanoma (Slika 15C).



Slika 15. IXN različito utiče na gornje delove PI3K/Akt i MAPK signalnih puteva u B16 i A-375 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije A) Akt, B) ERK1/2 i C) p38 MAPK i njihovi reprezentativni imunoblotovi. Relativna ekspresija proteina u B16 i A-375 ćelijama tretiranim IXN u naznačenim vremenskim intervalima određena je pomoću imunoblot metode. Rezultati predstavljaju SV \pm SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Kao što je već rečeno, paralelno je ispitivan uticaj IXN na donje delove pomenutih signalnih puteva koji integrišu više početnih stimulusa. U skladu sa tim, pokazalo se da su uprkos razlikama u uzvodnom delu navedenih signalnih kaskada, molekuli uključeni u nizvodne događaje bili na sličan način pogođeni istim tretmanom. Rezultati imunoblot analize su ukazali na vremenski ograničenu aktivaciju p70S6K tokom prvih 12 h, nakon koje je fosforilacija aktivnog mesta Thr389 p70S6 kinaze bila inhibirana u obe ćelijske linije (Slika 16A). Sa druge strane, dok je u A-375 ćelijama ekspresija ribozomalnog S6 proteina pratila dinamiku uzvodne S6K i naposljetku bila suprimirana, u B16 ćelijama S6 protein se nakon početne aktivacije zadržao na osnovnom nivou, što ukazuje na umešanost alternativnih regulatora njegove ekspresije (Slika 16B).



Slika 16. IXN inhibira ekspresiju p70S6K i S6 proteina u B16 i A-375 ćelijama. Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije A) p70S6K i B) S6 proteina i njihovi reprezentivni imunoblotovi. Relativna ekspresija proteina u B16 i A-375 ćelijama tretiranim IXN u naznačenim vremenskim intervalima određena je pomoću imunoblot metode. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Sveobuhvatno, može se zaključiti da IXN različito utiče na ključne signalne molekule uključene u regulaciju ćelijske smrti, proliferacije i diferencijacije u ćelijskim linijama melanoma. Iako su PI3K/Akt i MAPK signalni putevi modulirani od strane IXN, ovo jedinjenje ne može biti opisano ni kao inhibitor niti kao aktivator navedenih puteva transdukcije signala.

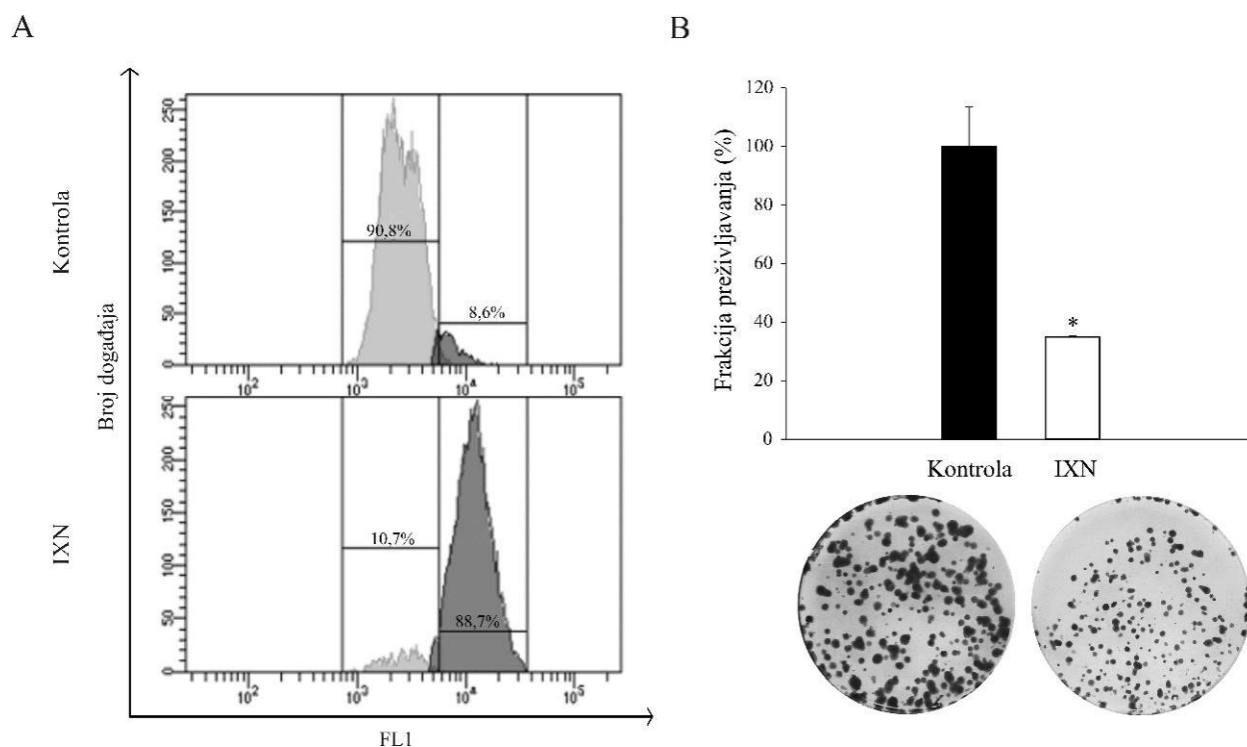
4.2.2. IXN inhibira proliferaciju, pokretljivost i invazivnost metastatske linije melanoma

4.2.2.1. IXN inhibira proliferaciju i smanjuje klonogeni potencijal B16-F10 ćelija

Pored toga što su prethodno dobijeni rezultati o indukciji snažne autofagije združene sa apoptozom zavisnom od aktivacije kaspaza u kulturi tretiranih B16-F10 ćelija ukazali na izražen citocidni efekat IXN, praćen je njegov uticaj na proliferativni i metastatski potencijal ovih ćelija mišjeg melanoma.

Kako su B16-F10 ćelije izuzetno proliferativne, najpre je analiziran njihov deobni potencijal u prisustvu eksperimentalnog terapeutika. U tu svrhu, ćelije su obeležene CFSE bojom, a potom izložene IC_{50} dozi IXN u trajanju od 48 h. Analiza protočnom citofluorimetrijom jasno je pokazala da je, u poređenju sa netretiranom kulturom, 48 časova duga inkubacija sa IXN rezultirala snažnom supresijom proliferacije tretiranih B16-F10 ćelija. Kao što se može videti na Slici 17A, dok je skoro 91% kontrolnih ćelija bilo podeljeno tokom naznačenog vremenskog intervala, čak 88,7% ćelija tretiranih eksperimentalnim agensom je ostalo nepodeljeno. Ovakav podatak bez sumnje potvrđuje da je za smanjeni vijabilitet B16-F10 ćelija pod tretmanom IXN, osim programirane ćelijske smrti tipa I i II, prevashodno odgovorna snažna inhibicija proliferacije indukovana pomenutom supstancom, koja po svoj prilici prethodi indukciji ćelijske smrti apoptozom/autofagijom. Ovo je bilo u skladu sa prethodno uočenom promenjenom morfologijom ćelija na nivou svetlosne mikroskopije (Tabela 4). Takođe, dobijeni rezultati koreliraju sa već opisanim citostatskim efektom IXN na ćelijama visoko invazivne forme primarnog melanoma – A-375.

Paralelno je ispitivan uticaj IXN na klonogeni potencijal B16-F10 ćelija. Kako bi se procenila sposobnost ove visoko proliferativne ćelijske linije mišjeg melanoma da formira kolonije *in vitro* nakon izlaganja IXN, korišćen je klonogeni esej. Da bi se isključila mogućnost da je uočeni efekat IXN posledica njegove citocidne aktivnosti, za potrebe testa formiranja kolonija ćelije su tretirane subtoksičnom (IC_{25}) dozom eksperimentalnog flavanona u trajanju od 48 h. Nakon 7 dana kultivacije ćelija pretretiranih IXN, analizirana je frakcija preživljavanja u B16-F10 ćelijskoj kulturi kojom se definiše udeo preživelih ćelija sa očuvanim klonogenim potencijalom. U skladu sa prethodno dobijenim, rezultati klonogenog eseja ukazali su na to da je sposobnost ćelija da formiraju kolonije bila dramatično smanjena nakon njihovog izlaganja IXN. U poređenju sa kontrolnom kulturom gde se brza proliferacija ćelija manifestovala stvaranjem brojnih velikih kolonija, inhibirani klonogeni potencijal tretiranih ćelija rezultirao je malim brojem formiranih ćelijskih klonova. Naime, klonogena frakcija preživljavanja u kulturi izloženoj IXN bila je smanjena za više od 60% u odnosu na kontrolnu kulturu (Slika 17B).



Slika 17. **IXN inhibira proliferaciju i smanjuje klonogeni potencijal B16-F10 ćelija.** A) Intenzitet fluorescencije B16-F10 ćelija obojenih CFSE bojom nakon tretmana IXN u trajanju od 48 h određen je metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. B) Frakcija preživljavanja u kulturi B16-F10 ćelija tretiranih IXN u trajanju od 48 h određena je klonogenim esejem nakon 7 dana kultivacije. Rezultat je predstavljen kao procenat kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost frakcije preživljavanja 100%. Rezultat predstavlja $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Zajedno sa prethodnim, ovi rezultati pokazuju da IXN ostvaruje dominantan citostatski efekat na metastatskom modelu melanoma *in vitro*, pri čemu se, osim uočene autofagije i apoptoze posredovane kaspazama, u osnovi njegovog antitumorskog dejstva nalazi snažna inhibicija proliferacije koja korelira sa smanjenim klonogenim potencijalom.

4.2.2.2. IXN smanjuje metastatski potencijal B16-F10 ćelija

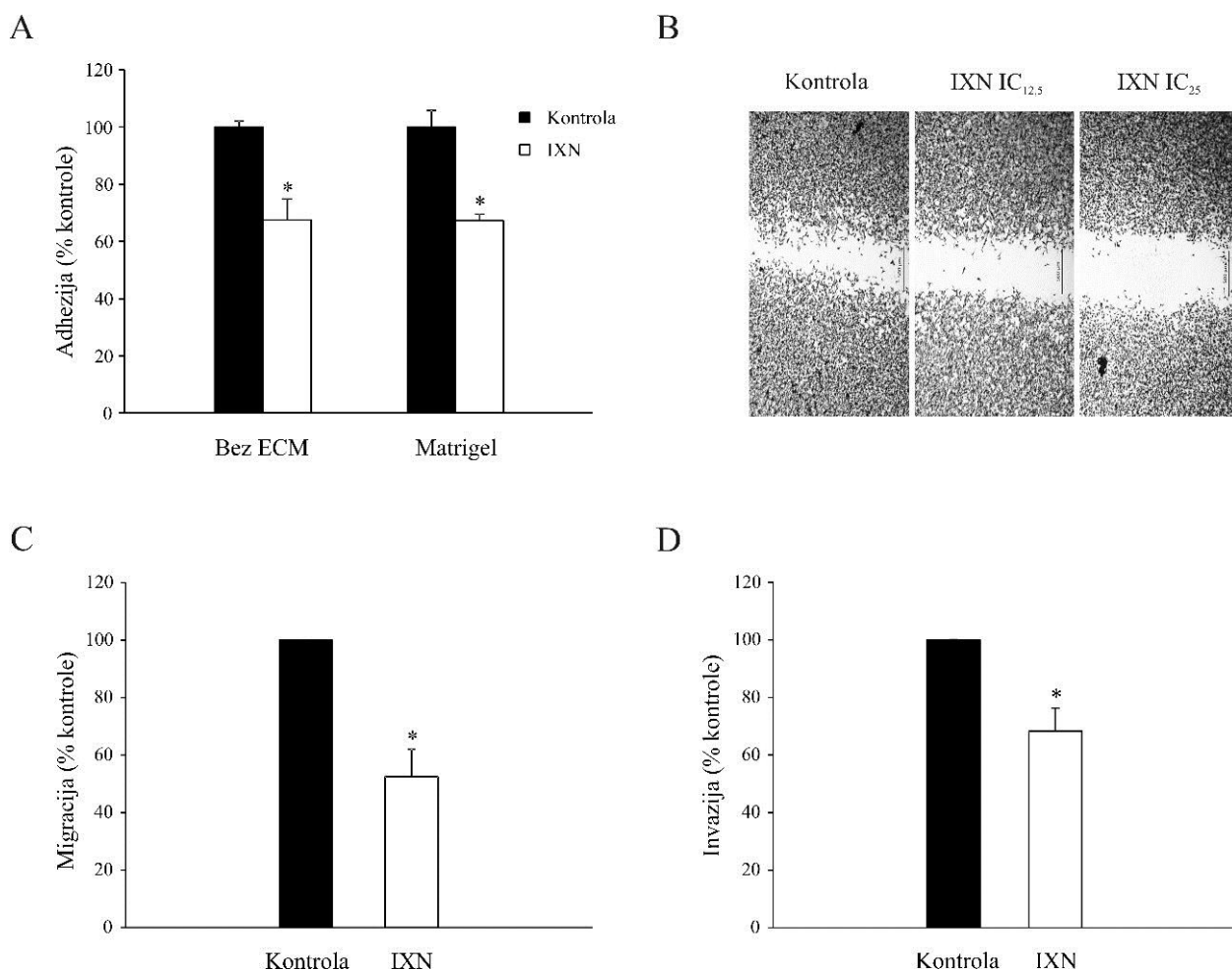
Pokazani smanjeni kapacitet formiranja kolonija koji je bio u korelaciji sa smanjenom proliferacijom tretiranih ćelija ukazao je na mogućnost promena u metastatskom potencijalu. Stoga se sa ciljem da se ispita uticaj IXN na metastatski potencijal mišjih B16-F10 ćelija melanoma pristupilo procenjivanju sposobnosti adhezije, migracije i invazije ovih ćelija. Kako bi se isključila mogućnost da bi potencijalni antimetastatski efekat IXN mogao biti posledica njegove citocidne aktivnosti, u narednim eksperimentima ćelije su tretirane subtoksičnim dozama (IC_{25} dozom ili nižom) IXN tokom 48 h pre samih analiza.

Budući da je adhezija ćelija ključni korak u kaskadi događaja karakterističnih za metastatske procese, najpre je analiziran uticaj IXN na sposobnost B16-F10 ćelija pretretiranih subtoksičnom dozom eksperimentalnog agensa da, u ograničenom vremenskom okviru od 1 h, adheriraju za plastiku ili podlogu obloženu proteinima vanćelijskog matriksa (Matrigel®). Rezultati eseja za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija su pokazali da je 48-časovni pretretman IXN smanjio procenat

ćelija koji je adherirao za oba tipa površina u sličnoj meri. Ovakav podatak je ukazao na moguću opšti gubitak ili blokadu adhezivnih molekula u ćelijskoj kulturi izloženoj tretmanu (Slika 18A).

Sledeći korak povezan sa višestepenim procesom metastaziranja definisan je migratornim potencijalom ćelije. Kako bi se ispitao uticaj IXN na pokretljivost B16-F10 ćelija *in vitro*, primenjen je test zarastanja rana. Da bi se izbegla pogrešna interpretacija rezultata uzrokovana citotoksičnošću agensa, test zarastanja rana je podrazumevao tretman dozama IXN koje su bile dva i četiri puta niže od utvrđene IC_{50} doze. Rezultati su analizirani svetlosnom mikroskopijom. Kao što se može videti na Slici 18B, u poređenju sa kontrolnom kulturom gde je razmak između ćelija bio gotovo u potpunosti premošten nakon 48 h, tretman IXN u obe doze, IC_{25} i $IC_{12.5}$, značajno je smanjio sposobnost ćelija da popune prazninu. Iz navedenog je bilo jasno da je eksperimentalni agens inhibitorno uticao na pokretljivost ćelija. U cilju potvrde dobijenih rezultata, migratorni potencijal B16-F10 ćelija dodatno je proveravan na osnovu njihove sposobnosti da migriraju kroz pore membrane veličine 8 μm u odgovoru na hemostimulus u vidu povećane koncentracije FBS u medijumu. Analiza rezultata vršena je 24 h po završetku 48-časovnog pretretmana ćelija IC_{25} dozom IXN. Rezultati transmigracionog eseja su očekivano potvrdili da IXN sprečava migraciju mišjih ćelija melanoma, pri čemu je migratornost tretiranih ćelija bila smanjena za približno 50% u poređenju sa kontrolom (Slika 18C).

Kako je invazivnost ključna odlika metastatskog procesa, dodatno je ispitivan uticaj IXN na invazivni potencijal B16-F10 ćelija koji doprinosi njegovim metastatskim osobinama. Za razliku od migracije koja se odnosi samo na kretanje ćelija, invazija podrazumeva sposobnost tumorskih ćelija da aktivno prodru u tkiva enzimskom digestijom ECM. Membrane obložene tankim slojem polimerizovanog gela poslužile su za testiranje sposobnosti ćelija melanoma da enzimski razgrade prepreke u vidu proteina ekstraćelijskog matriksa i migriraju kroz pore membrane veličine 8 μm ka izvoru hemostimulusa. Ćelije su inkubirane 48 h u prisustvu IC_{25} doze terapeutika, a potom im je dozvoljeno da tokom 12 h invadiraju kroz *in vitro* model ECM. Dobijeni rezultati su bili u korelaciji sa već navedenim. Naime, sposobnost IXN pretretiranih B16-F10 ćelija da pređu barijeru napravljenu od rekonstituisane bazalne membrane bila je 40% niža od sposobnosti netretiranih kontrolnih ćelija, čime je potvrđeno da IXN negativno utiče na invazivnost ćelija mišjeg melanoma (Slika 18D).



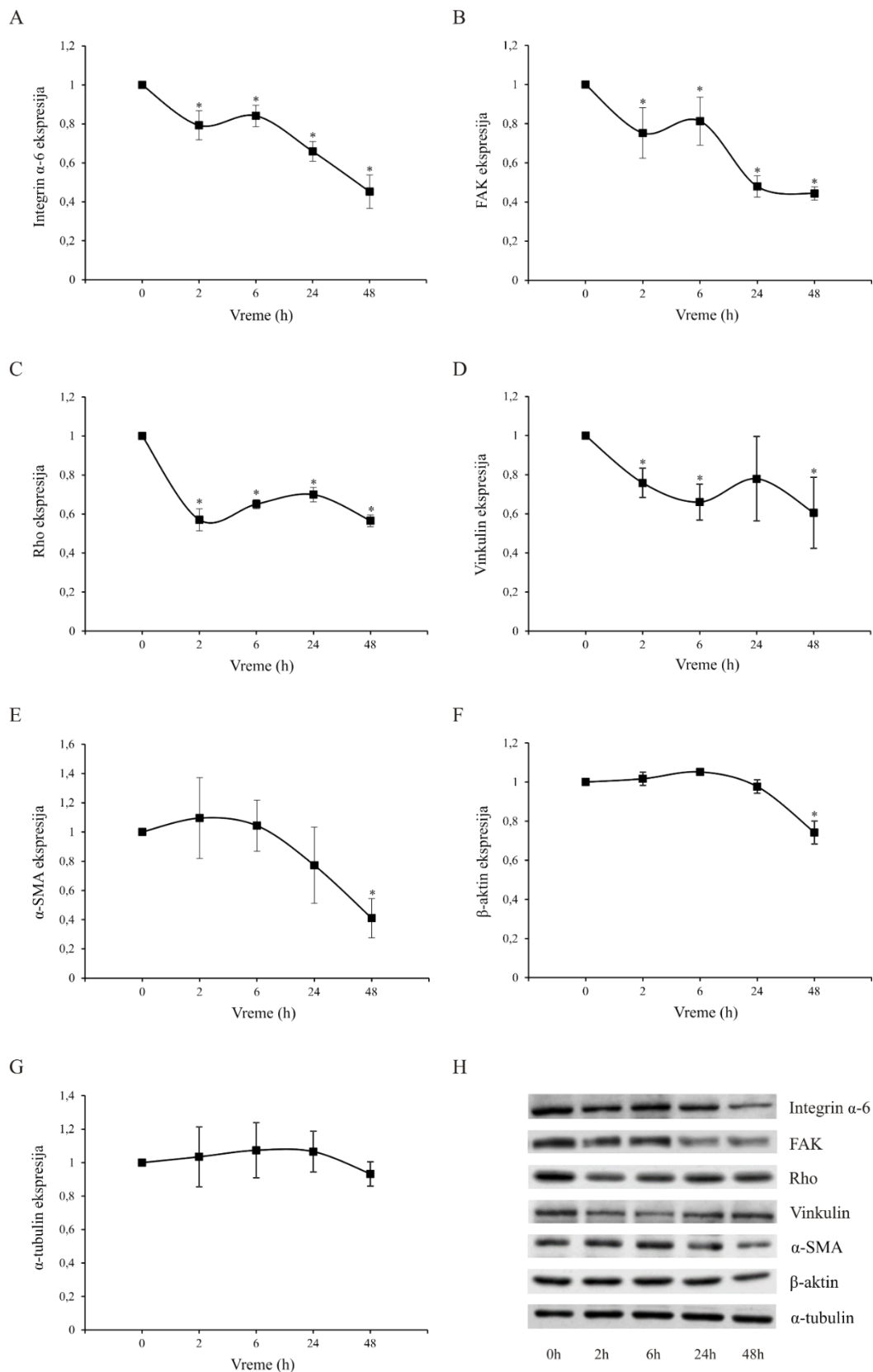
Slika 18. **IXN redukuje metastatske osobine B16-F10 ćelija *in vitro*.** A) Adhezivnost, B) i C) migratornost i D) invazivnost B16-F10 ćelija pretretiranih IXN u trajanju od 48 h određeni nakon determinisanih vremenskih perioda odgovarajućim testovima. Rezultati (A, C i D) su predstavljeni kao procenat kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 100%. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke. Rezultat (B) je predstavljen u vidu reprezentativnih mikrografija dobijenih na nivou svetlosne mikroskopije.

Predstavljeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da pretretman subtoksičnim dozama IXN koji nema uticaj na vijabilitet i proliferaciju ćelija, značajno smanjuje adhezivnost, migratornost i invazivnost B16-F10 ćelija, i na taj način redukuje metastatski potencijal ovog visoko invazivnog, metastatskog subklona ćelija melanoma *in vitro*.

4.2.2.3. IXN negativno reguliše ekspresiju proteina relevantnih za proces metastaziranja kod B16-F10 ćelijske linije

Kako bi se na unutarćelijskom nivou otkrio uzrok zapaženog gubitka metastatskog potencijala tretiranih B16-F10 ćelija i ujedno potvrdili rezultati dobijeni u prethodnim eksperimentima, ispitan je uticaj IXN na signalne puteve relevantne za proces metastaziranja. Stoga je analizirana ekspresija proteina koji igraju važnu ulogu u povezivanju ćelijske membrane sa unutarćelijskom citoskeletnom mašinerijom sa jedne strane i ECM sa druge strane, tako posredujući u adheziji, migraciji i invaziji.

Podaci iz literature potvrđuju da invazivnost tumora i migracioni potencijal ćelija zavisi od angažovanja integrinskih receptora i propagacije nizvodnog signala. Komunikacija citoplazmatskih citoskeletnih proteina sa vanćelijskim matriksom reguliše se putem intimnih kontakata specifičnih adapterskih proteina koji omogućavaju njihov adekvatan odgovor na stimulaciju membranskih receptora [237]. Da bi se ispitaio uticaj IXN na odabrane proteine važne za rearanžman citoskeleta posredovan integrinima, B16-F10 ćelije su bile izložene IC₅₀ dozi IXN, a ekspresija proteina je analizirana u tačno određenim vremenskim intervalima (2, 6, 24 i 48 h) imunoblot metodom. Najpre je analizirana ekspresija transmembranskog receptora integrina α -6, a potom FAK i vinkulina koji su deo mreže proteina u oblastima fokalne adhezije, kao i Rho proteina koji povezuje membranske receptore sa fokalnim adhezijama. Rezultati imunoblot analize ukazali su na kontinuirano smanjenje ekspresija pomenutih molekula kod ćelija mišjeg metastatskog melanoma tretiranih eksperimentalnim agensom (Slika 19A, B, C i D). Pored toga, detektovana je i inhibicija ekspresije α -SMA, proteina karakterističnog za agresivni fenotip, u ćelijama nakon izlaganja testiranoj supstanci (Slika 19E). Takođe je ispitan uticaj IXN na visoko konzervisane citoskeletne proteine, β -aktin i α -tubulin, čija je ekspresija obično stabilna u ćelijama. Kvantifikacija njihove ekspresije u B16-F10 ćelijama gajenim u prisustvu IXN otkrila je da ovo jedinjenje ostvaruje blagi ili nikakav efekat na pomenute proteine. Rezultati imunoblot analize su ukazali na smanjenu ekspresiju β -aktina samo u poslednjem vremenskom trenutku merenja u ćelijama tretiranim IXN (Slika 19F). Sa druge strane, budući da ekspresija α -tubulina nije bila promenjena tretmanom ni u jednom vremenskom intervalu, ovaj protein je poslužio kao referentni za određivanje ekspresije ostalih proteina (Slika 19G). Veći uticaj IXN na uzvodne proteine integrinskog signalnog puta u odnosu na proteine citoskeletne mašinerije sugeriše da ispitivani prenilflavonoid ostvaruje svoj antimetastatski potencijal pre delujući na nivou ćelijske membrane ili fokalnih adhezija koji su uključeni u interakcije ćelije sa unutrašnjim delom, okolinom ili pak drugom ćelijom, nego na sam citoskelet.



