

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija S. Mojić

ANALIZA ANTITUMORSKOG  
DELOVANJA AGENASA  
MODIFIKOVANIH AZOT-MONOKSIDOM,  
SAKVINAVIR-NO I GIT-27NO NA  
KANCERU KOLONA IN VITRO I IN VIVO

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija S. Mojić

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF  
ANTITUMOR ACTIVITY OF NO-  
MODIFIED COMPOUNDS, SAQUINAVIR-  
NO AND GIT-27NO IN COLON CANCER

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **MENTORI**

dr Sanja Mijatović, viši naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **KOMISIJA**

dr Sanja Mijatović, viši naučni saradnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Danijela Maksimović-Ivanić, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

dr Stanislava Stošić-Grujičić, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerzitet u Beogradu

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, 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.

***Hvala vam:***

Dr Sanji Mijatović, mojoj mentorki, ogromnu zahvalnost dugujem na prvim naučnim koracima, na pomoći u eksperimentalnom radu i prilikom pisanja ove teze, na bodrenju i ne dopuštanju da potonem, na strpljenju, na većitom preispitivanju, na dugim razgovorima, na insistiranju da uvek težim ka boljem – i kao naučnik i kao čovek, a najviše na tome što mi je bila veliki prijatelj svih ovih godina.

Dr Danijeli Maksimović-Ivanić, mojoj nezvaničnoj mentorki, sam posebno zahvalna na njenoj nepresušnoj energiji koja me je gurala kroz najteža razdoblja u izradi ove teze, na svim eksperimentima koje smo zajedno uz smeh uradile u trećoj smeni, na svim tako nesebično pruženim savetima, na strpljenju i nestrpljenju, na veri (i zahtevanju) da uvek mogu više i bolje, a najviše na prijateljstvu.

Zahvaljujem se dr Đorđu Miljkoviću na njegovom strpljenju, na svemu što me je naučio i podstakao da naučim, na svim prijateljskim savetima i nesebično pruženoj pomoći.

Dr Stanislavi Stošić-Grujičić dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, na brizi i na savetima koji su unapredili ovu doktorsku disertaciju.

Zahvaljujem se dr Gordani Matić na korisnim savetima prilikom izrade doktorske disertacije i na oceni ovog rada.

Mojoj kolegini i prijateljici, Jeleni Marković dugujem veliku zahvalnost za podršku i pomoć koju mi je nesebično pružala od samog početka rada na doktorskoj tezi.

Koleginici dr Ivani Mirkov veliku zahvalnost dugujem za pomoć u izvođenju eksperimenata *in vivo*.

Zahvaljujem se kolegama sa Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na toleranciji, razumevanju, prijateljskom pomaganju i prijatnom vremenu provedenom sa njima, kao i kolegama sa Odeljenja za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ na korisnim savetima i nesebičnoj pomoći koju su mi pružili u izvođenju eksperimenata.

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojoj mami i mom Radošu, koji su moja najveća podrška i čija ljubav daje smisao svim mojim uspesima.*

**Analiza antitumorskog delovanja agenasa modifikovanih azot-monoksidom,  
sakvinavir-NO i GIT-27NO na kanceru kolona *in vitro* i *in vivo***

SAŽETAK

Iz poznate uzročno-posledične veze infekcije i inflamacije, s jedne strane i karcinogeneze i progresije tumora, s druge strane, proistekla je ideja o upotrebi anti-inflamatornih i anti-infektivnih agenasa u terapiji kancera. Međutim, problem gastrotoksičnosti anti-inflamatornih, kao i generalne toksičnosti anti-viralnih lekova uz činjenicu da je reč o agensima niske biološke iskoristljivosti, ozbiljne su barijere u razmatranju njihove primene u terapiji bolesti za koje inicijalno nisu namenjeni. Kako bi se prevazišla farmakološka ograničenja pomenutih jedinjenja, a imajući u vidu poznato svojstvo azot-monoksida (NO) da neutrališe toksičnost supstanci na različitim nivoima, anti-inflamatornom agensu VGX-1027 i anti-retroviralnom agensu sakvinaviru (Saq) adekvatnom hemijskom intervencijom je dodata grupa dizajnirana da donira NO. Prednost novodobijenih jedinjenja GIT-27NO i Saq-NO nad poznatim nesteroidnim anti-inflamatornim agensima modifikovanim kovalentnim vezivanjem NO (NO-NSAID) je odsustvo molekula “nosača”, koji je inače odgovoran za genotoksičnost NO-NSAID. Strukturna promena ova dva jedinjenja doprinela je njihovom snažnom antitumorskom svojstvu, što je potvrđeno brojnim *in vitro* i *in vivo* studijama, uz umanjenu toksičnost u slučaju GIT-27NO ili potpunom gubitku toksičnosti Saq-NO tretmana. U ovoj studiji je po prvi put ispitano antitumorsko delovanje GIT-27NO i Saq-NO *in vitro* i *in vivo* na modelu kancera kolona, jednog od najtežih formi maligniteta. Kako su oba agensa NO-derivati, definisana je uloga NO u njihovom antitumorskom delovanju. Na molekularnom nivou, determinisani su glavni unutarćelijski događaji pokrenuti u odgovoru na tretman pomenutim jedinjenjima. Na kraju, imajući u vidu značaj mikrosredine za rast i progresiju tumora, ispitana je sposobnost GIT-27NO i Saq-NO da povrate osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom.

GIT-27NO i Saq-NO smanjuju vijabilitet ćelijskih linija kancera kolona CT26CL25 poreklom od miša, i HCT116 poreklom od čoveka, *in vitro* i *in vivo*, ali je značaj otpuštanja NO za antitumorsko delovanje ovih supstanci potpuno različit. Dok je pad vijabiliteta ćelija tretiranih sa GIT-27NO posledica visoke unutarćelijske koncentracije NO i konsekvantno generisanog oksidativnog i nitrozativnog stresa, antitumorsko delovanje Saq-NO nije posredovano oslobađanjem kvantitativno značajnih koncentracija ovog slobodnog radikala. Kod ćelija kancera kolona, GIT-27NO indukuje akumulaciju tumor supresora p53, promenu ravnoteže pro- i antiapoptotskih molekula i depolarizaciju mitohondrijskih membrana što ishoduje pokretanjem ćelijske smrti apoptozom zavisnom od kaspaza. Nasuprot njemu, tretman ćelija kancera kolona sa Saq-NO rezultovao je trajnom inhibicijom proliferacije i smanjenjem metastatskog potencijala *in vitro* i *in vivo*. U osnovi uočenog antitumorskog delovanja Saq-NO nalazi se snažna inhibicija fosforilacije ribozomalnog S6 proteina koja korelira sa prolaznom aktivacijom Akt, akumulacijom tumor supresora p53 i smanjenjem ekspresije ciklina D3. Za razliku od GIT-27NO, Saq-NO je pokazao sposobnost da vrati osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom, ukidajući rezistenciju na membranskom i unutarćelijskom nivou kroz povećanje membranske ekspresije DR5 receptora i smanjenje nivoa XIAP.

Opšte uzev, sa rezultatima ove doktorske disertacije zaokružena su preklinička ispitivanja GIT-27NO i Saq-NO i trasiran je put ka kliničkim ispitivanjima pomenutih agenasa na pacijentima obolelim od kancera kolona.

**Ključne reči:** kancer kolona, hemioterapija, GIT-27NO, Saq-NO, apoptoza, metastaze, S6 protein, TRAIL

**Naučna oblast:** Biologija tumora

**Uža naučna oblast:** Imunoonkologija

**UDK broj:** [615.276 + 615.281.8]:616-006.6 (043.3)



***In vitro* and *in vivo* evaluation of antitumor activity of NO-modified compounds,  
saquinavir-NO and GIT-27NO in colon cancer**

ABSTRACT

Concept of using anti-inflammatory and anti-infectious agents in cancer therapy is based on a known relationship between inflammation and infection on one side and carcinogenesis and tumor progression on the other side. However, the problem of gastrototoxicity of anti-inflammatory and general toxicity of antiviral drugs, along with their low bioavailability, marks a strong barrier when considering them in therapies for which they were not initially intended for. In order to overcome the pharmacological limits of these compounds, nitric-oxide (NO) with its documented feature to neutralize toxicity of drugs on various levels was added to anti-inflammatory agent VGX-1027 and antiretroviral agent saquinavir (Saq). The advantage of new compounds, GIT-27NO and Saq-NO, over known non-steroid anti-inflammatory agents modified by covalent binding NO moiety (NO-NSAID) is the absence of “carrier” molecule, which is responsible for genotoxicity of NO-NSAID. Structural change in these compounds resulted in potentiation of antitumor action, confirmed by numerous *in vitro* and *in vivo* studies, along with reduced toxicity of GIT-27NO or complete loss of toxicity of Saq-NO treatment.

In this study, antitumor potential of GIT-27NO and Saq-NO was tested *in vitro* and *in vivo* for the first time in colon cancer model, one of the most severe forms of malignancy. As both agents are NO-derivates, the role of NO in their antitumor action was defined. On molecular level, main intercellular events triggered by the treatment were determined. Finally, considering the importance of microenvironment for tumor growth and progression, the ability of GIT-27NO and Saq-NO to re-establish colon cancer cell sensitivity to TRAIL-mediated antitumor immune response was tested.

GIT-27NO and Saq-NO reduced the viability of mouse CT26CL25 and human HCT116 colon cancer cell lines, both *in vitro* and *in vivo*. The importance of NO release for antitumor action was quite different. While cell viability reduction under GIT-27NO treatment was due to accumulation of high intracellular concentration of NO and

consecutively generated oxidative and nitrosative stress, antitumor action of Saq-NO was not mediated by a release of quantitatively relevant amount of this free radical. GIT-27NO induced the accumulation of p53 tumor suppressor, changed pro- and antiapoptotic molecule ratio and triggered mitochondrial membrane depolarization which resulted in cell death via caspase-dependent apoptosis.

Opposite to GIT-27NO, Saq-NO treatment of colon cancer cells resulted in permanent inhibition of cell proliferation and reduction of metastatic potential, demonstrated *in vitro* and *in vivo*. Strong inhibition of ribosomal S6 protein phosphorylation that correlates with transient Akt activation, accumulation of p53 tumor suppressor and a reduction in cyclin D3 expression were found to be responsible for Saq-NO antitumor action. Unlike GIT-27NO, Saq-NO demonstrated the ability to reestablish colon cancer cell sensitivity to TRAIL-mediated antitumor immune response, canceling the resistance on both membrane and intracellular level by restoring the presence of DR5 receptor and reducing the expression of XIAP.

To conclude, this doctoral dissertation summarizes preclinical research of GIT-27NO and Saq-NO and sets the road for further clinical research on colon cancer patients.

**Keywords:** colon cancer, chemotherapy, GIT-27NO, Saq-NO, apoptosis, metastasis, S6 protein, TRAIL

**Research area:** Tumor biology

**Area of special interest:** Immunooncology

**UDC number:** [615.276 + 615.281.8]:616-006.6 (043.3)

<b>Sadržaj</b>	<b>strana</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Kancer kolona.....	1
1.2. Incidenca i uzroci nastanka kancera kolona.....	3
1.3. Terapija kancera kolona.....	6
1.4. Prevencija kancera kolona.....	7
1.5. Antitumorsko delovanje azot-monoksida .....	9
1.6. VGX-1027 i GIT-27NO.....	10
1.7. Sakvinavir (Saq) i Saq-NO.....	12
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>17</b>
3.1. Reagensi.....	17
3.2. Rastvori.....	20
3.3. Kulture ćelija.....	21
3.4. Eksperimentalne životinje.....	22
3.5. Primenjene metode.....	22
3.5.1. Tripsinizacija ćelija.....	22
3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija.....	23
3.5.3. Priprema ćelijskih kultura.....	23
3.5.4. Merenje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura.....	24
3.5.5. Evaluacija vijabiliteta ćelija kristal violet testom.....	24

3.5.6. Fluorimetrija i protočna citofluorimetrija.....	25
3.5.6.1. Analiza ćelijskog ciklusa.....	26
3.5.6.2. Analiza stope ćelijskih deoba.....	27
3.5.6.3. Detekcija rano apoptotičnih ćelija.....	28
3.5.6.4. Detekcija aktivisanih formi kaspaza.....	29
3.5.6.5. Merenje membranskog potencijala mitohondrija.....	29
3.5.6.6. Detekcija autofagije bojenjem ćelija akridin-oranžom.....	30
3.5.6.7. Merenje količine unutarćelijskog azot-monoksida.....	30
3.5.6.8. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta.....	31
3.5.6.9. Određivanje membranske ekspresije DR5 receptora.....	31
3.5.7. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK.....	32
3.5.8. Reakcija reverzne transkripcije.....	33
3.5.9. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu.....	33
3.5.10. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju.....	35
3.5.11. Imunoblot analiza za određivanje količine proteina.....	35
3.5.12. Imunocitohemijsko bojenje.....	36
3.5.13. Tretman ćelija u „trodimenzionalnoj“ kulturi.....	37
3.5.14. Esej za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija.....	38
3.5.15. Eseji za kvantifikovanje migracije i invazije ćelija <i>in vitro</i> .....	39
3.5.16. Indukcija kancera kolona i tretman životinja.....	39
3.5.17. Indukcija plućnih metastaza kancera kolona.....	40
3.6. Analiza izobologramom.....	41
3.7. Statistička obrada podataka.....	41

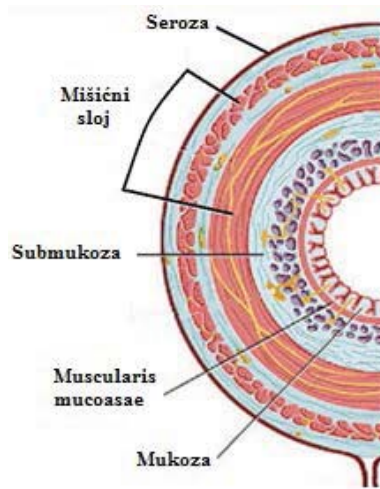
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>42</b>
4.1. Ispitivanje uloge NO-modifikacije u ostvarivanju antitumorskog delovanja GIT-27NO i Saq-NO.....	42
4.1.1. GIT-27NO i Saq-NO smanjuju vijabilitet ćelija kancera kolona <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	42
4.1.2. Različita uloga azot-monoksida u antitumorskom delovanju GIT-27NO i Saq-NO.....	45
4.2. Ispitivanje mehanizma u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija kancera kolona tretiranih NO-modifikovanim agensima.....	51
4.2.1. Mehanizam u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija tretiranih GIT-27NO.....	51
4.2.1.1. GIT27NO indukuje apoptozu HCT116 i CT26CL25 ćelija.....	51
4.2.1.2. Tretman GIT-27NO dovodi do akumulacije tumor supresora p53.....	54
4.2.1.3. GIT-27NO remeti ravnotežu pro- i anti-apoptotskih molekula i dovodi do kolapsa membranskog potencijala mitohondrija CT26CL25 ćelija.....	55
4.2.1.4. GIT-27NO indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza.....	57
4.2.2. Mehanizam antitumorskog delovanja Saq-NO.....	59
4.2.2.1. Saq-NO ne smanjuje vijabilitet kancera kolona indukcijom ćelijske smrti.....	59
4.2.2.2. Saq-NO trajno inhibira proliferaciju ćelija kancera kolona.....	61
4.2.2.3. Saq-NO smanjuje metastatski potencijal ćelija kancera kolona <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> .....	62

4.2.2.4. Saq i Saq-NO različito regulišu ekspresiju i post-translacionu modifikaciju proteina bitnih za inhibiciju proliferacije i smanjenje metastatskog potencijala ćelija kancera kolona.....	67
4.3. Ispitivanje uticaja GIT-27NO i Saq-NO na osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom.....	72
4.3.1. Saq-NO vraća osetljivost HCT116 ćelija na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom.....	72
4.3.2. GIT-27NO ne ukida rezistenciju HCT116 ćelija na apoptozu pokrenutu TRAIL molekulom.....	75
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>77</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>95</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>96</b>

# **1. UVOD**

## 1.1. Kancer kolona

Kolon anatomski pripada debelom crevu i predstavlja mesto na kome dolazi do finalne apsorpcije vode i soli, čime se u telu reguliše balans brojnih jona. Zid zdravog kolona je izgrađen od 5 slojeva: mukoza koju grade epitelne ćelije, *muscularis mucosae*, submukoza bogata krvnim sudovima, mišićni sloj zadužen za pravilno kretanje hrane kroz trakt i poslednji sloj - seroza (slika 1) (Ross i Pawlina, 2006).

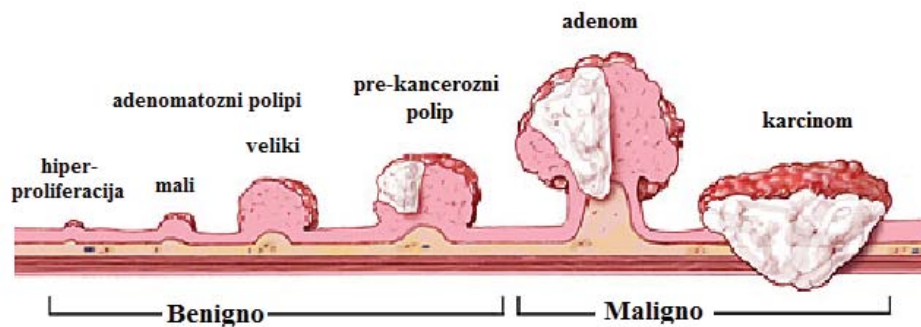


Slika 1. Građa zida kolona

(Preuzeto sa internet stranice <http://www.hopkinscoloncancercenter.org>)

Kao posledica neoplastične transformacije dolazi do intenzivirane proliferacije epitelnih ćelija kolona, što je vidljivo kao polip koji raste u mukozi (slika 2) (Markowitz i Bertagnolli, 2009, Leslie i sar., 2002). Dok je većina polipa benigna, u mukozi kolona su u malom broju prisutni i prekancerozni polipi – izrasline sa malignim ćelijama. Takvi polipi će, ukoliko se na vreme ne detektuju i ne uklone, sasvim izvesno prerasti u adenom (slika 2) (Leslie i sar., 2002). Kod osoba-nosioca nasleđenih mutacija u određenim genima koje ih predisponiraju za razvitak kancera kolona, inicijalni broj ovih prekanceroznih polipa je daleko veći (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Haggard i Boushey, 2009).





**Slika 2. Razvojni put kancera kolona**

(Preuzeto sa internet stranice <http://www.hopkinscoloncancercenter.org>)

Adenom ima tendenciju sporog rasta i može proći čitava decenija pre nego što preraste u formu najvećeg stepena maligniteta- karcinom (Hagggar i Boushey, 2009; Leslie i sar., 2002). Rizik progresije ka karcinomu (slika 2) raste sa veličinom adenoma i vremenom njegovog rasta u kolonu (Shinya i Wolff, 1979). Čelije karcinoma su invazivnijeg fenotipa i sposobne da prodru u dublje slojeve zida kolona gde se nalaze limfni i krvni sudovi, preko kojih kolonizuju limfne čvorove ili udaljene organe, kao što su jetra i pluća (Hagggar i Boushey, 2009).

Radi odabira adekvatnog terapijskog pristupa vrši se rangiranje uznapredovalosti kancera kolona po precizno definisanim stadijumima. Stadijumi se određuju, ne prema veličini tumora, već prema tome da li je i u kojoj meri tumor prodro u zid kolona i da li je metastazirao u limfne čvorove i udaljene organe (Wolpin i Mayer, 2008). Stadijumi takođe imaju prognostički značaj, budući da stepen progresije tumora jasno korelira sa povećanjem stope mortaliteta u periodu od 5 godina po uspostavljanju dijagnoze – ukoliko se kancer nije raširio van kolona stopa preživljavanje je 90 %, dok ta stopa pada na poražavajućih 10 % ukoliko je kancer metastazirao u druge organe (Hagggar i Boushey, 2009).

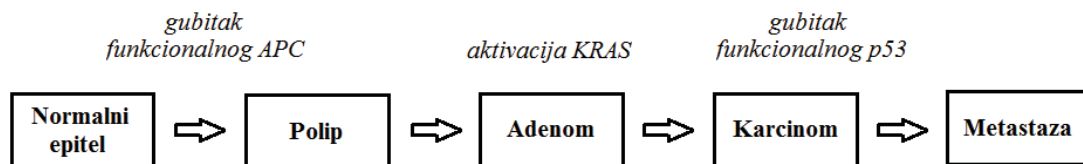
## 1.2. Incidenca i uzroci nastanka kancera kolona

U celokupnoj svetskoj populaciji, oko 20 % svih slučajeva kancera jeste kancer kolona (Hagggar i Boushey, 2009). Sa skoro istom incidencom se javlja kod muškaraca i žena, i nalazi se na visokom drugom mestu iza raka pluća kao uzrok smrti usled razvoja maligniteta (Hagggar i Boushey, 2009; Wolpin i Mayer, 2008). Samo kod 5-10 % obolelih su ustanovljene nasleđene mutacije koje su ih predisponirale za razvitak kancera kolona, dok se kod velike većine on sporadično pojavljuje (Hagggar i Boushey, 2009). Kao i kod drugih tipova tumora, najveći faktor rizika za razvijanje kancera kolona jeste starost – čak 90 % obolelih je starije od 50 godina (Hagggar i Boushey, 2009; Boyle i Leon, 2002). Međutim, ono što je zaista karakteristično za kancer kolona jeste da u njegovom nastanku važnu ulogu imaju faktori spoljašnje sredine. To potvrđuju brojne epidemiološke studije koje su pokazale da ne postoji uniformna distribucija ovog tipa kancera čija je incidenca daleko veća u razvijenim zemljama, sa takozvanim „zapadnom“ kulturom i stilom života (Hagggar i Boushey, 2009; Boyle i Leon, 2002; Le Marchand i sar., 1997). Tako, na primer, migranti iz zemalja koje imaju nisku incidencu kancera kolona (poput Japana) prelaskom u zemlje visokog rizika (Sjedinjene Američke Države) jednako često oboljevaju kao lokalno stanovništvo (Hagggar i Boushey, 2009; Takachi i sar., 2011; Boyle i Leon, 2002). Pod „zapadnim“ načinom života podrazumeva se ishrana koja obiluje nezasićenim mastima i crvenim mesom, a koja je istovremeno siromašna u svežem voću i povrću, zatim brojne loše navike poput manjka fizičke aktivnosti, kao i prekomerne konzumacije alkohola i cigareta (Hagggar i Boushey, 2009; Le Marchand i sar., 1997). Smatra se da bi izmena ovih navika dovela do smanjenja incidence kancera kolona za čak 70 % (Hagggar i Boushey, 2009).