Slika 19. **IXN negativno reguliše integrinski signalni put.** Grafički prikaz denzitometrijske kvantifikacije ekspresije A) integrina α -6, B) FAK, C) Rho, D) vinkulina, E) α -SMA, F) β -aktina, G) α -tubulina i H) reprezentivni imunoblotovi navedenih proteina. Relativna ekspresija proteina u B16-F10 ćelijama tretiranim IXN u naznačenim vremenskim intervalima određena je pomoću imunoblot metode. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Posmatrajući sve zajedno, može se zaključiti da opisani događaji na unutarćelijskom nivou u potpunosti potvrđuju prethodno dobijene rezultate, s obzirom da je očigledno da IXN narušava transdukciju signala posredovanu integrinskim receptorima te na taj način utiče na adhezivni, migratorni i invazivni potencijal B16-F10 ćelija.

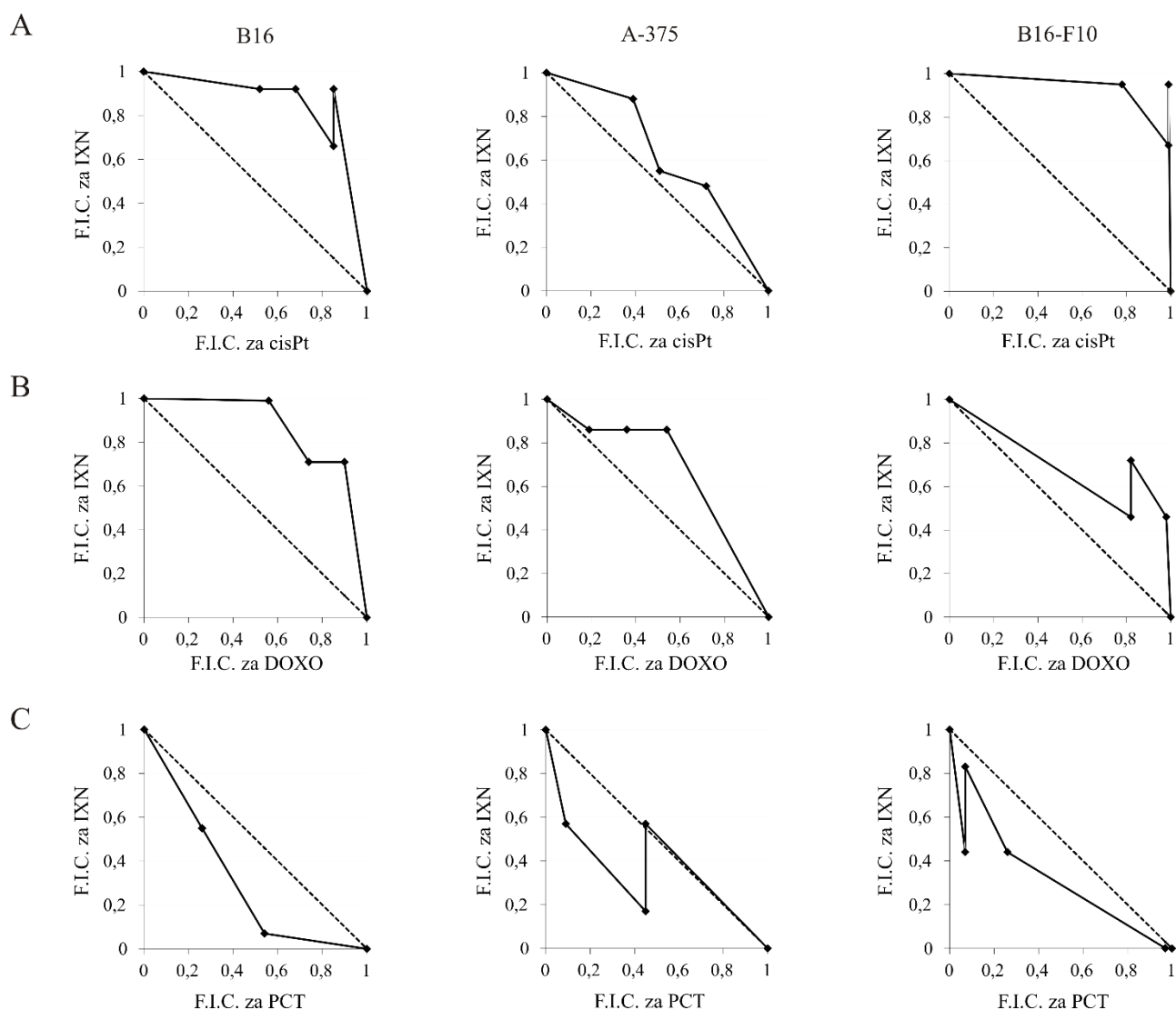
4.3. Indirektan uticaj IXN – interakcija sa hemioterapijom *in vitro* i *in vivo*

4.3.1. IXN interaguje sa hemioterapijom *in vitro*

Nakon detaljnog ispitivanja direktnog tumoricidnog efekta IXN na ćelije mišjeg i humanog melanoma, dalje istraživanje je fokusirano na izučavanje potencijalnih interakcija IXN sa hemioterapijom i njegove sposobnosti da senzitivizuje ćelije melanoma na konvencionalne hemioterapeutike *in vitro*.

U literaturi postoji obilje podataka o tome da su prenilflavonoidi sposobni da moduliraju metabolizam i efikasnost konvencionalnih terapeutika. Zbog toga je bilo od interesa istražiti potencijalni uticaj IXN na efikasnost komercijalnih hemioterapeutika koji su deo standardnih terapijskih protokola. U tu svrhu, ćelijske linije mišjeg (B16 i B16-F10) i humanog (A-375) melanoma su tretirane širokim rasponom subtoksičnih doza tri konvencionalna citostatika heterogenih mehanizama delovanja – cisplatinom, doksorubicinom i paklitakselom, posebno ili u kombinaciji sa IC₅₀ i dve niže doze IXN. Nakon perioda inkubacije u trajanju od 48 h, vijabilitet ćelija je određivan CV testom, a efekti kombinovanih tretmana su procenjivani izobologram analizom. Dobijeni rezultati u vidu konkavne izobologramske krive prilikom istovremene aplikacije IXN i cisPt odnosno DOXO su nedvosmisleno pokazali da je tretman IXN antagonizovao efikasnost pomenutih citostatika na sve tri ćelijske linije, što ukazuje na to da ovaj prenilflavonoid ublažava njihov efekat na ćelije melanoma (Slika 20A i B). S druge strane, kombinovani tretman IXN i PCT rezultirao je u konveksnom obliku izobologramske krive ukazujući na postojanje snažnog sinergizma između ova dva eksperimentalna agensa. Na taj način je testirani derivat hmelja uspeo da učini ćelije melanoma osetljivim na tretman subtoksičnim dozama pomenutog konvencionalnog hemioterapeutika, pri čemu je efekat senzitivizacije uočen na svim testiranim ćelijskim linijama melanoma (Slika 20C). Dodatno, izobologram konstruisan na osnovu paralelnog tretmana IXN i PCT na A-375 ćelijskoj liniji pokazivao je specifičnu sliku: pri paralelnoj upotrebi niskih doza pomenutih supstanci kao ishod se pojavljuje konveksna kriva koja sugerise sinergistički efekat i povećanje osetljivosti A-375 ćelija na PCT, dok se kao rezultat kombinacije visokih doza na izobologramu uočava aditivan efekat između ispitivanih agenasa.

Iz opisanih eksperimenata može se zaključiti da IXN poseduje izvanredan potencijal da neselektivno povećava osetljivost sve tri ćelijske linije melanoma na konvencionalnu terapiju paklitakselom *in vitro*, ali ne i cisplatinom i doksorubicinom.



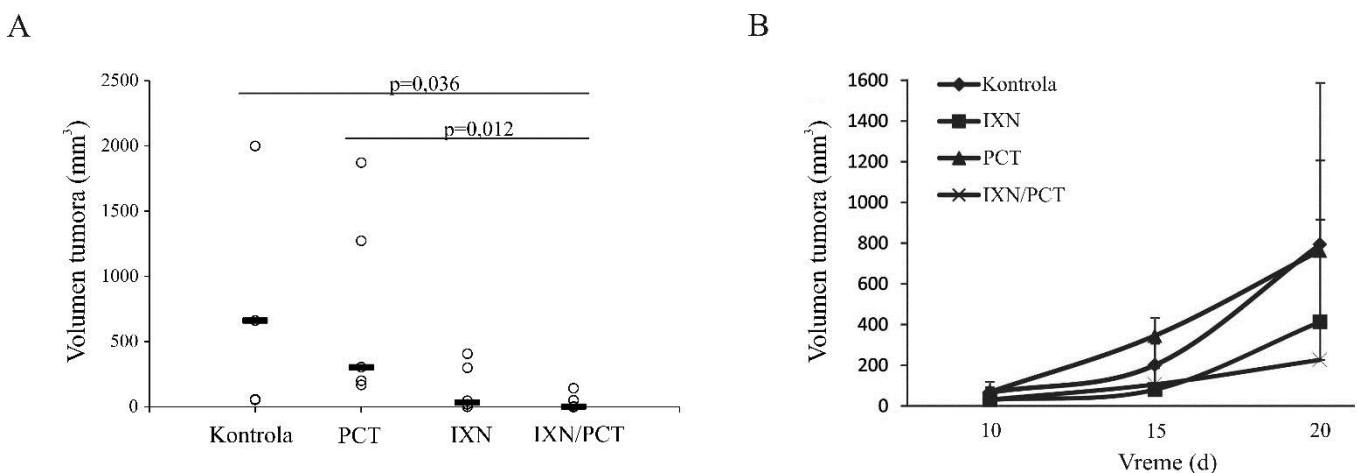
Slika 20. **IXN interaguje sa konvencionalnim hemioterapeuticima *in vitro*.** Efekat kombinovanog tretmana IXN sa A) cisPt, B) DOXO i C) PCT na ćelijskim linijama mišjeg (B16 i B16-F10) i humanog (A-375) melanoma nakon 48 h određen je analizom izoblograma i predstavljen izoblogramskim krivama. Prikazani su reprezentativni rezultati jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. F.I.C. = 1 se smatra aditivnim efektom; F.I.C. > 1 se smatra antagonizmom; F.I.C. < 1 se smatra sinergizmom.

4.3.2. IXN u kombinaciji sa PCT suprimira rast melanoma *in vivo* na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma

Nakon što je *in vitro* studijom dokazan snažan potencijal IXN u inhibiciji rasta melanoma kao i njegov kapacitet da senzitivizuje B16 ćelije melanoma na tretman PCT, sprovedena je *in vivo* studija o njegovom efektu na rast pomenutog tipa kancera i efikasnost hemioterapije PCT na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma. U tu svrhu, miševima soja C57BL/6 subkutano je ubrizgana suspenzija B16 ćelija. Deset dana po indukciji tumora, kada su isti postali palpabilni, otpočeto je sa intraperitonealnim davanjem tretmana, a eksperiment je okončan dvadesetog dana nakon inokulacije ćelija u životinje. Predstavljeni eksperimentalni dizajn omogućio je ispitivanje

terapeutskog efekta IXN primenjenog samog i u kombinaciji sa subtoksičnom dozom PCT. Učinak tretmana procenjivan je merenjem volumena tumora životinja. Kao što se vidi na Slici 21A, sam PCT primenjen u dozi koja je definisana kao subtoksična, kako se i očekivalo nije pokazao značajan uticaj na redukciju volumena tumora kod životinja koje su primale ovaj tretman. Sa druge strane, kod miševa koji su tretirani IXN ili kombinacijom IXN i PCT, rast tumora bio je vidno suprimiran. Naime, aplikacija IXN u koncentraciji od 20 mg/kg jeste smanjila zapreminu tumora kod C57BL/6 miševa ali bez statističke značajnosti ($p=0,055$ u poređenju sa kontrolom). Međutim, redukcija volumena tumora u grupi izloženoj kombinovanom tretmanu IXN i subterapeutske doze PCT dostigla je statističku značajnost i to u poređenju sa kontrolom ($p=0,036$) i sa grupom životinja tretiranom samim PCT ($p=0,012$). Ovakav podatak bez sumnje je u *in vivo* sistemu potvrdio prethodno dokazan snažan hemosenzitizujućí potencijal ispitivanog prenilflavonoida i postojanje sinergističkog efekta između IXN i PCT *in vitro*.

Takođe, tokom 20 dana, praćena je i upoređivana kinetika rasta tumora između grupa životinja. Merenjem veličina melanoma u taćno definisanim vremenskim intervalima nisu primećene razlike u rastu tumora između kontrolne i grupe tretirane PCT, dok su bile jasno vidljive između kontrolne i grupa koje su primale IXN pojedinaćno i u kotretmanu sa PCT (Slika 21B).



Slika 21. IXN samostalno i u kombinaciji sa PCT suprimira rast melanoma *in vivo* na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma. A) Volumeni tumora (mm³) izmereni su 20. dana nakon inokulacije B16 ćelija u C57BL/6 miševе i 10 dana od početka naznaćenih tretmana (6 životinja po grupi). Vrednost $p < 0,05$ je statistićki znaćajna. B) Kinetika rasta tumora u različito tretiranim grupama životinja praćena tokom 20 dana. Volumen tumora (mm³) meren je kaliperom u taćno definisanim vremenskim intervalima i predstavljen kao srednja vrednost (SV) velićine tumora po grupi od 6 životinja \pm SD.

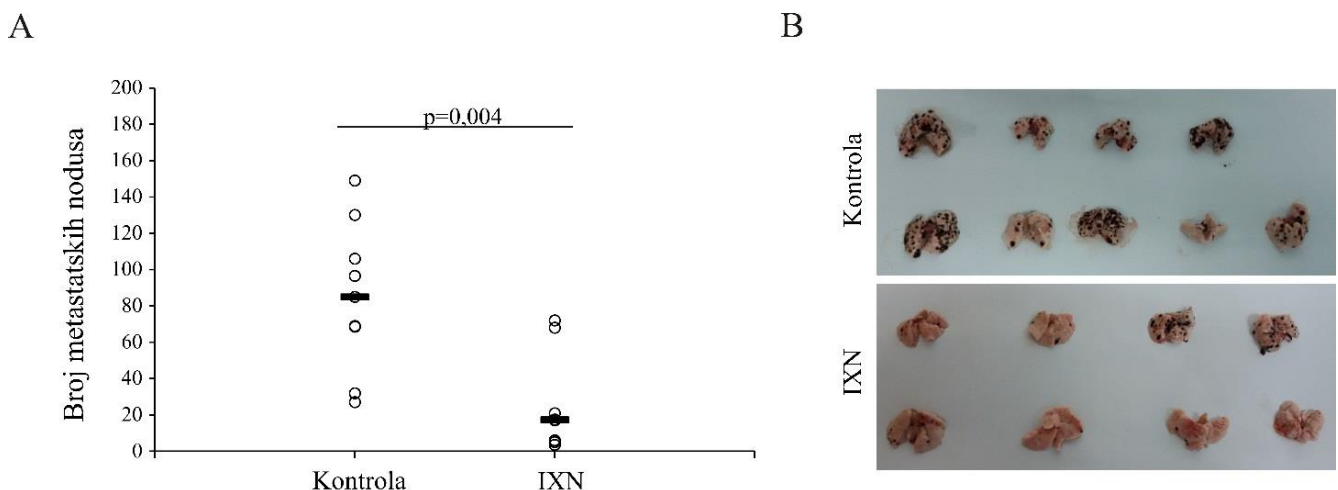
Sumarno, IXN poseduje sposobnost da samostalno inhibira rast solidnog melanoma ali i da statistićki znaćajno povećava efikasnost PCT *in vivo*.

S obzirom da je na početku studije pokazano da IXN ne ispoljava toksićan efekat na normalnim za razliku od tumorskih ćelija *in vitro*, od interesa je bilo proveriti da li ispitivano jedinjenje dovodi do akutne toksićnosti *in vivo*. U tu svrhu su formirane dve grupe životinja, kontrolna i ona u kojoj su miševi jednokratno tretirani visokom dozom IXN. Imajući u vidu da se kod nekih osoba IXN moće konvertovati u 8-PN u crevima, izostavljena je oralna primena i eksperimentalni agens je aplikovan intraperitonealno. Zbog rastvorljivosti i dozvoljene koncentracije DMSO, IXN je primenjen u jednoj dozi od 200 mg/kg. Dodatni razlog za odabir ove doze je bio taj što je ona bila ekvivalentna ukupnoj kolićini IXN koja je data životinjama u gore opisanom *in vivo* eksperimentu na solidnom modelu melanoma. Tokom narednih 14 dana posmatranja nisu primećeni vizuelni znaci toksićnosti

kod tretiranih životinja kao što su gubitak telesne težine, promene na koži ili u ponašanju, opadanje dlake i znaci gastrotoksičnosti (dijareja, povraćanje). Štaviše, stopa preživljavanja tokom ovog tretmana bila je 100%, što sve zajedno ukazuje na odsustvo akutnog toksičnog efekta IXN *in vivo*.

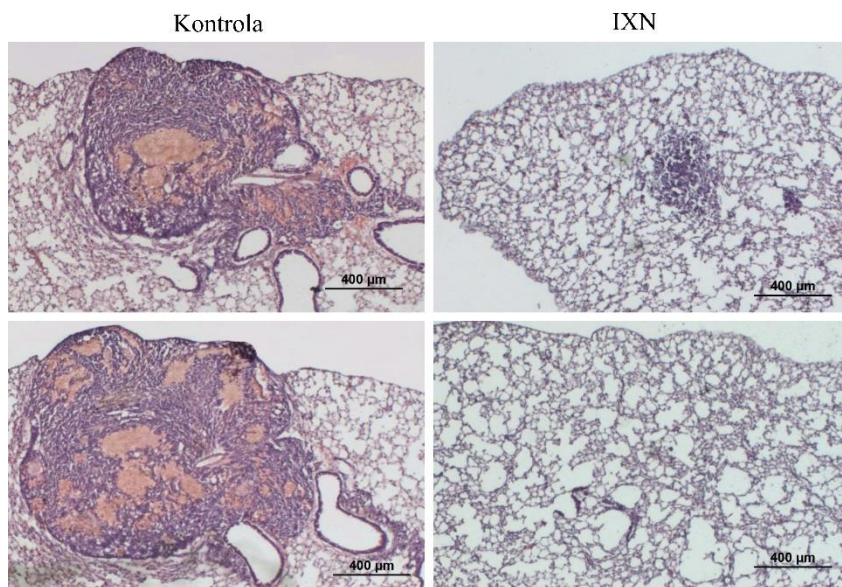
4.3.3. IXN suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma

Budući da je pokazano da IXN redukuje metastatski potencijal B16-F10 ćelija *in vitro* kao i da suprimira rast melanoma *in vivo* na solidnom modelu melanoma, od interesa je bilo ispitati antimetastatski potencijal eksperimentalnog agensa *in vivo*, na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma. Kako bi se ispitao uticaj IXN na razvoj metastaza *in vivo*, suspenzija B16-F10 ćelija je intravenski ubrizgana u repnu venu C57BL/6 miševa. Posledična kolonizacija pluća sa ciljem formiranja plućnih metastatskih nodusa trajala je 2 dana, nakon čega je započet dnevni tretman dozom 20 mg/kg IXN koji je primenjivan tokom 18 uzastopnih dana. Korišćena je doza koja se pokazala efikasnom u solidnom modelu melanoma. Trajanje tretmana bilo je definisano činjenicom da je izabrani period bio optimalan za razvoj metastaza nakon indukcije bolesti određenim brojem ćelija melanoma [238]. Dvadeset prvog dana od inokulacije ćelija, životinje su žrtvovane, a učinak tretmana je procenjivan brojanjem metastatskih čvorova na plućima. Kao što je prikazano na Slici 22A, broj metastatskih nodusa na plućima životinja izloženih eksperimentalnom jedinjenju duže od 2 nedelje bio je značajno manji u poređenju sa istim kod netretiranih životinja. Štaviše, srednja vrednost ukupnog broja metastaza na plućima svih kontrolnih životinja iznosila je 85, dok je u grupi životinja tretiranih IXN taj broj od 26 metastatskih čvorova bio čak tri puta manji. Ova razlika u broju metastaza na plućima kontrolnih i životinja tretiranih IXN jasno je ukazala na inhibiciju razvoja pulmonalnih metastaza od strane testiranog prenilflavonoida. Dodatno, fotografije pluća izolovanih iz miševa grupe koja je primala terapiju IXN jasno pokazuju da je u samo dve od osam životinja broj metastatskih žarišta bio je u opsegu vrednosti zabeleženih u kontrolnoj grupi. Pluća ostalih 6 životinja posedovala su znatno manji broj metastaza (Slika 22B). Osim toga, u kontrolnoj grupi su kod dve životinje pronađene metastaze na jetri, a kod jedne u peritoneumu.



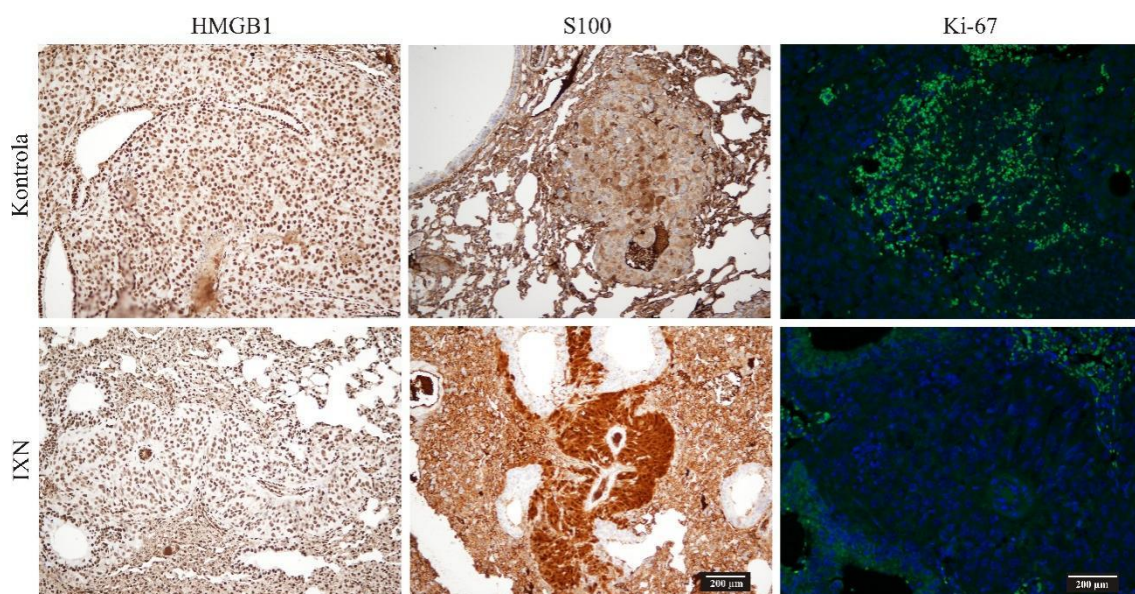
Slika 22. IXN suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma. A) Broj metastatskih nodusa na plućima određen je 21. dana nakon inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševima i 18 dana od početka tretmana IXN (8 životinja po grupi). Vrednost $p < 0,05$ je statistički značajna. B) Fotografije pluća sa metastazama izolovanih iz kontrolne i grupe životinja tretiranih IXN.

U cilju detaljnije analize uticaja IXN na formiranje metastaza *in vivo* i dobijanja uvida na nivou tkiva, kriopreseci izolovanih pluća sa metastatskim nodusima su analizirani svetlosnom mikroskopijom. Mikroskopska analiza obojenih histoloških preparata je pokazala da je prethodno uočena razlika u broju metastatskih čvorova bila praćena smanjenim prečnikom nodusa u grupi koja je tretirana IXN (Slika 23). Štaviše, u kontrolnoj grupi je detektovana bogata vaskularizacija metastatskih žarišta, dok kod životinja tretiranih eksperimentalnim terapeutikom ovaj fenomen nije primećen.



Slika 23. **IXN smanjuje broj i veličinu plućnih metastaza *in vivo***. Kriopreseci pluća izolovanih iz životinja 21. dana nakon inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševu i 18 dana od početka tretmana IXN, obojeni su H&E i evaluirani na nivou svetlosne mikroskopije (orig. uveličanje 5×, skala – 400 μm). Predstavljene su reprezentativne mikrofografije kriopreseka pluća izolovanih iz kontrolne i grupe životinja tretiranih IXN.

Dalje je, uz smanjen broj i prečnik metastatskih žarišta, ispitivano postojanje potencijalnih promena u ekspresiji specifičnih proteina koji odražavaju metastatske osobine. Metodom imunohistohemije na parafinskim presecima pluća sa metastazama izolovanih iz životinja analizirane su ekspresije HMGB1 i S100 proteina na nivou svetlosne mikroskopije, dok je u cilju detekcije ekspresije Ki-67 markera proliferacije korišćeno imunofluorescentno bojenje. Kao što se vidi na Slici 24, ekspresija HMGB1 proteina u nukleusima ćelija plućnih metastaza nakon tretmana životinja IXN bila je značajno umanjena u poređenju sa kontrolnim životinjama, što ukazuje na smanjeni maligni potencijal ovih ćelija. S druge strane, pojačana ekspresija proteina S100 zapažena u ćelijama plućnih metastaza koja je bila praćena njihovim sticanjem vretenastog oblika i niskom ekspresijom proliferativnog markera Ki-67, potvrdila je diferencijaciju metastatskih ćelija u smeru manje invazivnog fenotipa kao odgovor na tretman IXN (Slika 24).



Slika 24. **IXN utiče na fenotip metastatskih B16-F10 ćelija *in vivo*.** Ekspresija molekularnih markera u parafinskim presecima pluća izolovanih iz životinja 21. dana nakon inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševе i 18 dana od početka tretmana IXN, evaluirana je na nivou svetlosne mikroskopije (HMGB1 i S100) odnosno fluorescentne mikroskopije (Ki-67) (orig. uveličanje 200×, skala – 200 μm). Predstavljene su reprezentativne mikrografije parafinskih preseka pluća izolovanih iz kontrolne i grupe životinja tretiranih IXN.

Dakle, broj i veličina metastatskih čvorova u plućima životinja izloženih IXN bili su značajno smanjeni, što jasno ukazuje na to da IXN ostvaruje snažan antimetastatski potencijal *in vivo*. Takođe se može zaključiti da, pored efikasnosti u supresiji formiranja plućnih metastaza, testirano prirodno jedinjenje utiče i na fenotip metastatskih B16-F10 ćelija *in vivo*, dovodeći do njihove diferencijacije u smeru manje invazivne forme.

Paralelno je urađena i semikvantitativna analiza biohemijskih parametara u urinu životinja, da bi se utvrdilo da li testirano jedinjenje poseduje toksična svojstva. Urin kontrolnih i životinja tretiranih eksperimentalnim agensom je sakupljan nultog i 21. dana po inokulaciji tumorskih ćelija u životinje, a biohemijski parametri su određivani pomoću Multistix 10 SG test traka (Tabela 5). Analiza nultog dana inokulacije B16-F10 ćelija u miševе i na dan žrtvovanja ukazala je na povećano prisustvo proteina. Međutim, pošto je proteinurija fenomen koji je opšteprisutan kod zdravih miševa, ne može se smatrati pokazateljem toksičnosti [239]. Sa druge strane, na dan žrtvovanja kod životinja iz kontrolne grupe, ali ne i kod miševa tretiranih IXN, zabeleženo je prisustvo leukocita u tragovima, što može biti posledica inflamatornog procesa u urogenitalnom traktu usled razvoja bolesti, a do čega nije došlo u slučaju primene eksperimentalnog leka. Takođe, primećen je povećan nivo bilirubina u urinu kontrolnih životinja što može da ukaže na oštećenje funkcije jetre, dok je vrednost ovog, zajedno sa svim ostalim ispitivanim biohemijskim parametrima urina (glukoza, ketoni, specifična težina, eritrociti, pH, urobilinogen i nitriti) u tretiranoj grupi ostala nepromenjena u odnosu na vrednosti izmerene nultog dana indukcije bolesti.

S obzirom da su biohemijski parametri urina životinja tretiranih IXN bili u referentnom okviru i nepromenjeni nakon 21 dana od indukcije tumora, može se zaključiti da ispitivana supstanca nije toksična za eksperimentalne životinje. Takođe je važno napomenuti da nakon primene IXN nisu uočeni vizuelni znaci toksičnosti na osnovu indikatora kao što su opšta nelagodnost, oslabljeno kretanje, promenjeno ponašanje, gubitak dlake, promene telesne mase ili dijareja i povraćanje kao i da nije primećen mortalitet.

Tabela 5. Biohemijski parametri urina kontrolnih i životinja tretiranih IXN izmereni nultog i 21. dana od inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševе

	0.dan		21.dan	
	Obe grupe	Kontrola	IXN	
Glukoza (mmol/l)	/	/	/	
Bilirubin (μmol/l)	23,17 ± 14,37	70,00 ± 0,00	21,50 ± 9,00	
Ketoni (mmol/l)	4,0 ± 3,58	3,0 ± 3,8	/	
Specifična težina	1,028 ± 0,000	1,029 ± 0,003	1,030 ± 0,000	
Krv (~Ery/μl)	/	/	/	
pH	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,3	6,4 ± 0,5	
Proteini (g/l)	0,23 ± 0,08	0,26 ± 0,07	0,11 ± 0,14	
Urobilinogen (μmol/l)	/	/	/	
Nitriti	/	/	/	
Leukocitna esteraza (Leu/μl)	/	11,25 ± 7,50	/	

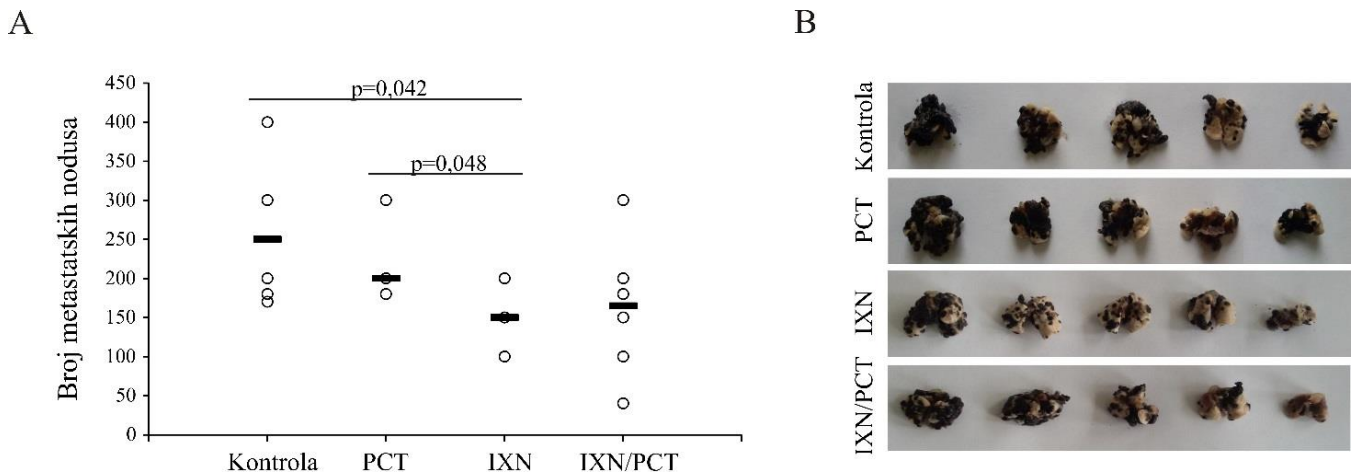
*Rezultati predstavljaju SV ± SD

4.3.4. IXN potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa kombinovanim tretmanom sa PCT na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma

Dosadašnje studije o interakcijama IXN sa konvencionalnim hemioterapeuticima ukazale su na izvanredan potencijal ovog derivata hmelja da senzitivizuje B16 ćelije na subtoksične doze PCT *in vitro* kao i *in vivo* na modelu mišjeg solidnog melanoma. Takođe je pokazano da testirani flavanon deluje neselektivno na ćelijske linije melanoma, povećavajući osetljivost B16-F10 metastatske linije na konvencionalnu terapiju paklitakselom *in vitro*. Imajući u vidu sve navedeno, bilo je zanimljivo ispitati reproducibilnost *in vitro* rezultata na B16-F10 ćelijama u *in vivo* sistemu na modelu mišjeg metastatskog melanoma i uporediti ih sa onima dobijenim na *in vivo* solidnom modelu melanoma.

Eksperimentalna postavka bila je ista kao i prilikom ispitivanja uticaja samostalno primenjenog IXN na razvoj plućnih metastaza, sa razlikom postojanja dodatnih grupa tretiranih samim PCT i kombinacijom IXN i subtoksične doze ovog hemioterapeutika. Eksperimentalni uslovi (doze, način aplikacije, režim tretiranja po danima) bili su identični onima na subkutanom *in vivo* modelu melanoma, sa razlikom u vremenu ukupnog trajanja tretmana koje je u ovom eksperimentu bilo 18 dana. Nakon 21 dana od intravenske inokulacije B16-F10 ćelija, miševi su žrtvovani, a pluća svih životinja hirurški izolovana. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 25A na kojoj je predstavljeno poređenje brojnosti metastatskih nodusa na plućima životinja svih grupa. Slično rezultatima na solidnom modelu melanoma, tretman subotoksičnim dozama PCT nije doveo do značajne supresije formiranja metastaza na plućima, u poređenju sa kontrolnom grupom. Dalje, uočeni inhibicioni efekat samog IXN na razvoj plućnih metastatskih žarišta potvrdio je rezultat prethodnog *in vivo* eksperimenta na metastatskom modelu melanoma. Međutim, nasuprot fenomenu uočenom na solidnom modelu melanoma, gde je kotretman IXN i PCT bio efikasniji od pojedinačnog tretmana IXN, na metastatskom modelu melanoma situacija je bila obrnuta. Naime, iako je kod obe grupe miševa, tretirane posebno IXN i u kombinaciji sa PCT, izmereni broj metastatskih nodusa na plućima bio manji u odnosu na kontrolnu grupu, statistička značajnost je ustanovljena samo u grupi životinja koje su primale sam IXN. Na fotografijama pluća životinja kontrolne grupe može se videti da su ona bila potpuno deformisana masivnim metastatskim

čvorovima, što se, doduše u manjoj meri, moglo uočiti i kod životinja tretiranih PCT. Za razliku od kontrole, na plućima životinja koje su primale IXN ili kombinovani tretman uočen je, ne samo manji broj, već i manji dijametar metastaza (Slika 25B).



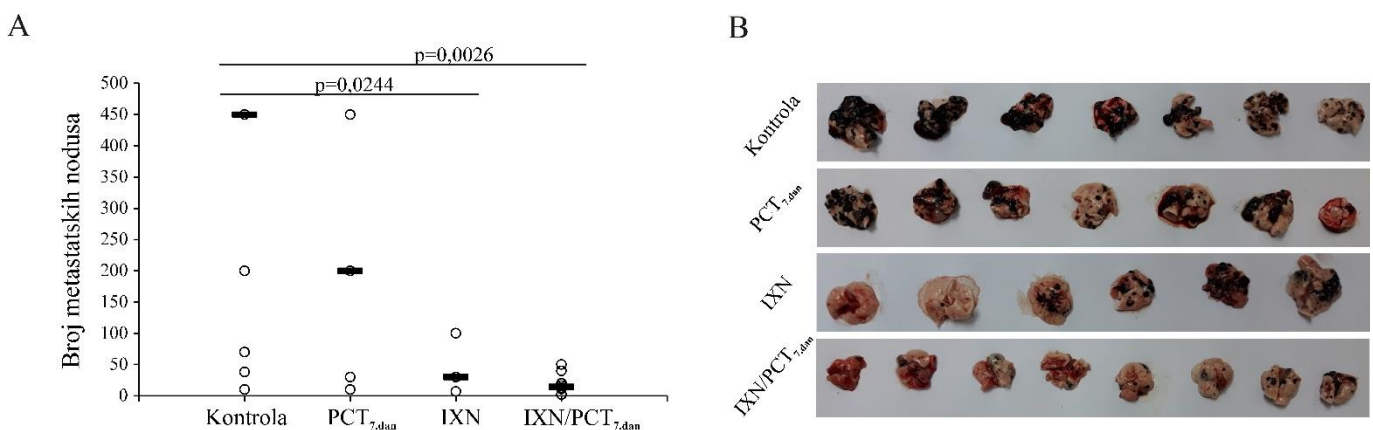
Slika 25. IXN potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa kombinovanim tretmanom sa PCT na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma. A) Broj metastatskih nodusa na plućima određen je 21. dana nakon inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševe i 18 dana od početka naznačenih tretmana (8 životinja po grupi). Vrednost $p < 0,05$ je statistički značajna. B) Fotografije pluća sa metastazama izolovanih iz naznačenih grupa životinja.

Poredeći rezultate dobijene na solidnom i metastatskom modelu melanoma *in vivo* može se zaključiti da je u metastatskom, za razliku od solidnog modela, samostalna terapija IXN poželjnija od kombinovanog tretmana IXN i PCT. Takođe, može se pretpostaviti da je razlika u ponašanju metastatskih ćelija u odnosu na njihove primarne pandane prepoznata kao odgovorna za različit odgovor na terapiju. Ovakav podatak bi mogao ići u prilog hipotezi da solidni i metastatski oblik istog tipa tumora zahtevaju različitu terapiju.

4.3.5. Pretretman IXN potencira delovanje PCT i suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo*

Prethodno je pokazano da IXN redukuje metastatski potencijal B16-F10 ćelija *in vitro*, što se ogledalo u njihovom smanjenom klonogenom potencijalu, adhezivnosti, migratornosti i invazivnosti, kao i da testirano prirodno jedinjenje utiče na fenotip ovih ćelija *in vivo* dovodeći do promena u ekspresiji određenih biomarkera. Iz toga je izveden zaključak da eksperimentalni prenilflavonoid dovodi do diferencijacije metastatskih, visoko invazivnih B16-F10 ćelija u smeru manje invazivnog fenotipa. To je navelo na razmišljanje da bi kombinovani tretman IXN i PCT mogao da bude značajno efikasniji ukoliko bi ćelije bile pretretirane IXN određeni vremenski period, a potom izložene PCT. U cilju ispitivanja ove hipoteze, dizajn *in vivo* eksperimenta se u odnosu na prethodni razlikovao samo u drugačijem vremenskom režimu primene dva agensa, dok su doze i načini aplikacije ostali nepromenjeni. Naime, celokupan tretman životinja koje su primale kombinovanu terapiju u ovom eksperimentu trajao je 18 dana, od čega je prvih 7 dana IXN aplikovan samostalno i svakodnevno, a potom je dodatno uključena subtoksična doza hemioterapeutika svaki drugi dan. Referentne grupe su tretirane ili IXN svakodnevno 18 dana ili PCT počev od 7. dana tretmana svaki drugi dan. Po završetku i.p. terapije, životinje su žrtvovane, pluća su izolovana, a učinak svakog tretmana ponaosob je procenjivan brojanjem metastatskih

čvorova na plućima. Rezultati predstavljeni na Slici 26A, ukazali su na očekivan izostanak efekta subterapeutske doze PCT primenjenog samostalno od 7. dana od početka tretmana na supresiju formiranja metastaza na plućima, u poređenju sa kontrolnom grupom. Sa druge strane, tretman samim IXN uspešno je doveo do statistički značajnog smanjenja broja plućnih metastatskih nodusa u tretiranim životinjama u odnosu na netretirane, čime je još jednom bez sumnje potvrđen njegov izuzetan inhibitory efekat na razvoj metastaza *in vivo*. Zanimljivo, razlika u odnosu na rezultate prethodnog *in vivo* eksperimenta na metastatskom modelu melanoma kada su IXN i PCT davani paralelno, ogledala se u postojanju znatno veće efikasnosti kombinovane terapije istim agensima davanim u drugačijem vremenskom režimu. Štaviše, ne samo da je kombinovani tretman doveo do statistički značajne supresije razvoja plućnih metastatskih žarišta u odnosu na kontrolu nego je, primenjen u ovom vremenski definisanom režimu, bio efikasniji i od pojedinačnog tretmana IXN. Pored toga, na Slici 26B jasno se može uočiti da je broj metastaza na plućima životinja tretiranih posebno IXN i u kotretmanu sa PCT znatno manji u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu su metastatski nodusi manjeg dijametra u grupi životinja tretiranih kombinacijom dva testirana terapeutika u odnosu na sve ostale grupe.



Slika 26. Pretretman IXN čini da kombinovani tretman IXN i PCT potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa samim IXN na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma. A) Broj metastatskih nodusa na plućima određen je 21. dana nakon inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševe i 18 dana od početka tretmana IXN (8 životinja po grupi). Vrednost $p < 0,05$ je statistički značajna. B) Fotografije pluća sa metastazama izolovanih iz naznačenih grupa životinja.

Urađena je i semikvantitativna analiza biohemijskih parametara urina životinja u uzorcima sakupljenim na početku, sredini i na kraju eksperimenta (Tabela 6). Kao i u prethodnim *in vivo* ogledima, kod životinja tretiranih samim IXN ili kombinovanim tretmanom sa PCT vrednosti ispitivanih biohemijskih parametara urina izmerene tokom eksperimenta nisu odstupale od referentnih niti su se razlikovale u odnosu na iste određene nultog dana indukcije bolesti. Stoga se može još jednom pouzdano zaključiti da ispitivana supstanca, aplikovana u samostalnoj formi ili u kombinaciji sa PCT, nije toksična za eksperimentalne životinje.

Tabela 6. Biohemijski parametri urina kontrolnih i tretiranih životinja izmereni nultog, 9-og i 18-og dana od inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševe

Inokulacija dan	Tretman dan	Grupa	Glukoza mmol/l	Bilirubin μ mol/l	Ketoni mmol/l	Specifična težina	Krv \sim Ery/ μ l	pH	Proteini g/l	Urobilinogen μ mol/l	Nitriti	Leukocitna Esteraza Leu/ μ l
0. dan	0. dan	Sve	2,50 \pm 2,61	53,92 \pm 20,46	1,21 \pm 1,01	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,1	0,20 \pm 0,10	/	/	/
9. dan	8. dan	Kontrola	1,00 \pm 2,24	70,00 \pm 0,00	1,10 \pm 0,55	1,030 \pm 0,000	/	6,3 \pm 0,3	0,15 \pm 0,00	/	/	/
		PCT _{7dan}	3,00 \pm 2,74	63,00 \pm 15,65	1,10 \pm 0,55	1,029 \pm 0,002	/	6,0 \pm 0,0	0,18 \pm 0,07	/	/	/
		IXN	/	70,00 \pm 0,00	1,25 \pm 0,50	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,0	0,15 \pm 0,00	/	/	/
		IXN/PCT _{7dan}	2,50 \pm 2,89	70,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,58	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,0	0,15 \pm 0,00	/	/	/
18. dan	17. dan	Kontrola	1,25 \pm 2,50	70,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,58	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,0	0,11 \pm 0,08	/	/	/
		PCT _{7dan}	1,00 \pm 2,24	56,00 \pm 19,17	1,10 \pm 0,55	1,026 \pm 0,005	/	6,0 \pm 0,0	0,18 \pm 0,07	/	/	/
		IXN	2,50 \pm 2,89	61,25 \pm 17,50	2,50 \pm 1,78	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,0	0,23 \pm 0,09	/	/	/
		IXN/PCT _{7dan}	6,25 \pm 6,29	70,00 \pm 0,00	1,88 \pm 1,49	1,030 \pm 0,000	/	6,0 \pm 0,3	0,19 \pm 0,07	/	/	/

*Rezultati predstavljaju SV \pm SD

Kao zaključak može se bez sumnje reći da je postavljena hipoteza opravdana i da je, u skladu sa dobijenim podacima *in vitro*, u *in vivo* eksperimentalnoj postavci uočen jasan potencijal IXN da dovede do diferencijacije B16-F10 ćelija. Na taj način je pretretman IXN učinio subterapeutsku dozu PCT visoko efikasnom i omogućio da kombinovani tretman potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa samim IXN na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma.

5. Diskusija

Maligni melanom predstavlja najagresivniji tip kancera kože čija pojava korelira sa vrlo lošom prognozom. Usled inicijalne ili stečene rezistencije i brojnih neželjenih dejstava, terapijske mogućnosti za metastatski melanom su prilično ograničene. Novi vidovi lečenja primenjivani u poslednjoj deceniji, doveli su do rasta medijane preživljavanja pacijenata sa metastazama melanoma na 20 – 30 meseci, što je najbolja ilustracija kriterijuma koji se smatraju prihvatljivim kada se procenjuje uspešnost terapijskih protokola [63]. Sumirajući sve navedeno, nijedan pristup u terapiji melanoma do sada nije suštinski dao zadovoljavajuće rezultate. Imajući u vidu da je ovaj tip kancera kože udružen sa visokom stopom smrtnosti, otkriće novih agenasa sa potencijalom da zaustave rast melanoma kao i inovativnih pristupa u kreiranju terapijskih protokola, sve je atraktivnije polje istraživanja.

Prirodni proizvodi poreklom iz biljaka predstavljaju bogat izvor jedinjenja sa antitumorskim potencijalom [81,82]. Takođe, prirodne komponente se od davnina koriste u kombinaciji sa raznim vidovima konvencionalne terapije u cilju smanjenja neželjenih efekata povezanih sa terapijom, ublažavanja simptoma uzrokovanih primarnom bolešću ili direktnog potenciranja antitumorskih efekata lekova, a sve u cilju podizanja kvaliteta života pacijenata [76]. U protekle dve decenije, ispitivana su svojstva oko stotinu različitih flavonoida u potencijalnoj terapiji melanoma, primenom različitih *in vitro* ili *in vivo* modela. Poslednjih godina brojne naučne publikacije podržavaju povoljne antikancerske osobine prenilflavonoida [92,142]. Najviše proučavan među njima je XN. Kako je ovo jedinjenje elektrofil i podleže ciklizaciji u gastrointestinalnom traktu gde se u velikoj meri pretvara u IXN [119], pažnja se sve više usmerava na antitumorska svojstva drugopomenutog jedinjenja. Sa druge strane, 8-PN, demetilovani derivat IXN, ne nastaje abiotskom transformacijom već je njegova konverzija iz IXN zavisna od mikrobioma osobe. Shodno tome, IXN je nutritivno najvažniji biljni fenol ove grupe jedinjenja [143,158].

Obilje podataka u literaturi o antitumorskom svojstvu IXN ukazalo je na potencijalni značaj ovog prenilflavonoida u lečenju melanoma. U studiji obuhvaćenoj ovom doktorskom disertacijom pokazan je značajan efekat IXN u suzbijanju rasta melanoma *in vitro* na paleti ćelijskih linija različitih karakteristika, porekla i stepena invazivnosti, nakon čega su isti potvrđeni u solidnom i metastatskom modelu pomenute bolesti *in vivo*. Takođe, važan aspekt istraživanja odnosio se na ispitivanje mogućnosti kombinovanja ovog prirodnog proizvoda sa komercijalnim hemioterapeuticima koji su deo standardne terapije, sa akcentom na definisanje interakcija i kreiranje protokola koji bi podigli efikasnost postojećih tretmana.

Ispitivanje antitumorskog potencijala IXN i njegovo poređenje sa parentalnim jedinjenjem XN i derivatom 8-PN vršeno je na ćelijskim linijama mišjeg (B16 i B16-F10) i humanog (A-375) melanoma. Kolorimetrijski testovi citotoksičnosti ukazali su na snažan potencijal svih testiranih prenilflavonoida u suzbijanju rasta ćelijskih linija melanoma *in vitro*. Naime, izlaganje ćelija IXN izazvalo je dozno-zavisno pad vijabiliteta testiranih ćelija, sa IC_{50} vrednostima u mikromolarnom opsegu, što je bilo u skladu sa prethodno opisanim antikancerskim dejstvom ispitivanog jedinjenja na brojnim tumorskim ćelijskim linijama [142,159,165,166,168–170,182,183]. Manja osetljivost B16-F10 ćelijske linije u odnosu na druge dve linije melanoma može se objasniti upravo karakteristikama same linije koja je izolovana iz metastatskog klona i poseduje izrazit proliferativni potencijal. S druge strane, tretman IXN, čak i u izuzetno visokim dozama, nije narušio vijabilitet primarnih makrofaga izolovanih iz peritoneuma miša, ukazujući na izraženu selektivnost za maligni fenotip. Ovaj podatak bio je u saglasnosti sa brojnim *in vitro* studijama gde je potvrđeno odsustvo toksičnog efekta testiranog prenilflavonoida na netumorske ćelije, kao što su primarni hepatociti pacova, epitelne ćelije creva pacova, embrionski fibroblasti miša, humane epitelne ćelije pupčane vene, humani fetalni hepatociti i humane epitelne ćelije želuca [163,164,167].

Indukcija apoptoze se nalazi u osnovi antitumorske aktivnosti mnogih prirodnih jedinjenja [159,161,166,170,173,193,194,240,241]. Tako je, na primer, IXN ispoljio direktan citocidni efekat na ćelijama kancera kolona (Ca-Co [166] i SW620 [161]) i kancera dojke (Sk-Br-3) [159]. U

skladu sa tim, analizom ekspresije molekula koji se smatraju medijatorima procesa apoptoze, isti je potvrđen i na unutraćelijskom nivou u sve tri testirane linije melanoma nakon tretmana eksperimentalnom supstancom. Iako su u većini *in vitro* studija XN i IXN indukovali apoptozu posredovanu kaspazama [142,161,242], tretman B16 i A-375 ćelija melanoma IXN nije bio praćen povećanom aktivnošću ovih enzima. Premda kaspaze predstavljaju važne medijatore apoptoze, poznato je da se ovaj tip ćelijske smrti može odigrati i bez njihovog učešća [232]. Slično tome, u PC3 i DU145 ćelijama kancera prostate opisana je smrt ćelija nezavisna od aktivacije kaspaza, ali je po svim karakteristikama odgovarala programiranoj ćelijskoj smrti tipa II tj. ćelijskoj smrti autofagijom [168]. Suprotno ovome, autofagija detektovana u B16 i A-375 ćelijama nakon tretmana eksperimentalnim agensom IXN, okarakterisana je kao citoprotektivna. Imajući u vidu da je u ovoj studiji takođe pokazano da je tretman ćelija humanog melanoma IXN rezultirao smanjenom stopom produkcije unutraćelijskog NO, osetljivost A-375 ćelija na indukciju apoptoze može se pripisati upravo smanjenom nivou ovog molekula, s obzirom da je NO endogeni faktor rasta navedene ćelijske linije [243]. Saglasno tome, brojni radovi su pokazali da deplecija endogeno proizvedenog azot-monoksida inhibira proliferaciju melanoma i promoviše apoptozu [243–245].