Postoje osobe kod kojih su, i pored zdravih životnih navika, rizik i incidenca oboljevanja od kancera kolona inicijalno visoki. Reč je o ljudima koji su oboleli od inflamatorne bolesti creva, ulcerativnog kolitisa ili Kronove bolesti, kod kojih je rizik povećan čak 20 puta u odnosu na ostatak populacije (Hagggar i Boushey, 2009, Bernstein i sar., 2001). Povećanje rizika posledica je hronične inflamacije digestivnog trakta, koja promovise nastanak mutacija u epitelu kolona i stimuliše dalji rast transformisanih ćelija (Monteleone i sar., 2012; Shacter i Weitzman, 2002; Bernstein i sar., 2001). Pored

inflamatorne bolesti creva i latentna virusna infekcija kolona povećava rizik od nastanka kancera, direktno – uvodeći mutacije, ili indirektno – generišući hronični inflamatorni odgovor (Chen i sar., 2012; Laghi i sar., 1999).

Kao što je prethodno spomenuto, 5-10 % obolelih imaju naslednu bolest, odnosno urođenu genetsku mutaciju koja ih predisponira za razvijanje kancera kolona (Haggar i Boushey, 2009). Kako je karcinogeneza višetepeni proces akumulacije mutacija u onkogenima, tumor supresorskim genima i čuvarima genoma, kao i epigenetskih promena, nosioci ovih mutacija su od rođenja korak bliže ka razvijanju karcinoma (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Hanahan i Weinberg, 2011; Dixon i Koprass, 2004). Reč je o familijarnoj adenomatoznoj polipozi, kod koje je mutiran gen za tumor supresor *APC*, i Linč sindromu, poznatijem kao naslednom nepolipoznom kanceru kolona, kod kojeg mutacije pogađaju gene uključene u reparaciju DNK, *MLH1* and *MSH2* (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Cunningham i sar., 2011). Dodatne mutacije su neophodne za malignu transformaciju, i one se kod većine kancera kolona nalaze u onkogenu *KRAS* i genu za tumor supresor *TP53* (slika 3) (Smith i sar., 2002).



Slika 3. Mutacioni događaji i progresija kancera kolona

*APC* je tumor supresor čiji je gen mutiran kod bolesnika sa familijarnom adenomatoznom polipozom, usled čega oni jako rano razvijaju multiple polipe, a do 40. godine skoro 100% njih razvije kancer kolona (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Smith i sar., 2002). *APC* se često naziva „čuvarom kapije“, budući da sprečava ulazak normalnih epitelnih ćelija kolona u adenom-karcinom progresiju (slika 3) (Smith i sar., 2002). Ovaj tumor supresor je deo kompleksa koji reguliše onkoprotein  $\beta$ -katenin

obeležavajući ga za proteazomalnu degradaciju (Aberle i sar., 1997; Liu i sar., 2002). Kao rezultat mutacije u genu za *APC*, gubi se vezivno mesto za  $\beta$ -katenin, koji stimuliše proliferaciju epitelnih ćelija i indukuje njihovu promenu fenotipa u mezenhimalni, daleko invazivniji tip (Smith i sar., 2002; Kim i sar., 2002; Brabletz i sar., 2005).

*KRAS* je onkogen, deo Raf/RAS/MEK/ERK signalnog puta (Downward, 2003; Chong i sar., 2003), koji se nalazi mutiran u 37% kancera kolona (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Smith i sar., 2002). Reč je o GTPazi koja hidrolizom GTP u GDP reguliše integritet aktinskog citoskeleta, proliferaciju ćelija, diferencijaciju, adheziju, migraciju i apoptozu (Downward, 2003; Chong i sar., 2003). Mutacijom se GTPazna funkcija gubi, usled čega ćelija postaje manje osetljiva na apoptotske signale, povećanog proliferativnog potencijala i veće invazivnosti (slika 3) (Smith i sar., 2002; Downward, 2003; Fang i Richardson, 2005).

Smatra se da je mutacija u genu za *TP53* kasni događaj u tumorigenezi kancera kolona odgovorna za prelazak adenoma u karcinom (slika 3) (Baker i sar., 1990; Smith i sar., 2002). Reč je o tumor supresoru, multifunkcionalnom proteinu, čiji nivo ekspresije trenutno raste kao odgovor na stresnu situaciju, poput oštećenja DNK ili poremećaja metabolizma ćelije. Sposoban je da zaustavi progresiju ćelijskog ciklusa u bilo kojoj fazi radi uklanjanja oštećenja, a ukoliko je šteta prevelika ili nepopravljiva, da pokrene kaskadu programirane ćelijske smrti apoptozom (Kastan i sar., 1995; Sionov i Haupt, 1999; Green i Evan, 2002). Gubitkom funkcionalnog p53 molekula mutiranjem njegovog gena, ćelija postaje neosetljiva na apoptotske signale, daleko invazivnijeg fenotipa i unakrsno rezistentna na delovanje hemioterapeutika, čak i na one sa kojima se nikada nije susrela (Muller i sar., 2011; Golubovskaya i sar., 2010; Lai i sar., 2012).

Po zvaničnom, sad već prestarelom genetskom modelu, akumulacija u navedenim genima (*APC*, *TP53*, *KRAS*) je odgovorna za tranziciju od hiperproliferativnog epitela do adenoma i karcinoma (Smith i sar., 2002; Samowitz i sar., 2007). U međuvremenu su detektovane brojne mutacije u drugim genima, kao na primer u *TGF- $\beta$* , *PTEN* i *EFGR* (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Grady i Markowitz, 2002) zbog čega je postalo jasno da se u osnovi progresije kancera kolona može naći više različitih „genetskih scenarija“.

### 1.3. Terapija kancera kolona

Nakon otkrića da neki polipi koji su smatrani benignim mogu prerasti u kancer kolona, postala je praksa da se prilikom kolonoskopije uklone sve, a ne samo prekancerozne hiperproliferativne izrasline (Shinya i Wolff, 1979; Cohen i Waye, 1986; Buess i sar., 1988). Međutim, ukoliko je tumor prodro u dublje slojeve zida, neizbežna je hirurška intervencija ukljanjanja kolona (Cunningham i sar., 2010). Pored hirurške intervencije, pacijenti se podvrgavaju hemioterapiji sa ciljem eliminacije preostalih, rasutih ćelija kancera i sprečavanja progresije tumora (Cunningham i sar., 2010). Postoji relativno mali broj odobrenih hemioterapeutika za lečenje kancera kolona, čija je delotvornost uslovljena stepenom progresije tumora (Wolpin i Mayer, 2008, Cunningham i sar., 2010; Markowitz i Bertagnolli, 2009).

Fluorouracil (5-FU) je antimetabolit koji se standardno koristi za tretman uznapredovalog kancera kolona, kao i prilikom njegovog relapsa (Grem, 2000; Longley i sar., 2003). 5-FU je fluoropirimidinski analog koji se u organizmu konvertuje u brojne aktivne metabolite poput 5-fluoroksiuridin monofosfata, koji se umesto uracila ugrađuje u iRNK i inhibira njeno procesovanje (Ghoshal i Jacob, 1994) ili 5-fluoro-2'-deoksiuridin-5'-O-monofosfata koji inhibira enzim timidilat sintazu što rezultuje deplecijom TTP, konstituentom DNK molekula (Johnston i sar., 1995). U osnovi antitumorskog delovanja 5-FU jeste zaustavljanje progresije ćelijskog ciklusa i posledična indukcija apoptoze (Grem, 2000; Longley i sar., 2003).

Karakteristično za kancer kolona je njego urođena rezistencija na konvencionalni hemioterapeutik cisplatinu (Sergent i sar, 2002). Stoga se u njegovom lečenju koristi platinski kompleks sledeće generacije – oksaliplatin. Reč je o kompleksu platine (Pt) sa 1,2-diaminocikloheksanom i sa ligandom, oksalatom, kao odlazećom grupom (Graham i sar., 2004). Svoje delovanje oksaliplatina ostvaruje nezavisno od faze ćelijskog ciklusa, generišući intra- i inter-lančana Pt-DNK umrežavanja, što rezultuje inhibicijom transkripcije i DNK replikacije, kao i indukcijom ćelijske smrti (Graham i sar., 2004).

Irinotekan hlorid je alkaloid izolovan iz ekstrakta azijskog drveta *Camptotheca acuminata*. U organizmu se konvertuje u aktivni metabolit, 7-etil-10-hidroksil-kamptotecin, koji inhibira aktivnost topoizomerase I, stabilišući njegov kompleks sa

DNK molekulom. Posledično dolazi do prekida DNK lanca, inhibicije replikacije i indukcije apoptoze. Agens je „S faze“ što znači da dejstvo ostvaruje samo kod aktivno proliferišućih ćelija (Mathijssen i sar., 2011; Chabot, 1997; Rothenberg, 2001).

U terapiji kancera kolona koriste se i rekombinantna monoklonska antitela koja mogu direktno ili posredno uticati na progresiju tumora. Cetuksimab je komercijalni naziv antitela na receptor za epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor receptor, EGFR*) koji, vezivanjem za ekstraćelijski domen, sprečava njegovu dimerizaciju i formiranje signala za proliferaciju tumorske ćelije (Wolpin i Mayer, 2008; Cunningham i sar., 2011). Bevacizumab je komercijalni naziv antitela na vaskularni endotelijalni faktor rasta (engl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*), koje sprečava njegovo vezivanje za receptor i čime je inhibirana angiogeneza tumora (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Wolpin i Mayer, 2008; Cunningham i sar., 2011).

Primenjeni pojedinačno, navedeni agensi ostvaruju skroman učinak te je davanje kombinovane terapije ustaljena praksa u lečenju kancera kolona. Najčešće kombinacije su FOLFOX (redukovana folna kiselina, 5-FU, oksaliplatin), FOLFIRI (redukovana folna kiselina, 5-FU, irinotekan hidrohlorid) i FOLFIRI sa Bevacizumabom (Wolpin i Mayer, 2008). Međutim, činjenica je da su sve navedene kombinacije hemioterapeutika neefikasne u slučaju uznapredovalih stadijuma kancera kolona jer njihova primena suštinski ne produžava život pacijenta, a budući da su praćene brojnim i teškim neželjenim dejstvima, ozbiljno degradiraju kvalitet preostalog vremena života (Abraham i sar., 2013).

#### **1.4. Prevencija kancera kolona**

Budući da se još uvek nije našlo rešenje za uznapredovale stadijume, u slučaju kancera kolona je zaista bolje sprečiti nego lečiti. Pravilna ishrana, zdrave životne navike, redovne provere prisustva krvi u stolici i kolonoskopija nakon 50. godine života, najbolja su prevencija nastanka kancera kolona kod najvećeg dela populacije (Watson i Collins, 2011; Haggard i Boushey, 2009). Kod osoba sa povećanim rizikom, kao u slučaju prethodno pomenutih osoba sa inflamatornom bolešću creva ili familijarnom

adenomatoznom polipozom, pored češćih provera stanja kolona, postoji trend hemioprevencije – uzimanja agenasa sigurnog farmakološkog profila sa ciljem spečavanja ili odlaganja momenta nastanka kancera kolona (Cooper i sar., 2010). Tako su rezultati brojnih epidemioloških studija sugerisali da povećan unos folne kiseline, kalcijuma, vitamina D i antioksidanasa (vitamin A, vitamin C, vitamin E, selenijum i  $\beta$ -karoten) može prevenirati nastanak kancera kolona (Cooper i sar., 2010; Huncharek i sar., 2009; Ströhle i sar., 2005).

Neočekivano dobre rezultate kao hemopreventivni agensi postigli su nesteroidni anti-inflamatorni lekovi (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID*), poput aspirina ili inhibitora ciklooksigenaze-2 (COX-2), čija je primena rezultovala smanjenjem incidence kancera kolona za čak 50 % (Kraus i sar., 2013; Tinsley i sar., 2013, Gwyn i Sinicrope, 2002). Pretpostavljeni mehanizam hemiopreventivnog, ali i direktnog antitumorskog delovanja NSAID jeste inhibicija COX-2 čija povećana aktivnost promoviše stanje inflamacije, nastanak ali i progresiju kancera kolona (Markowitz i Bertagnolli, 2009; Kashfi, 2009; Wu i sar., 2004; Wang i Dubois, 2010). Međutim, potencijalno letalan problem gastrotoksičnosti, koji se javlja pri dugotrajnom uzimanju NSAID, predstavlja ozbiljnu barijeru za njihovu upotrebu, ne samo kao hemiopreventivnih agenasa, već i kao analgetika, antipiretika i anti-inflamatornih agenasa (Gabriel i sar., 1991, Hernández-Díaz i Rodríguez, 2000). Sa ciljem prevazilaženja ovog problema, NSAID su modifikovani kovalentnim vezivanjem hemijske grupe koja će doniranjem azot-monoksida (engl. *nitric oxide, NO*) simulirati efekte prostaglandina, produkta aktivnosti ciklooksigenaze, i time doprineti očuvanju želudačne mukoze (Brzozowski i sar., 2000; Uno i sar., 1997). Kod ove velike grupe NO-NSAID, toksičnost je znatno smanjena i što je još interesantnije – došlo je do osnaživanja antitumorskog potencijala koji se ogleda u sposobnosti modifikovane forme da pri znatno nižim dozama od parentalnog agensa smanji vijabilitet ćelija kancera (Rigas i Williams, 2008). Smatra se da je otpuštanje visokih koncentracija NO odgovorno za osnaživanje antitumorskog delovanja NO-NSAID, budući da je grupa koja donira NO jedina zajednička tačka ovih strukturno vrlo različitih jedinjenja (Rigas i Williams, 2008).

## 1.5. Antitumorsko delovanje azot-monoksida

Azot-monoksid (NO) je slobodni radikal kratkog poluživota koji učestvuje u brojnim fiziološkim i patološkim procesima (Pacher i sar., 2007). U ćeliji nastaje u reakciji oksidacije L-arginina do L-citrulina koju katalizuje NO sintaza (NOS) (Chen i sar., 1998; Pacher i sar., 2007; Mocellin i sar., 2007). Po nastanku, visoko reaktivni NO može potencijalno interagovati sa virtuelno svim biomolekulima u samoj matičnoj ćeliji ali i u susednim ćelijama, budući da nesmetano difunduje kroz membrane i da nije ograničen na klasične ligand-receptor interakcije (Mocellin i sar., 2007; Pacher i sar., 2007). Takođe, unutar ćelije NO reaguje sa stalno prisutnim molekularnim kiseonikom i/ili superoksidnim anjonom, pri čemu nastaje visoko reaktivan peroksinitrit i čitav niz drugih produkata oksidacije koji, zavisno od prostorno-vremenske lokalizacije i koncentracije, kao i od osobnosti same ćelije i njene mikrosredine, mogu fino modulirati ćelijske procese ili generisati stanje oksidativnog i nitrozativnog stresa (Mocellin i sar., 2007; Pacher i sar., 2007; Hickok i Thomas, 2010).

Ezogeno dodat ili endogeno produkovan, NO prisutan u visokim, mikromolarnim koncentracijama će redukovati vijabilitet ćelija kancera (Mocellin i sar., 2007; Singh i Gupta, 2011; Huerta i sar., 2008). U osnovi citotoksičnog delovanja NO opisani su brojni unutarćelijski događaji. Pri visokim koncentracijama NO dolazi do promena na DNK molekulu poput deaminacije, tranzicije/transferzije, alkilacije i jednonančanih prekida koji, ukoliko premašuju kapacite ćelije da ih popravi, rezultuju indukcijom njene smrti (Mocellin i sar., 2007). Oštećujući DNK, NO dovodi do povećanja nivoa tumor supresora p53, koji delujući kao transkripcioni faktor menja nivo ekspresije pro- i antiapoptotskih proteina u smeru pokretanja apoptotske kaskade (Lancaster i Xie, 2006; Mocellin i sar., 2007). Opisano je i da NO može povećati nivo p53 proteina stabilizacijom preko takozvane fosforilacije indukovane NO (Mocellin i sar., 2007; Brüne, 2003). Poznato je da inaktivacijom jing jang 1 (engl. *ying yang 1*, *YY1*) transkripcionog faktora, NO dovodi do povećanja ekspresije Fas receptora, čineći ćeliju kancera osetljivom na apoptotske signale iz spoljašnje sredine (Mocellin i sar., 2007). NO i direktno i indirektno inhibira aktivnost protumorskog transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B (Marshall i Stamler, 2001; Reynaert i sar., 2004). Vezujući se za citohrom c oksidazu, NO inhibira ćelijsko disanje, usled čega dolazi do smanjenja membranskog



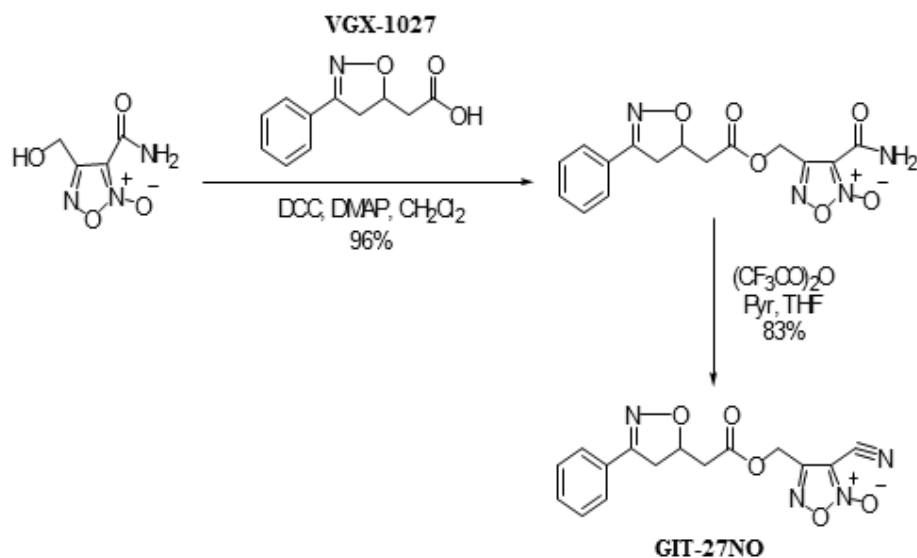
potencijala mitohondrija, otvaranja pora i otpuštanja citohroma c iz međumembranskog prostora, što je događaj kojim otpočinje apoptotska kaskada pokrenuta unutarćelijskim stimulusom (Mocellin i sar., 2007; Pacher i sar., 2007).

Azot-monoksid takođe čini mikrosredinu tumora manje „gostoprivimim“ mestom. Stimuliše antitumorsku aktivnost ćelija prirodnih ubica (Cifone i sar., 2001) ali i sam učestvuje u antitumorskom imunskom odgovoru: aktivirani makrofazi ubijaju tumorske ćelije produkujući visoke koncentracije ovog slobodnog radikala (Hibbs i sar., 1988; Albina i Reichner, 1998). Takođe, smatra se da NO produkovan od strane hepatocita predstavlja osnovni nivo odbrane od metastaziranja kancera u ovaj organ (Fukumura i sar., 2006).

#### **1.6. VGX-1027 i GIT-27NO**

(S,R)-3-fenil-4,5-dihidro-5-isoksazol sirćetna kiselina (VGX-1027) je sintetsko imunomodulatorno jedinjenje koje je u pretkliničkim studijama efikasno sprečavalo pojavu i ublaživalo tok brojnih akutnih i hroničnih inflamatornih bolesti (Stojanovic i sar., 2007; Stosic-Grujicic i sar., 2007). Za razliku od funkcionalno srodne grupe jedinjenja NSAID, koji pokazuju skroman antitumorski potencijal (Chan, 2002), VGX-1027 i u najvećim primenjenim dozama nije redukovao vijabilitet ćelija kancera (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010; Donia i sar., 2009). Iz podatka da NO-NSAID superiornije od parentalnih jedinjenja redukuju vijabilitet tumorskih ćelija proizašla je ideja da bi modifikacija VGX-1027 azot-monoksidom mogla rezultovati sticanjem antitumorskih svojstava. Tako je, kao rezultat strukturne promene VGX-1027 kovalentnim vezivanjem grupe koja donira NO, nastalo kvalitativno novo jedinjenje GIT-27NO (slika 4), čije je antitumorsko delovanje pokazano *in vitro* i *in vivo* na brojnim ćelijskim linijama tumora (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010; Donia i sar., 2009). GIT-27NO je zavisno od karakteristika ćelija tumora, indukovao apoptozu, sa ili bez učešća kaspaza, ili ćelijsku smrt autofagijom (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010; Donia i sar., 2009). Istovremeno, agens pokazuje selektivnost delovanja spram tumorskih ćelija

budući da je, primenjen u terapijski relevantnim dozama znatno manje toksičan za primarne, netransformisanje ćelije (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008).



**Slika 4. Reakcija modifikovanja VGX-1027**

(Preuzeto iz Maksimovic-Ivanic i sar., 2008)

Kako je kod GIT-27NO grupa koja donira NO direktno, bez učešća „nosača“, vezana za parentalni agens, on predstavlja novi tip jedinjenja modifikovanih sa NO (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Takođe, za razliku od NO-aspirina, tipičnog predstavnika iz grupe NO-NSAID, čije je antitumorsko delovanje rezultanta aktivnosti originalnog agensa, molekula „nosača“ NO grupe i samog otpuštenog NO (Rigas i Williams, 2008), za novostečeni antitumorski potencijal GIT-27NO je isključivo zaslužno otpuštanje i efikasan ulazak visokih koncentracija NO u ćeliju (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010). Antraciklinskoj strukturi nosača se pripisuju genotoksična svojstva pomenutog NO-aspirina, te odsustvo takve strukture kod GIT-27NO čini ovaj agens sigurnijim za terapijsku primenu (Rigas i Williams, 2008; Dunlap i sar., 2008). Još jedna važna osobenost GIT-27NO koja ga izdvaja iz

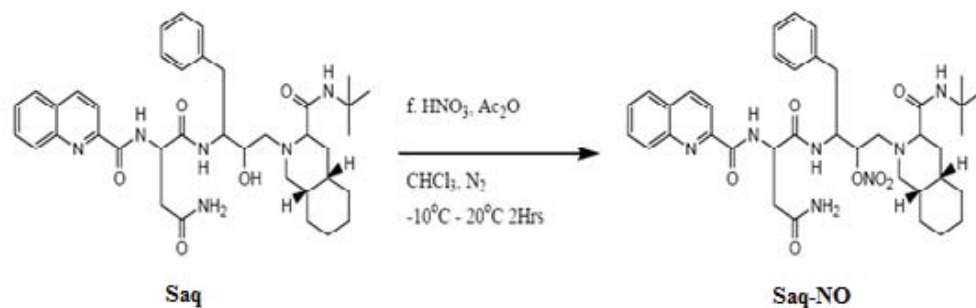
grupe jedinjenja koja doniraju NO jeste da otpušta ovaj slobodni radikal isključivo u kontaktu sa ćelijom ili nekim njenim, još uvek neidentifikovanim, sekretovanim produktom (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Kao posledica internalizacije NO u ćeliji se generiše čitav spektar reaktivnih vrsta kiseonika i azota, čije prekomerno prisustvo uvodi ćeliju u stanje oksidativnog i nitrozativnog stresa, koje ukoliko premašuje antioksidativne kapacitete ćelije rezultuje indukcijom njene smrti (Mocellin i sar., 2007; Pacher i sar., 2007; Hickok i Thomas, 2010). Upravo zbog toga, mehanizam delovanja GIT-27NO spram tumorske ćelije i njegovi targeti na molekularnom nivou u velikoj meri zavise od redoks statusa, kako same ćelije, tako i njene mikrosredine. Tako su, kao posledica tretmana ćelija kancera sa GIT-27NO u literaturi opisane promene u aktivnosti mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAP kinaze), smanjenje ekspresije transkripcionog represora YY1, povećanje nivoa tumor supresora p53 i promena odnosa pro- i antitumorskih molekula u smeru indukovanja programirane ćelijske smrti (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010).

### **1.7. Sakvinavir (Saq) i Saq-NO**

Saq je sintetički peptidomimetik, dizajniran da inhibira aktivnost proteaze virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (engl. *human immunodeficiency virus, HIV1*), enzima ključnog za maturaciju viralne partikule (De Clercq, 2002; Speck i sar., 2000; Randolph i DeGoey, 2004). Poznat je kao prvi proteazni inhibitor čija je terapijska primena odobrena od relevantnih institucija i danas je, u kombinaciji sa drugim antiviralnim agensima, deo standardne terapije HIV pozitivnih pacijenata (Chow i sar., 2009). Već u ranim stadijumima kliničkih ispitivanja postalo je jasno da Saq pored antiviralnog poseduje i antitumorski potencijal. Naime, nezavisno od rekonstitucije imunskog sistema, primena Saq je dovela do regresije postojećih i smanjene incidence pojave Kapoši sarkoma i nekih tipova non-Hoćkin limfoma, tumora tipičnih za pacijenate sa HIV virusom (Sgadari i sar., 2002, 2003). Njegov antitumorski potencijal je potom potvrđen *in vitro* i *in vivo* na brojnim ćelijskim linijama tumora, čiji je vijabilitet redukovao indukcijom spontane ili programirane ćelijske smrti (Pajonk i sar., 2002; Ikezoe i sar., 2004; McLean i sar., 2009). Pored direktnog uticaja na vijabilitet,

antitumorsko delovanje Saq ostvaruje i inhibicijom angiogeneze (Sgadari i sar., 2003), kao i vraćanjem osetljivosti ćelija kancera na radio- i hemioterapiju (Cuneo i sar., 2007; Timeus i sar., 2006). Na molekularnom nivou poznati su brojni targeti njegovog delovanja. Inhibicijom fosforilacije Akt kinaze Saq neutrališe aktivnost PI3K/Akt signalne kaskade koja promoviše proliferaciju i migratornost tumorskih ćelija i ujedno ih čini manje osetljivim na apoptotske signale (Plastaras i sar., 2008; Gupta i sar., 2005; Chow i sar., 2009). Takođe, ovaj agens inhibira peptidaznu aktivnost 20S i 26S subjedinica proteazoma, što rezultuje smanjenjem aktivnosti NF- $\kappa$ B signalnog puta i senzitivacijom ćelija kancera na indukciju ćelijske smrti (Pajonk i sar., 2002). Pored inhibicije angiogeneze, Saq smanjuje invazivnost tumora i putem inhibicije proteolitičke aktivacije matriksne metaloproteinaze 2 (MMP2), čijom sekrecijom tumorska ćelija remodeluje ekstraćelijski matriks (Barillari i sar., 2003, 2012).

Terapeutska primena Saq, bilo kao antiretroviralnog ili kao antitumorskog agensa, kompromitovana je njegovim lošim farmakološkim karakteristikama. Najpre, samo 10 % oralno unete doze Saq dospeva u krvotok, gde se supstanca sa visokim afinitetom vezuje za proteine plazme, poput  $\alpha$ 1 kiselog glikoprotina (AAG), i gubi aktivnost (Mouly i sar., 2004). Zatim prolaskom kroz jetrin krvotok, Saq se susreće sa enzimom citohrom P450 koji ga inaktiviše. I na kraju, posredstvom membranskog, ATP zavisnog P-gP transportera on biva aktivno sekretovan iz ciljnih ćelija usled čega se razvija rezistencija na ovaj agens (Mouly i sar., 2004). Zbog vrlo loše i varijabilne bioiskoristljivosti kao i zbog razvijanja rezistencije, za ostvarivanje terapijskog efekta neophodno je stalno povećavati primenjenu dozu Saq, što za posledicu ima pojavu niza neželjenih i potencijalno letalnih efekata poput neosetljivosti na insulin i dijabetesa, kardiovaskularnih komplikacija, osteopatije i redistribucije masti (Ben-Romano i sar., 2003; Carr i sar., 1998; Bergersen, 2006). Prihvatajući koncept iz studija sa NO-NSAID, po kom modifikacija NO rezultuje smanjenjem toksičnosti supstance i sticanjem, odnosno osnaživanjem antitumorskog potencijala, Saq je izmenjen direktnim vezivanjem NO grupe za originalno jedinjenje (slika 5) (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009).



**Slika 5. Reakcija modifikovanja Saq**

(Preuzeto od Maksimovic-Ivanic i sar., 2009)

Modifikovanjem Saq nastalo je novo jedinjenje Saq-NO, kod kojeg je toksičnost spram primarnih, netransformisanih ćelija potpuno neutralisana dok je istovremeno anti-retroviralna aktivnost očuvana (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). U poređenju sa parentalnim agensom, Saq-NO je *in vitro* pokazao snažnije antitumorsko delovanje redukujući vijabilitet ćelija kancera pri znatno nižim dozama (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Donia i sar., 2011; Mijatovic i sar., 2011; Mojic i sar., 2012). U modelima *in vivo*, Saq-NO je ostvarivao isti ili bolji učinak u smanjenju volumena tumora kao Saq, ali za razliku od grupe koja je dobijala originalno jedinjenje, životinje tretirane sa Saq-NO nisu pokazivale znake intoksikacije (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Kao glavni mehanizam u osnovi antitumorskog delovanja Saq-NO u literaturi je opisana inhibicija proliferacije i indukcija diferencijacije ćelija kancera ka netransformisanom fenotipu (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Mojic i sar., 2012), dok je u iznimnim slučajevima redukcija vijabiliteta bila posledica indukcije apoptoze (Donia i sar., 2011; Mijatovic i sar., 2010). Dodatno, Saq-NO se pokazao uspešnim u vraćanju osetljivosti ćelija kancera na antitumorski imunski odgovor posredovan ligandom sličnim TNF, koji ima sposobnost da indukuje apoptozu (engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*, *TRAIL*) kao i na konvencionalnu hemioterapiju (Mijatovic i sar., 2010, Mojic i sar., 2012; Donia i sar., 2011). Antitumorsko delovanje Saq-NO je bilo postojano i nezavisno od prisutnosti funkcionalnog tumor supresora p53 u ćelijama tumora kao i nivoa ekspresije

membranskih transportera P-gp, MRP1 i BCRP, koji izbacivanjem agenasa u vanćelijski prostor doprinose razvitku rezistencije na hemioterapiju (Rothweiler i sar., 2010; Donia i sar., 2011).

Za razliku od NO-NSAID, ali i od ranije pomenutog GIT-27NO, čiji je parentalni agens modifikovan na isti način kao i Saq, Saq-NO ne oslobađa detektabilne količine NO te samim tim odsustvo toksičnosti i osnaživanje antitumorskog delovanja kod ovog agensa nije rezultat otpuštanja i delovanja NO (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Snažno antitumorsko delovanje GIT-27NO i Saq-NO pokazano je na brojnim ćelijskim linijama poreklom od miša, pacova ili čoveka *in vitro* i *in vivo*. Rezultati pređašnjih studija su ukazali na bitno drugačiji mehanizam delovanja ovih jedinjenja, vezano za sprovedenu modifikaciju i ulogu NO u ostvarivanju njihovih efekata. Stvorena je potreba preciznijeg definisanja uloge ovog molekula u različitim aspektima antitumorskog dejstva ispitivanih terapeutika. Konačno, ni jedno jedinjenje nije testirano na kanceru kolona, jednom od najučestalijih visoko metastatskih maligniteta današnjice. Ovom studijom bi se zaokružila pretklinička ispitivanja GIT-27NO i Saq-NO, a dobijeni rezultati bi pružili na uvid potrebne informacije za ulazak u fazu kliničkog testiranja na pacijentima obolelim od kancera kolona.

Na osnovu svega navedenog, ciljevi postavljeni u ovoj tezi su:

1. Utvrđivanje antitumorskog delovanja GIT-27NO i Saq-NO, supstanci modifikovanih kovalentnim vezivanjem NO za originalni agens, na ćelijskim linijama kancera kolona CT26CL25 poreklom od miša i HCT116 poreklom od čoveka *in vitro* i *in vivo*.
2. Određivanje i upoređivanje uloge koju NO ima u antitumorskom delovanju GIT-27NO i Saq-NO.
3. Rasvetljavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi antitumorskog delovanja GIT-27NO i Saq-NO na modelu kancera kolona *in vitro*.
4. Ispitivanje uticaja GIT-27NO i Saq-NO na osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL ligandom.



# **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Reagensi

U eksperimentalnom radu korišćeni su sledeći reagensi:

Medijum za uzgajanje ćelija RPMI -1640, serum fetusa govečeta (engl. *fetal bovine serum*, *FBS*; PAA Laboratories, Pašing, Austrija), jugocilin, streptomycin-sulfat, nistatin (Galenika, Beograd, Srbija), kristal-violet, Folin-Ciocalteu-ov reagens (Mol, Beograd, Srbija), tripsin, hemoglobin, N-1-naftilendiamin dihidrohlorid, sulfanilamid, propidijum jodid (PI), etilendiamin tetrasirćetna kiselina (engl. *ethylenediamin tetra-acetic acid*, *EDTA*), RNAza, dimetil sulfoksid (DMSO), ditiotreitrol (DTT), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), ExtrAvidin® -peroksidaza, Triton X-100, Tween-20, doksorubicin, aprotinin, bromfenol plavo, natrijum nitroprusid (engl. *sodium nitropruside*, *SNP*) (Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD), natrijum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ), dinatrijum hidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), hloroform (Merck, Darmštadt, Nemačka), natrijum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; Carlo Erba, Milano, Italija), kalijum natrijum tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija), natrijum dihidrogenfosfat-2-hidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ; Analytika, Prag, Česka), natrijum hlorid ( $\text{NaCl}$ ; ICN, Aurora, Ohajo, SAD), glicerol, natrijum hidroksid ( $\text{NaOH}$ ), kalijum dihidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), kalijum hlorid ( $\text{KCl}$ , LachNer, Neratovice, Česka), bakar sulfat-5-hidrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ), fosforna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kalcijum hlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), sirćetna kiselina, metanol, etanol (Zorka, Šabac, Srbija), tripan plavo, goveđi albumin iz seruma (engl. *bovine serum albumine*, *BSA*), Tris (Fluka, Buh, Nemačka), TRAIL (Peprotech, London, Velika Britanija), 5, 5', 6, 6'-tetrahloro-1, 1', 3, 3'-tetraetilbenzimidazol-karbocijanin jodid (JC-1; Biotium, Hejvard, Kalifornija, SAD), akridin oranž (Labo-Moderna, Pariz, Francuska), karboksifluorescein diacetat sukcinimidil estar (CFSE), 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM diacetat), dihidrorodamin 123 (DHR; Molecular Probes, Judžin, Oregon, SAD), HEPES (Flow Laboratories, Irvin, Velika Britanija), dezoskiribonukleotid-trifosfati (dNTP), nasumični heksamerni prajmeri, komercijalni pufer za reverznu transkripciju, reverzna transkriptaza Moloni virusa mišje leukemije, inhibitor RNaze (Fermentas, Vilnius, Litvanija), kit za izolaciju totalne RNK (mi-Total RNA Isolation Kit), prajmeri za gene od interesa koji su navedeni u tabeli \*\* (Metabion, Martinsrid, Nemačka), prajmeri za  $\beta$ -aktin gen (Integrated DNA Technologies, Koralvil, Ajova, SAD), komercijalna smeša za Real-Time PCR - SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija,

SAD), amonijum persulfat (APS),  $\beta$ -merkaptometanol, SDS (Applichem, Darmstadt, Nemačka), paraformaldehid (PFA), glicin, N, N, N', N'-tetrametileten diamin (TEMED), akrilamid / bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka), ECL sistem za detekciju (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija), Majerov hematoksilin (BioOptica, Milano, Italija), glicergel (Dako, Glostrup, Danska), diaminobenzidin (DAB), ApoStat, Z-VAD-fmk (R&D Systems, Mineapolis, Minesota, SAD), Matrigel<sup>®</sup> (BD Labware, Bedford, Masačusets, SAD), aneksinV-FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC; BD Pharmingen, San Dijego, Kalifornija, SAD), dietilentriamin NONOat (Deta NONOat), 3-morfolinosidnonimin hlorid (SIN-1 Cl), S-nitrozo-N-acetilpenicilamin (SNAP), (2-merkaptometil)-guanidin sulfat (MEG sulfat) (Cayman chemical, An Arbor, Mičigen, SAD), sakvinavir (Saq; Roche, Bazel, Švajcarska), sakvinavir-NO (Saq-NO), (S,R)- 3- fenil-4, 5- dihidro-5-izoksazol sićetna kiselina (VGX-1027), (S,R)-3-fenil-4, 5-dihidro-5- izoksazol sićetna kiselina-azot oksid (GIT- 27NO; Onconox, Kopenhagen, Danska). Pregled antitela korišćenih u eksperimentima prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1. Antitela korišćena u eksperimentima**

<b>Primarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>
Anti-p-Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-Akt	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-p-S6	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-S6	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-XIAP	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-RKIP	kunić	Cell Signaling Tehnology, Denvers, MA, SAD
Anti-p-p53 Ser 20	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Kruz, SAD
Anti-p53	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Kruz, SAD
Anti-ciklin D3	kunić	Santa Cruz Biotechnology, Santa Kruz, SAD
Anti- $\beta$ -aktin	miš	Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD
Anti-DR5	miš	Biosource, Kamariljo, Kalifornija, SAD
<b>Sekundarna antitela</b>	<b>Poreklo</b>	<b>Proizvođač</b>
Anti-kunić, obeleženo peroksidazom rena	magarac	GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija
Anti-miš, obeleženo peroksidazom rena	ovca	GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija
Anti-miš, konjugovano sa FITC-om	koza	Invitrogen, Karlsbad, Kalifornija, SAD

### 3.2. Rastvori

Za uzgajanje ćelijskih linija kancera kolona poreklom od miša (CT26CL25) i od čoveka (HCT116) korišćen je RPMI-1640 medijum (PAA Laboratories, Pašing, Austrija). U RPMI-1640 medijum dodavani su: antibiotici jugocilin (100 IJ/ml) i streptomycin-sulfat (0.25 mg/ml), antimikotik nistatin i 10% FBS (PAA Laboratories GmbH, Austrija), što je skupa u daljem tekstu označeno kao medijum za uzgajanje. FBS je inkubiran 30 minuta na 56 °C kako bi se inaktivisale komponente komplemента, a medijumu je dodavan u cilju kultivacije ćelija. PBS (engl. *phosphate buffered saline*, *PBS*) pravljen je od: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, i imao je vrednost pH 7.4 na 25 °C . Za odlepljivanje adheriranih ćelija od podloge upotrebljavan je rastvor tripsina (0.25 %) u PBS-u uz dodatak 0.02 % EDTA. Prilikom brojanja ćelija korišćen je 0.1% rastvor boje tripan plavo u PBS-u. Za ispitivanje relativnog broja adheriranih ćelija pravljen je 1% rastvor boje kristal violet u PBS. Griess-ov reagens, koga čine 0.1 % rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1 % rastvor sulfanilamida u 5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pomešani u razmeri 1:1, koristio se za merenje koncentracije nitrita u supernatantima kultura ćelija. Za potrebe bojenja ćelija aneksin V- FITC-om napravljen je pufer za vezivanje aneksina (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>).

Za merenje koncentracija proteina metodom po Loriju pravljeni su rastvori: 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0.1 M NaOH, 1 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 2 % K-Na-tartarat u H<sub>2</sub>O i mešani u razmeri 98:1:1. Za potrebe imunoblot analize pravljeni su sledeći rastvori: rastvor za liziranje ćelija (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 na 25 °C, 2 % SDS, 10 % glicerol i 50 mM DTT u destilovanoj vodi) koji je neposredno pred upotrebu obogaćen inhibitorima proteaza (10 µg/ml aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF); 5 x PBS bez kalijuma (400 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O u H<sub>2</sub>O); standardni pufer za nalivanje na gel za elektroforezu, tzv. 4 x Lemli (Laemmli) pufer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 % SDS, 0.2 M β-merkaptioetanol, 0.004 % bromfenol plavo, 20 % glicerol) (Laemmli, 1970); 5 x pufer za elektroforezu (125 mM Tris, 0.5 % SDS, 1.25 M glicin u H<sub>2</sub>O); pufer za transfer na membranu (25 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % metanol, 0.1 % SDS u H<sub>2</sub>O); za pranje membrana korišćen je rastvor 0.1% Tween-20-PBS (PBSTw); nespecifično vezivanje antitela blokirano je sa 5 % BSA (Frakcija V) u

0.1 % PBSTw; željene koncentracije antitela su spravljane u 0.1 % PBSTw sa 1 % BSA (Frakcija V).

U imunocitohemijskom bojenju za permeabilizaciju membrana pravljen je 0.5 % rastvor Triton X-100 u PBS-u (PBST), za blokiranje endogenih peroksidaza rastvor 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 10 % metanol u 0.1 % PBST-u, za blokiranje nespecifičnih mesta vezivanja antitela rastvor 5 % FBS u 0.1 % PBST-u; razblaženje od 1:500 anti-p53 antitela pravljen je u PBS sa 1 % BSA; supstrat za ekstravidin peroksidazu bio je 0.5 % DAB – 0.1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u PBS-u.

GIT-27NO (Mw= 328 g/mol) i VGX-1027 (Mw = 205 g/mol) su neposredno pre upotrebe pravljeni kao 5 mg/ml rastvori u 2.5 % DMSO- H<sub>2</sub>O, a za tretman ćelija su finalno rastvarani u medijumu za uzgajanje. Saq (Mw= 670 g/mol) i SaqNO (Mw= 715 g/mol) su čuvani kao 5 mg/ml rastvori u 25 % DMSO-RPMI-1640 na -20 °C, i neposredno pred tretman su rastvarani u medijumu za uzgajanje ćelija.

### 3.3. Kulture ćelija

U eksperimentima korišćene su sledeće ćelijske linije:

- **CT26CL25** ćelijska linija kancera kolona poreklom od miša, koja je sub-klon CT26 ćelijske linije. Originalna linija, CT26, nastala je hemijskom indukcijom kancera kolona kod BALB/c miševa tretmanom N-nitrozo-N-metiluretanom (Brattain i sar., 1980). Sub-klon CT26CL25 dobijen je stabilnom retrovirusnom transdukcijom CT26 linije, genom za enzim β-galatozidazu poreklom od bakterije *Escherichia coli*. Pokazano je da originalna linija i CT26CL25 sub-klon imaju isto vreme deobe u kulturi i da su podjednako sposobne da indukuju tumor u imunokompatibilnim miševima (Wang i sar., 1995).
- **HCT116** linija ćelija kancera kolona poreklom od čoveka (Brattain i sar., 1981). HCT116 linija je nosilac mutacije u genu za APC kao i u kodonu 13 Kirsten Rat Sarcoma (K- Ras) protoonkogena, što je kombinacija mutacija koja se vrlo često nalazi kod pacijenata (Kinzler i Vogelstein, 1996; Morin i sar., 1997; Andreyev i sar., 1998).

Obe ćelijske linije su poklon profesora Ferdinanda Nikoletija sa Univerziteta u Kataniji (Sicilija, Italija), a originalno su nabavljene od American Type Culture Collection (Rokvil, MD, SAD). Ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašicama (75 cm<sup>3</sup>) (Sarstedt, Njuton, NC, SAD) sa 10 ml medijuma za uzgajanje, u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37 °C i pri koncentraciji CO<sub>2</sub> od 5 % (u daljem tekstu inkubacija). Na svaka tri dana sipan je svež medijum za uzgajanje, a ćelije su presađivane po dostizanju 80% konfluentnosti ili korišćene u eksperimentima.

### **3.4. Eksperimentalne životinje**

U ovom istraživanju korišćeni su miševi ženskog pola soja BALB/c starosti 6-8 nedelja. Miševi su dobijeni iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalne životinje su čuvane pod standardnim uslovima, bez ograničenja pristupa hrani i vodi.