Dok je u osnovi citocidnog dejstva IXN na B16 i A-375 ćelije bila programirana ćelijska smrt tipa I nezavisna od aktivacije kaspaza, a autofagija je bila isključivo citoprotektivnog karaktera, na visoko invazivnoj B16-F10 ćelijskoj liniji tretman IXN rezultirao je kombinovanom indukcijom programirane ćelijske smrti tipa I i II – apoptozom i autofagijom. Efekat indukcije apoptoze na ovoj visoko metastatskoj liniji bio je skoro ekvivalentan onom izraženom na A-375 ćelijskoj liniji, a veći u odnosu na B16 ćelije, što se moglo i očekivati s obzirom da se radi o dvema invazivnim linijama melanoma. Nedavno je u jednoj studiji pokazano da IXN dovodi do povećanja kaspazne aktivnosti u SW620 ćelijama kancera kolona indukujući apoptozu [161]. Saglasno tome, pojačana aktivnost egzekutorskih proteaza otkrivena je u B16-F10 ćelijama nakon 48-časovne inkubacije sa IXN. Ipak, ovaj rezultat bio je u suprotnosti sa prethodno detektovanom apoptozom neposredovanom kaspazama u njegovom nemetastatskom pandanu, B16 ćelijama. Stoga bi intenzivirana aktivnost pomenutih proteaza u B16-F10 ćelijskoj liniji melanoma mogla biti posledica drugačije uloge ove porodice enzima u procesima povezanim sa kancerom. Naime, dobro je poznato da kaspaze nisu važne samo za izvršavanje procesa apoptoze, a sve veći broj dokaza ukazuje na višestruke funkcije ovih enzima izvan okvira apoptotskog programa. Tako kaspaze imaju značajnu ulogu i posreduju u drugim brojnim procesima kao što su inflamacija, piroptoza, nekroptoza, diferencijacija tkiva, regeneracija, transformacija fenotipa, unutraćelijska komunikacija kao i međusobna interakcija apoptoze i autofagije [232,246]. Osim toga, čini se da tretman IXN dovodi do destruktivne autofagije u B16-F10 ćelijama, dok je kod manje invazivnog fenotipa, B16 ćelija, primećeno suprotno ponašanje gde je, kako je već pomenuto, autofagija izazvana delovanjem eksperimentalnog prenilflavonoida bila isključivo citoprotektivnog karaktera. Osnovu različitog odgovora ćelija manje i više invazivne forme istog tipa kancera na tretman IXN možemo tražiti u različitim unutarćelijskim karakteristikama svake ćelijske linije ponaosob. Autori jednog istraživanja su utvrdili da je vreme udvostručavanja B16-F10 subklona bilo kraće od onog kod njegovog manje agresivnog pandana, i da su subklonovi B16 ćelija, B164A5, B16GMCSF, B16FLT3 i B16-F10 imali različite unutarćelijske karakteristike kao i odgovore na iste stimulse [202]. Stoga nije iznenađujuće što B16-F10 ćelije, u odnosu na B16, imaju drugačiji odgovor na isti stimulus.

Pored apoptotskog procesa, snažna inhibicija proliferacije zapažena je u kulturama sve tri ćelijske linije melanoma nakon tretmana IXN. Dobijeni rezultati bili su u skladu sa brojnim ispitivanjima opisanim u literaturi. Naime, IXN je ostvario antiproliferativni efekat na ćelijske linije koje vode poreklo od različitih tipova kancera, npr. kolona, prostate, jajnika, sarkoma materice, dojke, pluća, glioblastoma, leukemije kao i na neke forme rezistentne na terapiju [142,143,159–169]. Shodno tome, u ovoj studiji je pokazano da IXN značajno smanjuje stopu deobe B16 i A-375 ćelija, pri čemu je ostvareni citostatski efekat eksperimentalnog agensa bio naročito izražen na visoko

invazivnoj amelanotičnoj ćelijskoj liniji humanog melanoma. Dalje je, ispitivanjem postojanosti efekta IXN i nezavisnosti istog od stalnog prisustva supstance, otkriveno da supresija rasta ćelija nije bila narušena njegovim uklanjanjem iz kulture nakon 48 h tretmana. Ovaj podatak, zajedno sa uočenim gubitkom proliferativnog potencijala, je od posebnog značaja jer je sugerisao da testirana supstanca poseduje potencijal da podstakne promene permanentnog karaktera na unutarćelijskom nivou kod obe ćelijske linije melanoma. Ovakve izmene bi mogle dovesti do gubitka njihovih malignih svojstava i fenotipske alteracije. Saglasno sa time, mišje i humane ćelije melanoma tretirane IXN su na nivou svetlosne mikroskopije pokazale izmenjenu morfologiju. Rezultat da ćelije melanoma, nakon jednokratnog tretmana IXN trajno gube proliferativnu sposobnost i trpe evidentne promene morfologije, ukazao je na mogućnost da ovaj prenilflavonoid ima sposobnost da indukuje diferencijaciju tumorskih ćelija. Zaista, izražena morfološka transformacija bila je u korelaciji sa ispitivanim biohemijskim markerima diferencijacije. Tako je aktivnost enzima tirozinaze bila udvostručena u B16 ćelijama nakon tretmana IXN, ukazujući na pojačan proces melanogeneze. Međutim, ovde prikazan rezultat dobijen na ćelijama mišjeg melanoma je suprotan prethodno opisanom efektu XN na melanogenezu u istoj ćelijskoj liniji. Naime, autori su naveli da je primarni derivat hmelja inhibirao proces melanogeneze, redukujući aktivnost tirozinaze i smanjujući sadržaj pigmenta melanina u B16 ćelijama [247]. Iznenadujuće je, pak, da u našoj studiji, pojačana aktivnost tirozinaze uočena nakon izlaganja ćelija IXN nije bila praćena očekivanim povećanjem količine pigmenta melanina, čak ni u kasnijim vremenskim tačkama (72 h, podaci nisu prikazani). Diskrepanca između ova dva povezana parametra mogla bi se objasniti činjenicom da se IXN ponaša kao „sakupljač“ slobodnih radikala i interferira sa redoks statusom ćelije, što je veoma važno za sintezu melanina. Naime, dokumentovano je da ROS predstavljaju potentne unutraćelijske medijatore procesa melanogeneze i imaju značajnu ulogu u regulaciji sinteze ovog pigmenta [248–253]. S tim u vezi, supstance sa antioksidativnim osobinama koje deluju kao „sakupljači“ slobodnih radikala mogu negativno uticati na proces melanogeneze u normalnim humanim melanocitima ali i pigmentnim ćelijama melanoma, blokirajući sintezu melanina [253,254]. Takođe, stimulacija endogenih antioksidanata, poput metalotioneina, blokirala je melanogenezu u humanim melanocitima [252]. Uz to, primena antioksidanata, naročito biljnih proizvoda iz grupe karotenoida i flavonoida, štiti ljudsku kožu od štetnih efekata ultraljubičastog zračenja [255,256]. Iz podataka dobijenih u ovoj studiji, očigledno je da je IXN, pored potenciranja aktivnosti enzima tirozinaze u B16 ćelijama, blokirao nizvodnu kaskadu u sintezi melanina, verovatno kroz svoju aktivnost uklanjanja ROS. Zaista, više puta je pokazano da prenilflavonoidi, poput većine polifenola, poseduju antioksidativna svojstva [142]. Saglasno sa time, sposobnost IXN da deluje kao potentan „sakupljač“ slobodnih radikala potvrđena je mnogobrojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima [108,143,162,184–186]. Rezultati prikazani u ovoj studiji sugerišu da taj potencijal može doprineti njegovom antitumorskom delovanju na B16 ćelije. Iz svega navedenog je bilo razumno izvesti zaključak da tretman IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija ka njihovom izvornom fenotipu – melanocitima.

S druge strane, morfološka transformacija sinhronizovana sa smanjenim proliferativnim kapacitetom visoko invazivnih amelanotičnih A-375 ćelija bila je praćena smanjenjem ekspresije „stem“ markera nakon tretmana IXN, ukazujući na gubitak niskodiferentovanog fenotipa i pluripotentnih osobina ovih ćelija. Naime, opažena promenjena morfologija humanih A-375 ćelija nije bila povezana sa njihovim sazrevanjem u smeru melanocita, s obzirom da je ova ćelijska linija poznata kao amelanotična. Nizak nivo diferencijacije ovih ćelija povezan je sa njihovom invazivnošću i „stem“ fenotipom. Podaci iz literature pokazuju da se ove humane ćelije melanoma odlikuju visokom ekspresijom površinskih markera, kao što je CD44, koji su inače karakteristični za matične ćelije kancera, a aktivno učestvuju u procesima migracije, invazije i metastaziranja [234,257–259]. U ovom istraživanju, inkubacija sa IXN u trajanju od 48 h dovela je do inhibicije poznatih markera niskodiferentovanog fenotipa. Tako je aktivnost β -katenina, Notch 1 i Oct-3/4 proteina, ključnih aktera Wnt/ β -katenin, Notch i OCT signalnih puteva, bila kontinuirano suprimirana tretmanom IXN. Diferencijacija, preživljavanje i migracija melanocita iz prekursora

neuralne kreste u velikoj meri se oslanjaju na kanonski Wnt signalni put, preko β -katenina [260,261]. Ovaj signalni put, koji je važan tokom embrionalnog razvića melanocita, često je izmenjen i može se reaktivirati nakon transformacije melanocita u ćelije melanoma [230,262]. U literaturi se navodi da je metastatski profil melanoma povezan sa pozitivno regulisanim Wnt signalnim putem. Akumulacija β -katenina u nukleusu i/ili citoplazmi ćelija, kao ključni pokazatelj pojačane Wnt signalne aktivnosti, primećena je u više od 30% malignih melanoma. Ovaj protein je dokazano esencijalni faktor preživljavanja metastatskih ćelija melanoma, dok nije neophodan za opstanak benignih i primarnih, neinvazivnih ćelija melanoma. Pored toga što utiče na proces metastaziranja, nivo β -katenina kontroliše i diferencijaciju tumora [174,175,262,263]. Takođe, Notch 1 signalni put je aktiviran u humanom melanomu. Naime, povećani nivo Notch 1 proteina otkriven je u lezijama kao i u ćelijskim linijama humanog melanoma, gde je aktivacija Notch 1 signalizacije omogućila ćelijama da steknu metastatske sposobnosti. Pretpostavlja se da ovaj protein ne utiče na lokalnu invaziju i intravazaciju već je važan za ekstravazaciju i rast melanoma na udaljenim mestima, te je aktivacija pomenute kaskade neophodna za progresiju ovog najagresivnijeg tipa kancera kože. Dodatno, onkogeni efekat Notch 1 na primarne ćelije melanoma posredovan je β -kateninom, koji je pozitivno regulisan nakon aktivacije Notch 1 signalnog molekula [177,264]. Dalje, prekomerna ekspresija Oct-3/4 gena povezana je sa lošom prognozom i metastatskim formama nekih kancera. Štaviše, pozitivna regulacija ovog embrionalnog transkripcionog faktora u ćelijama melanoma korelira sa njihovim invazivnim fenotipom kao i pojačanim kapacitetom pokretljivosti i ekstravazacije. Tako je prekomerna ekspresija Oct-3/4 proteina kao markera pluripotentne populacije „stem“ ćelija odgovorna za povećani migracioni i invazivni potencijal A-375 ćelija [176]. Imajući u vidu sve pomenute regulatorne zavisnosti, opšta supresija navedenih signalnih puteva od strane IXN implicirala je da ovaj flavanon može da utiče na niskodiferentovane ćelije i procese povezane sa invazijom tumora, i da dovede do smanjenja metastatskog potencijala A-375 humanih ćelija melanoma. Stoga bi pomenuti derivat piva mogao biti sposoban da ograniči progresiju anaplastičnih melanoma, što je od posebnog značaja jer se radi o tumorima visokog gradusa koji su praktično neizlečivi. Dodatno, u literaturi je opisano da IXN inhibira Notch 1 signalizaciju i indukuje apoptozu kod uznapredovalog hepatocelularnog karcinoma, kancera pankreasa i jajnika [171–173]. Navedeni podaci ukazuju na opštu karakteristiku prenilflavonoida da napadaju invazivne kancere. U ovoj studiji je takođe pokazano da je tretman ćelija humanog melanoma IXN rezultirao smanjenom stopom produkcije unutarćelijskog NO, što je sugerisalo da ovaj mehanizam može doprineti antitumorskom delovanju eksperimentalnog agensa. Ekspresija enzima iNOS smatra se lošim prognostičkim faktorom, a NO kritičnim posrednikom agresivnog fenotipa u humanim metastatskim melanomima. Upravo bi negativna regulacija esencijalnih signalnih puteva odgovornih za niskodiferentovani fenotip A-375 ćelija mogla biti povezana sa detektovanom smanjenom produkcijom endogenog azot-monoksida [243–245].

Opisani mehanizmi dejstva pomenutog prenilflavonoida u mišjim B16 i humanim A-375 ćelijama melanoma potvrđeni su i na molekularnom nivou. Međutim, uočeno je da IXN različito utiče na ključne signalne molekule PI3K/Akt i MAPK puteva uključenih u regulaciju ćelijske smrti, proliferacije i diferencijacije u ispitivanim ćelijskim linijama melanoma. Osnovne razlike između B16 i A-375 ćelija u aktivnosti signalnih puteva definisale su i njihov raznolik odgovor na tretman IXN. Premda navedene ćelije pripadaju istom tipu tumorskih ćelija, molekularna osnova regulacije unutarćelijskih procesa je različita. Dok je MEK/ERK signalni put prekomerno eksprimiran u A-375 ćelijskoj liniji [236], signalni molekuli istog puta su mnogo slabije eksprimirani u B16 ćelijama. Dodatna razlika jeste prisustvo funkcionalnog PTEN (engl. *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*) proteina kod ćelija mišjeg, odnosno njegovo odsustvo kod ćelija humanog melanoma [265]. Shodno navedenom, odgovor ovih ćelijskih linija na isti tretman je često različit na unutarćelijskom nivou. Analiza intracelularnog odgovora ćelija melanoma na tretman IXN otkrila je da je u B16 ćelijama ostvarena prolazna inhibicija Akt i ERK1/2. Iz literature je poznato da je prekomerna aktivacija Akt signalnog molekula povezana sa intenzivnom

proliferacijom tumora [266], te je rezultat dobijen na B16 ćelijama u skladu sa pokazanom inhibicijom deobe ovih ćelija, indukovanom IXN. Dodatno, Busca i saradnici su pokazali da je inhibicija fosforilacije Akt, ključnog efektor PI3K i p70S6 kinaze, uključena u regulaciju diferencijacije B16 ćelija. Koristeći specifične inhibitore ovih signalnih molekula stimulirana je ekspresija tirozinaze i sticanje dendritične morfologije ćelija melanoma [267], što je usaglašeno sa ovde pokazanim potencijalom IXN da indukuje diferencijaciju mišjih tumorskih ćelija. Sa druge strane, u A-375 ćelijama uočena je recipročna regulacija navedenih proteina pod delovanjem eksperimentalnog agensa. Dok je Akt bio kontinuirano aktiviran, ERK1/2 je bio inhibiran. Ovaj fenomen je, kod navedene humane ćelijske linije melanoma, već opisan u literaturi [268,269]. Kako je aktivirani Akt okarakterisan kao molekul koji inhibira apoptozu [270], pozitivna regulacija njegove ekspresije uslovljena IXN kod A-375 ćelijske linije bi mogla predstavljati pokušaj ćelije da se spase. Međutim, postoje podaci koji opisuju povećanje aktivnosti Akt kod ćelijskih linija koje podležu apoptozi, što još jednom potvrđuje dualnu prirodu svih signalnih molekula i značaj konteksta u kome deluju [268,271,272]. Dalje, autori jedne studije navode da je apoptoza kod A-375 ćelijske linije humanog melanoma bila uslovljena inaktivacijom ERK1/2 molekula [273]. Takođe, imajući u vidu da se kod humanog melanoma prekomerna aktivnost ERK1/2 dovodi u vezu sa proliferacijom, preživljavanjem ćelija i rastom tumora [236], pad aktivnosti ERK1/2 indukovan IXN mogao bi biti uzrok ili posledica započete apoptoze i/ili inhibicije ćelijske deobe, što je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima ove studije. Međutim, uprkos razlikama u uzvodnim delovima navedenih signalnih puteva kod dve ćelijske linije melanoma, molekuli uključeni u nizvodne događaje bili su na sličan način pogođeni istim tretmanom. Aktivnost p70S6 kinaze i njenog ciljnog proteina, S6, bila je inhibirana nakon početne, vremenski ograničene pozitivne regulacije. Različitost u ekspresiji proteina u gornjem delu PI3K/Akt i MAPK signalnih puteva s jedne strane, i sinhronizovani odgovor njihovih nizvodnih aktera s druge strane, podvlači složenost i unakrsno povezivanje unutarćelijske signalizacije ciljane eksperimentalnim terapeutikom IXN. Sposobnosti prenilflavonoida da indukuju apoptozu i inhibiraju proliferaciju tako što smanjuju ekspresiju Akt i ERK1/2 u različitim tumorskim ćelijama već su opisani u literaturi [195,196,240,274]. Štaviše, uloga ovih proteina u regulaciji diferencijacije kao i ćelijske smrti bila je predmet brojnih studija [269,275]. Već je pokazano da unutrašnje karakteristike ćelija melanoma kao što su ekspresija iNOS, redoks status i aktivnost signalnih puteva uključenih u proliferaciju, diferencijaciju i ćelijsku smrt definišu odgovor ćelija na različite tretmane. Različita regulacija Akt i ERK1/2 signalnih molekula u B16 i A-375 ćelijama tretiranim aloe emodinom korelirala je sa različitim ishodom tretmana, a sve usled unutarćelijskih razlika među ćelijskim linijama istog tipa kancera [269]. Pored toga, pozitivna regulacija p38 MAPK detektovana tokom tretmana IXN u obe ćelijske linije melanoma opisana u ovoj studiji, može se dovesti u vezu sa uočenom diferencijacijom ćelija melanoma, što je u saglasnosti sa rezultatima drugog istraživanja [276]. S druge strane, p70S6 kinaza, a posredno i njen supstrat S6 ribozomalni protein, regulišu sintezu proteina, reorganizaciju citoskeleta, preživljavanje ćelija i proliferaciju [277–279] pa se promena njihove aktivnosti usled dejstva IXN može odraziti na sve navedene aspekte.

U skladu sa rezultatima dobijenim na B16 i A-375 ćelijama, na ćelijskoj liniji visoko invazivnog, metastatskog mišjeg melanoma je nakon 48-časovnog delovanja IXN otkrivena snažna inhibicija ćelijske proliferacije koja je bila praćena promenama u njihovoj pokretljivosti. Obeležavanje B16-F10 ćelija CFSE bojom i klonogeni esej jasno su pokazali da je deobni i klonogeni potencijal ovih ćelija bio izrazito umanjen pod tretmanom IXN. Skoro 90% tretiranih ćelija ostalo je nepodeljeno, ukazujući na značajan citostatski efekat koji se može okarakterisati kao primarni način delovanja eksperimentalnog prenilflavonoida na ovoj invazivnoj tumorskoj liniji. Pokazani snažan antiproliferativni efekat u saglasnosti je sa načinom delovanja IXN na drugim visoko metastatskim ćelijskim linijama različitih vrsta tumora [142,143,167–169,159–166].

Vrlo često je smanjena proliferacija koja korelira sa redukovanim kapacitetom formiranja kolonija praćena gubitkom malignog potencijala. Glavna karakteristika agresivnog malignog fenotipa jeste

potencijal formiranja metastaza. Opšte je poznato da diseminacija tumora na udaljena mesta podrazumeva višestepenu kaskadu događaja [11,16]. Prema tome, bilo koja vrsta tretmana koja utiče na jedan ili više koraka metastatske kaskade mogla bi biti od interesa za borbu protiv malignih bolesti. Pretretman ćelija melanoma subtoksičnim dozama IXN, koji nije smanjio ćelijsku proliferaciju, u velikoj meri je negativno regulisao nekoliko koraka pomenutog metastatskog puta istovremeno. Tako je u ovoj studiji pokazano da su ključni događaji višestepenog procesa metastaziranja – adhezija, migracija i invazija, bili znatno suprimirani usled tretmana B16-F10 ćelija testiranim jedinjenjem. Na taj način je prenilovani flavanon uspeo da redukuje metastatski potencijal visoko invazivnog subklona ćelija melanoma *in vitro*. Saglasno tome, kao deo ove studije je pokazano da u invazivnim A-375 ćelijama humanog melanoma IXN smanjuje ekspresiju β -katenina, proteina koji učestvuje u ćelijsko-ćelijskoj adheziji posredovanoj kadherinima i koji predstavlja deo Wnt signalnog puta čija se pojačana regulacije dovodi u vezu sa metastatskim profilom melanoma [174,175,177]. Pored toga, prekomerna ekspresija Oct-3/4 proteina u ćelijama melanoma koja korelira sa njihovim invazivnim fenotipom kao i pojačanim kapacitetom pokretljivosti i ekstravazacije, a koja je bila odgovorna za povećani migracioni i invazivni potencijal A-375 ćelija [176], bila je suprimirana od strane IXN. S obzirom da je na humanoj liniji melanoma uspeo da suprimira aktivnost proteina koji su, između ostalog, odgovorni za invaziju i diseminaciju metastatskih ćelija, nije iznenađujuć sličan efekat ovog derivata piva na mišju metastatsku liniju melanoma. Dodatno, podaci iz literature potvrđuju antimetastatski potencijal ispitivane supstance i na drugim tipovima kancera. Tako je sposobnost IXN da inhibira invaziju kroz ekstraćelijski matriks uočena na HT115 ćelijama kancera kolona [166]. Objavljeno je da je IXN ispoljio snažan antiangiogeni efekat tako što je redukovao formiranje struktura nalik kapilarima nastalih od visoko agresivnih, invazivnih, niskodiferentovanih ćelija kancera dojke, MDA-MB-231, *in vitro* [183]. Slično tome, XN i IXN, ali ne i 8-PN, promovisali su antiangiogene i antiinflamatorne efekte na vaskularnim ćelijama *in vitro*, inhibirajući njihov rast, pokretljivost i invaziju [180,181]. Dalje, XN je kompromitovao adheziju ćelija kancera dojke, MCF-7, za limfoendotelne ćelije putem smanjenja ekspresije ICAM-1 (engl. *InterCellular Adhesion Molecule-1*), dok je efekat na epitelno-mezenhimsku tranziciju i ćelijsku pokretljivost ostvario supresijom paksilina, MCL2 i S100A4 [280]. Takođe, gubitak proliferativnog i klonogenog potencijala B16-F10 ćelija korelirao je sa smanjenom adhezijom i migracijom nakon tretmana ćelija melanoma flavonoidom galanginom [281]. Zajedno sa rezultatima predstavljenim u ovoj studiji, indikativno je da prenilflavonoidi poreklom iz hmelja mogu posedovati osobine koje im omogućavaju da značajno inhibiraju metastatska svojstva malignih ćelija.

Uzrok zapaženog gubitka metastatskog potencijala B16-F10 ćelija tretiranih IXN može se tražiti na unutarćelijskom nivou analizom signalnih puteva relevantnih za proces metastaziranja. Adhezija ćelija za ECM je ključni korak u kaskadi događaja karakterističnih za metastatski proces [16]. Proteini koji igraju važnu ulogu u povezivanju ćelijske membrane sa ECM sa jedne strane i unutarćelijskim citoskeletom sa druge strane, posreduju u adheziji, migraciji i invaziji. Literatura govori u prilog tome da migratorni potencijal ćelija i invazivnost tumora zavise od aktivacije integrinskog puta transdukcije signala. Angažovanjem integrinskih receptora dolazi do propagacije nizvodnog signala koja počiva na komunikaciji vanćelijskog matriksa sa unutarćelijskom citoskeletnom mašinerijom, a reguliše se putem intimnih kontakata specifičnih adapterskih proteina koji omogućavaju njen adekvatan odgovor na stimulaciju membranskih receptora. Tako su integrinski receptori i aktin povezani preko adapterskih proteina (talina, paksilina, tenzina, vinkulina, α -actinina, itd.), Arp2/3 kompleksa (engl. *Actin Related Protein 2/3 complex*), signalnih kinaza (FAK, ILK (engl. *Integrin-Linked Kinase*), Src itd.) i malih G-proteina (Rho GTPaza). Svi ovi molekuli čine deo složenih struktura zvanih fokalne adhezije, čije je formiranje i rastavljanje dinamički regulisano tokom migracije ćelija. Unutar ćelije, citoskelet predstavlja proteinsku mrežu koja statički i dinamički definiše njenu morfologiju i ponašanje [16,237].