Svi *in vivo* eksperimenti odobreni su od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

### **3.5. Primenjene metode**

#### **3.5.1. Tripsinizacija ćelija**

Nakon vizuelne procene da su adherentne ćelijske linije kancera kolona HCT116 i CT26CL25 dostigle oko 80 % konfluentnosti, one su skidane sa podloge postupkom tripsinizacije. Medijum u kome su ćelije rasle je prosipan, a plastična flašica prana sa 10 ml PBS-a. Pranjem se uklanjaju mrtve ćelije i zaostali medijum sa FBS-om koji bi inhibirao proces tripsinizacije. Opranoj kulturi ćelija dodavan je 1 ml rastvora tripsina (0.25 %) i EDTA (0.02 %) u PBS-u. Tripsin je proteolitički enzim koji isecanjem adhezivnih molekula prekida međućelijske veze i veze ćelija sa podlogom, a EDTA je helator kalcijumovih jona, koji su neophodni za pravilno funkcionisanje adhezivnih molekula. Nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, odlepljenim ćelijama je dodavan medijum za uzgajanje koji je obogaćen 10 % FBS-om čime se proces

tripsinizacije prekida. Suspenzija ćelija je centrifugirana 5 minuta na 1000 obrtaja po minuti (opm), ćelijski talog je potom resuspendovan u 3 ml medijuma za uzgajanje i pristupalo se brojanju ćelija.

### **3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija**

Za određivanje ukupnog broja ćelija i relativnog broja živih ćelija korišćen je 0.1 % rastvor boje tripan plavo u PBS-u. Selektivnost bojenja citoplazmi mrtvih ćelija tripan plavom bojom leži u činjenici da je reč o negativnoj naelektrisanj hromofori koja, kao nosilac naelektrisanja ne može proći kroz ćelijsku membranu očuvanog integriteta. Dakle, pod svetlosnim mikroskopom moguće je jasno razlikovati mrtve – plavo obojene, od živih – neobojenih ćelija. Suspenzija ćelija mešana je sa rastvorom tripan plave boje u odnosu 1:1 nakon čega su ćelije brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Türker-Bürku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po mililitru suspenzije računat je po obrascu: broj ćelija / broj polja  $\times 0.5 \times 10^6$ . Poznavajući broj raspoloživih ćelija, razblaživanjem suspenzije podešavana je njihova gustina za kultivaciju i dalji ekperimentalni rad.

### **3.5.3. Priprema ćelijskih kultura**

U sterilne plastične ploče sa 6 bunarića ravnog dna zapremine 17.2 ml (Sarstedt, Njuton, NC, SAD) sađeno je  $3 \times 10^5$  HCT116 ili CT26CL25 ćelija u 1 ml medijuma za uzgajanje, dok je u sterilne plastične ploče sa 96 bunarića ravnog dna zapremine 380  $\mu$ l (Sarstedt, Njuton, NC, SAD) sađeno  $1 \times 10^4$  ćelija u 100  $\mu$ l medijuma za uzgajanje. Za potrebe imunocitohemijskog bojenja CT26CL25 ćelije su ravnomerno sađene na sterilnim mikroskopskim pločicama sa 4 komorice (Lab-Tek, Nalge Nunc International, IL, SAD) pri gustini od  $3 \times 10^4$  ćelija/bunarić u 200  $\mu$ l medijuma za uzgajanje. Kulture su inkubirane preko noći kako bi se ćelije zalepile za podlogu i što bolje oporavile od tripsinizacije, nakon čega su dodavani rastvori primenjivanih hemikalija do finalne zapremine od 2 ml za ploče sa 6 bunarića, do 200  $\mu$ l za ploče sa 96 bunarića odnosno do 400  $\mu$ l kod mikroskopske pločice sa 4 komorice. Svaki od tretmana bio je urađen u



triplikatu, a rezultati su predstavljani kao srednja vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) triplikata.

#### **3.5.4. Merenje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura**

Azot-monoksid ( $\text{NO}^\cdot$ ) je izuzetno reaktivan slobodni radikal koji u supernatantu ćelijskih kultura brzo reaguje sa molekularnim kiseonikom ( $\text{O}_2$ ) ili superoksidnim anjonom ( $\text{O}_2^\cdot$ ), što rezultuje stvaranjem stabilnijih produkata: nitrita odnosno nitrata ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) (Chen i sar., 1998). Koncentraciju nitrita u supernatantu ćelijskih kultura tretiranih GIT-27NO, Saq-NO ili konvencionalnim NO donorima (SNP, Deta NONOat, SIN-1 hlorid, SNAP), a koja je indikator oslobađanja NO od strane ovih supstanci, moguće je izmeriti Griess testom baziranim na reakciji diazotizacije (Griess, 1879).

Nakon odgovarajućeg tretmana CT26CL25 kulture ćelija, uzimano je po 50  $\mu\text{l}$  supernanata i mešano sa istovetnom zapreminom Griess reagensa (0.1 % rastvor N-1-naftilendiamin dihidrohlorida i 1 % rastvor sulfanilamida u 5 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) u pločama sa 96 bunarića ravnog dna. Sa sulfanilamidom nitriti formiraju diazonijum soli, a ova reakcija se vizuelizuje N-1-naftilendiamin dihidrohloridom. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi moguće je uočiti razvijanje roze boje čija je apsorbancija merena na 570 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija nitrita računata je na osnovu standardne krive dobijene određivanjem absorbancija za poznate koncentracije  $\text{NaNO}_2$ .

#### **3.5.5. Evaluacija vijabiliteta ćelija kristal violet testom**

Kristal violet test je kolorimetrijski test kojim je moguće proceniti vijabilitet adherentnih ćelija u kulturi (Flick i Gifford, 1984). Kristal violet je bazna boja koja boji sve negativno naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline u ćeliji, te je količina boje koju ćelije u kulturi vežu proporcionalna njihovom broju. Upoređivanjem količine vezane boje kod tretiranih i netretiranih, kontrolnih ćelija, moguće je nacrtati dozno-zavisnu krivu vijabiliteta i oceniti citotoksičnost ispitivane supstance.

Ćelije su sadene u sterilne ploče sa 96 bunarića ravnog dna i inkubirane sa Saq, Saq-NO, VGX-1027, GIT-27NO, konvencionalnim NO donorima (Deta NONOat, SNP, SIN-1 hloridom, SNAP), hvatačem peroksinitrita MEG, hemoglobinom ili sa TRAIL. Po završetku tretmana, supernatant je odlivan i dodavano je 50  $\mu$ l 4 % paraformaldehida radi fiksiranja ćelija za podlogu. Fiksiranje je trajalo 10 minuta, nakon čega se pristupalo bojenju fiksiranih ćelija 1 % rastvorom kristal violeta u PBS-u u trajanju od 15 minuta. Potom su se bunarići sa kulturama intenzivno ispirali vodom i ostavljali da se osuše preko noći. Vezana boja je rastvarana u 33 % sirćetnoj kiselini, a intenzitet rastvorene boje određivan je merenjem apsorbancije svetlosti na talasnim dužinama od 540 nm i 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče. Od svake vrednosti apsorbance očitane na 540 nm oduzimana je odgovarajuća pozadinska apsorbancija koja je čitana je na 670 nm. Vijabilitet tretiranih ćelija prikazan je kao procenat vrednosti apsorbance izmerene kod netretiranih kultura, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta.

### **3.5.6. Fluorimetrija i protočna citofluorimetrija**

Obeležavanje markera na površini ili unutar ćelije fluorescentnim bojama (fluoroforama) i merenje intenziteta fluorescence nalazi se u osnovi mnogih metoda primenjenih u ovom istraživanju. Fluoresciranje je višestepeni proces koji otpočinje pobuđivanjem fluorofore apsorbovanjem tzv. ekscitacionog fotona koga odaje svetlosni izvor aparata (laser ili određen tip lampe). Fluorofora se u nestabilnom, višem energetsom stanju nalazi kratko (nekoliko nanosekundi). Emitujući foton, vraća se na svoje osnovno energetske stanje i može biti ponovo pobuđena. Kako se deo apsorbovane energije gubi na vibracije molekula, emisioni fotoni koje detektuje aparat uvek su niže enerije od ekscitacionih te ih je moguće međusobno razlikovati primenom filtera za određene talasne dužine. Činjenica da jedna fluorofora može biti ciklično pobuđivana i emitovati više fotona, a da pri tom ne dolazi do oštećenja ispitivanog uzorka (kulture ćelija, tkiva) je glavna prednost visoko senzitivnih metoda baziranih na detekciji fluorescence (Shapiro, 2003).

Za merenje intenziteta fluorescence obeleženih uzoraka korišćen je Chameleon fluorimetar (Hidex, Oj, Turku, Finska) ili FACSCalibur (Becton Dickinson, San Hoze,

Kalifornija, SAD) protočni citofluorimetar. Osnovna prednost rada sa fluorimetrom je mogućnost brze detekcije prosečne fluorescence velikog broja uzoraka, ali je osetljivost tehnike mala. FACSCalibur protočni citofluorimetar odlikuje se većom osetljivošću i kvantifikuje fluorescencu pojedinačne ćelije. Time je omogućena primena više različitih fluorofora i detekcija diskretnih subpopulacija ćelija u velikim uzorcima. U eksperimentalnom radu korišćene su sledeće fluorescentne boje: propidijum jodid, CFSE, aneksin V konjugovan sa fluoroforom FITC, inhibitor kaspaza konjugovan FITC, JC-1, DAF-FM diacetat, DHR i anti-miš antitelo obeleženo sa FITC. Ekscitacioni i emisioni maksimumi fluorescentnih boja su dati u tabeli 2.

**Tabela 2. Fluorescentne boje korišćene u eksperimentima.**

Fluorescentna boja	Ekscitacioni maksimum (nm)	Emisioni maksimum (nm)
Propidijum jodid	536	617
CFSE	492	517
FITC	494	518
JC-1	498 (monomer) 593 (agregat)	525 (monomer) 595 (agregat)
Akridin oranž	488	530/640
DAF-FM diacetat	495	515
DHR	500	536

### 3.5.6.1. Analiza ćelijskog ciklusa

Za potrebe analize ćelijskog ciklusa, ćelije su tretirane 75  $\mu\text{M}$  VGX-1027 ili GIT-27NO (24 h za CT26CL25 ćelije i 48 h za HCT116) odnosno 24 h sa Saq ili Saq-NO (18.75  $\mu\text{M}$  za HCT116 i 37.5  $\mu\text{M}$  za CT26CL25 ćelije). Po završetku tretmana, supernatanti su skupljani u epruvete i kasnije spajani sa odgovarajućom suspenzijom ćelija sakupljenih tripsinizacijom. Suspenzije ćelija prane su dva puta hladnim PBS i svaki put centrifugirane 3 minuta na 750 g. Ćelije su potom fiksirane u 70 % etanol-PBS preko noći na 4 °C. Fiksiranjem je vršena permeabilizacija ćelijskih membrana, čime je

omogućeno bojenje unutarćelijskog sadržaja. Od rastvora za fiksaciju ćelije su dva puta prane PBS, a zatim inkubirane u rastvoru propidijum jodida (20 µg/ml) i RNaze (0.1 mg/ml) u PBS 45 minuta na 37 °C u mraku. Propidijum jodid (PI) se ravnomerno, po celoj dužini, umeće u dvostruki heliks DNK, što znači da je količina vezanog PI proporcionalna količini DNK u ćeliji. Kako u ćelijama postoji i dvolančana RNK koju bi PI takođe mogao obeležiti, ona se uklanja dodavanjem RNaze (Nunez, 2001).

Crvena fluorescencija PI je merena FACSCalibur protočnim citofluorimetrom. Radi diskriminacije agregata ćelija, protok prilikom detektovanja fluorescencije je bio ispod 1000 ćelija u sekundi (optimalno 200-300 ćelija/s). Razvrstavanje ćelija po fazama ćelijskog ciklusa CellQuestPro programom (BD Biosciences, San Diego, Kalifornija, SAD) vršeno je na osnovu količine DNK. Hipodiploidne ćelije u sub-G fazi su smatrane apoptotičnim.

### **3.5.6.2. Analiza stope ćelijskih deoba**

Ispitivanje uticaja Saq odnosno Saq-NO tretmana na stopu ćelijskih deoba određivano je obeležavanjem ćelija CFSE bojom. Reč je o derivatu fluoresceina koji sam po sebi nije fluorescentan i koji pasivno difunduje kroz ćelijske membrane. Nakon isecanja acetatnih grupa aktivnošću unutarćelijskih esteraza nastaje fluorescentni karboksifluorescein sukcinimidil ester, koje reagujući sa aminima obeležava proteine citoplazme. Obeležavanje proteina ne utiče nepovoljno na ćelijske funkcije niti na sposobnost ćelije da se deli. Nakon deobe, ćerke ćelije podjednako nasleđuju istu količinu ove boje, to jest po polovinu od roditeljske, te intenzitet fluorescencije po ćeliji koji se detektuje protočnom citofluorimetrijom postaje duplo slabiji. Ovom metodom je moguće identifikovati od 7 do 10 sukcesivnih generacija ćelija (Parish, 2002).

Odmah nakon tripsinizacije, ćelije ( $5 \times 10^6$ /ml) su resuspendovane u 1 ml 0.1 % FBS-PBS i inkubirane sa 1 µM CFSE boje 10 minuta na 37 °C. Boja koja nije difundovala kroz ćelijske membrane i vezala se za proteine citoplazme uklonjena je pranjem ćelija u PBS. Ćelije su posađene u ploče sa 6 bunarića ravnog dna i nakon 4 sata, koliko im je bilo potrebno da adheriraju za podlogu, tretirane su Saq ili Saq-NO (18.75 µM za HCT116 i 37.5 µM za CT26CL25 ćelijsku liniju). Tretman je trajao 72 h, nakon čega su

ćelije odlepljivane sa podloge tripsinizacijom i dva puta prane sa PBS. Intenzitet zelene fluorescence detektovan je na FACSCalibur protočnom citometru i analiziran CellQuestPro programom.

### **3.5.6.3. Detekcija rano apoptotičnih ćelija**

Jedna od morfoloških odlika rane apoptoze, koja se uočava pre fragmentacije DNK u jedru, jeste gubljenje asimetričnosti ćelijske membrane (Demchenko, 2012). Fosfatidil serin, koji je normalno smešten u citoplazmatičnom sloju ćelijske membrane zajedno sa ostalim negativno naelektrisanim lipidima, premešta se u spoljašnji sloj. Njega je moguće detektovati fluorescentno obeleženim rekombinantnim aneksinom V, proteinom koji vezuje fosfolipide i pokazuje snažan afinitet prema fosfatidil serinima (Vermes i sar., 1995). Kontrastnim bojenjem propidijum jodidom moguće je razlikovati rane od kasno apoptotičnih/nekrotičnih ćelija, jer ova fluorescentna boja ulazi samo u ćelije narušenog permeabiliteta ćelijske membrane.

Ćelije ( $3 \times 10^5$ ) su sađene u pločama sa 6 bunarića ravnog dna i tretirane GIT-27NO ( $75 \mu\text{M}$ ) u trajanju od 24 h (CT26CL25) ili 48 h (HCT116). Po isteku predviđenog vremena, skupljeni su supernantanti kojima su kasnije dodane odgovarajuće ćelije skupljene tripsinizacijom. Suspenzija ćelija je oprana PBS i resuspendovana u  $100 \mu\text{l}$  pufera za vezivanje aneksina kome je dodato  $1.5 \mu\text{l}$  FITC obeleženog aneksin V i  $1.5 \mu\text{l}$  propidijum jodida ( $1 \text{ mg/ml}$ ). Bojenje ćelija u mraku na sobnoj temperaturi trajalo je 15 minuta i prekidano je dodavanjem  $200 \mu\text{l}$  pufera za vezivanje aneksina. Fluorescenca je detektovana FACSCalibur protočnim citofluorimetrom, uz FL1/FL2 kompenzaciju od 30 %, i analizirana CellQuestPro programom. Rano apoptotične ćelije, kod kojih je još uvek očuvan integritet ćelijske membrane, su detektovane kao aneksin V pozitivne - propidijum jodid negativne. Dvostruko pozitivne ćelije, aneksin V pozitivne - propidijum jodid pozitivne, smatrane su apoptotičnim ili sekundarno nekrotičnim.

#### **3.5.6.4. Detekcija aktivisanih formi kaspaza**

Za detekciju aktiviranih formi kaspaza korišćen je ApoStat, pan-kaspazni inhibitor konjugovan FITC. CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^5$ ) su gajene u sterilnim pločama sa 6 bunarčića i inkubirane 24 h sa  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO. Supernatanti su skupljeni u epruvete i kasnije spajani sa odgovarajućom suspenzijom ćelija sakupljenih tripsinizacijom. Ćelije su oprane u PBS, centrifugirane 3 minuta na  $750 \text{ g}$  i resuspendovane u  $100 \mu\text{l}$   $5\%$  FBS-PBS kome je dodat  $1 \mu\text{l}$  ApoStat. Nakon inkubacije od 30 minuta na  $37^\circ\text{C}$ , ćelije su oprane i resuspendovane u  $300 \mu\text{l}$  PBS. Fluorescenca je detektovana FACSCalibur protočnim citofluorimetrom i analizirana CellQuestPro programom.

#### **3.5.6.5. Merenje membranskog potencijala mitohondrija**

Kolaps membranskog potencijala mitohondrija služi kao indikator pokrenutog apoptotskog programa ćelijske smrti, što se može detektovati bojenjem ćelija JC-1 fluorescentnom bojom. Reč je o lipofilnoj, pozitivno naelektrisanj fluorofori čija se fluorescenca menja zavisno od toga da li se u ćeliji nalazi kao agregat ili kao monomer. Kod ćelija koje nisu ušle u apoptozu, JC-1 se selektivno akumulira u mitohondrijama očuvanog elektrohemijskog gradijenta. Pri dostizanju kritične koncentracije u mitohondrijama, JC-1 formira agregate koji fluoresciraju crveno. U apoptotičnim ćelijama, membranski potencijal mitohondrija kolabira čime je sprečena JC-1 akumulacija, te on ostaje u citoplazmi kao monomer i fluorescira zeleno.

CT26CL25 i HCT116 ćelije su tretirane  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO u trajanju od 24 h, odnosno 48 h, nakon čega su skupljene tripsinizacijom, oprane PBS i inkubirane sa JC-1 bojom ( $5 \mu\text{g/ml}$  u PBS-u) 20 minuta na  $37^\circ\text{C}$ . Suspenzija ćelija je od viška JC-1 boje dva puta prana sa PBS pre detektovanja fluorescencije FACSCalibur protočnim citofluorimetrom. Zelena i crvena fluorescenca, očitane na FL1 odnosno FL2 kanalu, analizirane su CellQuestPro programom.

### **3.5.6.6. Detekcija autofagije bojenjem ćelija akridin-oranžom**

Karakteristični marker autofagije jesu autofagozomi – kisele vezikule sa dvostrukom membranom koje okružuju delove citoplazme i/ili ćelijske organele čija je konačna sudbina degradacija u lizozomima (Gozuacik i Kimchi, 2004; Levine i Yuan, 2005). Akridin-oranž je fluorofora koja se sa visokim afinitetom vezuje za acidofilne strukture u citoplazmi te se koristi za detekciju autofagozoma. Zavisno od zapremine i kiselosti vezikula, emituje se crvena fluorescencija odgovarajućeg intenziteta. Ukoliko se veže za DNK, akridin oranž emituje zelenu fluorescenciju.

CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^5$ ) su tretirane 24 h sa  $37 \mu\text{M}$  Saq ili Saq-NO, nakon čega su kulture oprane u PBS-u, a ćelije sakupljene tripsinizacijom. Bojenje akridin-oranžom (finalna koncentracija  $1 \mu\text{g/ml}$ ) rađeno je na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Pranjem ćelija u PBS-u odstranjen je višak boje. Zelena i crvena fluorescencija, očitane na FL1 odnosno FL3 kanalu, analizirane su CellQuestPro programom.

### **3.5.6.7. Merenje količine unutarćelijskog azot-monoksida**

Za kvantifikaciju unutarćelijskog NO korišćen je DAF-FM diacetat (Kojima i sar., 1998, 1999). To je fluorescentna boja koja pasivno difunduje kroz ćelijske membrane, a deacetilacijom ćelijskim esterazama biva zarobljena u citoplazmi ćelija. Sam DAF-FM ima svoju fluorescenciju koja se dramatično povećava nakon reakcije sa NO kada nastaje derivat benzotriazola (Kojima i sar., 1998, 1999)

Nakon 24 h tretmana sa GIT-27NO, Saq-NO ili konvencionalnim donorima NO (SNP, Deta NONOat, SIN-1 hlorid, SNAP), ćelije su oprane 2 puta sa PBS i inkubirane 1 h na  $37^\circ\text{C}$  u  $5 \mu\text{M}$  rastvoru DAF-FM diacetata u medijumu za uzgajanje bez fenol crvene boje. Ćelije su potom ponovo oprane 2 puta PBS i inkubirane dodatnih 15 minuta na  $37^\circ\text{C}$  u medijumu bez fenol crvene boje i bez seruma, radi završavanja reakcije deacetilacije ćelijskih esteraza. Očitane vrednosti zelene fluorescence na Chameleon fluorimetru su deljene sa brojem adherentnih ćelija procenjenim kristal violet testom, sa ciljem dobijanja vrednosti prosečne fluorescence po ćeliji. Rezultati su prikazani kao umnožak vrednosti prosečnog intenziteta fluorescence po ćeliji netretiranih kultura

kojima je arbitrarno data vrednost 1. Za potrebe finije detekcije u slučaju tretmana ćelija sa Saq-NO korišćen je FACSCalibur protočni citofluorimetar, a dobijeni podaci su analizirani CellQuestPro programom.

#### **3.5.6.8. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta**

Produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u ćelijama kancera kolona, kao posledica 24 h tretmana sa GIT-27NO, Saq-NO ili konvencionalnim donorima NO (SNP, Deta NONOat, SIN-1 hlorid, SNAP) detektovana je primenom DHR boje. Reč je o nepolarnom jedinjenju koje lako ulazi u ćelije u kojima postaje fluorescentno nakon reakcije sa reaktivnim kiseoničnim i azotnim vrstama.

Ćelijske kulture su inkubirane 20 minuta na 37 °C sa 4 μM rastvorom DHR boje u medijumu za uzgajanje ćelija, koji je finalno razblaživan do 1 μM rastvora dodavanjem GIT-27NO, Saq-NO ili konvencionalnih donora NO. Intenzitet zelene fluorescence je meren na Chameleon fluorimetru i deljen sa brojem adherentnih ćelija kvantifikovanim kristal violet testom, sa ciljem dobijanja prosečne vrednosti fluorescence po ćeliji. Rezultati su prikazani kao umnožak vrednosti prosečnog intenziteta fluorescence po ćeliji netretiranih kultura kojima je arbitrarno data vrednost 1. Za potrebe finije detekcije u slučaju tretmana ćelija sa Saq-NO korišćen je FACSCalibur protočni citofluorimetar, a dobijeni podaci su analizirani CellQuestPro programom.

#### **3.5.6.9. Određivanje membranske ekspresije DR5 receptora**

Kultura ćelije kancera kolona HCT116 poreklom od čoveka, konfluentnosti od oko 60 %, tretirana je 37.5 μM koncentracijom Saq i Saq-NO u trajanju od 24 h. Po završetku tretmana, ćelije su oprane sa PBS i odlepljene sa podloge primenom jakog mlaza hladnog rastvora EDTA (1 mM) u PBS. Suspenzija ćelija je još jednom oprana sa PBS, a zatim su ćelije ostavljene 1 h na sobnoj temperaturi u medijumu za kultivaciju kako bi se oporavile od skidanja sa podloge i rekonstituisale membrane, pre fluorescentnog obeležavanja membranskih DR5 receptora u daljem toku eksperimenta. Od medijuma za kultivaciju, ćelije su oprane u 0.5 % BSA-PBS, a zatim inkubirane 45 minuta na



sobnoj temperaturi sa anti- DR5 antitelom produkovanim u mišu (razblaženje 1:1000) u 0.5 % BSA-PBS. Od primarnog antitela ćelije su prane dva puta u 0.5 % BSA-PBS, a zatim su 30 minuta inkubirane na sobnoj temperaturi u mraku sa anti-miš antitelom konjugovanim sa FITC fluoroforom (razblaženje 1:200) u 0.5 % BSA-PBS. Od sekundarnog antitela ćelije su dva puta prane u 0.5 % BSA-PBS, a zatim su fiksirane sa 1 % paraformaldehidom 10 minuta na 4 °C. Kao kontrola specifičnosti primarnog anti-DR5 antitela prema ovom membranskom receptoru poslužile su ćelije inkubirane samo sa sekundarnim antitelom. Fluorescenca je detektovana FACSCalibur protočnim citofluorimetrom i analizirana CellQuest programom.

### **3.5.7. Priprema uzoraka i izolacija totalne RNK**

CT26CL25 ćelije su sađene u sterilne ploče sa 6 bunarića ravnog dna, i po dostizanju 80 % konfluentnosti tretirane su 6 h sa 75 µM GIT-27NO. Supernatanti kultura su odbacivani, a na kulturu ćelija je sipano 400 µl rastvora za izolaciju totalne RNK (mi-Total RNA Isolation Kit). Lizat ćelija je skupljan u male konusne eprivete i držan na -20 °C preko noći.

Po odmrzavanju, uzorci su držani 2 minuta na sobnoj temperaturi i intenzivno vorteksirani. Zatim su dopunjavani sa po 100 µl hloroforma, resuspendovani i ostavljani 2 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirani. Nakon centrifugiranja na 12000 g u trajanju od 20 minuta na 4 °C u malim konusnim epruvetama su se jasno izdvojila tri sloja: gornja vodena faza u kojoj se nalazila RNK, intermedijarna faza sa DNK, i donja faza u kojoj su proteini i lipidi. Gornji, vodeni sloj je prebacivan u čiste male konusne epruvete, a ostatak je odbacivan. RNK je precipitirana dodavanjem 400 µl izopropil-alkohola po epruveti, nakon čega su epruvete vorteksirane i ostavljane 10 min na -20 °C. Zatim su epruvete centrifugirane 20 minuta na 12000 g na 4 °C. RNK je istaložena na dnu, a supernatanti odlivani. Slabo vidljiv talog RNK je zatim pran dodavanjem 750 µl 70 % etanola, resuspendovanjem i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 12000 g na 4 °C. Potom je odlivan etanol, a talog RNK je sušen 5 do 15 minuta, dok nije ispario sav etanol i finalno rastvaran u 10 µl destilovane vode.

### 3.5.8. Reakcija reverzne transkripcije

Nakon izolacije RNK molekuli su prevedeni u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije (RT). Uzorak se sastoji od: 1  $\mu$ l nasumičnih heksamernih prajmera (0.2  $\mu$ g/ml), 1  $\mu$ l 10 mM rastvora sva četiri dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP, po 2 mM ATP, TTP, GTP i CTP), 10  $\mu$ l izolovane RNK. Zatim su uzorci inkubirani na 70 °C u trajanju od 5 minuta, što obezbeđuje nasumično vezivanje prajmera za RNK, nakon čega se reakcija prekida prebacivanjem uzoraka na led. Potom je u uzorke dodavano po 4  $\mu$ l pufera za reverznu transkripciju, po 1  $\mu$ l enzima reverzne transkriptaze Moloni virusa mišje leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas, Litvanija), po 0.5  $\mu$ l inhibitora RNaze (Ribolock®, Fermentas, Litvanija) i po 2.5  $\mu$ l destilovane vode. Zatim su uzorci mešani i inkubirani na 25 °C 15 minuta, a potom na 42 °C, temperaturi optimalnoj za funkcionisanje reverzne transkriptaze u trajanju od 60 minuta. Konačno, reakcija je prekidana inkubacijom uzoraka 10 minuta na 70 °C, temperaturi na kojoj dolazi do inaktivacije enzima reverzne transkriptaze i 3 minuta na 95 °C, u cilju razdvajanja sintetisanih lanaca cDNK. Uzorci sa cDNK su čuvani na 4 °C do dalje upotrebe.

### 3.5.9. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu

Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu („Real-time“ PCR) je metoda koja pored umnožavanja proizvoda omogućava njegovu kvantifikaciju i koristi se za analizu relativne ekspresije gena. U eksperimentima je korišćena mikroploča sa 96 bunarića prilagođena za kvantitativni PCR (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) i u svaki od bunarčića dodavano je po 10  $\mu$ l reakcione smeše SYBR Green PCR Master Mix, koji sadrži potrebnu fluorescentnu boju SYBR Green, enzim AmliTaq Gold koji je DNK polimeraza i dNTP i po 1  $\mu$ l specifičnih prajmera (finalna koncentracija prajmera je 500 nM) za gen od interesa ili za referentni gen  $\beta$ -aktin. Korišćeni parovi prajmera dati su u tabeli 3. Potom je u svaki bunarić dodavano po 8  $\mu$ l odgovarajućeg uzorka cDNK. Svi uzorci su rađeni u duplikatima. Bunarići su zapečaćeni optičkim adhezivnim filmom (Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD), ploča je centrifugirana 2 minuta na 1000 g, prenetu u termoblok aparata za kvantitativni PCR (ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Karlsbad,

Kalifornija, SAD). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: 1 minut na 95 °C u cilju denaturacije lanaca, a zatim 60 ciklusa koji su obuhvatali 15 sekundi na 95 °C, za početnu denaturaciju lanaca i 1 minut na 60 °C, za vezivanje prajmera i elongaciju lanaca. Po završenom umnožavanju se postepeno snižava temperatura termo bloka, uz praćenje smanjenja intenziteta fluorescencije, koje odgovara disocijaciji nastalog proizvoda. Ovaj korak obezbeđuje proveru kontaminacija uzoraka genomskom DNK kao i eventualnog nastanka tzv. dimer prajmera. Za analizu dobijenih rezultata korišćen je odgovarajući kompjuterski program (7500 System software; Applied Biosystems, Karlsbad, Kalifornija, SAD) obezbeđen od proizvođača aparata za kvantitativni PCR. Nivo ekspresije ispitivanog gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao  $2^{-dCt}$  gde je  $dCt$  razlika između  $Ct$  vrednosti gena od interesa i  $\beta$ -aktina. Nivoi ekspresije gena za kaspaze 3 i 8 prikazani su kao umnožak vrednosti dobijene kod netretiranih kultura kojima je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

**Tabela 3. Parovi prajmera korišćeni u „Real-time“ PCR**

<b>Gen</b>	<b>Parovi prajmera</b>	<b>Pristupni broj u bazi podataka</b>
<b>Bax</b>	5'-TGAAGACAGGGGCCTTTTTG-3' 5'-AATTCGCCGGAGACTCG-3'	NM_007527
<b>Bcl-2</b>	5'-TCGCAGAGATGTCCAGTCAG-3' 5'-CCTGAAGAGTTCCTCCACCA-3'	NM_177410.2
<b>Bcl-X<sub>L</sub></b>	5'-CGGAGAGCGTTCAGTGATCT-3' 5'-TGCAATCCGACTCCCAATA-3'	NM_009743.4
<b>Kaspaza 3</b>	5'-TCTGACTGGAAAGCCGAAACT-3' 5'-AGGGACTGGATGAACCACGAC-3'	NM_009810
<b>Kaspaza 8</b>	5'-TCAACTTCCTAGACTGCAACCG-3' 5'-CTCAATCCAACCTCGCTCACTT-3'	NM_009812
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	5'-GGACCTGACAGACTACC-3' 5'-GGCATAGAGGTCTTTACGG-3'	NM_007393.3

### **3.5.10. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju**

Koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija merena je metodom po Loriju (Lowry i sar., 1951). Uzimano je 20  $\mu$ l uzoraka razblaženih 10 puta u destilovanoj vodi i mešano (uz snažno vorteksiranje) sa 300  $\mu$ l rastvora 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0.1 M NaOH, 1 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  i 2 % K-Na-tartarat u  $\text{H}_2\text{O}$ , pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 minuta, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno vorteksiranje. Apsorbanca uzoraka merena je na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče. Za konstruisanje standardne krive, na osnovu koje su određivane koncentracije proteina u uzorcima, korišćen je rastvor BSA (0.1-1 mg/ml) u destilovanoj vodi.

### **3.5.11. Imunoblot analiza za određivanje količine proteina**

Za određivanje relativne količine Akt signalnog molekula (fosforilisanog i ukupnog), ribozomalnog S6 proteina (fosforilisanog i ukupnog), tumor supresora p53, antiapoptotskog molekula XIAP-a, antimetastatskog proteina RKIP i ciklina D3 rađena je imunoblot analiza.

Tretman ćelijskih linija kancera kolona ( $1 \times 10^6$ ) Saq ili Saq-NO (37.5  $\mu$ M za CT26CL25 odnosno 18.75  $\mu$ M za HCT116 ćelije) prekidan je u različitim vremenskim tačkama pranjem kultura ledeno hladnim PBS i dodavanjem hladnog rastvora za liziranje (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 na 25 °C, 2% SDS, 10% glicerola i 50 mM DTT u destilovanoj vodi) koji je neposredno pred upotrebu obogaćen inhibitorima proteaza (10 $\mu$ g/ml aprotinin, 2mM EDTA i 1mM PMSF). Od trenutka liziranja ćelija počinju procesi kao što su defosforilacija, denaturacija i proteoliza, koji se usporavaju držanjem uzoraka na ledu. Lizati su kuvani 5 minuta na 100 °C i više puta provučeni kroz nastavak pipete radi razbijanja oslobođene DNK na što sitnije delove i smanjenja viskoznosti uzorka. Nakon centrifugiranja 20 minuta na 20000 g na 4 °C, supernatanti sa rastvorenim proteinima su prebačeni u nove male konusne epruvete dok je talog sa ćelijskim debrisom i DNK odbačen. Koncentracija proteina određivana je metodom po Loriju.

Uzorci (30 µg proteina) su mešani u odnosu 4:1 sa standardnim puferom za nalivanje na gel za elektroforezu, tzv. 4x Lemli puferom (1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 % SDS, 0.2 M β-merkaptoetanol, 0.004 % bromfenol plavo, 20 % glicerol) (Laemmli, 1970) i razdvojeni elektroforezom na 12 % SDS-poliakrilamidnom gelu. Po završenoj elektroforezi sledio je transfer na polivinil difluoridnu membranu. Transfer je izvršen korišćenjem polusuvog sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Goettingen, Nemačka) na 5 mA/cm<sup>2</sup>. Nespecifično vezivanje antitela blokirano je 1h na sobnoj temperaturi sa 5 % BSA (Frakcija V) u PBS sa 0.1 % Tween-20, a zatim su membrane inkubirane preko noći na 4 °C sa antitelima specifičnim za p-Akt, Akt, p-S6, S6, XIAP, RKIP, p53, ciklin D3 ili β-aktin (tabela 1) rastvorenim u 1 % BSA (Frakcija V) u PBS-u sa 0.1 % Tween-20. Potom je usledila inkubacija u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom (tabela 1) konjugovanim sa peroksidazom rena (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija) i koje pokazuje specifičnost za IgG kunića ili miša. Vezana antitela detektovana su hemiluminescencijom (ECL, GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija). Količina proteina merena je denzitometrijski upotrebom programa ImageJ (Nacionalni institut za zdravlje, SAD) i preračunata u odnosu na količinu totalnih, nefosforilisanih formi proteina (kod p-Akt ili p-S6) ili na količinu β-aktina, što je izraženo grafički na slikama.

### **3.5.12. Imunocitohemijsko bojenje**

Imunocitohemijsko bojenje je metoda zasnovana na specifičnoj interakciji antigen-antitelo, koja omogućava *in situ* detektovanje unutarćelijskih ili membranskih molekula. Predmet bojenja su fiksirane ćelijske kulture, a ne histološki preparati, što je glavna razlika od njemu sličnog imunohistohemijskog bojenja. Za detekciju i procenu promene nivoa ekspresije tumor supresora p53 u ćelijama tretiranim GIT-27NO primenjena je indirektna, višestepena imunocitohemijska metoda.

Nakon GIT-27NO tretmana (75 µM) u trajanju od 24 h, mikroskopska pločica sa komoricama u kojima su posađene CT26CL25 ćelije dobro je oprana sa PBS. Ćelije su potom fiksirane korišćenjem 4 % paraformaldehida u trajanju od 20 minuta. Permeabilizacija membrana, kako bi antitelima koja se koriste u ovoj metodi bio

omogućen pristup intracelularnom odeljku, izvršena je tretiranjem ćelija 0.5 % rastvorom deterdženta Triton X-100 u PBS (u daljem tekstu PBST) 30 minuta. Aktivnost endogenih peroksidaza blokirana je sa 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -10 % metanol u PBST 10 minuta, a mesta za koja bi mogla da se nespecifično vežu antitela blokirana su sat vremena sa 5 % FBS u 0.1 % PBST. Svi do sada navedeni koraci u imunocitohemijskom bojenju, rađeni su na sobnoj temperaturi. Izlaganje ćelija primarnom zečijem poliklonskom antitelu specifičnom za totalni p53 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SAD) razblaženom 500 puta u 1% BSA-PBS trajalo je preko noći na temperaturi od 4 °C. Detekcija reakcije antigen-primarno antitelo je rađena pomoću ExtrAvidinPeroksidaza kita (Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD) prema uputstvima preporučenim od strane proizvođača. To je podrazumevalo sledeće: tretmani od po 30 minuta na sobnoj temperaturi prvo sekundarnim anti-zečijim IgG biotiniziranim antitelom razblaženim 20 puta u 1 % BSA-PBS, a potom ekstravidinom konjugovanom peroksidazom rena, takođe razblaženom 20 puta u 1 % BSA-PBS. Kulture ćelija su prane 3 puta po 5 minuta u PBS-u nakon isteka tretmana svakog koraka metode. Kao supstrat ekstravidin peroksidaze ćelijama je ponuđen 0.5 % diaminobenzidin (R&D Systems, Mineapolis, MN, SAD) rastvoren u 0.1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –PBS. Odmah po uočenom razvitku braon boje, reakcija je prekidana pranjem ćelija PBS nakon čega su komorice skidane sa mikroskopske pločice. Kontrastno bojenje, koje omogućava uočavanje ćelijskih membrana pod mikroskopom, rađeno je Majerovim hematoksilinom 30-60 sekundi. Pločice su najpre prane destilovanom, a potom tekućom vodom do razvitka plavičaste boje. Priprema preparata je završena nanošenjem glicergela (Dako, Glostrup, Danska) i stavljanjem pokrovnog stakla. Nakon sušenja glicergela preko noći, preparati su posmatrani pod Zeiss Axiovert mikroskopom (Zeiss, Jena, Nemačka).

### **3.5.13. Tretman ćelija u „trodimenzionalnoj“ kulturi**

„Trodimenzionalna“ kultura podrazumeva rast ćelija u prisustvu komponenata ekstraćelijskog matriksa. U tu svrhu se koristi komercijalno dostupan Matrigel<sup>®</sup> - smeša ekstraćelijskih proteina koje sekretuju Engelbret-Holm-Svarm (EHS) ćelije mišjeg sarkoma. Gajenje kultura ćelija na Matrigel<sup>®</sup>-u, koji je bogat proteinima bazalne

membrane (kolagenom IV, lamininom i heparan-sulfat proteoglikanima) i faktorima rasta (FGF, EGF, IGF-1, PDGF, TGF- $\beta$ ), omogućava uvid u kompleksnije ponašanje ćelija koje se inače ne može prepoznati prilikom rasta na plastičnoj podlozi (Kleinman i sar., 1982; Ulrich i sar., 2009). Često se uočava promena morfologije ćelija, promena u organizaciji kulture (formiranje kanala, rast u kolonijama) kao i drugačiji odgovor na tretman (Sahai i Marshall, 2003).

Matrigel<sup>®</sup> koji se čuva na -20 °C, topljen je preko noći na 4°C. Ploče sa 96 bunarića ravnog dna su oblagane tankim slojem nerazblaženog Matrigel<sup>®</sup> (10 mg/ml), kome je dozvoljeno da polimeriše 1 h na 37 °C. Zatim su u ploče sadene HCT116 i CT26CL25 ćelije ( $5 \times 10^4$ ), i nakon 4 h dodavani Saq ili Saq-NO. Nakon 72 h, kulture su posmatrane Zeiss Axiovert mikroskopom i slikane pod uvećanjem od 100 puta.

#### **3.5.14. Esej za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija**

Ćelije su tretirane Saq ili Saq-NO (18.7  $\mu$ M za CT26CL25 i 9.4  $\mu$ M za HCT116 ćelije) u trajanju od 24 h, oprane PBS i resuspendovane u medijumu za uzgajanje. Oporavak od tripsinizacije i rekonstitucija ćelijskih membrana trajala je 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se pristupalo određivanju uticaja tretmana na adhezivnost ćelija. Sterilne ploče za gajenje ćelija u suspenziji sa 96 bunarića (Sarstedt, Njuton, NC, SAD) obložene su sa 20  $\mu$ g/ml Matrigel<sup>®</sup> na 4 °C preko noći. Bunarići obloženi Matrigel<sup>®</sup> oprani su 3 puta PBS, i u njih je sadeno  $6 \times 10^4$  ćelija kojima je dozvoljeno da adheriraju 1 h na 37 °C. Ćelije koje se nisu vezale za komponente ekstraćelijskog matriksa ukonjene su pranjem kultura u PBS-u, dok je broj preostalih adherentnih ćelija određivan kristal violet testom.

### 3.5.15. 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).

Za procenu uticaja Saq i Saq-NO tretmana na migraciju i invaziju CT26CL25 i HCT116 ćelija *in vitro*, korišćene su komorice čije je dno u vidu membrane, prečnika 6.4 mm i dijametra pora 8  $\mu\text{m}$  (BD Labware, Bedford, MA, SAD) koje su stavljane u ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bunarića. Za potrebe invazionog eseja, gornja površina membrana ovih komorica bila je obložena tankim slojem Matrigel-a (500  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{l}$  po membrani) kome je dozvoljeno da polimeriše 1 h na 37 °C. Kod migracionog eseja membrana je ostajala neobložena. Ćelijske linije kancera kolona su tretirane 24 h Saq ili Saq-NO (dozom 18.7  $\mu\text{M}$  za CT26CL25 i 9.4  $\mu\text{M}$  za HCT116 ćelije). Po završetku tretmana ćelije su skupljene tripsinizacijom, oprane PBS-om i resuspendovane u „gladnom medijumu“ (0.1 % BSA-RPMI 1640). U svaku komoricu posađeno je po  $2 \times 10^5$  ćelija. Kao hemoatraktivni stimulus poslužio je medijum za kultivaciju (10 % FBS - RPMI-1640) koji je stavljen sa spoljne strane komorica, u bunariće ploče za kultivaciju ćelija. Ploče su inkubirane na 37 °C sa 5 %  $\text{CO}_2$  u trajanju od 12 h za invaziju i 24 h za migraciju, nakon čega su membrane fiksirane u 4 % paraformaldehidu i bojene Majerovim hematoksilinom. Ćelije na gornjoj površini membrane koje nisu uspele da migriraju kroz pore (kod migracionog eseja) ili da prođu kroz sloj Matrigel® (kod invazionog eseja), pažljivo su uklonjene pamučnom vatom. Ćelije na donjoj površini membrane brojane su pod svetlosnim mikroskopom (400  $\times$  uveličanje), korišćenjem novog CAST Visopharm Integrator sistema (Danska). Prikazan je prosečan broj ćelija izbrojanih u 30 nezavisnih polja (200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ) na donjoj površini membrana. Svaki eksperiment je rađen u triplikatu.

### 3.5.16. Indukcija kancera kolona i tretman životinja

CT26CL25 ćelije ( $5 \times 10^6$ ) su ubrizgane subkutano u desni dorzalni lumbosakralni region singenih BALB/c miševa. Rast tumora je praćen dva puta nedeljno, a njegova veličina merena je u tri dimenzije. Volumen tumora ( $\text{mm}^3$ ) računat je po formuli:  $a \times b^2$



x 0,52, gde je a najduži, a b najkraći izmereni dijametar. Četrnaestog dana po indukciji, tumori su postali palpabilni, a životinje nasumično raspoređene u grupe od po 10. Analiza urađena nakon raspodele životinja po grupama pokazala je da nije bilo statistički značajnih razlika u volumenima tumora na početku tretmana između različitih grupa. Jedna grupa životinja je ostavljena bez tretmana dok je drugim grupama narednih 15 dana svakodnevno intraperitonealno davan Saq, Saq-NO (10 mg/kg), GIT-27NO (0.5 mg/miš) ili sam rastvarač ovih agenasa - DMSO (20 %). Kao pozitivna kontrola jednoj grupi je svakodnevno davan konvencionalni citostatik doksorubicin (2 mg/kg).