Izmenjena ekspresija integrina se često detektuje u tumorima, gde integrini imaju ulogu u signalizaciji preko receptora za faktore rasta (engl. *Growth Factor Receptor*, GFR) i od nje zavisnoj migraciji i invaziji ćelija kancera [282]. Pored toga, integrini regulišu proces kolonizacije na metastatskim mestima tako što olakšavaju preživljavanje cirkulišućih tumorskih ćelija nezavisno od njihovog usidravanja [17]. Ekspresija α -6 integrina je jedna od glavnih karakteristika različitih tipova uznapredovalih tumora, među kojima je i melanom [283,284]. Ova grupa heterodimernih glikoproteina predstavlja transmembranske receptore koji se vezuju za ECM, preferencijalno za laminin, i pomažu ćelijsku adheziju kao i među- i unutarćelijsku komunikaciju [283]. Pretpostavlja se da α -6 integrini imaju dvostruku ulogu u metastatskom procesu, posredujući u adheziji tumorskih ćelija za luminalnu površinu endotela i adheziji za laminin u subendotelnom vanćelijskom matriksu tokom ekstravazacije [284]. Vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) i faktor rasta fibroblasta (engl. *Fibroblast Growth Factor*, FGF) povećavaju njihovu ekspresiju. Poznato je da su oba ova faktora proangiogena i važna za početne korake neovaskularizacije [285]. Pokazano je da specifična blokada α 6 β 1 integrinskog heterodimernog kompleksa sprečava adheziju metastatskih B16-BL6 ćelija melanoma za laminin [286]. Takođe, administracija EA-1, antitela na integrin α -6, pre ili istovremeno sa ćelijama mišjeg melanoma, sprečila je stvaranje metastaza *in vivo* [284]. U studiji ove disertacije, IXN je snažno suprimirao ekspresiju integrina α -6. Ovaj rezultat je na unutarćelijskom nivou potvrdio nalaze eseja za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija koji su ukazali na moguću blokadu adhezivnih molekula u ćelijama tretiranim IXN. Negativna regulacija ekspresije integrina α -6 mogla bi imati reperkusije na skoro svaki korak u metastatskom procesu, počev od adhezije za ECM do ekstravazacije u ciljno tkivo. Uz to, osim što je integrin α -6 visoko ekspresiran u embrionalnim, hematopoetskim i neuralnim matičnim ćelijama, njegova ekspresija je zapažena i u tumorskim matičnim ćelijama [287]. Imajući u vidu ovaj podatak, uticaj IXN na njegovu ekspresiju mogao bi rezultirati gubitkom niskodiferentovanog fenotipa što bi uvećalo njegovo blagotvorno dejstvo u terapiji uznapredovalih tumora.

Kinaza fokalne adhezije (FAK) je tirozin kinaza koja je ključni regulator preživljavanja, proliferacije, migracije i invazije. Ona čini važan deo složenih struktura – fokalnih adhezija, gde igra suštinsku ulogu u prenošenju signala posredovanih integrinskim receptorima tako što povezuje adapterske proteina sa aktinskim filamentima i na taj način učestvuje u kontroli ćelijskog oblika i promenama u ćelijsko-ćelijskoj adheziji potrebnih za efikasno kretanje ćelija. S obzirom da integrini nemaju svojstvenu enzimsku aktivnost, ova kinaza prenosi signale sa fokalnih adhezija na ćelijsku citoskeletnu mašineriju fosforilacijom različitih proteina povezanih sa integrinima. U odgovoru na angažovanje integrina, dolazi do fosforilacije FAK i njene regrutacije u oblasti fokalne adhezije [237,288–290]. Znatna je količina posrednih dokaza koji povezuju prekomernu ekspresiju FAK sa širokim spektrom humanih epitelnih kancera. Štaviše, nivoi ekspresije FAK koreliraju sa invazivnim potencijalom tumora i lošom prognozom pacijenata. Tako je nađeno da je autofosforilacija FAK na mestu Tyr39 povišena u izuzetno pokretnim, metastatskim, invazivnim ćelijama kao i u uzorcima humanih tkiva raznih tipova malignih tumora [290–292]. Saglasno tome, utvrđeno je da je amplifikacija FAK gena kao i prekomerna ekspresija i aktivnost FAK proteina u malignim melanomima u korelaciji sa njihovim agresivnim fenotipom [293]. Ispitivanje funkcionalne uloge FAK u agresivnom humanom melanomu otkrilo je da narušavanje signalne transdukcije posredovane ovom kinazom rezultira u smanjenju ćelijske invazije i migracije, kao i u inhibiciji vaskulogene mimikrije [294,295]. Kao i drugi biološki fenomeni, ekspresija FAK nije uvek u pozitivnoj korelaciji sa metastatskim procesom. Pokazano je da je supresija aktivnosti FAK u B16-F10 ćelijama melanoma dovela do povećanog formiranja invadopodija i posledične invazije kroz ekstraćelijski matriks ali je oslabila migraciju, što implicira da je FAK sposobna da migraciju i invaziju ćelija melanoma reguliše na različit način [296]. Međutim, nedavno su Pei i saradnici potvrdili značaj ekspresije FAK u regulaciji glavnih signalnih puteva, kao i u regulaciji ekspresije gena uključenih u migraciju/metastaziranje invazivnih ćelija mišjeg (B16-F10) i humanog (A-375) melanoma. Naime, negativna regulacija FAK potisnula je migraciju oba tipa ćelija melanoma i

dovela do značajne supresije procesa metastaziranja *in vivo* [297]. Mnogi flavonoidi (kao npr. galangin, genistein, kvercetin, luteolin, itd.) su u stanju da ometaju aktivnost pomenute kinaze, inhibirajući adheziju, migraciju i invaziju tumorskih ćelija. Tretman ovim flavonoidima je, osim *in vitro* na tumorskim ćelijama pankreasa i melanoma, doveo do smanjenja nivoa ekspresije FAK i *in vivo*, u plućima sa metastazama melanoma [281,298,299]. Pored toga, utvrđeno je da je u ćelijskom modelu kancera prostate i akutne leukemije inhibicija fosforilacije FAK posredovana prenilovanim halkonom XN dovela do smanjene migracije i invazije ovih ćelija [195,196]. Shodno svemu navedenom, u našem istraživanju detektovana je kontinuirana inhibicija ekspresije FAK nakon izlaganja visoko invazivnih B16-F10 ćelija prenilflavonoidu IXN. Ovaj rezultat je bio u skladu sa negativno regulisanom ekspresijom α -6 integrina i, posledično, Rho proteina. Rho GTPaze i njihovi nizvodni efektorski proteini, kao što je ROCK (engl. *Rho-Associated Protein Kinase*), regulišu povezivanje citoskeletnih struktura višeg reda izgrađenih od unakrsno povezanih snopova aktinskih filamenata, tzv. aktinskih stres vlakana, koji indukuju tenziju sa zrelim fokalnim adhezijama sastavljenim od integrinskih receptora i adapterskih proteina [237,291]. Familija malih Rho GTPaza je povezana sa brojnim proteinima koji su uključeni u regulaciju unutarćelijske aktinske dinamike i ćelijskog kretanja kod različitih vrsta kancera, uključujući melanom [300]. Aktivnost RhoA i RhoC GTPaza dovodi se u vezu sa invazivnim ćelijskim fenotipom [301]. Takođe, različiti RhoGEFs (engl. *Rho Guanine nucleotide Exchange Factors*), koji predstavljaju aktivatore Rho proteina, su prekomerno ekspimirani u mnogim metastaskim tumorima [302]. Pokazano je da u ćelijama karcinoma dojke, Rgnef, specifični RhoGEF, aktivira RhoC koja dalje olakšava stvaranje invadopodija [303]. S druge strane, primena inhibitora Rho kinaza snažno je suprimirala aktivnost ROCK1 i ROCK2 u ćelijama melanoma u kulturi i *in vivo*. Tretman ćelija melanoma pomenutim inhibitorima je drastično redukovao njihovu invaziju, negativno utičući i na ameboidne i na mezenhimske modalitete invazije u kulturi, dok je inhibicija ROCK smanjila sposobnost ćelija melanoma da efikasno kolonizuju pluća [304]. Inhibicija FAK mogla bi biti povezana sa inhibicijom Rho kinaze kao odgovor na stimulus IXN, s obzirom da je zabeleženo da specifični RhoGEF, pored svoje primarne funkcije aktivatora RhoA i C, takođe vezuje i FAK, igrajući ulogu u njenom regrutovanju i aktivaciji [305]. Dakle, ciljane inhibicije RhoGEF, poput Rgnef, može rezultirati dvostrukom inhibicijom FAK i Rho GTPaza signalnih puteva [301]. U literaturi je opisana izuzetna važnost signalne ose RhoA-FAK kod nesitnoćelijskog karcinoma pluća koji eksprimira mutirani KRAS (engl. *Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*), agresivnog tipa kancera otpornog na terapiju [306]. Aktivacija RhoA posredovana RhoGEF i posledična povećana kontraktilnost olakšavaju fosforilaciju paksilin tirozina koja je posredovana FAK, a važna je za sazrevanje fokalnih adhezija, ali i za naknadno regrutovanje proteina kao što je vinkulin [302]. Vinkulin je identifikovan kao komponenta fokalnih adhezija i adhezionih veza gde ima ulogu u adheziji ćelije za ECM i za drugu ćeliju. Kao važan deo fokalnih adhezija učestvuje u regulaciji adhezije tako što se direktno vezuje za aktin, stimuliše njegovu polimerizaciju i regrutuje proteine za preuređivanje aktinskog citoskeleta. Poremećaji interakcije vinkulin-aktin utiču na ćelijsku morfologiju, pokretljivost ćelija i adheziju [307]. Nedavno je pokazano da je flavonoid genistein uspeo da smanji ekspresiju ovog proteina i tako dovede do inhibicije migratornih i invazivnih sposobnosti B16-F10 ćelija [298]. U skladu sa tim, sposobnost IXN da umanja ekspresiju vinkulina, ali i β -aktina, može biti dodatni faktor odgovoran za smanjene metastatskih osobina tretiranih B16-F10 ćelija. β -aktin je visoko konzervisan protein ekspimiran u svim ćelijama i široko se koristi kao referentni molekul za kvantifikaciju nivoa ekspresije drugih proteina. Kao glavni konstituent kontraktilnog aparata, citoskeleta, uključen je u motilitet, strukturu i integritet ćelije. Međutim, podaci iz literature pokazuju da je navedeni citoskeletni protein pozitivno regulisan kod brojnih kancera poput melanoma, kancera jetre, bubrega, debelog creva, želuca, pankreasa, jednjaka, pluća, dojke, prostate, jajnika kao i leukemije i limfoma. Otkriveno je da su abnormalna ekspresija i polimerizacija β -aktina, kao i posledična alteracija citoskeleta povezani sa uspostavljanjem invazivnog fenotipa kod različitih tipova tumora [308]. Za razliku od ostalih članova porodice aktina, ekspresija aktina glatkih mišića (α -SMA) uglavnom je ograničena na ćelijsku lozu glatkih mišića, ali je tipična za specijalizovane fibroblaste poznate kao

miofibroblasti, hepatične perisinusoidne ćelije, pericite i mioepitelne ćelije [309]. U tumorskim tkivima, njegova se ekspresija pripisuje fibroblastima povezanim sa kancerom (engl. *Cancer-Associated Fibroblasts*, CAFs) i smatra se lošim prognostičkim markerom. Tako je nađeno da α -SMA pozitivni stromalni miofibroblasti koreliraju sa lošijim ukupnim preživljavanjem pacijenata sa invazivnim kancerom dojke i pankreasa [310,311]. Dodatno, glavni izvori α -SMA u benignim i premalignim tumorima pigmentnih ćelija bili su kapilarni periciti, dok je u tkivu malignog melanoma visoka ekspresija ovog proteina detektovana prvenstveno u fibroblastima strome koji okružuju melanom i imaju fenotip miofibroblasta [312]. Postoji samo nekoliko zabeleženih slučajeva o ekspresiji α -SMA u tumorskim ćelijama, koji ukazuju na njegovu povezanost sa agresivnim fenotipom. Nađeno je da je ovaj tip aktina bio uključen u migraciju, invaziju, klonogenost i transendotelnu penetraciju tumorskih ćelija adenokarcinoma pluća *in vitro*, dok je njegova neutralizacija ukinula niskodiferentovani fenotip ovih ćelija [313]. Pored toga, α -SMA pozitivne tumorske ćelije pronađene su u tumorima neuroektodermalnog porekla, u koje spadaju i melanomi [314]. Prisustvo α -SMA može ukazati na njihov niskodiferentovani fenotip i impresivnu plastičnost, budući da je utvrđeno da CAFs, koji ekspimiraju ovaj protein, poseduju iste genetske abnormalnosti kao i većinska populacija ćelija tumora prepoznatljivog fenotipa (engl. *bulk cells*) [315]. Dakle, potencijal IXN da smanji ekspresiju α -SMA prikazan u ovoj studiji predstavlja izuzetno vredan rezultat i naglašava njegovu ulogu u “utišavanju” agresivnosti melanoma, što se manifestuje smanjenom ekspresijom markera koji je definišu i podsticanjem konverzije niskodiferentovanog u zreliji fenotip.

Sveobuhvatno, opisani događaji na unutarćelijskom nivou, koji su u skladu sa literaturom, u potpunosti potvrđuju negativan uticaj IXN na adhezivni, migratorni i invazivni potencijal B16-F10 ćelija. Snažniji inhibitorni efekat IXN na proteine koji regulišu uzvodni deo integrinskog signalnog puta u poređenju sa uticajem ovog jedinjenja na citoskeletne proteine, sugerise da ispitivani prenilflavonoid ostvaruje svoj antimetastatski potencijal delujući na nivou ćelijske membrane ili pak fokalnih adhezija pre nego na samu citoskeletnu mašineriju.

Specifično svojstvo IXN da interferira sa metabolizmom lekova i na taj način menja njihovu efikasnost opisano je u literaturi, i ono ga čini veoma aktuelnim kada je u pitanju terapija kancera. S obzirom da MDR predstavlja glavnu prepreku kliničke efikasnosti konvencionalnih terapeutika u lečenju različitih vrsta kancera, zabeležena sposobnost IXN da inhibira aktivnost MDR proteina ukazuje na izuzetan kapacitet ovog prenilflavonoida u senzitivizaciji na hemioterapiju [156,163,188,191,192]. Naime pokazano je da se IXN ponaša kao inhibitor/supstrat ABC transportera koji eliminišu ksenobiotike, u ovom slučaju lekove, iz ćelije i na taj način, bilo kompetitivnim ili nekompetitivnim mehanizmom onemogućava funkciju MDR na membrani tumorskih ćelija [163,191,192]. Osim toga, literatura potvrđuje da IXN ostvaruje interakcije sa CYP superfamilijom metaboličkih enzima, tačnije, selektivno inhibira nekolicinu citohrom P450 enzima, dovodeći do modulacije metabolizma lekova. Na taj način ovaj prenilflavonoid može da utiče na efikasnost i bezbednost primene različitih lekova koji su supstrati navedenih enzima, u slučajevima kada se primenjuju paralelno. To dalje ukazuje na širok dijapazon uticaja hrane i napitaka biljnog porekla čiji su konstituenti ovo ili slična jedinjenja na efikasnost lekova, bilo da je potenciraju ili neutrališu [156,188,190]. Upravo je poslednji deo ove disertacije fokusiran na *in vitro* i *in vivo* izučavanje potencijalnih interakcija IXN sa hemioterapijom i njegove sposobnosti da senzitivizuje ćelija melanoma na komercijalne hemioterapeutike koji su deo standardnih terapijskih protokola. Na ovaj način se simuliraju situacije u kojima se uz konvencionalno lečenje konzumiraju preparati biljnog porekla. Poslednje dve decenije se uočava porast u broju farmakodinamičkih studija o kombinovanju biljnih i konvencionalnih lekova, naročito u oblasti kancera. To ukazuje na povećanu potrebu za kliničkim studijama koje bi se bavile ispitivanjem ovih interakcija, a time i definisanjem pristupa koji bi imali pozitivne farmakološke efekte, uključujući sinergizam sa konvencionalnom terapijom i/ili ublažavanje neželjenih dejstava [74]. Nedavno je zabeleženo da je IXN obnovio osetljivost MCF-7/ADR ćelija tumora dojke rezistentnih na doksorubicin [163]. U

studiji obuhvaćenoj ovom tezom je, pak, izobologram analizom utvrđeno da ovaj prenilflavonoid poseduje izvanredan potencijal da neselektivno povećava osetljivost sve tri testirane ćelijske linije melanoma na konvencionalnu terapiju paklitakselom *in vitro*, ali ne i cisplatinom i doksorubicinom. Naime, kombinovani tretman IXN i subtoksičnim dozama PCT na sve tri ćelijske linije melanoma rezultirao je snažnim sinergizmom, dok je istim agensom efikasnost cisPt i DOXO parcijalno neutralisana. Brojni su dokazi koji potvrđuju da prirodni proizvodi poreklom iz biljaka ostvaruju pozitivne interakcije sa hemioterapijom kroz različite mehanizme [74,84,316]. Kapacitet IXN da ograniči progresiju metastatskog klon, B16-F10 ćelija i, dodatno, da ga senzitivizuje na PCT primenjen u subterapeutskoj dozi, zajedno sa sličnim rezultatima dobijenim na invazivnim A-375 ćelijama, deklariše IXN kao obećavajući hemosenzitivizujući agens u slučaju uznapredovalih maligniteta koje karakteriše loš terapeutski odgovor.

Izvanredan hemosenzitivizujući potencijal IXN i sinergističko delovanje sa PCT dalje je potvrđeno *in vivo*, u singenim mišjim modelima solidnog i metastatskog melanoma. Oba mišja modela melanoma validni su modeli melanoma u pretkliničkim istraživanjima, a rezultati dobijeni na njima predstavljaju prve i najznačajnije korake u evaluaciji potencijalne primene nekog agensa na ljudima [199]. Terapijski režim primene IXN, samostalno u dozi od 20 mg/kg, doveo je do supresije rasta melanoma u solidnom modelu kao i inhibicije razvoja plućnih metastaza u metastatskom modelu ove bolesti. Kako je i očekivano, subterapeutska doza PCT primenjena u oba modela nije ispoljila inhibični efekat na rast odnosno formiranje plućnih metastaza melanoma. Uzimajući u obzir sve pomenute aktivnosti koje je IXN ispoljio na B16 ćelijama i njihovom metastatskom klonu B16-F10, nije bilo iznenađujuće da su volumeni solidnih tumora, kao i broj i prečnik metastatskih čvorova u plućima životinja izloženih eksperimentalnom jedinjenju, bili značajno manji u poređenju sa netretiranim životinjama, potvrđujući sve efekte uočene *in vitro*. Pored toga, u uzorcima plućnih tkiva izolovanih iz životinja koje su primale prenilflavonoid su uočene promene u ekspresiji specifičnih proteina koji odražavaju metastatske osobine. Smanjena ekspresija HMGB1 proteina u nukleusima ćelija plućnih metastaza životinja tretiranih IXN ukazala je na smanjeni maligni potencijal ovih ćelija. Pokazano je da je prekomerna ekspresija HMGB1 povezana sa svim obeležjima kancera, uključujući neograničeni deobni potencijal, angiogenezu, invaziju i metastaziranje, te da se ovaj molekul smatra markerom tumorske progresije [317]. Takođe je potvrđeno da je HMGB1 prekomerno eksprimiran u uzorcima tkiva melanoma humanog porekla, a njegovo prisustvo se vezuje za snažan proliferativni potencijal ovih ćelija. Viši nivoi ekspresije HMGB1 koreliraju sa naprednijim stadijumima bolesti i sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa melanomom [318]. Huber i saradnici su otkrili da je pojačana ekspresija HMGB1 u korelaciji sa progresijom tumora i razvojem metastaza u mišjem B16 modelu melanoma, dok je povećana koncentracija ovog proteina u serumu otkrivena kod pacijenata sa metastatskim melanomom. Pored ovog direktnog uticaja na tumorske ćelije, nađeno je da HMGB1 može da indukuje reprogramiranje ćelija urođene imunosti ka protumorigenom fenotipu [319]. S druge strane, prisustvo S100 proteina u ćelijama melanoma izmenjenog vretenastog oblika i niska ekspresija Ki-67 markera proliferacije u metastatskim lezijama na plućima životinja tretiranih IXN ukazali su na to da su ove ćelije melanoma podlegle procesu diferencijacije u smeru manje invazivnog fenotipa. Familiji S100 proteina pripadaju mnogi različiti proteini, strukturno srodni i interaktivni, koji su prisutni u brojnim tipovima ćelija, uključujući melanocyte i ćelije tumora epitelnog porekla. Njihova ekspresija je specifična za ćelijski tip [320]. Međutim, ono što je relevantno za ovu studiju jeste činjenica da je S100 protein jedan od najosetljivijih markera diferencijacije melanocita, s obzirom da su tumorske ćelije snažno i difuzno pozitivne u svim benignim, primarnim i sekundarnim malignim lezijama, kao i u većini dezoplastičnih i melanoma vretenastih ćelija [321]. Iako ga odlikuje visoka senzitivnost (97 – 100%), specifičnost za melanome je ograničena (75 – 87%) [322]. Uprkos tome, S100 se rutinski upotrebljava kao imunohistohemijski biomarker prve linije u dijagnozi melanocitnih lezija [322–325]. U literaturi se navodi da bi imunohistohemijsko bojenje sa S100 trebalo da potvrdi dijagnozu melanoma i da ga razlikuje od ostalih maligniteta, s obzirom da je eksprimiran u više od 95% malignih i metastatskih melanoma [326]. Ipak, mada vrlo retko,

maligni melanomi mogu biti negativni na S-100 protein [327–329]. Iako se ne može zanemariti različita ekspresija i funkcije pojedinačnih članova ove familije proteina, povećana ekspresija S100 proteina u plućima životinja tretiranih IXN može barem da potvrditi da su ćelije sa promenjenom morfologijom definitivno ćelije melanoma koje se, shodno niskoj ekspresiji Ki-67 proteina, odlikuju smanjenim deobnim potencijalom. Ki-67 je marker proliferacije koji se najčešće koristi u patologiji i predstavlja nuklearni antigen prisutan u svima aktivnim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i M), a odsutan u fazi mirovanja (G0). Pozitivno bojenje na Ki-67 je prijavljeno u 13 – 30% ćelija u malignom melanomu, iako pojedinačni slučajevi mogu pokazati skoro 100% nuklearne pozitivnosti [322]. Imajući na umu navedeno, može se reći da, pored efikasnosti u supresiji rasta solidnog melanoma i razvoja plućnih metastaza, IXN utiče i na fenotip metastatskih B16-F10 ćelija *in vivo*, dovodeći do njihove diferencijacije u smeru manje invazivnog fenotipa.

Različita efikasnost kombinovanog tretmana IXN i subtoksične doze konvencionalnog hemioterapeutika PCT uočena u dva eksperimentalna modela istog tipa kancera ukazala je na bitne razlike među njima. Naime, u solidnom modelu melanoma, kotretman životinja navedenim eksperimentalnim agensima bio je efikasniji od pojedinačnog tretmana IXN, ostvarivši statistički značajan inhibitorski efekat na rast melanoma. Nasuprot fenomenu uočenom na solidnom, u metastatskom modelu melanoma je statistička značajnost kombinovanog tretmana, i pored vidnog trenda smanjenja u broju metastaza na plućima u poređenju sa kontrolnom grupom, izostala, a ista je ustanovljena samo u grupi životinja koje su primale sam IXN. Predstavljani rezultati su ukazali na to da je u metastatskom, za razliku od solidnog modela, samostalna terapija IXN delotvornija od kombinovane terapije u kojoj se IXN i PCT aplikuju paralelno. Pretpostavlja se da je razlika u karakteristikama i ponašanju metastatskih ćelija melanoma u odnosu na primarne klonove odgovorna za različit odgovor na istu terapiju. Pojava metastaza predstavlja jedan od najvećih izazova u terapiji malignih bolesti uopšte, s obzirom na inicijalnu ili stečenu rezistenciju metastatskih lezija u odnosu na primarne tumore [330]. Stoga bi se moglo reći da, iako se radi o istom tipu tumora, solidni i metastatski oblik melanoma zahtevaju različit terapijski pristup i redizajniranje postojećih terapijskih protokola. Ovo je potvrđeno *in vivo*, ogleđom na metastatskom modelu melanoma sa nešto izmenjenim eksperimentalnim dizajnom u odnosu na prethodno opisani. Naime, šema davanja IXN i PCT je promenjena, a IXN je aplikovan vremenski odvojeno od PCT, neposredno po indukciji bolesti, a pre primene subtoksične doze hemioterapeutika. Ovakav izmenjeni režim davanja drastično je povećao efikasnost kotretmana, a po intenzitetu supresije bolesti prevazišao delovanje samog IXN. Uočeni fenomen se može objasniti uticajem testiranog prirodnog jedinjenja na fenotip visoko invazivnih, metastatskih B16-F10 ćelija, kako je i pokazano *in vitro* i *in vivo*. Promena fenotipa ćelije ka zrelijoj, više diferentovanoj formi se ogleda u smanjenoj mogućnosti formiranja kolonija, redukovanoj migraciji, adheziji i invaziji, kao i smanjenoj ekspresiji biomarkera povezanih sa metastatskim svojstvima. Diferencijacija malignih ćelija u tumorskoj masi visokog gradusa predstavlja platformu sa koje se efekti sledstvene primene hemioterapije višestruko uvećavaju i to ima utemeljenje u više nivoa. Najpre, ćelije u višem stupnju diferentovanosti pokazuju veću osetljivost na citotoksično delovanje hemioterapije. Na nivou međućelijske komunikacije, na ovaj način se ukida fenomen kompenzatorne proliferacije, koji je jedan od glavnih “krivaca” brze repopulacije uznapredovalih tumora u kratkom periodu nakon primenjene hemio- ili radioterapije. Ćelije sa ključnom ulogom u ovom efektu koji terapije tumora visokog gradusa čini neuspešnim, jesu nisko- ili nediferentovane forme koje poseduju pluripotentna svojstva. Ovakve ćelije u kontaktu sa umirućom ćelijom, primaju signal za deobu čime se svakim citocidnim atakom, broj ćelija u tumorskoj masi zapravo uvećava. Promenom fenotipa ove frakcije ćelija, gasi se stimulus za samoobnavljanje tumorskog tkiva [84]. Imajući u vidu da IXN poseduje potencijal da indukuje diferencijaciju mišjih ćelija melanoma u smeru manje invazivnog fenotipa, ne čudi podatak da su izmenjene ćelije bile izuzetno podložne subterapeutskim dozama PCT. Iako se pomenuta terapijska strategija koja podrazumeva indukciju diferencijacije već koristi za lečenje hematoloških kancera, njena primena u solidnim tumorima i dalje je marginalna, a složenost dešavanja u tkivu otežava razumevanje događaja i predikciju ishoda [84]. Sporadični su klinički

podaci koji potvrđuju da promena fenotipa ćelije ka više diferentovanom fenotipu dovodi do poboljšanja kliničke slike pacijenata [331–333].