### **3.5.17. Indukcija plućnih metastaza kancera kolona**

Pluća su, pored jetre, najčešće mesto metastaziranja kancera kolona (Iwasaki i sar., 2005; Rama i sar., 2009; Pfannschmidt i sar., 2007). Stoga su za evaluaciju celokupnog antutumorskog potencijala novih supstanci od velikog značaja *in vivo* metastatski modeli u kojima je ćelijama kancera kolona omogućena kolonizacija pluća imunokompatibilnih životinja (Sakurai i sar., 2003; Weis i sar., 2004).

Kultura CT26CL25 ćelija je tretirana Saq ili Saq-NO (37.5  $\mu$ M) u trajanju od 24 h nakon čega su ćelije skupljene tripsinizacijom i resuspendovane u PBS. Kontrolna kultura ćelija rasla je u standardnom medijumu za kultivaciju bez tretmana. Sa ciljem vazodilatacije i lakšeg intravenskog ubrizgavanja ćelija, miševi singenog soja BALB/c grejani su pod lampom 30 minuta. Eksperimentalne životinje su podeljene u tri grupe: one koje će dobiti ćelije prethodno tretirane Saq ili Saq-NO i one koje će dobiti kontrolne ćelije, te im je u repnu venu ubrizgano 100  $\mu$ l odgovarajuće ćelijske suspenzije ( $3 \times 10^6$  ćelija/ml). Životinje u eksperimentu nisu dobijale nikakvu terapiju i redovno su praćene radi procene opšteg stanja i kontrole vijabiliteta. Nakon 18 dana od intravenske inokulacije ćelija, životinje su žrtvovane, a pluća izvađena sterilnim priborom. Radi kvantifikacije uticaja Saq i Saq-NO na metastatski potencijal CT26CL25 ćelija *in vivo*, brojani su metastatski nodusi u plućima svakog miša.

### 3.6. Analiza izobologramom

Za utvrđivanje efekata kombinovane primene Saq ili Saq-NO i TRAIL-a korišćena je analiza izobologramom. Izobologram je grafik koji se konstruiše u cilju utvrđivanja interakcije dva agensa (Berenbaum, 1981).

Kultura HCT116 ćelija je tretirana 24 h različitim koncentracijama Saq, Saq-NO (9.4, 18.75 i 37.5  $\mu$ M) ili TRAIL (1.25, 2.5, 5 i 10 ng/ml) kao i kombinacijama ovih agenasa (Saq i TRAIL ili Saq-NO i TRAIL). Vijabilitet ćelija nakon tretmana određivan je kristal violet 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 FIC (engl. *fractional inhibitory concentration*). Kada je suma FIC jednaka jedinici, efekat dva kombinovana agensa je aditivan, što je na grafiku geometrijski pokazano kao prava linija; kada je suma ovih vrednosti  $< 1$ , agensi u kombinaciji deluju sinergistički i grafik pokazuje konkavnu krivu, dok kada je suma FIC  $> 1$ , odnos ispitivane kombinacije je antagonistički i grafik je konveksnog oblika.

### 3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$  triplikata kultura jednog, reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri izvedena, ili  $SV \pm SD$  više istih eksperimenata. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Student-Newman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednost parametra  $p$  manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

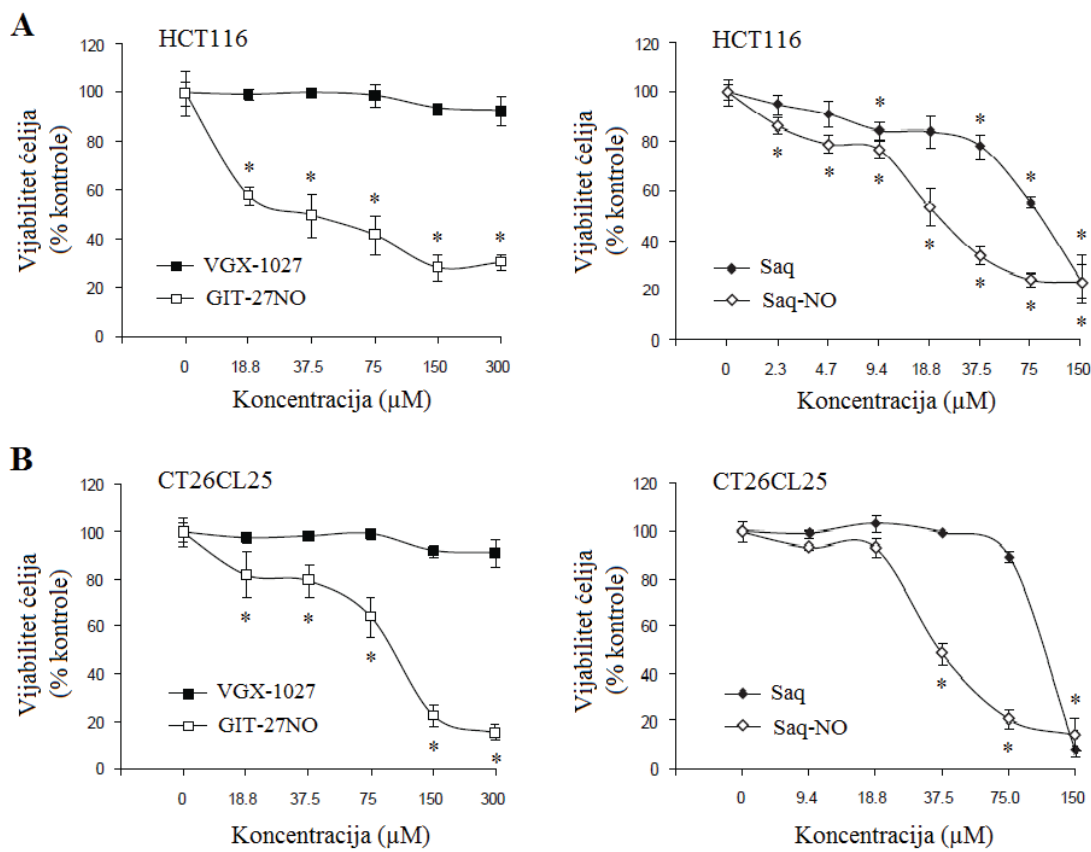
## **4. REZULTATI**

#### **4.1. Ispitivanje uloge NO-modifikacije u ostvarivanju antitumorskog delovanja GIT-27NO i Saq-NO**

##### **4.1.1. GIT-27NO i Saq-NO smanjuju vijabilitet ćelija kancera kolona *in vitro* i *in vivo***

Antitumorsko delovanje GIT-27NO i Saq-NO pokazano je na brojnim ćelijskim linijama kancera (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008, 2009; Mijatovic i sar., 2008, 2010, 2011; Donia i sar., 2009, 2011; Mojic i sar., 2012). U cilju ispitivanja potencijala ovih supstanci da u *in vitro* uslovima smanje rast ćelija kancera kolona, odabrane linije HCT116, poreklom od čoveka i CT26CL25, poreklom od miša, tretirane su širokim opsegom doza navedenih supstanci. Dodatno, kako bi se utvrdio doprinos kovalentnog vezivanja azot-monoksida za parentalno jedinjenje (NO-modifikacija) u antitumorskom delovanju GIT-27NO i Saq-NO, kulture su tretirane sa VGX-1027 i sa Saq. Tretman ćelija je trajao 24 h, nakon čega je vijabilitet procenjivan kristal violet testom.

GIT-27NO je dozno-zavisno smanjivao vijabilitet HCT116 i CT26CL25 ćelija, dok VGX-1027 nije uticao na rast navedenih kultura (slika 6, levi grafici). Sa druge strane, i Saq i Saq-NO su pokazali antitumorski potencijal *in vitro* (slika 6, desni grafici), ali je NO-modifikovana forma to činila pri znatno nižim dozama (letalna doza 50, LD<sub>50</sub>, Saq-NO u odnosu na Saq: 37.5 μM naspram 111.3 μM za CT26CL25 i 18.8 μM naspram 90.5 μM za HCT116). Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da je kod VGX-1027 kovalentno vezivanje azot-monoksida rezultovalo sticanjem antitumorskih svojstava, dok je ista hemijska manipulacija dovela do osnaživanja antitumorskog potencijala Saq.

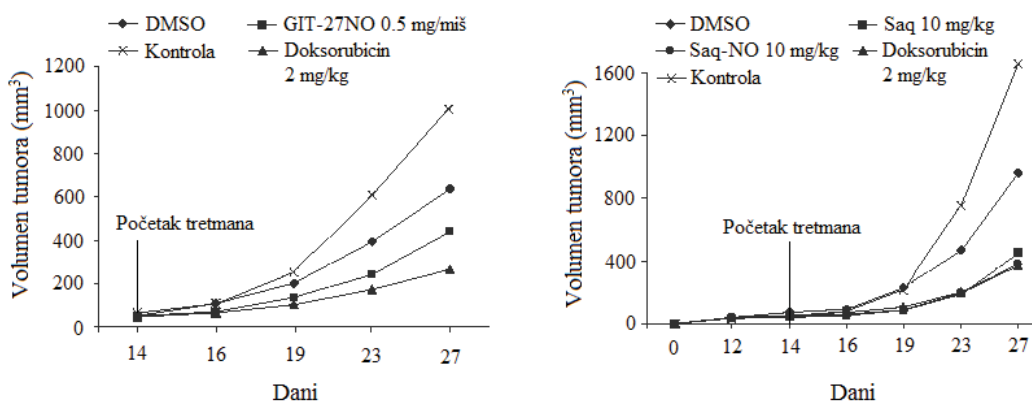


**Slika 6. GIT-27NO i Saq-NO smanjuju vijabilitet ćelija kancera kolona *in vitro***

HCT116 (A) i CT26CL25 (B) ćelije kancera kolona ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su 24 h širokim opsegom koncentracija VGX-1027, Saq i jedinjenja nastalih njihovom NO-modifikacijom, GIT-27NO i Saq-NO. Kulture koje su služile kao kontrole uzgajane su u medijumu bez tretmana. Relativan broj živih ćelija određivan je kristal violetom testom. Vijabilitet tretiranih ćelija prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Podaci predstavljaju srednju vrednost (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD) reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  se odnosi na kontrolne uzorke.

Kako bi se ispitala reproducibilnost *in vitro* dobijenih rezultata u *in vivo* sistemu, u singeni soj BALB/c miševa je potkožno ubrizgana suspenzija CT26CL25 ćelija ( $5 \times 10^6$ ). Sa intraperitonealnim davanjem tretmana otpočelo se 14. dana, kada su tumori postali palpabilni, a eksperiment je okončan 27 dana od inokulacije ćelija. Ovakvim eksperimentalnim dizajnom omogućeno je procenjivanje terapijskog, a ne preventivnog efekta GIT-27NO, odnosno Saq-NO. Statistički značajno smanjenje

volumena tumora kod životinja koje su primale ispitivane agense u odnosu na kontrolnu grupu uočeno je već nakon 5 dana davanja tretmana (slika 7). U poređenju sa kontrolnim životinjama, kod miševa iz GIT-27NO i Saq-NO grupe volumen tumora izmeren na kraju eksperimenta bio je značajno manji (za 50 % kod GIT-27NO, odnosno za 75 % kod Saq-NO, slika 7). Nasuprot *in vitro* dobijenim podacima, u *in vivo* eksperimentalnoj postavci nije uočena razlika u antitumorskom potencijalu Saq i Saq-NO (slika 7), ali je opšte stanje životinja tretiranih NO-modifikovanim agensom bilo evidentno bolje. Kao pozitivna kontrola korišćen je konvencionalni hemioterapeutik doksorubicin, u odnosu na koga je Saq-NO podjednako potentno smanjio volumen tumora, dok je GIT-27NO ostvario nešto slabiji učinak. Opšte uzev, dobijeni rezultati potvrđuju da su i u *in vivo* uslovima ispitivana NO-modifikovana jedinjenja sposobna da inhibiraju rast ćelija kancera kolona.

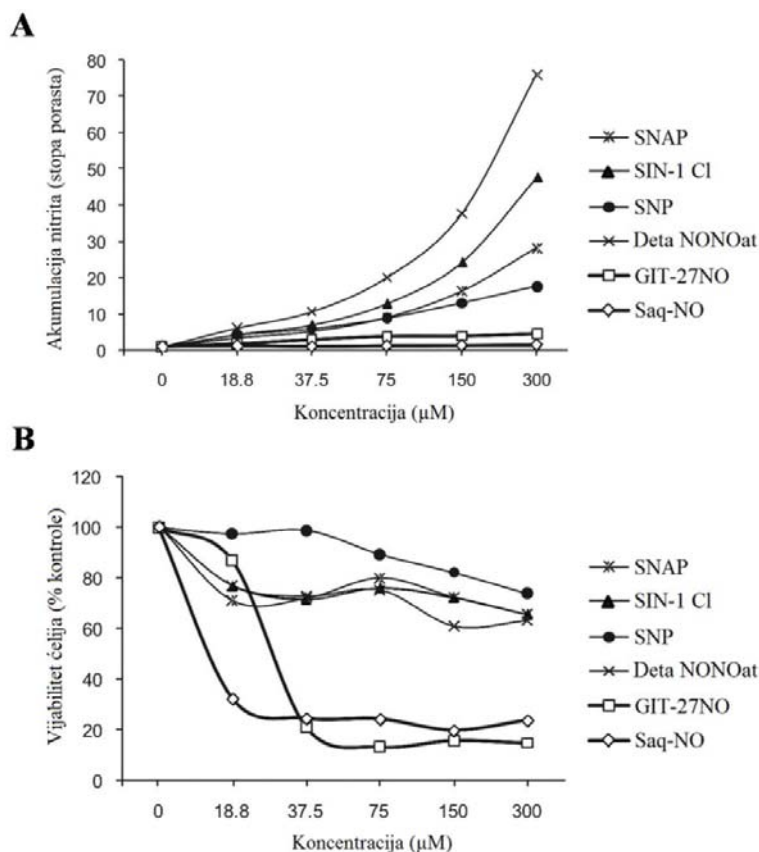


**Slika 7. GIT-27NO i Saq-NO inhibiraju rast CT26CL25 ćelija u BALB/c miševima**

Tumori su indukovani potkožnim ubrizgavanjem CT26CL25 ćelija ( $5 \times 10^6$ ) u desni dorzalni lumbosakralni region singenih BALB/c miševa. Od 14. dana, kada su tumori postali palpabilni, miševima je svakodnevno intraperitonealno davan GIT-27NO, Saq, Saq-NO, doksorubicin ili odgovarajući rastvor DMSO. Kontrolna grupa životinja je ostavljena bez tretmana. Volumeni tumora su mereni dva puta nedeljno do kraja eksperimenta, koji je okončan 27. dana od inokulacije ćelija. \*  $p < 0.05$  se odnosi na kontrolnu, netretiranu grupu životinja.

#### **4.1.2. Različita uloga azot-monoksida u antitumorskom delovanju GIT-27NO i Saq-NO**

Pošto su istovetnim pristupom, koji podrazumeva kovalentno vezivanje NO za parentalnu supstancu (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008, 2009), nastali agensi potentnijeg antitumorskog delovanja od originalnih jedinjenja, dalji eksperimenti su imali za cilj utvrđivanje uloge koju NO ima u smanjenju vijabiliteta ćelija kancera kolona tretiranih GIT-27NO ili Saq-NO. Najpre je ispitano u kojoj meri navedena jedinjenja otpuštaju NO, što je posredno učinjeno merenjem koncentracije akumuliranih nitrita u supernatantima tretiranih kultura. U poređenju sa konvencionalnim donorima NO (SNAP, SIN-1 Cl, SNP, Deta NONOat), količina otpuštenog NO od strane GIT-27NO je bila drastično manja, dok u slučaju Saq-NO nije bilo moguće detektovati akumulaciju nitrita ni u dozama višestruko jačim od LD<sub>50</sub> (slika 8A). Budući da su i GIT-27NO i Saq-NO daleko potentnije smanjivali vijabilitet ćelija od konvencionalnih donora NO (slika 8B), može se izvesti zaključak da količina otpuštenog NO detektovanog u supernatantima kultura ne mora nužno da korelira sa efikasnošću supstance da smanji vijabilitet ćelija.

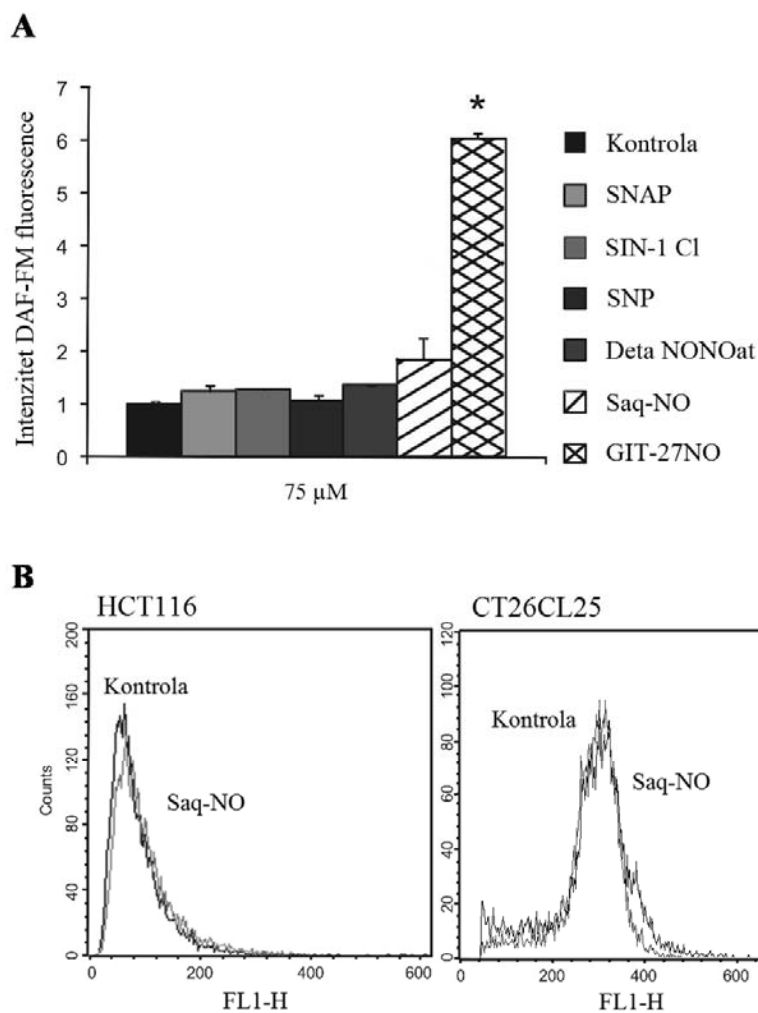


**Slika 8. Smanjenje vijabiliteta ćelija kancera kolona ne korelira sa količinom nitrita u supernatantima tretiranih kultura**

CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) su tretirane širokim opsegom doza konvencionalnih NO donora, GIT-27NO i Saq-NO. Nakon 24 h inkubacije, akumulacija nitrita u supernatantima kultura određivana je Griess-ovom reakcijom dok je vijabilitet ćelija procenjivan kolorimetrijski kristal violet testom. Vijabilitet tretiranih ćelija prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je srednja vrednost reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta, dok je standardna devijacija u svim tačkama bila manja od 10 %.

Obzirom na visoku reaktivnost NO, jasno je da njegova koncentracija u supernatantima tretiranih kultura ne mora da odgovara onoj unutar ćelija. Kako bi se kvantifikovale količine unutarćelijskog NO nakon 24 h tretmana, ćelije kancera kolona su bojene DAF-FM fluoroforom. Uočeno je da je od svih testiranih jedinjenja, od kojih je većina imala znatno veći potencijal oslobađanja NO u supernatantima kultura, jedino tretman GIT-27NO doveo do povišenog nivoa unutarćelijskog azot-monoksida (slika 9A).





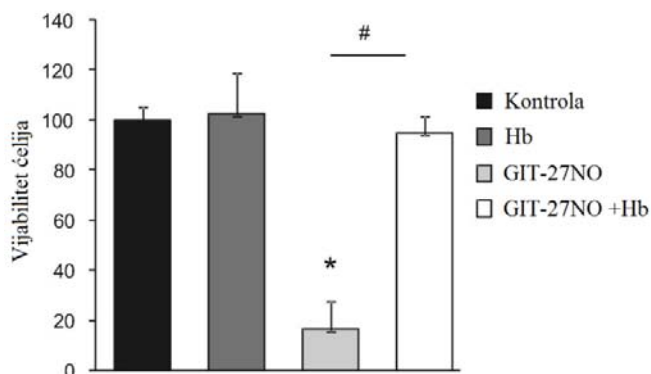
**Slika 9. Tretman GIT-27NO, ali ne i Saq-NO, rezultuje akumulacijom NO unutar ćelija**

(A) CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su 24 h sa  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO, Saq-NO ili sa navedenim konvencionalnim NO donorima, nakon čega su obojene DAF-FM bojom. Intenzitet zelene fluorescence je meren na Chameleon fluorimetru. Rezultati su prikazani kao umnožak vrednosti prosečnog intenziteta fluorescence po ćeliji netretiranih kultura kojima je arbitrarno data vrednost 1. Prikazana je  $SV \pm SD$  reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke (B) HCT116 i CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^5$ ) su nakon 24 h tretmana sa Saq-NO obojene DAF-FM bojom čiji je intenzitet fluorescence očitao na FACSCalibur protočnom citofluorimetru.

Dobijeni nalaz je u skladu sa rezultatima pređašnjih studija u kojima je uočeno da GIT-27NO otpušta NO samo u kontaktu sa ćelijom ili nekim njenim solubilnim produktom (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Kod ćelija tretiranih Saq-NO nije detektovana

unutarćelijska akumulacija NO (slika 9). Na osnovu ovog podatka i činjenice da nije detektovana akumulacija nitrita u supernatantima ćelija nakon Saq-NO tretmana, može se zaključiti da je posledica NO-modifikacije antiviralnog agensa nastanak novog hemijskog entiteta, koje ne otpušta NO u merljivim količinama.

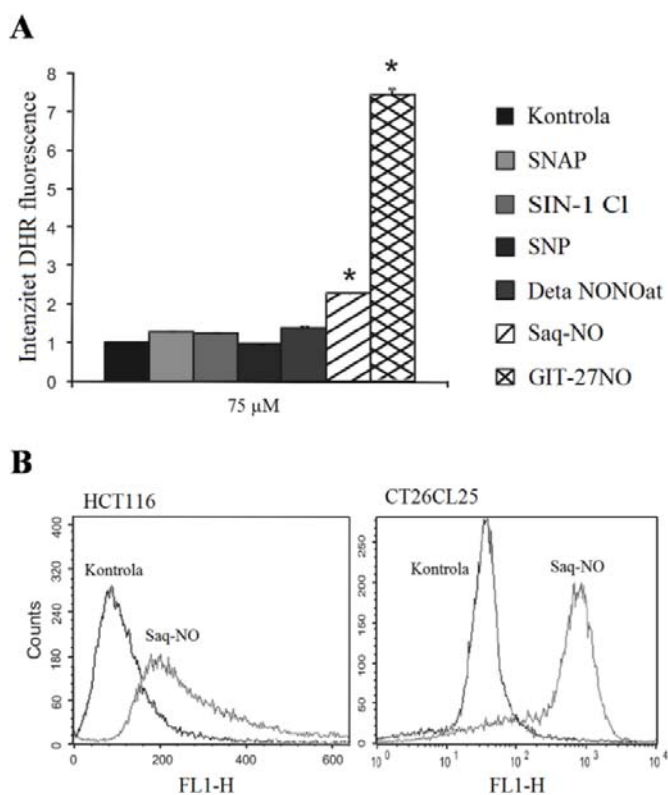
Da bi se potvrdilo da je otpuštanje NO zaista u osnovi antitumorskog delovanja GIT-27NO, ćelije su paralelno tretirane hemoglobinom, molekulom koji ima izuzetno veliki afinitet za vezivanje NO, ali isključivo u vanćelijskim uslovima (Gow i Stamler, 1998). Ovim eksperimentalnim pristupom se pruža uvid u antitumorski potencijal supstance u uslovima eliminisanog NO, otpuštenog u vanćelijskim uslovima. Dok je tretman citotoksičnom dozom GIT-27NO znatno redukovao broj živih ćelija, ko-tretman hemoglobinom je potpuno neutralisao antitumorsko delovanje ispitivane supstance, oporavivši vijabilitet ćelija do nivoa kontrolnih kultura (slika 10). Gore navedeni rezultati su pružili nedvosmislen dokaz da je NO, oslobođen od strane testirane komponente izvan ćelije, ključan za ostvarivanje njene toksične aktivnosti.



**Slika 10. Tretman hemoglobinom u potpunosti neutrališe antitumorsko delovanje GIT-27NO**

CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO,  $25 \mu\text{M}$  hemoglobinom (Hb) ili njihovom kombinacijom. Nakon 24 h, vijabilitet tretiranih ćelija određivan je kristal violet testom i prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je  $SV \pm SD$  reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  u odnosu na kontrolne uzorke. #  $p < 0.05$  u odnosu na ćelije tretirane sa GIT-27NO.

Kada se nađe unutar ćelije NO brzo reaguje sa stalno prisutnim molekularnim kiseonikom i/ili superoksid anjonom, što dovodi do nastanka čitavog spektra reaktivnih vrsta kiseonika i azota (Pryor i Squadrito, 1995). Radi njihove detekcije i kvantifikacije, ćelije su najpre bojene DHR bojom i tretirane 24 h sa GIT-27NO, Saq-NO ili sa konvencionalnim NO donorima, nakon čega je očitana fluorescena fluorofore. Očekivano, prethodno uočeni porast nivoa unutarćelijskog NO nakon tretmana GIT-27NO rezultovao je u generisanju ekvivalentno visokih koncentracija reaktivnih vrsta kisonika i azota (slika 11A).

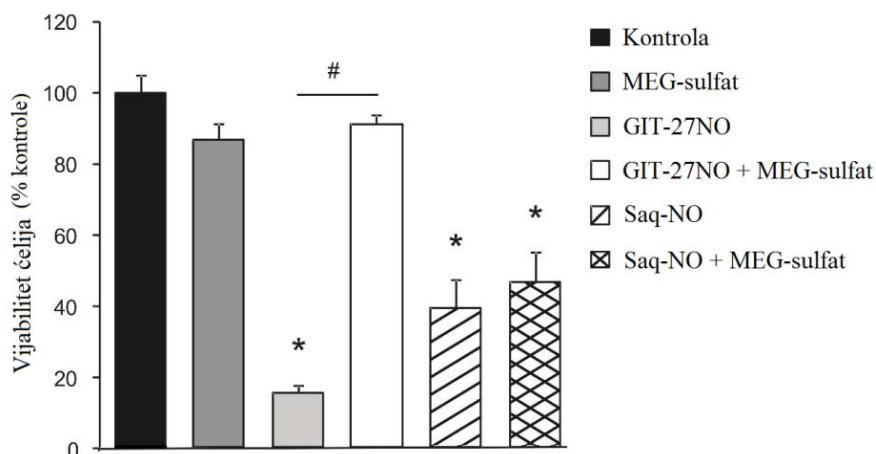


**Slika 11. GIT-27NO i Saq-NO indukuju produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i azota**

(A) CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) ćelije su obojene DHR bojom i tretirane 24 h sa 75 μM GIT-27NO, Saq-NO ili sa konvencionalnim NO donorima. Intenzitet fluorescence je očitana na Chameleon fluorimetru. Prikazana je SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke. (B) HCT116 i CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^5$ ) su obojene DHR bojom čiji je intenzitet fluorescence nakon 24 h tretmana sa Saq-NO očitana na FACSCalibur protočnom citofluorimetru.

Konvencionalni donori NO, koji su se pokazali potentnijim u otpuštanju ovog slobodnog radikala u vanćelijskim uslovima, ali koji nisu doveli do njegove značajne akumulacije unutar ćelija, nisu doveli ni do porasta nivoa ispitivanih reaktivnih vrsta. Zanimljivo je da tretman Saq-NO koji, iako ne otpušta NO u merljivim količinama, dovodi do generisanja reaktivnih vrsta kisonika i azota (slika 11), ali u daleko manjoj razmeri od GIT-27NO.

Iako tretman ćelija sa GIT-27NO i Saq-NO u oba slučaja rezultuje generisanjem reaktivnih vrsta kiseonika i azota, njihov značaj za antitumorsko delovanje navedenih supstanci može biti potpuno različit. Da bi se precizirala njihova uloga, a znajući da je peroksinitrit glavni produkt unutarćelijske oksidacije NO (Pacher i sar., 2007), ćelije su paralelno sa ispitivanim supstancama tretirane „hvatačem“ peroksinitrita, MEG-sulfatom. Navedeni ko-tretman je doveo do skoro potpunog oporavka vijabiliteta ćelija u slučaju GIT-27NO (slika 12), ali ne i Saq-NO.



**Slika 12. Peroksinitriti su medijatori toksičnosti GIT-27NO, ali ne i Saq-NO**

CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) su 24 h tretirane citotoksičnom dozom GIT27-NO (75  $\mu\text{M}$ ) odnosno Saq-NO (37.5  $\mu\text{M}$ ), sa ili bez prisustva hvatača peroksinitrita MEG-sulfata (100  $\mu\text{M}$ ). Vijabilitet tretiranih ćelija određivan je kristal violet testom i prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je SV  $\pm$  SD reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke. #  $p < 0.05$  odnosi se na ćelije tretirane sa GIT-27NO.

Rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima i potvrđuje ulogu peroksinitrita kao medijatora toksičnosti GIT-27NO. Odsustvo opravka vijabiliteta kod Saq-NO kotretmana sa MEG-sulfatom korelira sa činjenicom da se ova supstanca ne ponaša kao donor NO, te i da produkcija peroksinitrita nije u osnovi njenog antitumorskog delovanja.

U celini, do sada navedeni rezultati pokazuju da je NO modifikacija odgovorna za sticanje antitumorskog potencijala GIT-27NO, koji svoje delovanje ostvaruje akumulacijom visokih koncentracija NO unutar ćelija i posledičnim generisanjem oksidativnog i nitrozativnog stresa. U slučaju Saq-NO, isti tip modifikacije parentalnog jedinjenja je doveo do stvaranja novog hemijskog entiteta, čije je antitumorsko delovanje nezavisno od oslobađanja kvantitativno značajnih količina NO.

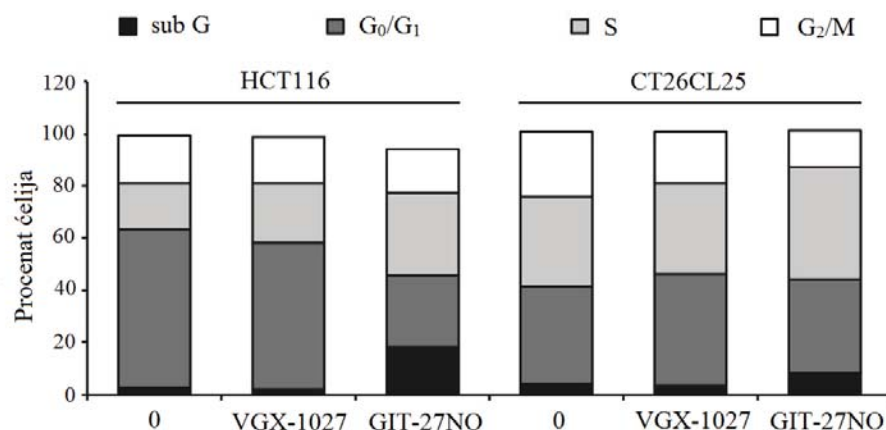
## **4.2 Ispitivanje mehanizma u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija kancera kolona tretiranih NO-modifikovanim agensima**

### **4.2.1 Mehanizam u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija tretiranih GIT-27NO**

#### **4.2.1.1. GIT27NO indukuje apoptozu HCT116 i CT26CL25 ćelija**

Prethodno dobijeni rezultati su okarakterisali GIT-27NO kao donora NO nove generacije i ukazali na značaj oslobađanja ovog slobodnog radikala i posledičnog generisanja reaktivnih vrsta kiseonika i azota za njegovo antitumorsko delovanje. Naredni eksperimenti imali su za cilj definisanje mehanizama u osnovi navedenog delovanja supstance, te je u tu svrhu analiziran uticaj tretmana GIT-27NO na distribuciju ćelija kancera kolona po različitim fazama ćelijskog ciklusa. Ćelije su nakon završetka tretmana citotoksičnom dozom GIT-27NO bojene propidijum jodidom, čija je fluorescencija očitavana na protočnom citofluorimetru. Razvrstavanje ćelija po fazama ćelijskog ciklusa vršeno je na osnovu količine jedarne DNK. Kako se i očekivalo, preraspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa kod uzoraka tretiranih VGX-1027 nije

značajnije odstupala od kontrolnih (slika 13). Nasuprot tome, tretman GIT-27NO je kod obe ćelijske linije kancera kolona doveo do akumulacije hipodiploidnih ćelija u sub G fazi. Budući da je akumulacija ćelija u sub G fazi ćelijskog ciklusa uočavana tek nakon dužeg trajanja tretmana (24 h u slučaju CT26CL25, odnosno 48 h kod HCT116 ćelija), rezultat implicira da indukcija brze ćelijske smrti nekrozom najverovatnije nije u osnovi antitumorskog delovanja GIT-27NO.

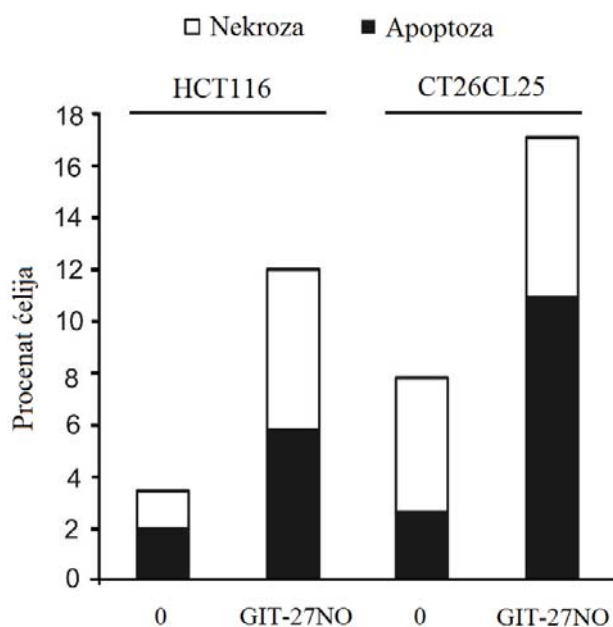


**Slika 13. Uticaj GIT-27NO tretmana na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa**

Kulture ćelija kancera kolona ( $3 \times 10^5$ ) su tretirane sa  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO ili VGX-1027 u trajanju od 24 h za CT26CL25 odnosno 48 h za HCT116 ćelije. Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez tretmana. Ćelije su obojene propidijum jodidom ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) i na osnovu intenziteta fluorescence izmerene protočnom citofluorimetrijom razvrstavane po fazama ćelijskog ciklusa.

Kako bi se ispitalo da li je u osnovi citocidnog delovanja GIT-27NO indukcija ćelijske smrti apoptozom pristupilo se dvostrukom bojenju ćelija fluorescentno obeleženim aneksinom V i propidijum jodidom. Aneksinom V se detektuje premeštanje fosfatidil serina u spoljašnji sloj plazma membrane, što je događaj rane apoptoze, dok se propidijum jodid koristi radi diskriminacije apoptotičnih od nekrotičnih ćelija (Vermes i sar., 1995). Ćelije su tretirane citotoksičnom dozom GIT-27NO ( $75 \mu\text{M}$ ) 24 h, u slučaju CT26CL25, odnosno 48 h u slučaju HCT116 ćelija, nakon čega su uzorci obojeni fluorescentno obeleženim aneksinom V i propidijum jodidom. Analiza protočnom citofluorimetrijom (slika 14) je kod obe ćelijske linije ukazala na porast procentualne

zastupljenosti aneksin V<sup>+</sup>/ propidijum jodid<sup>-</sup> ćelija, to jest ćelija u ranoj fazi apoptoze. Pored pomenute populacije, uočeno je i prisustvo dvostruko pozitivnih ćelija (aneksin V<sup>+</sup>/ propidijum jodid<sup>+</sup>), kod kojih je pored izvrtnanja fosfatidil serina došlo i do gubljenja integriteta plazma membrane, što je odlika kasno apoptotskih ili sekundarno nekrotičnih ćelija. Pojava dvostruko pozitivne populacije tek nakon 24 h, odnosno 48 h tretmana, je još jedna potvrda da je indukcija apoptoze, a ne nekroze, u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija tretiranih sa GIT-27NO.

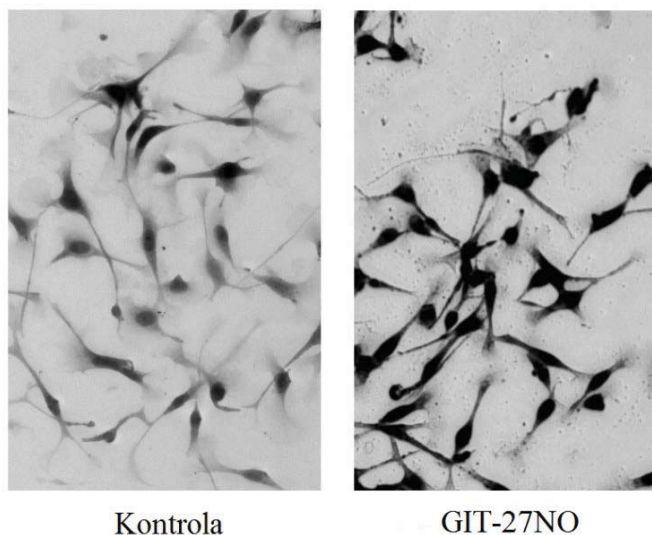


**Slika 14. GIT-27NO indukuje apoptozu ćelija kancera kolona**

CT26CL25 i HCT116 ćelijske linije kancera kolona su tretirane GIT-27NO (75  $\mu$ M) u trajanju od 24 h odnosno 48 h, nakon čega su bojene fluorescentno obeleženim aneksinom V i propidijum jodidom. Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez GIT-27NO. Prikazan je rezultat reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta.

#### 4.2.1.2. Tretman GIT-27NO dovodi do akumulacije tumor supresora p53

Tumor supresor p53 je ključni molekul u donošenju odluke ćelije pod stresom da pokrene program ćelijske smrti apoptozom (Kastan i sar., 1995; Sionov i Haupt, 1999; Green i Evan, 2002). Obzirom da je apoptoza indukovana oksidativnim ili nitrozativnim stresom praćena akumulacijom navedenog molekula (Bonavida i sar., 2006; Lala i Chakraborty, 2001; Umansky i Schirmacher, 2001), ispitan je uticaj tretmana GIT-27NO na ekspresiju p53 molekula u ćelijama kancera kolona. Kultura CT26CL25 ćelija tretirana je 6 h odabranom dozom GIT-27NO, nakon čega je nivo ekspresije tumor supresora p53 procenjivan imunocitohemijским bojenjem. Porast nivoa ekspresije uočen svetlosnom mikroskopijom već nakon samo 6 h (slika 15) potvrđuje učesće p53 molekula u donošenju odluke da se pokrene apoptotski put smrti kao odgovor na tretman GIT-27NO.



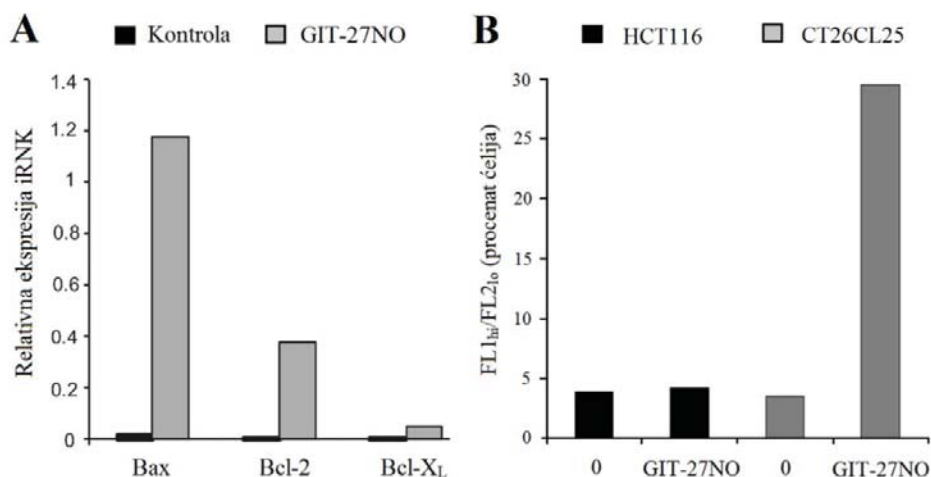
**Slika 15. Tretman GIT-27NO dovodi do akumulacije p53 proteina u ćelijama kancera kolona**

CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^4$ ) su 6 h tretirane sa  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO. Kontrolne kulture su uzgajane bez tretmana. Nivo ekspresije totalnog p53 proteina određivan je imunocitohemijским bojenjem. Prikazane su slike dobijene svetlosnom mikroskopijom po uvećanjem od 100 puta.



#### 4.2.1.3. GIT-27NO remeti balans pro- i antiapoptotskih molekula i dovodi do kolapsa membranskog potencijala mitohondrija CT26CL25 ćelija

Odnos pro- i anti-apoptotskih molekula u ćeliji određuje da li će biti pokrenuta kaskada događaja koja će dovesti do programirane smrti apoptozom (Oltvai i sar., 1993). Kako prethodno navedeni rezultati pokazuju da GIT-27NO indukuje apoptozu ćelija kancera kolona, cilj daljih eksperimenata bio je ispitivanje uticaja ovog agensa na ekspresiju pro- i antiapoptotskih molekula. CT26CL25 ćelije su tretirane sa 75  $\mu$ M GIT-27NO u trajanju od 6 h, nakon čega je relativna ekspresija gena za Bax, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> kvantifikovana „Real-time“PCR-om. Očekivano, u ćelijama tretiranim GIT-27NO dolazi do intenzivne transkripcije proapoptotskog Bax gena (slika 16, levo). U nešto manjem obimu u odnosu na Bax, dolazi i do povećanja ekspresije citoprotektivnih molekula: Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub>. Iz poređenja nivoa ekspresije (Bax/Bcl-2 = 3.1; Bax/Bcl-X<sub>L</sub> = 24.9) evidentno je da tretman GIT-27NO remeti balans pro- i antiapoptotskih molekula u smeru koji favorizuje pokretanje apoptoze.