Što se tiče antitumorskog delovanja prenilflavonoida *in vivo*, do sada je samo nekoliko studija potvrdilo blagotvorno dejstvo oralno aplikovanog XN na mišjim modelima kancera dojke, prostate, leukemije i limfoma T ćelija [194–197]. Takođe, pokazano je da flavonoid galangin inhibira formiranje tumorskih kolonija na plućima nakon intravenske inokulacije B16-F10 ćelija u C57BL/6 miševima [281]. Međutim, do danas, prema našim saznanjima, ne postoje podaci o efikasnosti IXN u supresiji tumora *in vivo*. Stoga ovo istraživanje predstavlja pionirsku studiju antitumorske aktivnosti najbitnijeg metabolita oralno unesenog XN – IXN, potvrđene *in vivo* na animalnom modelu melanoma. Osim toga, ovom studijom je prvi put dokazan izvanredan potencijal IXN da senzitivizuje tumorske ćelije na hemioterapeutik *in vivo*, u ovom slučaju paklitaksel, omogućavajući da subtoksična doza konvencionalnog citostatika uz pomoć prirodnog proizvoda dostigne terapijski efekat. I konačno, a po značajnosti možda i najvažnije, prvi put je pokazano da promenom dinamike davanja bez promene doza, u režimu u kome tretman IXN prethodi aplikaciji hemioterapije, ova biljna komponenta omogućava da konvencionalni terapeutik ostvari snažno delovanje u metastatskom modelu i to u opsegu doza daleko ispod terapijskog minimuma, čime nas još jednom učvršćuje u uverenju da je uticaj IXN na fenotip maligne ćelije u uznapredovalom stupnju bolesti od esencijalnog značaja za sva opisana antitumorska svojstva.

Pored svega navedenog, istraživanja obuhvaćena ovom studijom pokazuju da ispitivana supstanca nije toksična za eksperimentalne životinje, što je potvrđeno testom akutne toksičnosti, kao i semikvantitativnom analizom biohemijskih parametara urina miševa tokom *in vivo* ogleada. Nisu primećeni nikakvi znaci intoksikacije tokom 14 dana posmatranja nakon primene IXN u jednokratnoj dozi 10 puta većoj od one korišćene u eksperimentima *in vivo*. Takođe, stopa preživljavanja tokom ovog tretmana bila je 100%. Dodatno, vrednosti ispitivanih biohemijskih parametara urina životinja tretiranih IXN samostalno ili u kombinaciji sa PCT bili su u referentnim okvirima. Navedeni rezultati su u skladu sa podacima iz literature gde se flavonoidi opisuju kao jedinjenja niske ili nikakve toksičnosti u biološkim sistemima [92,158,334,335], mada je klinički zabeleženo da mogu da indukuju akutnu bubrežnu toksičnost pri velikoj pojedinačnoj dozi ili hroničnoj uporebi malih doza [120]. Iako ne postoje konkretne studije o bezbednosti primene IXN *in vivo*, podaci dobijeni raznim ispitivanjima na animalnim modelima i ljudima idu u prilog rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji [120,122,123,336,337]. U skladu sa tim, toksikološke studije na miševima pokazale su da prekursor IXN, halkan XN, dat oralno miševima u mnogo većim dozama, čak i pri dugotrajnoj izloženosti, ne pokazuje štetne efekte na funkcije glavnih organa, metabolizam proteina i masti kao ni homeostazu [193,338,339]. Takođe, oralni unos visoke doze ekstrakta hmelja bogatog IXN, XN i 8-PN nije doveo do akutne toksičnosti kod žena u menopauzi [124]. Premda je broj toksikoloških studija hmelja ili njegovih preparata ograničen, duga istorija njihove intenzivne i kontinuirane upotrebe od strane ljudi kroz konzumaciju piva i dodatka ishrani ukazuje na visok stepen bezbednosti njihove primene.

Na samom kraju treba istaći da rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji otkrivaju značajnu delotvornost IXN u samostalnoj upotrebi ili u sklopu konvencionalne terapije solidnih i metastatskih melanoma, *in vitro* i *in vivo*. Posebnu vrednost imaju rezultati koji potvrđuju postojanost njegovog efekta u modelu metastatskog melanoma i izvanredan senzitivizujući potencijal kada se daje vremenski odvojeno od hemioterapije, u pretretmanu. Ovo dalje potvrđuje kapacitet ispitivane komponente da promenom fenotipa maligne ćelije slabi njena zloćudna svojstva i na više nivoa potencira efekte hemioterapije. Stoga je ovaj prenilflavonoid perspektivan kandidat za buduća ispitivanja na polju eksperimentalne onkologije, ne samo kao agens sa antimetastatskim potencijalom, već i kao supstanca koja indukuje diferencijaciju i hemosenzitivizaciju melanoma. Rezultati nastali u ovoj studiji upućuju na značajnost različitog dizajna u lečenju solidnih i

metastatskih tumora i neagresivnog pristupa u terapiji kancera koji počiva na diferencijaciji malignih ćelija pre nego na indukciji njihove smrti.

6. Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja, a na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci ove doktorske disertacije:

1. IXN smanjuje vijabilitet ćelija primarnog (B16) i metastatskog (B16-F10) melanoma mišjeg porekla kao i visoko invazivnog humanog melanoma (A-375) *in vitro*.
2. IXN ne ostvaruje inhibitorni efekat na rast primarne kulture makrofaga *in vitro* te pokazuje izraženu selektivnost za maligni fenotip.
3. U osnovi citocidnog dejstva IXN na kulture B16 i A-375 ćelija izvedenih iz primarnog melanoma jeste indukcija ćelijske smrti apoptozom nezavisnom od aktivacije kaspaza, dok je autofagija intenzivirana delovanjem ovog agensa citoprotektivnog karaktera.
4. IXN inhibira proliferaciju i ostvaruje permanentan efekat u kulturama nisko invazivnih B16 i visoko invazivnih A-375 ćelija, dovodeći do gubitka njihovih malignih svojstava i promene fenotipa.
5. IXN indukuje atipičnu diferencijaciju B16 ćelija u smeru izvornog fenotipa, potvrđenu morfološki i biohemijski (povećana aktivnost enzima tirozinaze), bez kompletirane sinteze melanina.
6. IXN dovodi do gubitka pluripotentnih osobina visoko invazivnih amelanotičnih A-375 ćelija, što je potvrđeno morfološki i deprivacijom „stem“ markera – β -katenina, Notch 1 i Oct-3/4.
7. IXN snažno inhibira produkciju ROS/RNS i NO, koji su od vitalnog značaja za B16 i A-375 ćelije, čime doprinosi ukupnom antitumorskom delovanju koje ostvaruje na pomenutim ćelijskim linijama.
8. Indukcija apoptoze i diferencijacije zajedno sa inhibicijom ćelijske proliferacije pod delovanjem IXN korelira sa složenom dinamikom promena u ekspresiji ključnih molekula PI3/Akt i MAPK signalnih kaskada uključenih u ćelijsku smrt, deobu i diferencijaciju, uz dominantnu inhibiciju nizvodnih targeta, p70S6K i S6 proteina, u kulturama B16 i A-375 ćelija.
9. U osnovi citocidnog dejstva IXN na metastatski klon B16-F10 jeste indukcija apoptoze posredovana kaspazama združena sa snažnom programiranom ćelijskom smrću posredovanom autofagijom.
10. IXN inhibira proliferaciju i smanjuje klonogeni potencijal visoko proliferativnog metastatskog klona B16-F10, što je sinhronizovano sa izraženom redukcijom njegovih metastatskih osobina *in vitro*. Smanjena adhezivnost, migratornost i invazivnost B16-F10 ćelija potvrđena je negativnom regulacijom ekspresije proteina integrinskog signalnog puta relevantnih za proces metastaziranja od strane IXN.
11. Pored neposrednog tumorocidnog efekta, IXN interferira sa PCT, povećavajući njegovu efikasnost *in vitro* na svim ispitivanim ćelijskim linijama, nezavisno od razlika u njihovom malignom potencijalu.
12. Kombinovani tretman IXN i PCT potentnije suprimira rast melanoma *in vivo* u poređenju sa efektom samog IXN na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma.
13. Samostalno primenjen IXN potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa kombinovanim tretmanom IXN i PCT na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma.
14. Promena u dinamici tretmana, u kojoj davanje IXN prethodi aplikaciji PCT, potentnije suprimira formiranje plućnih metastaza *in vivo* u poređenju sa samostalno primenjenim IXN na singenom modelu mišjeg metastatskog melanoma. Opisani fenomen se pripisuje svojstvu IXN da konvertuje B16-F10 ćelije u manje invazivni fenotip, čineći subterapeutsku dozu PCT visoko efikasnom.

7. Literatura

1. Anand, P.; Kunnumakkara, A.B.; Kunnumakara, A.B.; Sundaram, C.; Harikumar, K.B.; Tharakan, S.T.; Lai, O.S.; Sung, B.; Aggarwal, B.B. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2097–116.
2. Vineis, P.; Wild, C.P. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet (London, England)* **2014**, *383*, 549–57.
3. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M.; Gavin, A.; Visser, O.; Bray, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur. J. Cancer* **2018**, *103*, 356–87.
4. Weinberg, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 3713–21.
5. Weinberg, R.A. *The biology of cancer.*; 2nd Editio.; Garland Science: New York, USA, 2014.
6. Paige, A. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2147–63.
7. Marjanovic, N.; Hofree, M.; Chan, J.; Canner, D.; Wu, K.; Trakala, M.; Hartmann, G.; Smith, O.; Kim, J.; Evans, K.; Hudson, A.; Ashenberg, O.; Porter, C.; Bejnood, A.; Subramanian, A.; Pitter, K.; Yan, Y.; Delorey, T.; Phillips, D.; Shah, N.; Chaudhary, O.; Tsankov, A.; Hollmann, T.; Rekhman, N.; Massion, P.; Poirier, J.; Mazutis, L.; Li, R.; Lee, J.; Amon, A.; Rudin, C.; Jacks, T.; Regev, A.; Tammela, T. Emergence of a high-plasticity cell state during lung cancer evolution. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 229–46.e13.
8. Yamada, Y.; Haga, H.; Yamada, Y. Concise review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer. *Stem Cells Transl. Med.* **2014**, *3*, 1182–7.
9. Friedmann-Morvinski, D.; Verma, I. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 244–53.
10. Carvalho, J. Cell reversal from a differentiated to a stem-like state at cancer initiation. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 541.
11. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–74.
12. Wiseman, M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc. Nutr. Soc.* **2008**, *67*, 253–6.
13. Hahn, W.; Counter, C.; Lundberg, A.; Beijersbergen, R.; Brooks, M.; Weinberg, R. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **1999**, *400*, 464–8.
14. Hanahan, D.; Weinberg, R. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
15. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Biological hallmarks of cancer. In *Holland-Frei Cancer Medicine*; Bast, R., Hait, W., Kufe, D., Weichselbaum, R., Holland, J., Croce, C., Piccart-Gebart, M., Wang, H., Hong, W., Pollock, R., Eds.; John Wiley & Sons, Inc., 2017; p. 2008.
16. Guan, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 402–18.

17. Fares, J.; Fares, M.; Khachfe, H.; Salhab, H.; Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 28.
18. Lobo, N.; Shimono, Y.; Qian, D.; Clarke, M. The biology of cancer stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 675–99.
19. Celià-Terrassa, T.; Kang, Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev.* **2016**, *30*, 892–908.
20. Clark, A.; Vignjevic, D. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *36*, 13–22.
21. Cheung, K.; Ewald, A. A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* **2016**, *352*, 167–9.
22. Fouad, Y.A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1016–36.
23. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–96.
24. Friedl, P.; Locker, J.; Sahai, E.; Segall, J. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 777–83.
25. Zervantonakis, I.; Hughes-Alford, S.; Charest, J.; Condeelis, J.; Gertler, F.; Kamm, R. Three-dimensional microfluidic model for tumor cell intravasation and endothelial barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 13515–20.
26. Welch, D.; Hurst, D. Defining the hallmarks of metastasis. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 3011–27.
27. Wong, A.; Searson, P. Mitosis-mediated intravasation in a tissue-engineered tumor-microvessel platform. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6453–61.
28. Bockhorn, M.; Jain, R.; Munn, L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet. Oncol.* **2007**, *8*, 444–8.
29. Sleeman, J.; Nazarenko, I.; Thiele, W. Do all roads lead to Rome? Routes to metastasis development. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 2511–26.
30. Roh, J.; Muelleman, T.; Tawfik, O.; Thomas, S. Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Oral Oncol.* **2015**, *51*, 16–23.
31. Lugassy, C.; Kleinman, H.; Engbring, J.; Welch, D.; Harms, J.; Rufner, R.; Ghanem, G.; Patierno, S.; Barnhill, R. Pericyte-like location of GFP-tagged melanoma cells: ex vivo and in vivo studies of extravascular migratory metastasis. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164*, 1191–8.
32. Yu, M.; Bardia, A.; Wittner, B.; Stott, S.; Smas, M.; Ting, D.; Isakoff, S.; Ciciliano, J.; Wells, M.; Shah, A.; Concannon, K.; Donaldson, M.; Sequist, L.; Brachtel, E.; Sgroi, D.; Baselga, J.; Ramaswamy, S.; Toner, M.; Haber, D.; Maheswaran, S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* **2013**, *339*, 580–4.
33. Aceto, N.; Bardia, A.; Miyamoto, D.; Donaldson, M.; Wittner, B.; Spencer, J.; Yu, M.; Pely, A.; Engstrom, A.; Zhu, H.; Brannigan, B.; Kapur, R.; Stott, S.; Shioda, T.; Ramaswamy, S.; Ting, D.; Lin, C.; Toner, M.; Haber, D.; Maheswaran, S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **2014**, *158*, 1110–22.

34. Labelle, M.; Hynes, R. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 1091–9.
35. Riggi, N.; Aguet, M.; Stamenkovic, I. Cancer metastasis: A reappraisal of its underlying mechanisms and their relevance to treatment. *Annu. Rev. Pathol.* **2018**, *13*, 117–40.
36. Strilic, B.; Offermanns, S. Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 282–93.
37. Reymond, N.; D'Água, B.; Ridley, A. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 858–70.
38. Wu, Q.; Wang, J.; Condrón, C.; Bouchier-Hayes, D.; Redmond, H. Human neutrophils facilitate tumor cell transendothelial migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *280*, C814–22.
39. Strilic, B.; Yang, L.; Albarrán-Juárez, J.; Wachsmuth, L.; Han, K.; Müller, U.; Pasparakis, M.; Offermanns, S. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **2016**, *536*, 215–8.
40. Peinado, H.; Lavotshkin, S.; Lyden, D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21*, 139–46.
41. Karrison, T.; Ferguson, D.; Meier, P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 80–5.
42. Crowley, N.; Seigler, H. Late recurrence of malignant melanoma. Analysis of 168 patients. *Ann. Surg.* **1990**, *212*, 173–7.
43. Tsao, H.; Cosimi, A.; Sober, A. Ultra-late recurrence (15 years or longer) of cutaneous melanoma. *Cancer* **1997**, *79*, 2361–70.
44. Aguirre-Ghiso, J. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 834–46.
45. Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Postep. Dermatologii i Alergol.* **2013**, *30*, 30–41.
46. Erdei, E.; Torres, S. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10*, 1811–23.
47. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.; Torre, L.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
48. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–49.
49. Gilchrest, B.; Eller, M.; Geller, A.; Yaar, M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1341–8.
50. Wang, Y.; Zhao, Y.; Ma, S. Racial differences in six major subtypes of melanoma: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 691.

51. Lancaster, H. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. *Med. J. Aust.* **1956**, *43*, 1082–7.
52. Houghton, A.; Polsky, D. Focus on melanoma. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 275–8.
53. Gandini, S.; Sera, F.; Cattaruzza, M.; Pasquini, P.; Abeni, D.; Boyle, P.; Melchi, C. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 28–44.
54. Goldstein, A.; Tucker, M. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective. *Arch. Dermatol.* **2001**, *137*, 1493–6.
55. Ibrahim, N.; Haluska, F. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu. Rev. Pathol.* **2009**, *4*, 551–79.
56. Balch, C.M.; Houghton, A.N.; Sober, A.J.; Soong, S. Cutaneous Melanoma. 4th Edition. *Dermatologic Surg.* **2005**, *31*, 1715.
57. Bastian, B. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* **2014**, *9*, 239–71.
58. Ross, M.; Gershenwald, J. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. *J. Surg. Oncol.* **2011**, *104*, 341–53.
59. Gupta, A.; Gomes, F.; Lorigan, P. The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. *Melanoma Manag.* **2017**, *4*, 125–36.
60. Gogas, H.; Kirkwood, J.; Sondak, V. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer* **2007**, *109*, 455–64.
61. Sandru, A.; Voinea, S.; Panaitescu, E.; Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life* **2014**, *7*, 572–6.
62. Cummins, D.; Cummins, J.; Pantle, H.; Silverman, M.; Leonard, A.; Chanmugam, A. Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, *81*, 500–7.
63. Ribas, A.; Hamid, O.; Daud, A.; Hodi, F.; Wolchok, J.; Kefford, R.; Joshua, A.; Patnaik, A.; Hwu, W.; Weber, J.; Gangadhar, T.; Hersey, P.; Dronca, R.; Joseph, R.; Zarour, H.; Chmielowski, B.; Lawrence, D.; Algazi, A.; Rizvi, N.; Hoffner, B.; Mateus, C.; Gergich, K.; Lindia, J.; Giannotti, M.; Li, X.; Ebbinghaus, S.; Kang, S.; Robert, C. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *J. Am. Med. Assoc.* **2016**, *315*, 1600–9.
64. Flaherty, K.T.; Puzanov, I.; Kim, K.B.; Ribas, A.; McArthur, G.A.; Sosman, J.A.; O'Dwyer, P.J.; Lee, R.J.; Grippo, J.F.; Nolop, K.; Chapman, P.B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 809–19.
65. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A.J.M.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J.M.; Linette, G.P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C.H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J.I.; Wolchok, J.D.; Weber, J.S.; Tian, J.; Yellin, M.J.; Nichol, G.M.; Hoos, A.; Urban, W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–23.
66. Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Demidov, L. V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C.U.; Miller, W.H.; Kaempgen, E.; Martín-Algarra, S.; Karaszewska,

- B.; Mauch, C.; Chiarion-Sileni, V.; Martin, A.-M.; Swann, S.; Haney, P.; Mirakhur, B.; Guckert, M.E.; Goodman, V.; Chapman, P.B. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **2012**, *380*, 358–65.
67. McArthur, G.; Chapman, P.; Robert, C.; Larkin, J.; Haanen, J.; Dummer, R.; Ribas, A.; Hogg, D.; Hamid, O.; Ascierto, P.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; Lorigan, P.; Lebbé, C.; Jouary, T.; Schadendorf, D.; O'Day, S.; Kirkwood, J.; Eggermont, A.; Dréno, B.; Sosman, J.; Flaherty, K.; Yin, M.; Caro, I.; Cheng, S.; Trunzer, K.; Hauschild, A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet. Oncol.* **2014**, *15*, 323–32.
68. Long, G.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Levchenko, E.; de Braud, F.; Larkin, J.; Garbe, C.; Jouary, T.; Hauschild, A.; Grob, J.; Chiarion-Sileni, V.; Lebbe, C.; Mandalà, M.; Millward, M.; Arance, A.; Bondarenko, I.; Haanen, J.; Hansson, J.; Utikal, J.; Ferraresi, V.; Kovalenko, N.; Mohr, P.; Probachai, V.; Schadendorf, D.; Nathan, P.; Robert, C.; Ribas, A.; DeMarini, D.; Irani, J.; Swann, S.; Legos, J.; Jin, F.; Mookerjee, B.; Flaherty, K. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **2015**, *386*, 444–51.
69. Ribas, A.; Puzanov, I.; Dummer, R.; Schadendorf, D.; Hamid, O.; Robert, C.; Hodi, F.; Schachter, J.; Pavlick, A.; Lewis, K.; Cranmer, L.; Blank, C.; O'Day, S.; Ascierto, P.; Salama, A.; Margolin, K.; Loquai, C.; Eigentler, T.; Gangadhar, T.; Carlino, M.; Agarwala, S.; Moschos, S.; Sosman, J.; Goldinger, S.; Shapira-Frommer, R.; Gonzalez, R.; Kirkwood, J.; Wolchok, J.; Eggermont, A.; Li, X.; Zhou, W.; Zernhelt, A.; Lis, J.; Ebbinghaus, S.; Kang, S.; Daud, A. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet. Oncol.* **2015**, *16*, 908–18.
70. Weber, J.; D'Angelo, S.; Minor, D.; Hodi, F.; Gutzmer, R.; Neyns, B.; Hoeller, C.; Khushalani, N.; Miller, W.; Lao, C.; Linette, G.; Thomas, L.; Lorigan, P.; Grossmann, K.; Hassel, J.; Maio, M.; Sznol, M.; Ascierto, P.; Mohr, P.; Chmielowski, B.; Bryce, A.; Svane, I.; Grob, J.; Krackhardt, A.; Horak, C.; Lambert, A.; Yang, A.; Larkin, J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **2015**, *16*, 375–84.
71. Ascierto, P.; McArthur, G.; Dréno, B.; Atkinson, V.; Liskay, G.; Di Giacomo, A.; Mandalà, M.; Demidov, L.; Stroyakovskiy, D.; Thomas, L.; de la Cruz-Merino, L.; Dutriaux, C.; Garbe, C.; Yan, Y.; Wongchenko, M.; Chang, I.; Hsu, J.; Koralek, D.; Rooney, I.; Ribas, A.; Larkin, J. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **2016**, *17*, 1248–60.
72. Schwartz, A.; Nath, P.; Allgauer, M.; Lessey-Morillon, E.; Sipes, J.; Ridnour, L.; Morillon Ii, Y.; Yu, Z.; Restifo, N.; Roberts, D. Antisense targeting of CD47 enhances human cytotoxic T-cell activity and increases survival of mice bearing B16 melanoma when combined with anti-CTLA4 and tumor irradiation. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **2019**, *68*, 1805–17.
73. Ravelo, A.; Estévez-Braun, A.; Chávez-Orellana, H.; Pérez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*,

241–65.

74. Choi, J.; Eom, S.; Kim, J.; Kim, S.; Huh, E.; Kim, H.; Lee, Y.; Lee, H.; Oh, M. A Comprehensive review of recent studies on herb-drug interaction: a focus on pharmacodynamic interaction. *J. Altern. Complement. Med.* **2016**, *22*, 262–79.
75. Ma, X.; Zheng, C.; Han, L.; Xie, B.; Jia, J.; Cao, Z.; Li, Y.; Chen, Y. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 579–88.
76. Yin, S.; Wei, W.; Jian, F.; Yang, N. Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, *2013*, 302426.
77. Ichikawa, H.; Nakamura, Y.; Kashiwada, Y.; Aggarwal, B. Anticancer drugs designed by mother nature: ancient drugs but modern targets. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3400–16.
78. Sarkar, F.; Li, Y. Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3347–50.
79. Vogelstein, B.; Kinzler, K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 789–99.
80. Cragg, G.; Newman, D. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72–9.
81. Newman, D.; Cragg, G. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803.
82. Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* **2007**, *9*, 767–76.
83. Butler, M. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475–516.
84. Mijatović, S.; Bramanti, A.; Nicoletti, F.; Fagone, P.; Kaluđerović, G.; Maksimović-Ivanić, D. Naturally occurring compounds in differentiation based therapy of cancer. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1622–32.
85. Cragg, G.M.; Kingston, D.G.I.; Newman, D.J. *Anticancer agents from natural products.*; 2nd Editio.; CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton, Florida, USA, 2012.
86. Syed, D.; Mukhtar, H. Botanicals for the prevention and treatment of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2011**, *24*, 688–702.
87. Banerjee, S.; Li, Y.; Wang, Z.; Sarkar, F. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 226–42.
88. Ivanov, V.; Partridge, M.; Johnson, G.; Huang, S.; Zhou, H.; Hei, T. Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. *Exp. Cell Res.* **2008**, *314*, 1163–76.
89. Olivera, A.; Moore, T.; Hu, F.; Brown, A.; Sun, A.; Liotta, D.; Snyder, J.; Yoon, Y.; Shim, H.; Marcus, A.; Miller, A.; Pace, T. Inhibition of the NF- κ B signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 368–77.

90. Huang, K.; Zhang, G.; Huang, Y.; Diao, Y. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *12*, 334–41.
91. Zhou, J.; Wu, J.; Chen, X.; Fortenbery, N.; Eksioglu, E.; Kodumudi, K.; Pk, E.; Dong, J.; Djeu, J.; Wei, S. Icariin and its derivative, ICT, exert anti-inflammatory, anti-tumor effects, and modulate myeloid derived suppressive cells (MDSCs) functions. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11*, 890–8.
92. Júnior, R.G. de O.; Ferraz, C.A.A.; Silva, M.G. e; Lavor, É.M. de; Rolim, L.A.; Lima, J.T. de; Fleury, A.; Picot, L.; Quintans, J. de S.S.; Júnior, L.J.Q.; Almeida, J.R.G. da S. Flavonoids: promising natural products for treatment of skin cancer (melanoma). In *Natural Products and Cancer Drug Discovery*; InTech, 2017.
93. Ferry, D.R.; Smith, A.; Malkhandi, J.; Fyfe, D.W.; Detakats, P.G.; Anderson, D.; Baker, J.; Kerr, D.J. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 659–68.
94. Lin, T.; Ruppert, A.; Johnson, A.; Fischer, B.; Heerema, N.; Andritsos, L.; Blum, K.; Flynn, J.; Jones, J.; Hu, W.; Moran, M.; Mitchell, S.; Smith, L.; Wagner, A.; Raymond, C.; Schaaf, L.; Phelps, M.; Villalona-Calero, M.; Grever, M.; Byrd, J. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 6012–8.
95. Lazarevic, B.; Boezelijjn, G.; Diep, L.; Kvernrod, K.; Ogren, O.; Ramberg, H.; Moen, A.; Wessel, N.; Berg, R.; Egge-Jacobsen, W.; Hammarstrom, C.; Svindland, A.; Kucuk, O.; Saatcioglu, F.; Taskèn, K.; Karlsen, S. Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 clinical trial. *Nutr. Cancer* **2011**, *63*, 889–98.
96. Ravishankar, D.; Rajora, A.; Greco, F.; Osborn, H. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2821–31.
97. Campbell, N.; Reece, J.; Urry, L.; Cain, M.; Wasserman, S.; Minorsky, P.; Jackson, R. *Biology*; 8th Editio.; Person International Edition: San Francisco, USA, 2008.
98. Mobh, S. Research for vitamin P. *J. Biochem.* **1939**, *29*, 487–501.
99. Panche, A.; Diwan, A.; Chandra, S. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, e47.
100. Andrés-Lacueva, C.; Medina-Remón, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic compounds. Chemistry and occurrences in fruit and vegetables. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*; de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G.A., Eds.; Wiley-Blackwell, 2010; pp. 53–88.
101. De la Rosa, L.A.; Alvarez-Parrilla, E.; González-Aguilar, G.A. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*; 1st Edition.; Wiley-Blackwell: Ames Iowa, USA, 2010.
102. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231–46.
103. Han, X.; Shen, T.; Lou, H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 950–88.

104. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–47.
105. McNaught, A.D.; Wilkinson, A. *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations.*; 2nd Editio.; Blackwell Science: Oxford, UK, 1997.
106. Ververidis, F.; Trantas, E.; Douglas, C.; Vollmer, G.; Kretzschmar, G.; Panopoulos, N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol. J.* **2007**, *2*, 1214–34.
107. Seliger, J.; Misuri, L.; Maser, E.; Hintzpeter, J. The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2018**, *33*, 607–14.
108. Venturelli, S.; Burkard, M.; Biendl, M.; Lauer, U.M.; Frank, J.; Busch, C. Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition* **2016**, *32*, 1171–8.
109. Shen, G.; Huhman, D.; Lei, Z.; Snyder, J.; Sumner, L.; Dixon, R. Characterization of an isoflavonoid-specific prenyltransferase from *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 70–80.
110. Stompor, M.; Uram, Ł.; Podgórski, R. In vitro effect of 8-prenylnaringenin and naringenin on fibroblasts and glioblastoma cells - cellular accumulation and cytotoxicity. *Molecules* **2017**, *22*, 1092.
111. Stevens, J.F.; Page, J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1317–30.
112. Prof.dr.sc. Grago M. *Industrijsko i krmno bilje.*; Zagreb, Hrvatska, 1998.
113. Magalhães, P.J.; Carvalho, D.O.; Cruz, J.M.; Guido, L.F.; Barros, A.A. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 591–610.
114. Stevens, J.; Taylor, A.; Clawson, J.; Deinzer, M. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2421–8.
115. Stevens, J.; Taylor, A.; Deinzer, M. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 97–107.
116. Wilhelm, H.; Wessjohann, L.A. An efficient synthesis of the phytoestrogen 8-prenylnaringenin from xanthohumol by a novel demethylation process. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6961–6.
117. Kamiński, D.M.; Gawęda, K.; Arczewska, M.; Senczyna, B.; Gagoś, M. A kinetic study of xanthohumol cyclization to isoxanthohumol – a role of water. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1139*, 10–6.
118. Kim, H.; Lee, I. Microbial metabolism of the prenylated chalcone xanthohumol. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1522–4.
119. Nikolic, D.; Li, Y.; Chadwick, L.; Pauli, G.; van Breemen, R. Metabolism of xanthohumol and isoxanthohumol, prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.), by human liver microsomes. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 289–99.

120. Martinez, S.E.; Davies, N.M. Enantiospecific pharmacokinetics of isoxanthohumol and its metabolite 8-prenylnaringenin in the rat. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1674–89.
121. Possemiers, S.; Heyerick, A.; Robbens, V.; De Keukeleire, D.; Verstraete, W. Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus* L.) by intestinal microbiota; conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6281–8.
122. Possemiers, S.; Bolca, S.; Grootaert, C.; Heyerick, A.; Decroos, K.; Dhooge, W.; De Keukeleire, D.; Rabot, S.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T. The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1862–7.
123. Possemiers, S.; Rabot, S.; Espín, J.C.; Bruneau, A.; Philippe, C.; González-Sarrías, A.; Heyerick, A.; Tomás-Barberán, F.A.; De Keukeleire, D.; Verstraete, W. Eubacterium limosum activates isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1310–6.
124. van Breemen, R.; Yuan, Y.; Banuvar, S.; Shulman, L.; Qiu, X.; Alvarenga, R.; Chen, S.; Dietz, B.; Bolton, J.; Pauli, G.; Krause, E.; Viana, M.; Nikolic, D. Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1962–9.
125. World Health Organization (2018). Global status report on alcohol and health 2018. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274603/9789241565639-eng.pdf?ua=1>.
126. Kondo, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors* **2004**, *22*, 303–10.
127. Quifer-Rada, P.; Vallverdú-Queralt, A.; Martínez-Huélamo, M.; Chiva-Blanch, G.; Jáuregui, O.; Estruch, R.; Lamuela-Raventós, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem.* **2015**, *169*, 336–43.
128. Boronat, A.; Soldevila-Domenech, N.; Rodríguez-Morató, J.; Martínez-Huélamo, M.; Lamuela-Raventós, R.; de la Torre, R. Beer phenolic composition of simple phenols, prenylated flavonoids and alkylresorcinols. *Molecules* **2020**, *25*, 2582.
129. Zhao, H.; Chen, W.; Lu, J.; Zhao, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1150–8.
130. Kavalier, A.; Ma, C.; Figueroa, M.; Kincaid, D.; Matthews, P.; Kennelly, E. Targeted analysis of polyphenol metabolism during development of hop (*Humulus lupulus* L.) cones following treatment with prohexadione-calcium. *Food Chem.* **2014**, *145*, 254–63.
131. Zhang, C.; Zhong, M. Consumption of beer and colorectal cancer incidence: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control* **2015**, *26*, 549–60.
132. Fagherazzi, G.; Vilier, A.; Boutron-Ruault, M.; Mesrine, S.; Clavel-Chapelon, F. Alcohol consumption and breast cancer risk subtypes in the E3N-EPIC cohort. *Eur. J. Cancer Prev.* **2015**, *24*, 209–14.
133. Benedetti, A.; Parent, M.; Siemiatycki, J. Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk of 13 types of cancer in men: results from a case-control study in Montreal. *Cancer Detect. Prev.* **2009**, *32*, 352–62.

134. Chao, C. Associations between beer, wine, and liquor consumption and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, *16*, 2436–47.
135. Friedenreich, C.; Speidel, T.; Neilson, H.; Langley, A.; Courneya, K.; Magliocco, A.; Cook, L. Case-control study of lifetime alcohol consumption and endometrial cancer risk. *Cancer Causes Control* **2013**, *24*, 1995–2003.
136. Greving, J.; Lee, J.; Wolk, A.; Lukkien, C.; Lindblad, P.; Bergström, A. Alcoholic beverages and risk of renal cell cancer. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 429–33.
137. Nelson, R.; Samelson, S. Neither dietary ethanol nor beer augments experimental colon carcinogenesis in rats. *Dis. Colon Rectum* **1985**, *28*, 460–2.
138. Hamilton, S.R.; Hyland, J.; Mcavinchey, D.; Chaudhry, Y.; Hartka, L.; Kim, H.T.; Cichon, P.; Floyd, J.; Turjman, N.; Kessie, G.; Nair, P.P.; Dick, J. Effects of chronic dietary beer and ethanol consumption on experimental colonic carcinogenesis by azoxymethane in rats. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 1551–9.
139. Nozawa, H.; Yoshida, A.; Tajima, O.; Katayama, M.; Sonobe, H.; Wakabayashi, K.; Kondo, K. Intake of beer inhibits azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in male Fischer 344 rats. *Int. J. Cancer* **2004**, *108*, 404–11.
140. Chiva-Blanch, G.; Arranz, S.; Lamuela-Raventos, R.; Estruch, R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol* **2013**, *48*, 270–7.
141. Ceslová, L.; Holcapek, M.; Fidler, M.; Drsticková, J.; Lísa, M. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7249–57.
142. Gerhäuser, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 1941–54.
143. Żołnierczyk, A.; Mączka, W.; Grabarczyk, M.; Wińska, K.; Woźniak, E.; Anioł, M. Isoxanthohumol - Biologically active hop flavonoid. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 71–82.
144. Zhang, C.; Ma, Y.; Gao, H.M.; Liu, X.Q.; Chen, L.M.; Zhang, Q.W.; Wang, Z.M.; Li, A.P. Non-alkaloid components from *Sophora flavescens*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2013**, *38*, 3520–4.
145. Li, W.; Liang, H.; Yin, T.; Wang, B.; Zhao, Y.-Y. Main flavonoids from *Sophora flavescens*. *Yao Xue Xue Bao* **2008**, *43*, 833–7.
146. Jin, J.H.; Kim, J.S.; Kang, S.S.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kim, H.P. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 589–95.
147. Martinez, S.; Lakowski, T.; Davies, N. Enantiospecific analysis of 8-prenylnaringenin in biological fluids by liquid-chromatography-electrospray ionization mass spectrometry: application to preclinical pharmacokinetic investigations. *Chirality* **2014**, *26*, 419–26.
148. Nikolic, D.; Li, Y.; Chadwick, L.; Grubjesic, S.; Schwab, P.; Metz, P.; van Breemen, R. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 272–9.

149. Yilmazer, M.; Stevens, J.; Buhler, D. In vitro glucuronidation of xanthohumol, a flavonoid in hop and beer, by rat and human liver microsomes. *FEBS Lett.* **2001**, *491*, 252–6.
150. Yilmazer, M.; Stevens, J.F.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. In vitro biotransformation of xanthohumol, a flavonoid from hops (*Humulus lupulus*), by rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 223–31.
151. Nookandeh, A.; Frank, N.; Steiner, F.; Ellinger, R.; Schneider, B.; Gerhäuser, C.; Becker, H. Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 561–70.
152. Fukizawa, S.; Yamashita, M.; Fujisaka, S.; Tobe, K.; Nonaka, Y.; Murayama, N. Isoxanthohumol, a hop-derived flavonoid, alters the metabolomics profile of mouse feces. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* **2020**, *39*, 100–8.
153. Bolca, S.; Van de Wiele, T.; Possemiers, S. Gut metabotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 220–5.
154. Moens, E.; Bolca, S.; Van de Wiele, T.; Van Landschoot, A.; Goeman, J.; Possemiers, S.; Verstraete, W. Exploration of isoxanthohumol bioconversion from spent hops into 8-prenylnaringenin using resting cells of *Eubacterium limosum*. *AMB Express* **2020**, *10*, 79.
155. Fu, M.; Wang, W.; Chen, F.; Dong, Y.; Liu, X.; Ni, H.; Chen, Q. Production of 8-prenylnaringenin from isoxanthohumol through biotransformation by fungi cells. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7419–26.
156. Yuan, Y.; Qiu, X.; Nikolić, D.; Chen, S.N.; Huang, K.; Li, G.; Pauli, G.F.; Van Breemen, R.B. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by hops (*Humulus lupulus*) and hop prenylphenols. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 55–61.
157. Guo, J.; Nikolic, D.; Chadwick, L.; Pauli, G.; van Breemen, R. Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1152–9.
158. Bolca, S.; Possemiers, S.; Maervoet, V.; Huybrechts, I.; Heyerick, A.; Vervarcke, S.; Depypere, H.; De Keukeleire, D.; Bracke, M.; De Henauw, S.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T. Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 950–9.
159. Monteiro, R.; Faria, A.; Azevedo, I.; Calhau, C. Modulation of breast cancer cell survival by aromatase inhibiting hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *105*, 124–30.
160. Bartmańska, A.; Tronina, T.; Popłoński, J.; Milczarek, M.; Filip-Psurska, B.; Wietrzyk, J. Highly cancer selective antiproliferative activity of natural prenylated flavonoids. *Molecules* **2018**, *23*, 2922.
161. Ambrož, M.; Lněničková, K.; Matoušková, P.; Skálová, L.; Boušová, I. Antiproliferative effects of hop-derived prenylflavonoids and their influence on the efficacy of oxaliplatin, 5-fluorouracil and irinotecan in human colorectal cells. *Nutrients* **2019**, *11*, 879.
162. Stompor, M.; Świtalska, M.; Podgórski, R.; Uram, Ł.; Aebischer, D.; Wietrzyk, J. Synthesis and biological evaluation of 4'-O-acetyl-isoxanthohumol and its analogues as antioxidant and antiproliferative agents. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *64*, 577–83.
163. Liu, M.; Zhang, W.; Zhang, W.; Zhou, X.; Li, M.; Miao, J. Prenylflavonoid isoxanthohumol

- sensitizes MCF-7/ADR cells to doxorubicin cytotoxicity via acting as a substrate of ABCB1. *Toxins (Basel)* **2017**, *9*, 208.
164. Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Helmrich, A.; Henderson, M.C.; Rodriguez, R.J.; Yang, Y.H.; Deinzer, M.L.; Barnes, D.W.; Buhler, D.R. Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 271–85.
 165. Tronina, T.; Bartmańska, A.; Filip-Psurska, B.; Wietrzyk, J.; Popłoński, J.; Huszcza, E. Fungal metabolites of xanthohumol with potent antiproliferative activity on human cancer cell lines in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2001–6.
 166. Allsopp, P.; Possemiers, S.; Campbell, D.; Gill, C.; Rowland, I. A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using in vitro models of colon cancer. *Biofactors* **2013**, *39*, 441–7.
 167. Hudcová, T.; Bryndová, J.; Fialová, K.; Fiala, J.; Karabín, M.; Jelínek, L.; Dostálek, P. Antiproliferative effects of prenylflavonoids from hops on human colon cancer cell lines. *J. Inst. Brew.* **2014**, *120*, 225–30.
 168. Delmulle, L.; Vanden Berghe, T.; Keukeleire, D. De; Vandenabeele, P. Treatment of PC-3 and DU145 prostate cancer cells by prenylflavonoids from hop (*Humulus lupulus* L.) induces a caspase-independent form of cell death. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 197–203.
 169. Delmulle, L.; Bellahcène, A.; Dhooge, W.; Comhaire, F.; Roelens, F.; Huvaere, K.; Heyerick, A.; Castronovo, V.; De Keukeleire, D. Anti-proliferative properties of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.) in human prostate cancer cell lines. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 732–4.
 170. Yang, J.-Y.; Della-Fera, M.A.; Rayalam, S.; Baile, C.A. Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1953–63.
 171. Kunnimalaiyaan, S.; Sokolowski, K.M.; Balamurugan, M.; Gamblin, T.C.; Kunnimalaiyaan, M. Xanthohumol inhibits Notch signaling and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **2015**, *10*, e0127464.
 172. Kunnimalaiyaan, S.; Trevino, J.; Tsai, S.; Gamblin, T.C.; Kunnimalaiyaan, M. Xanthohumol-mediated suppression of Notch1 signaling is associated with antitumor activity in human pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 1395–403.
 173. Drenzek, J.G.; Seiler, N.L.; Jaskula-Sztul, R.; Rausch, M.M.; Rose, S.L. Xanthohumol decreases Notch1 expression and cell growth by cell cycle arrest and induction of apoptosis in epithelial ovarian cancer cell lines. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *122*, 396–401.
 174. Rimm, D.L.; Caca, K.; Hu, G.; Harrison, F.B.; Fearon, E.R. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 325–9.
 175. Damsky, W.E.; Curley, D.P.; Santhanakrishnan, M.; Rosenbaum, L.E.; Platt, J.T.; Gould Rothberg, B.E.; Taketo, M.M.; Dankort, D.; Rimm, D.L.; McMahon, M.; Bosenberg, M. β -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 741–54.
 176. Borrull, A.; Ghislin, S.; Deshayes, F.; Lauriol, J.; Alcaide-Loridan, C.; Middendorp, S. Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *J.*

Cancer Res. Clin. Oncol. **2012**, *138*, 1145–54.

177. Balint, K.; Xiao, M.; Pinnix, C.C.; Soma, A.; Veres, I.; Juhasz, I.; Brown, E.J.; Capobianco, A.J.; Herlyn, M.; Liu, Z.-J. Activation of Notch1 signaling is required for beta-catenin-mediated human primary melanoma progression. *J. Clinical Investig.* **2005**, *115*, 3166–76.
178. Haiaty, S.; Rashidi, M.; Akbarzadeh, M.; Maroufi, N.; Yousefi, B.; Nouri, M. Targeting vasculogenic mimicry by phytochemicals: A potential opportunity for cancer therapy. *IUBMB Life* **2020**, *72*, 825–41.
179. Bertl, E.; Klimo, K.; Heiss, E.; Klenke, F.; Peschke, P.; Becker, H.; Eicher, T.; Herhaus, C.; Kapadia, G.; Bartsch, H.; C. Gerhäuser Identification of novel inhibitors of angiogenesis using a human in vitro anti-angiogenesis assay. *Int. J. Canc. Prev.* **2004**, *1*, 47–61.
180. Bertl, E.; Becker, H.; Eicher, T.; Herhaus, C.; Kapadia, G.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *325*, 287–95.
181. Negrão, R.; Costa, R.; Duarte, D.; Taveira Gomes, T.; Mendanha, M.; Moura, L.; Vasques, L.; Azevedo, I.; Soares, R. Angiogenesis and inflammation signaling are targets of beer polyphenols on vascular cells. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 1270–9.
182. Negrão, R.; Duarte, D.; Costa, R.; Soares, R. Isoxanthohumol modulates angiogenesis and inflammation via vascular endothelial growth factor receptor, tumor necrosis factor alpha and nuclear factor kappa B pathways. *Biofactors* **2013**, *39*, 608–22.
183. Serwe, A.; Rudolph, K.; Anke, T.; Erkel, G. Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 898–915.
184. Popoola, O.K.; Marnewick, J.L.; Rautenbach, F.; Ameer, F.; Iwuoha, E.I.; Hussein, A.A. Inhibition of oxidative stress and skin aging-related enzymes by prenylated chalcones and other flavonoids from *Helichrysum teretifolium*. *Molecules* **2015**, *20*, 7143–55.
185. Ristivojević, P.M.; Morlock, G.E. Effect-directed classification of biological, biochemical and chemical profiles of 50 German beers. *Food Chem.* **2018**, *260*, 344–53.
186. Büchter, C.; Havermann, S.; Koch, K.; Wätjen, W. Isoxanthohumol, a constituent of hop (*Humulus lupulus* L.), increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 257–65.
187. Miranda, C.L.; Yang, Y.H.; Henderson, M.C.; Stevens, J.F.; Santana-Rios, G.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline, mediated by cDNA-expressed human CYP1A2. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1297–302.
188. Henderson, M.C.; Miranda, C.L.; Stevens, J.F.; Deinzer, M.L.; Buhler, D.R. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 235–51.
189. Gross-Steinmeyer, K.; Stapleton, P.L.; Liu, F.; Tracy, J.H.; Bammler, T.K.; Quigley, S.D.; Farin, F.M.; Buhler, D.R.; Safe, S.H.; Strom, S.C.; Eaton, D.L. Phytochemical-induced changes in gene expression of carcinogen-metabolizing enzymes in cultured human primary hepatocytes. *Xenobiotica*. **2004**, *34*, 619–32.

190. Botta, B.; Vitali, A.; Menendez, P.; Misiti, D.; Delle Monache, G. Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 713–39.
191. Lee, S.H.; Kim, H.J.; Lee, J.S.; Lee, I.-S.; Kang, B.Y. Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol from hops. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 1435–9.
192. Tan, K.W.; Cooney, J.; Jensen, D.; Li, Y.; Paxton, J.W.; Birch, N.P.; Scheepens, A. Hop-derived prenylflavonoids are substrates and inhibitors of the efflux transporter breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 2099–110.
193. Liu, M.; Hansen, P.E.; Wang, G.; Qiu, L.; Dong, J.; Yin, H.; Qian, Z.; Yang, M.; Miao, J. Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). *Molecules* **2015**, *20*, 754–79.
194. Monteiro, R.; Calhau, C.; Silva, A.O.E.; Pinheiro-Silva, S.; Guerreiro, S.; Gärtner, F.; Azevedo, I.; Soares, R. Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *104*, 1699–707.
195. Venè, R.; Benelli, R.; Minghelli, S.; Astigiano, S.; Tosetti, F.; Ferrari, N. Xanthohumol impairs human prostate cancer cell growth and invasion and diminishes the incidence and progression of advanced tumors in TRAMP mice. *Mol. Med.* **2012**, *18*, 1292–302.
196. Benelli, R.; Venè, R.; Ciarlo, M.; Carlone, S.; Barbieri, O.; Ferrari, N. The AKT/NF- κ B inhibitor xanthohumol is a potent anti-lymphocytic leukemia drug overcoming chemoresistance and cell infiltration. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1634–42.
197. Chen, B.; Yi, B.; Mao, R.; Liu, H.; Wang, J.; Sharma, A.; Peiper, S.; Leonard, W.; She, J. Enhanced T cell lymphoma in NOD.Stat5b transgenic mice is caused by hyperactivation of Stat5b in CD8⁺ thymocytes. *PLoS One* **2013**, *8*, e56600.
198. Teicher, B. *Tumor models in cancer research.*; Humana Press: Totowa, New Jersey, USA, 2002.
199. Overwijk, W.; Restifo, N. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, *Chapter 20:Unit 20.1*.
200. Briles, E.; Kornfeld, S. Isolation and metastatic properties of detachment variants of B16 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1978**, *60*, 1217–21.
201. Fidler, I. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat. New Biol.* **1973**, *242*, 148–9.
202. Danciu, C.; Falamas, A.; Dehelean, C.; Soica, C.; Radeke, H.; Barbu-Tudoran, L.; Bojin, F.; Pînzaru, S.; Munteanu, M. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 75.
203. Yerlikaya, A.; Erin, N. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 817–23.
204. Ohira, T.; Ohe, Y.; Heike, Y.; Podack, E.; Olsen, K.; Nishio, K.; Nishio, M.; Miyahara, Y.; Funayama, Y.; Ogasawara, H. In vitro and in vivo growth of B16F10 melanoma cells transfected with interleukin-4 cDNA and gene therapy with the transfectant. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 631–5.
205. Zang, G.; Gustafsson, K.; Jamalpour, M.; Hong, J.; Genové, G.; Welsh, M. Vascular

- dysfunction and increased metastasis of B16F10 melanomas in Shb deficient mice as compared with their wild type counterparts. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 234.
206. Takeda, Y.; Li, Q.; Kazarov, A.; Epardaud, M.; Elpek, K.; Turley, S.; Hemler, M. Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. *Blood* **2011**, *118*, 464–72.
 207. Fidler, I.J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 218–24.
 208. Burghoff, S.; Gong, X.; Viethen, C.; Jacoby, C.; Flögel, U.; Bongardt, S.; Schorr, A.; Hippe, A.; Homey, B.; Schrader, J. Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 898.
 209. Giard, D.; Aaronson, S.; Todaro, G.; Arnstein, P.; Kersey, J.; Dosik, H.; Parks, W. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417–23.
 210. Rozenberg, G.; Monahan, K.; Torrice, C.; Bear, J.; Sharpless, N. Metastasis in an orthotopic murine model of melanoma is independent of RAS/RAF mutation. *Melanoma Res.* **2010**, *20*, 361–71.
 211. White, N.; Knight, G.; Butler, P.; Burnstock, G. An in vivo model of melanoma: treatment with ATP. *Purinergic Signal.* **2009**, *5*, 327–33.
 212. Weber, C.; Luo, C.; Hotz-Wagenblatt, A.; Gardyan, A.; Kordaß, T.; Holland-Letz, T.; Osen, W.; Eichmüller, S. miR-339-3p is a tumor suppressor in melanoma. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3562–71.
 213. Huang, D.; Yang, X.; Ochiatti, B.; Fadhil, I.; Camirand, A.; Kremer, R. Parathyroid hormone-related protein: potential therapeutic target for melanoma invasion and metastasis. *Endocrinology* **2014**, *155*, 3739–49.
 214. Shapiro, H.M. *Practical flow cytometry.*; 4th Editio.; Wiley-Liss: New York, USA, 2003.
 215. Van Engeland, M.; Nieland, L.J.W.; Ramaekers, F.C.S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1–9.
 216. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39–51.
 217. Gozuacik, D.; Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **2004**, *23*, 2891–906.
 218. Parish, C.; Warren, H. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr. Protoc. Immunol.* **2002**, *Chapter 4:Unit 4.9*.
 219. Kojima, H.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Hirata Y; Nagano T Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew Chem Int Ed Engl* **1999**, *38*, 3209–12.
 220. Mason, H.S. The chemistry of melanin; mechanisms of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **1948**, *172*, 83–99.
 221. Körner, A.; Pawelek, J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **1982**, *217*, 1163–5.

222. Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, A.; Randall, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–75.
223. Karlsson, J.; Ostwald, K.; Kåbjörn, C.; Andersson, M. A method for protein assay in Laemmli buffer. *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 144–6.
224. Franken, N.; Rodermond, H.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–9.
225. Rafahi, H.; Orłowski, C.; Georgiadis, G.; Ververis, K.; El-Osta, A.; Karagiannis, T. Clonogenic assay: adherent cells. *J. Vis. Exp.* **2011**, 2573.
226. Hughes, C.; Postovit, L.; Lajoie, G. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **2010**, *10*, 1886–90.
227. Rodriguez, L.; Wu, X.; Guan, J. Wound-healing assay. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *294*, 23–9.
228. Berenbaum, M. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv. Cancer Res.* **1981**, *35*, 269–335.
229. Winkelmann, C.T.; Figueroa, S.D.; Rold, T.L.; Volkert, W.A.; Hoffman, T.J. Microimaging characterization of a B16-F10 melanoma metastasis mouse model. *Mol. Imaging* **2006**, *5*, 105–14.
230. Damsky, W.; Rosenbaum, L.; Bosenberg, M. Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel)*. **2010**, *3*, 126–63.
231. Chan, J. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int. J. Surg. Pathol.* **2014**, *22*, 12–32.
232. Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845.
233. Wu, Y.; Tan, H.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M.; Ong, C.; Codogno, P.; Shen, H. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 10850–61.
234. Hiraga, T.; Ito, S.; Nakamura, H. Cancer stem-like cell marker CD44 promotes bone metastases by enhancing tumorigenicity, cell motility, and hyaluronan production. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4112–22.
235. Massi, D.; Franchi, A.; Sardi, I.; Magnelli, L.; Paglierani, M.; Borgognoni, L.; Maria Reali, U.; Santucci, M. Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. *J. Pathol.* **2001**, *194*, 194-200(7).
236. Gray-Schopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **2007**, *445*, 851–7.
237. Nagano, M.; Hoshino, D.; Koshikawa, N.; Akizawa, T.; Seiki, M. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 310616.
238. Ortiz, R.; Díaz, J.; Díaz, N.; Lobos-Gonzalez, L.; Cárdenas, A.; Contreras, P.; Díaz, M.; Otte, E.; Cooper-White, J.; Torres, V.; Leyton, L.; Quest, A. Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 40571–93.

239. Thung, P. Physiological proteinuria in mice. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* **1962**, *10*, 248–61.
240. Deeb, D.; Gao, X.; Jiang, H.; Arbab, A.; Dulchavsky, S.; Gautam, S. Growth inhibitory and apoptosis-inducing effects of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops, in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 3333–9.
241. Gerhäuser, C.; Alt, A.; Heiss, E.; Gamal-Eldeen, A.; Klimo, K.; Knauft, J.; Neumann, I.; Scherf, H.-R.; Frank, N.; Bartsch, H.; Becker, H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 959–69.
242. Pan, L.; Becker, H.; Gerhäuser, C. Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor and mitochondrial pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 837–43.
243. Grimm, E.; Ellerhorst, J.; Tang, C.; Ekmekcioglu, S. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2008**, *19*, 133–7.
244. Ekmekcioglu, S.; Ellerhorst, J.; Smid, C.M.; Prieto, V.G.; Munsell, M.; Buzaid, A.C.; Grimm, E.A. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4768–75.
245. Tang, C.; Grimm, E. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 288–98.
246. Shalini, S.; Dorstyn, L.; Dawar, S.; Kumar, S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 526–39.
247. Koo, J.; Kim, H.; Yoon, H.; Kwon, K.; Choi, I.; Jung, S.; Kim, H.; Park, B.; Park, J. Effect of xanthohumol on melanogenesis in B16 melanoma cells. *Exp. Mol. Med.* **2008**, *40*, 313–9.
248. Roméro-Graillet, C.; Aberdam, E.; Biagoli, N.; Massabni, W.; Ortonne, J.; Ballotti, R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28052–6.
249. Roméro-Graillet, C.; Aberdam, E.; Clément, M.; Ortonne, J.; Ballotti, R. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 635–42.
250. Horikoshi, T.; Nakahara, M.; Kaminaga, H.; Sasaki, M.; Uchiwa, H.; Miyachi, Y. Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res.* **2000**, *13*, 358–63.
251. Sasaki, M.; Horikoshi, T.; Uchiwa, H.; Miyachi, Y. Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2000**, *13*, 248–52.
252. Sasaki, M.; Kizawa, K.; Igarashi, S.; Horikoshi, T.; Uchiwa, H.; Miyachi, Y. Suppression of melanogenesis by induction of endogenous intracellular metallothionein in human melanocytes. *Exp. Dermatol.* **2004**, *13*, 465–71.
253. Funasaka, Y.; Komoto, M.; Ichihashi, M. Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* **2000**, *13*, 170–4.
254. Funasaka, Y.; Chakraborty, A.; Komoto, M.; Ohashi, A.; Ichihashi, M. The depigmenting

- effect of alpha-tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* **1999**, *141*, 20–9.
255. Sies, H.; Stahl, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 173–200.
256. Stahl, W.; Sies, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37*, 26–30.
257. Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 33–45.
258. Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 254–67.
259. Visvader, J.; Lindeman, G. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 755–68.
260. Ikeya, M.; Lee, S.; Johnson, J.; McMahon, A.; Takada, S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **1997**, *389*, 966–70.
261. Hari, L.; Brault, V.; Kléber, M.; Lee, H.; Ille, F.; Leimeroth, R.; Paratore, C.; Suter, U.; Kemler, R.; Sommer, L. Lineage-specific requirements of beta-catenin in neural crest development. *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 867–80.
262. Larue, L.; Delmas, V. The Wnt/beta-catenin pathway in melanoma. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 733–42.
263. Sinnberg, T.; Menzel, M.; Ewerth, D.; Sauer, B.; Schwarz, M.; Schaller, M.; Garbe, C.; Schittek, B. β -Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS One* **2011**, *6*, e23429.
264. Liu, Z.; Xiao, M.; Balint, K.; Smalley, K.; Brafford, P.; Qiu, R.; Pinnix, C.; Li, X.; Herlyn, M. Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4182–90.
265. Melnikova, V.; Bolshakov, S.; Walker, C.; Ananthaswamy, H. Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene* **2004**, *23*, 2347–56.
266. Pitt, S.; Chen, H.; Kunnimalaiyaan, M. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling suppresses tumor cell proliferation and neuroendocrine marker expression in GI carcinoid tumors. *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16*, 2936–42.
267. Buscà, R.; Bertolotto, C.; Ortonne, J.; Ballotti, R. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31824–30.
268. Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Mojić, M.; Timotijević, G.; Miljković, Đ.; Mangano, K.; Donia, M.; Di Cataldo, A.; Al-Abed, Y.; Cheng, K.; Stosić-Grujičić, S.; Nicoletti, F. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 1803–12.
269. Radović, J.; Maksimović-Ivanić, D.; Timotijević, G.; Popadić, S.; Ramić, Z.; Trajković, V.; Miljković, Đ.; Stosić-Grujičić, S.; Mijatović, S. Cell-type dependent response of melanoma

cells to aloe emodin. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 3181–9.

270. Kim, T.; Lee, J.; Song, S.; Choi, J.; Choi, C.; Kim, B.; Lee, J.; Bae, D. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 1678–82.
271. Meng, L.; Tao, H.; Dong, G.; Yang, T.; Zhang, W.; Zhu, W.; Huang, C. ERK1/2 and Akt pathway activated during (3R,6R)-bassiatin(1)-induced apoptosis in MCF-7 cells. *Cell Biol. Int.* **2012**, *36*, 345–8.
272. Ou, Y.; Yang, C.; Cheng, C.; Raung, S.; Hung, Y.; Chen, C. Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *563*, 49–60.
273. Tada, K.; Kawahara, K.; Matsushita, S.; Hashiguchi, T.; Maruyama, I.; Kanekura, T. MK615, a Prunus mume Steb. Et Zucc ('Ume') extract, attenuates the growth of A375 melanoma cells by inhibiting the ERK1/2-Id-1 pathway. *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 833–8.
274. Albin, A.; Dell'Eva, R.; Vené, R.; Ferrari, N.; Buhler, D.; Noonan, D.; Fassina, G. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *FASEB J.* **2006**, *20*, 527–9.
275. Mijatović, S.; Maksimović-Ivanić, D.; Radović, J.; Miljković, Đ.; Harhaji, L.; Vučković, O.; Stosić-Grujičić, S.; Mostarica Stojković, M.; Trajković, V. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 589–98.
276. Bulatović, M.; Maksimović-Ivanić, D.; Bensing, C.; Gómez-Ruiz, S.; Steinborn, D.; Schmidt, H.; Mojić, M.; Korać, A.; Golić, I.; Pérez-Quintanilla, D.; Momčilović, M.; Mijatović, S.; Kaluđerović, G. Organotin(IV)-loaded mesoporous silica as a biocompatible strategy in cancer treatment. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 5982–7.
277. Pearce, L.; Alton, G.; Richter, D.; Kath, J.; Lingardo, L.; Chapman, J.; Hwang, C.; Alessi, D. Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem. J.* **2010**, *431*, 245–55.
278. Ruvinsky, I.; Meyuhas, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 342–8.
279. Fenton, T.; Gout, I. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 47–59.
280. Viola, K.; Kopf, S.; Rarova, L.; Jarukamjorn, K.; Kretschy, N.; Teichmann, M.; Vonach, C.; Atanasov, A.G.; Giessrigl, B.; Huttary, N.; Raab, I.; Krieger, S.; Strnad, M.; de Martin, R.; Saiko, P.; Szekeres, T.; Knasmüller, S.; Dirsch, V.M.; Jäger, W.; Grusch, M.; Dolznig, H.; Mikulits, W.; Krupitza, G. Xanthohumol attenuates tumour cell-mediated breaching of the lymphendothelial barrier and prevents intravasation and metastasis. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1301–12.
281. Zhang, W.; Tang, B.; Huang, Q.; Hua, Z. Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 152–61.
282. Hamidi, H.; Ivaska, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 533–48.
283. Kacsinta, A.D.; Rubenstein, C.S.; Sroka, I.C.; Pawar, S.; Gard, J.M.; Nagle, R.B.; Cress, A.E. Intracellular modifiers of integrin alpha 6p production in aggressive prostate and breast

cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *454*, 335–40.

284. Ruiz, P.; Dunon, D.; Sonnenberg, A.; Imhof, B.A. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for $\alpha 6$ integrins. *Cell Adhes. Commun.* **1993**, *1*, 67–81.
285. Lee, T.-H.; Seng, S.; Li, H.; Kennel, S.J.; Avraham, H.K.; Avraham, S. Integrin regulation by vascular endothelial growth factor in human brain microvascular endothelial cells: role of $\alpha 6\beta 1$ integrin in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 40450–60.
286. Ramos, D.; Berston, E.; Kramer, R. Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 728–34.
287. Lathia, J.D.; Gallagher, J.; Heddleston, J.M.; Wang, J.; Eyler, C.E.; MacSwords, J.; Wu, Q.; VasANJI, A.; McLendon, R.E.; Hjelmeland, A.B.; Rich, J.N. Integrin $\alpha 6$ regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* **2010**, *6*, 421–32.
288. Mitra, S.; Hanson, D.; Schlaepfer, D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 56–68.
289. Mitra, S.; Schlaepfer, D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 516–23.
290. Schaller, M. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 1007–13.
291. McLean, G.; Carragher, N.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V.; Frame, M. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 505–15.
292. Schlaepfer, D.; Mitra, S.; Ilic, D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1692*, 77–102.
293. Chatzizacharias, N.; Kouraklis, G.; Theocharis, S. Focal adhesion kinase: a promising target for anticancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 1315–28.
294. Hess, A.R.; Hendrix, M.J. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 478–80.
295. Hess, A.R.; Postovit, L.-M.; Margaryan, N. V; Seftor, E.A.; Schneider, G.B.; Seftor, R.E.B.; Nickoloff, B.J.; Hendrix, M.J. Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9851–60.
296. Kolli-Bouhafs, K.; Sick, E.; Noulet, F.; Gies, J.-P.; De Mey, J.; Rondé, P. FAK competes for Src to promote migration against invasion in melanoma cells. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1379.
297. Pei, G.; Lan, Y.; Chen, D.; Ji, L.; Hua, Z.-C. FAK regulates E-cadherin expression via p-SrcY416/p-ERK1/2/p-Stat3Y705 and PPAR γ /miR-125b/Stat3 signaling pathway in B16F10 melanoma cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 13898–908.
298. Cui, S.; Wang, J.; Wu, Q.; Qian, J.; Yang, C.; Bo, P. Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. *Oncotarget* **2017**, *8*, 21674–91.
299. Huang, Y.T.; Lee, L.T.; Lee, P.P.H.; Lin, Y.S.; Lee, M.T. Targeting of focal adhesion kinase

- by flavonoids and small-interfering RNAs reduces tumor cell migration ability. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 2017–25.
300. Sanz-Moreno, V.; Marshall, C.J. Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1484–7.
 301. Narumiya, S.; Tanji, M.; Ishizaki, T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 65–76.
 302. Barrio-Real, L.; Kazanietz, M. Rho GEFs and cancer: linking gene expression and metastatic dissemination. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, pe43.
 303. Bravo-Cordero, J.; Oser, M.; Chen, X.; Eddy, R.; Hodgson, L.; Condeelis, J. A novel spatiotemporal RhoC activation pathway locally regulates cofilin activity at invadopodia. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 635–44.
 304. Sadok, A.; McCarthy, A.; Caldwell, J.; Collins, I.; Garrett, M.D.; Yeo, M.; Hooper, S.; Sahai, E.; Kuemper, S.; Mardakheh, F.K.; Marshall, C.J. Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2272–84.
 305. Miller, N.; Kleinschmidt, E.; Schlaepfer, D. RhoGEFs in cell motility: novel links between Rgnef and focal adhesion kinase. *Curr. Mol. Med.* **2014**, *14*, 221–34.
 306. Konstantinidou, G.; Ramadori, G.; Torti, F.; Kangasniemi, K.; Ramirez, R.; Cai, Y.; Behrens, C.; Dellinger, M.; Brekken, R.; Wistuba, I.; Heguy, A.; Teruya-Feldstein, J.; Scaglioni, P. RHOA-FAK is a required signaling axis for the maintenance of KRAS-driven lung adenocarcinomas. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 444–57.
 307. Bays, J.L.; DeMali, K.A. Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 2999–3009.
 308. Guo, C.; Liu, S.; Wang, J.; Sun, M.-Z.; Greenaway, F.T. ACTB in cancer. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *417*, 39–44.
 309. Rockey, D.C.; Weymouth, N.; Shi, Z. Smooth muscle α actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One* **2013**, *8*, e77166.
 310. Nanda, S. High stromal expression of α -smooth-muscle actin correlates with aggressive pancreatic cancer biology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 652–652.
 311. Yamashita, M.; Ogawa, T.; Zhang, X.; Hanamura, N.; Kashikura, Y.; Takamura, M.; Yoneda, M.; Shiraishi, T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer* **2012**, *19*, 170–6.
 312. Tsukamoto, H.; Mishima, Y.; Hayashibe, K.; Sasase, A. Alpha-smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment cell tumors. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *98*, 116–20.
 313. Lee, H.W.; Park, Y.M.; Lee, S.J.; Cho, H.J.; Kim, D.-H.; Lee, J.-I.; Kang, M.-S.; Seol, H.J.; Shim, Y.M.; Nam, D.-H.; Kim, H.H.; Joo, K.M. Alpha-smooth muscle actin (ACTA2) is required for metastatic potential of human lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5879–89.
 314. Dundr, P.; Povýsil, C.; Tvrdík, D. Actin expression in neural crest cell-derived tumors including schwannomas, malignant peripheral nerve sheath tumors, neurofibromas and

melanocytic tumors. *Pathol. Int.* **2009**, *59*, 86–90.

315. Nair, N.; Calle, A.S.; Zahra, M.H.; Prieto-Vila, M.; Oo, A.K.K.; Hurley, L.; Vaidyanath, A.; Seno, A.; Masuda, J.; Iwasaki, Y.; Tanaka, H.; Kasai, T.; Seno, M. A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6838.
316. Fasinu, P.; Bouic, P.; Rosenkranz, B. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 69.
317. Tang, D.; Kang, R.; Zeh III, H.J.; Lotze, M.T. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2010**, *1799*, 131–40.
318. Li, Q.; Li, J.; Wen, T.; Zeng, W.; Peng, C.; Yan, S.; Tan, J.; Yang, K.; Liu, S.; Guo, A.; Zhang, C.; Su, J.; Jiang, M.; Liu, Z.; Zhou, H.; Chen, X. Overexpression of HMGB1 in melanoma predicts patient survival and suppression of HMGB1 induces cell cycle arrest and senescence in association with p21 (Waf1/Cip1) up-regulation via a p53-independent, Sp1-dependent pathway. *Oncotarget* **2014**, *5*, 6387–403.
319. Huber, R.; Meier, B.; Otsuka, A.; Fenini, G.; Satoh, T.; Gehrke, S.; Widmer, D.; Levesque, M.P.; Mangana, J.; Kerl, K.; Gebhardt, C.; Fujii, H.; Nakashima, C.; Nonomura, Y.; Kabashima, K.; Dummer, R.; Contassot, E.; French, L.E. Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-1 and M2-like macrophages. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29914.
320. Petersson, S.; Shubbar, E.; Enerbäck, L.; Enerbäck, C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res.* **2009**, *19*, 215–25.
321. Nakajima, T.; Watanabe, S.; Sato, Y.; Kameya, T.; Shimosato, Y.; Ishihara, K. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer* **1982**, *50*, 912–8.
322. Ohsie, S.; Sarantopoulos, G.; Cochran, A.; Binder, S. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J. Cutan. Pathol.* **2008**, *35*, 433–44.
323. Zubovits, J.; Buzney, E.; Yu, L.; Duncan, L. HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum. Pathol.* **2004**, *35*, 217–23.
324. de Vries, T.J.; Smeets, M.; de Graaf, R.; Hou-Jensen, K.; Bröcker, E.B.; Renard, N.; Eggermont, A.M.; van Muijen, G.N.; Ruiter, D.J. Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional, lymph node, and visceral metastases: implications for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Cooperative Group. *J. Pathol.* **2001**, *193*, 13–20.
325. Ordóñez, N. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. *Hum. Pathol.* **2014**, *45*, 191–205.
326. Lange, J.R.; Fecher, L.A.; Sharfman, W.H.; Alani, R.M.; Mikkilineni, R.; Topalian, S.L.; Balch, C.M. Part III - Specific malignancies, Chapter 73 - Melanoma. In *Abeloff's Clinical Oncology*; Abeloff, M.D., Armitage, J.O., Niederhuber, J.E., Kastan, M.B., McKenna, G.W., Eds.; Elsevier Health Sciences, 2008; p. 2592.
327. Biernacka, A.; Linos, K.; DeLong, P.; Suriawinata, A.; Padmanabhan, V.; Liu, X. A case of S-100 negative melanoma: A diagnostic pitfall in the workup of a poorly differentiated metastatic tumor of unknown origin. *Cytojournal* **2016**, *13*, 21.

328. Aisner, D.; Maker, A.; Rosenberg, S.; Berman, D. Loss of S100 antigenicity in metastatic melanoma. *Hum. Pathol.* **2005**, *36*, 1016–9.
329. Argényi, Z.; Cain, C.; Bromley, C.; Nguyen, A.; Abraham, A.; Kerschmann, R.; Leboit, P. S-100 protein-negative malignant melanoma: fact or fiction? A light-microscopic and immunohistochemical study. *Am. J. Dermatopathol.* **1994**, *16*, 233–40.
330. Higashiyama, M.; Okami, J.; Maeda, J.; Tokunaga, T.; Fujiwara, A.; Kodama, K.; Imamura, F.; Kobayashi, H. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: In vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). *J. Thorac. Dis.* **2012**, *4*, 40–7.
331. Demetri, G.; Fletcher, C.; Mueller, E.; Sarraf, P.; Naujoks, R.; Campbell, N.; Spiegelman, B.; Singer, S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 3951–6.
332. Grosso, F.; Jones, R.; Demetri, G.; Judson, I.; Blay, J.; Le Cesne, A.; Sanfilippo, R.; Casieri, P.; Collini, P.; Dileo, P.; Spreafico, C.; Stacchiotti, S.; Tamborini, E.; Tercero, J.; Jimeno, J.; D'Incalci, M.; Gronchi, A.; Fletcher, J.; Pilotti, S.; Casali, P. Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet. Oncol.* **2007**, *8*, 595–602.
333. Sherman, E.; Fury, M.; Tuttle, R.; Ghossein, R.; Stambuk, H.; Baum, M.; Lisa, D.; Su, Y.; Shaha, A.; Pfister, D. Phase II study of depsipeptide (DEP) in radioiodine (RAI)-refractory metastatic nonmedullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 6059.
334. Legette, L.; Karnpracha, C.; Reed, R.; Choi, J.; Bobe, G.; Christensen, J.; Rodriguez-Proteau, R.; Purnell, J.; Stevens, J. Human pharmacokinetics of xanthohumol, an antihyperglycemic flavonoid from hops. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 248–55.
335. Legette, L.; Ma, L.; Reed, R.; Miranda, C.; Christensen, J.; Rodriguez-Proteau, R.; Stevens, J. Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 466–74.
336. Schaefer, O.; Bohlmann, R.; Schleuning, W.; Schulze-Forster, K.; Hümpel, M. Development of a radioimmunoassay for the quantitative determination of 8-prenylnaringenin in biological matrices. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2881–9.
337. Fukizawa, S.; Yamashita, M.; Wakabayashi, K.; Fujisaka, S.; Tobe, K.; Nonaka, Y.; Murayama, N. Anti-obesity effect of a hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol in a high-fat diet-induced obese mouse model. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* **2020**, *39*, 175–82.
338. Vanhoecke, B.W.; Delporte, F.; Van Braeckel, E.; Heyerick, A.; Depypere, H.T.; Nuytinck, M.; De Keukeleire, D.; Bracke, M.E. A safety study of oral tangeretin and xanthohumol administration to laboratory mice. *In Vivo (Brooklyn)*. **2005**, *19*, 103–7.
339. Dorn, C.; Bataille, F.; Gaebele, E.; Heilmann, J.; Hellerbrand, C. Xanthohumol feeding does not impair organ function and homeostasis in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1890–7.

BIOGRAFIJA AUTORA

Tamara Krajnović je rođena 19. aprila 1986. godine u Kotoru, Crna Gora. Školske 2005/2006. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne studije je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,06. Diplomski rad pod nazivom „Ispitivanje dejstva inhibitora faktora inhibicije migracije makrofaga na preživljavanje ćelija pacovskog insulinoma RIN5mF u *in vitro* uslovima“ uradila je u laboratoriji Odeljenja za imunologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju pod mentorstvom dr Ivane Cvetković i dr Biljane Božić i odbranila ga 09. jula 2013. godine sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je školske 2013/2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Molekularna onkologija. Zaposlena je kao istraživač pripravnik na Odeljenju za imunologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ 19. maja 2014. godine, a zvanje istraživač saradnik stiče 29. januara 2015. godine. Kao student na razmeni u okviru 3 DAAD projekta (2014/2016, 2016/2018, 2018/2020), boravila je ukupno 5 puta po mesec dana na Leibniz Institutu za biljnu biohemiju Martin-Luter-Univerziteta u Haleu, Nemačka. Takođe je boravila na „Saxonian Incubator for Clinical Translation“ (SIKT) Institutu Univerziteta u Lajpcigu, Nemačka 2018. godine u okviru Erasmus+ internacionalnog projekta za visoko obrazovane studente i osoblje. Tamara Krajnović je do danas autor/koautor 12 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 8 saopštenja na skupovima međunarodnog i 2 na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, u časopisima M21 i M21a kategorije.