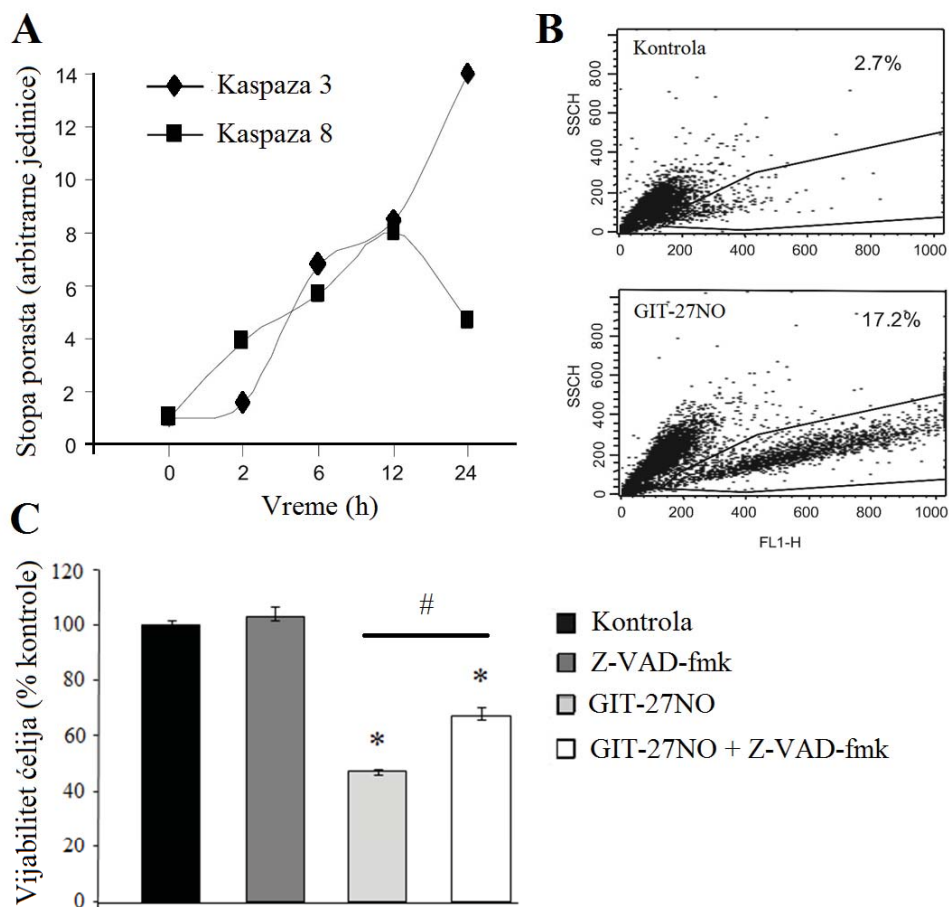
**Slika 16. Tretman GIT-27NO stimuliše ekspresiju proapoptotskih molekula i dovodi do depolarizacije membrana mitohondrija CT26CL25 ćelija**

A) Nakon 6 h tretmana CT26CL25 ćelija sa GIT-27NO (75  $\mu$ M), relativna ekspresija gena za Bax, Bcl-2 i Bcl-X<sub>L</sub> analizirana je „Real-time“ PCR-om. Nivo ekspresije ispitivanih gena standardizovan je u odnosu na ekspresiju gena za  $\beta$ -aktin detektovanog u istom uzorku i iskazan kao  $2^{-\Delta Ct}$ . B) CT26CL25 i HCT116 ćelije su nakon 24 h, odnosno nakon 48 h tretmana 75  $\mu$ M GIT-27NO bojene JC-1 fluoroforom. Prikazan je procenat ćelija u kojima je protočnom citofluorimetrijom detektovana depolarizacija membranskog potencijala mitohondrija.

Bax je citosolni protein koji, nakon oligomerizacije, formira poru u spoljašnjoj membrani mitohondrija, što dovodi do povećavanja njenog permeabiliteta, praćene depolarizacijom i izlaskom faktora iz međumembranskog prostora ključnih za aktivaciju nishodne kaspazne kaskade (Pastorino i sar., 1998, 1999; De Giorgi i sar., 2002). Stoga, kolaps membranskog potencijala mitohondrija služi kao još jedan indikator pokrenute apoptoze i može se detektovati JC-1 fluoroforom. CT26CL25 i HCT116 ćelije su tretirane citotoksičnom dozom GIT-27NO u trajanju od 24 odnosno 48 h, nakon čega su bojene JC1 bojom. Analizom fluorescence CT26CL25 ćelija protočnom citofluorimetrijom uočava se procentualni porast ćelija sa depolarizovanom membranom mitohondrija ( $FL1_{hi}/FL2_{lo}$ , slika 16, desno). Nasuprot njima, kolaps potencijala izostaje kod HCT116 ćelija (slika 16, desno), što može biti još jedno objašnjenje dužeg delovanja GIT-27NO koje je potrebno za ostvarivanje njegovog citocidnog efekta, budući da u ovim ćelijama ne dolazi do amplifikacije apoptotskog signala preko mitohondrija. Navedeni rezultati pokazuju da je indukcija apoptoze pod tretmanom GIT-27NO delimično posredovana promenom ekspresije pro- i antiapoptotskih molekula koja je praćena depolarizacijom membrana mitohondrija.

#### 4.2.1.4. GIT-27NO indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza

U egzekuciji apoptoze važnu ulogu imaju kaspaze, ali se ovaj tip ćelijske smrti može odigrati i bez njihovog učešća. Uzročno-posledični odnos GIT-27NO tretmana ćelija kancera kolona i transkripcije gena za kaspaze, odnosno njihove aktivacije na proteinskom nivou kao odgovor na tretman, ispitan je sledećim nizom eksperimenata. CT26CL25 ćelije su tretirane sa 75  $\mu$ M GIT-27NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h i 24 h, nakon čega je izolovana iRNK iz uzoraka. „Real-time“ PCR analiza je pokazala da GIT-27NO dovodi do višestrukog intenziviranja transkripcije gena za kaspaze 8 i 3 (slika 17A) i to već nakon 2 h, odnosno 6 h. Zatim su CT26CL25 ćelije tretirane 24 h citotoksičnom dozom GIT-27NO i bojene fluorescentno obeleženim pan-kaspaznim inhibitorom ApoStat. Analiza rezultata dobijenih protočnom citofluorimetrijom pokazala je da tretman GIT-27NO dovodi do aktivacije kaspaza (slika 17B). Kako bi se konačno potvrdilo da je apoptoza u osnovi pada vijabiliteta ćelija tretiranih GIT-27NO posredovana aktivacijom kaspaza, CT26CL25 ćelije su paralelno tretirane pan-kaspaznim inhibitorom Z-VAD-fmk. Očekivano, tretman citotoksičnom dozom GIT-27NO je smanjio broj živih ćelija u uzorku (slika 17C), dok je ko-tretman sa Z-VAD-fmk doveo do delimičnog, ali ne i potpunog oporavka vijabiliteta. Dobijen rezultat je potvrdio da je egzekucija apoptoze ćelija kancera kolona tretiranih GIT-NO barem delom zavisna od aktivacije kaspaza.



**Slika 17. Apoptoza ćelija kancera kolona tretiranih GIT-27NO je zavisna od aktivacije kaspaza**

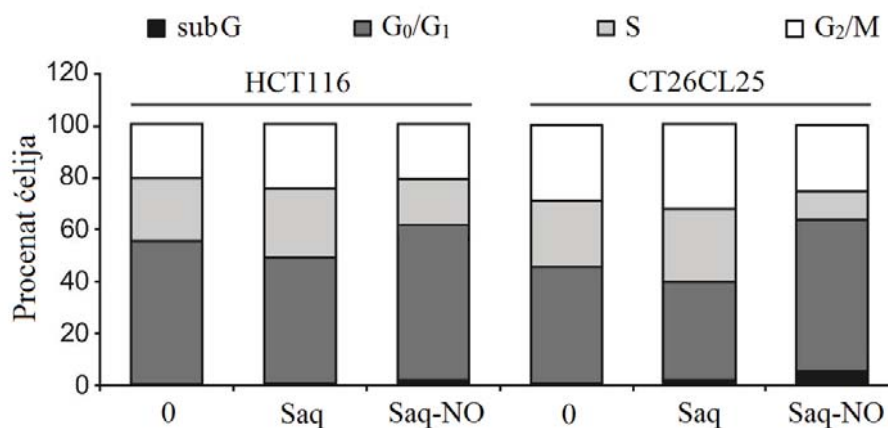
CT26CL25 ćelije su tretirane sa 75  $\mu$ M GIT-27NO. A) Nakon 2 h, 6 h, 12 h i 24 h tretmana ekspresija iRNK kaspaza 3 i 8 analizirana je Real-time PCR. B) Aktivacija kaspaza nakon 24 h tretmana detektovana je protočnom citofluorimetrijom bojenjem ćelija ApoStatom. C) CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su 24 h sa 75  $\mu$ M GIT-27NO, sa 20  $\mu$ M Z-VAD-fmk ili sa oba agensa istovremeno. Kontrolne kulture gajene su u medijumu bez tretmana. Vijabilitet tretiranih ćelija određivan je kristal violet testom i prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je  $SV \pm SD$  rezultata reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke. #  $p < 0.05$  odnosi se na uzorke tretirane GIT-27NO.

U celini, navedeni rezultati pokazuju da tretman GIT-27NO ćelija kancera kolona dovodi do povećane ekspresije proapoptotskih molekula, depolarizacije membrana mitohondrija i akumulacije p53 proteina, što zajedno rezultuje pokretanjem apoptotskog puta ćelijske smrti koji je delimično zavisna od aktivacije kaspaza.

## 4.2.2. Mehanizam antitumorskog delovanja Saq-NO

### 4.2.2.1. Saq-NO ne smanjuje vijabilitet kancera kolona indukcijom ćelijske smrti

Radi determinisanja mehanizama u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija kancera kolona tretiranih Saq-NO, najpre je ispitan uticaj navedene supstance na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Kulture ćelija su 24 h tretirane Saq ili Saq-NO (18.75  $\mu$ M za HCT116 i 37.5  $\mu$ M za CT26CL25 ćelije) i bojene propidijum jodidom čiji je intenzitet fluorescence analiziran na protočnom citofluorimetru. U poređenju sa kontrolom, tretman Saq-om nije doveo do redistribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa niti do akumulacije hipodiploidnih ćelija (slika 18), što je očekivano budući da je primenjen u dozi koja *in vitro* nije statistički značajno smanjivala vijabilitet ćelija kancera kolona. Nasuprot njemu, nakon Saq-NO tretmana evidentna je akumulacija ćelija u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi, koja je naročito izražena kod CT26CL25 ćelija, uz smanjenje procentualne zastupljenosti ćelija u S fazi (slika 18). Kako kod obe ćelijske linije izostaje akumulacija hipodiploidnih ćelija u subG fazi, koje karakteriše fragmentisana DNK, isključuje se mogućnost indukcije apoptoze kao mehanizma antitumorskog delovanja Saq-NO.

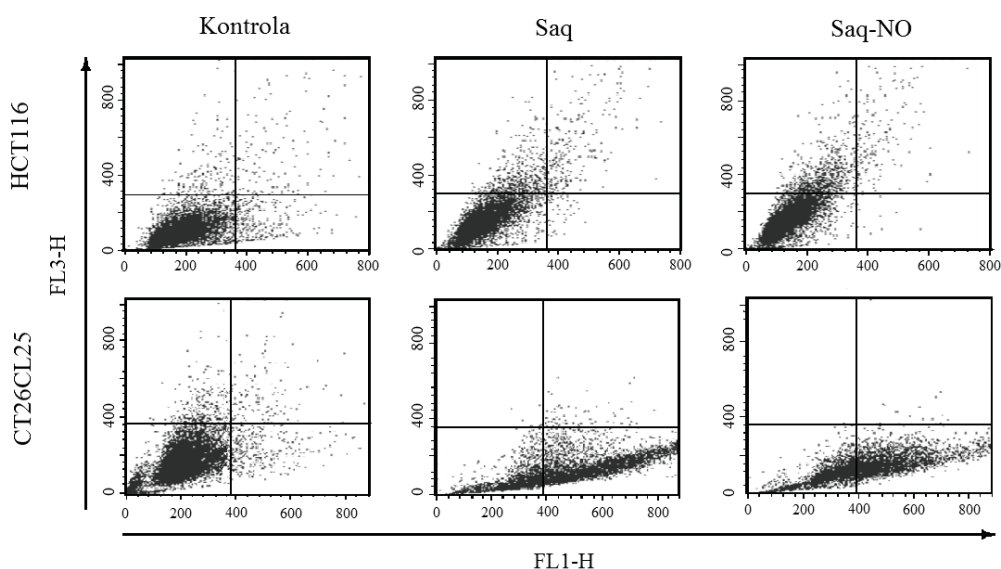


Slika 18. Uticaj tretmana Saq-NO na distribuciju ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

HCT116 i CT26CL25 ćelije ( $3 \times 10^5$ ) tretirane su Saq ili Saq-NO u trajanju od 24 h. Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez tretmana. Ćelije su obojene propidijum jodidom (20  $\mu$ g/ml) i na osnovu intenziteta fluorescence izmerene protočnom citofluorimetrijom razvrstavane po fazama ćelijskog ciklusa.

Odsustvo akumulacije hipodiploidnih ćelija posle tretmana Saq-NO ne isključuje mogućnost da ovaj agens ne dovodi do ćelijske smrti autofagijom, koja nije praćena fragmentacijom DNK (Gozuacik i Kimchi, 2004). Da bi odgovorilo da li je indukcija navedenog tipa programirane ćelijske smrti odgovorna za pad vijabiliteta, kulture HCT116 i CT26CL25 ćelija su tretirane 24 h Saq ili Saq-NO, nakon čega su bojene supravitalnom akridin-oranž bojom. Eventualno prisustvo autofagozoma, glavnih markera autofagije, detektovano je protočnom citofluorimetrijom merenjem intenziteta fluorescence u crvenom delu spektra (FL3-H, slika 19). Rezultati su pokazali da tretman Saq-NO u ćelijama kancera kolona ne intenzivira proces autofagije, čime se isključuje svaka mogućnost da je ovaj proces odgovoran za smanjen broj ćelija pod tretmanom.

Budući da nema akumulacije ćelija sa fragmentisanom DNK niti da dolazi do intenziviranja autofagije kod kultura tretiranih Saq-NO, može se zaključiti da indukcija ćelijske smrti nije u osnovi antitumorskog delovanja ispitivanog agensa.



**Slika 19. Tretman Saq-NO ne indukuje autofagiju kod ćelija kancera kolona.**

Ćelije kancera kolona ( $3 \times 10^5$ ) su tretirane sa Saq ili Saq-NO (doza  $18.75 \mu\text{M}$  za HCT116 i  $37.5 \mu\text{M}$  za CT26CL25 ćelije). Kontrolne kulture su uzgajane u medijumu bez tretmana. Nakon isteka 24 h, ćelije su obojene akridin oranž bojom ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) čija je fluorescenca analizirana na protočnom citofluorimetru.

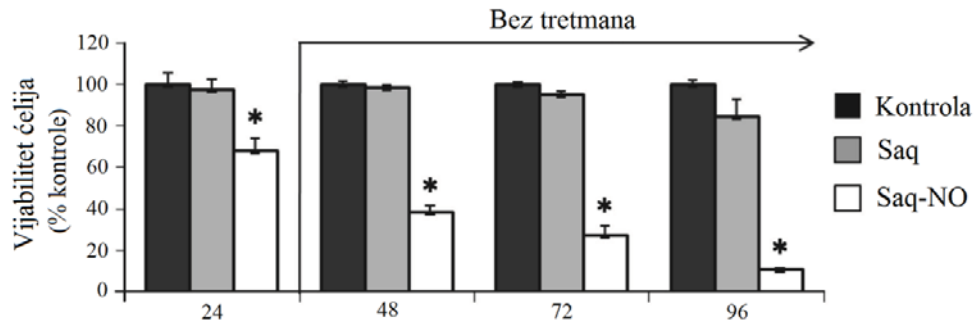
#### 4.2.2.2. Saq-NO trajno inhibira proliferaciju ćelija kancera kolona

Odsustvo indukcije ćelijske smrti, uz uočenu akumulaciju ćelija u G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa usmerila su dalji tok istraživanja u pravcu ispitivanja uticaja Saq-NO na deobu ćelija kancera kolona. HCT116 i CT26CL25 ćelije su najpre inkubirane u prisustvu CFSE boje koja obeležava proteine citoplazme, a zatim tretirane Saq ili Saq-NO u trajanju od 72 h. U slučaju deobe, CFSE se ravnomerno raspoređuje na ćerke ćelije koje sad fluoresciraju duplo slabijim intenzitetom u odnosu na roditeljske (Parish, 2002). Analizom rezultata dobijenih protočnom citofluorimetrijom uočava se da Saq-NO snažno inhibira deobu ćelija kancera kolona (tabela 4). Citostatski efekat je naročito izražen na CT26CL25 liniji, kod koje se samo 12 % ćelija podelilo tokom 72 h. Da bi se proverilo da li je gubitak proliferativnog potencijala permanentan, to jest nezavisan od stalnog prisustva supstance, CT26CL25 ćelije su tretirane 24 h sa 37.5 μM Saq ili Saq-NO, nakon čega su kulture naredna 3 dana rasle u medijumu bez navedenih supstanci. Vijabilitet ćelija je određivan svakodnevno, kristal violet testom (slika 20). Za razliku od parentalne supstance, do oporavka vijabiliteta CT26CL25 ćelija nije došlo ni tri dana nakon jednokratnog, 24 h tretmana Saq-NO, ukazujući da navedeni agens permanentno inhibira proliferaciju ćelija kancera kolona.

Tabela 4. Saq-NO inhibira proliferaciju ćelija kancera kolona

	Kontrola	Saq	Saq-NO
<b>HCT116</b>	90	70	50
<b>CT26CL25</b>	86.6	90.1	11.9

Ćelije kancera kolona ( $3 \times 10^5$ ) obojene CFSE bojom su tretirane 72 h Saq ili Saq-NO (18.75 μM za HCT116 i 37.5 μM za CT26CL25 ćelije). Kontrolne ćelije su uzgajane u medijumu bez tretmana. Intenzitet fluorescence je meren protočnom citofluorimetrijom. U tabeli je prikazan procenat podeljenih ćelija.



**Slika 20. Inhibicija proliferacije ćelija kancera kolona tretiranih Saq-NO je trajna i nezavisna od stalnog prisustva supstance**

CT26CL25 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) su tretirane  $37.5 \mu\text{M}$  Saq ili Saq-NO 24 h, nakon čega su uzgajane u medijumu bez navedenih agenasa. Vijabilitet tretiranih ćelija je odredivan kristal violetom u prikazanim vremenskim tačkama i prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je  $SV \pm SD$  rezultata reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke.

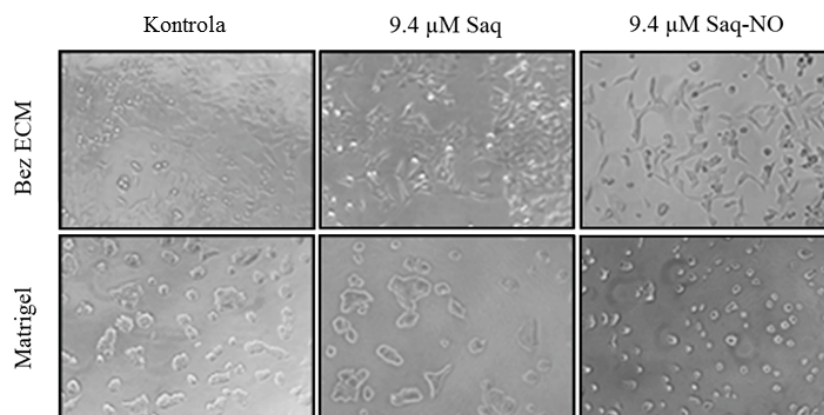
#### 4.2.2.3. Saq-NO smanjuje metastatski potencijal ćelija kancera kolona *in vitro* i *in vivo*

Inhibicija proliferacije koja je nezavisna od stalnog prisustva Saq-NO sugerise da dotični agens trajno menja fenotip HCT116 i CT26CL25 ćelija kancera kolona, što bi se moglo odražavati i na njihov metastatski potencijal. Kako bi se ispitala navedena pretpostavka, najpre se evaluirao uticaj tretmana sa Saq ili Saq-NO na rast ćelija na tankom sloju Matrigela, smeše proteina u sastavu ekstraćelijskog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*), to jest u tzv. „trodimenzionalnoj“ (3D) kulturi. Struktura, gustina i rigiditet ovakve podloge predstavlja bolju simulaciju ćelijskog okruženja *in vivo* i pruža korektniju sliku o morfologiji ćelija, organizaciji kulture i uticaju tretmana (Sahai i Marshall, 2003; Ulrich i sar., 2009). HCT116 i CT26CL25 ćelije su posađene na podlogu obloženu tankim slojem Matrigel<sup>®</sup> ili na neobloženu plastiku i tretirane 72 h Saq ili Saq-NO ( $9.4 \mu\text{M}$  za HCT116 i  $18.7 \mu\text{M}$  za CT26CL25 ćelije) u dozi koja slabije od  $LD_{50}$  inhibira rast ćelija ( $LD_{20}$ ). HCT116 i CT26CL25 ćelije koje su rasle na Matrigel<sup>®</sup>-u imale su drugačiju morfologiju i prostornu organizaciju (slika 21) u poređenju sa istim kulturama na neobloženoj podlozi. Dok su HCT116 ćelije imale zaokrugljen izgled i rasle u diskretnim, grozdastim kolonijama, CT26CL25 ćelije

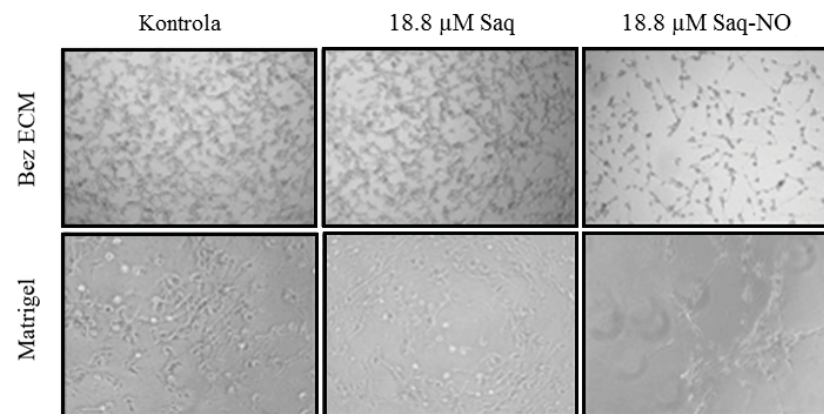


vretenastog oblika su formirale mrežu koja je zauzimala ceo raspoloživ prostor. Morfologija ćelija uočena u „3D“ kulturi se može povezati sa različitim načinom remodeliranja citoskeleta prilikom migracije i sa različitim zahtevom ćelija za aktivnošću ekstraćelijskih proteaza prilikom invazije kroz tkivo (Sahai i Marshall, 2003). Nezavisno od uočenih morfoloških razlika, Saq-NO tretman ( $LD_{20}$ ) je inhibirao rast, smanjio komunikaciju ćelija i veličinu kolonija HCT116 i CT26CL25 ćelija na Matrigel® (slika 21).

### HCT116



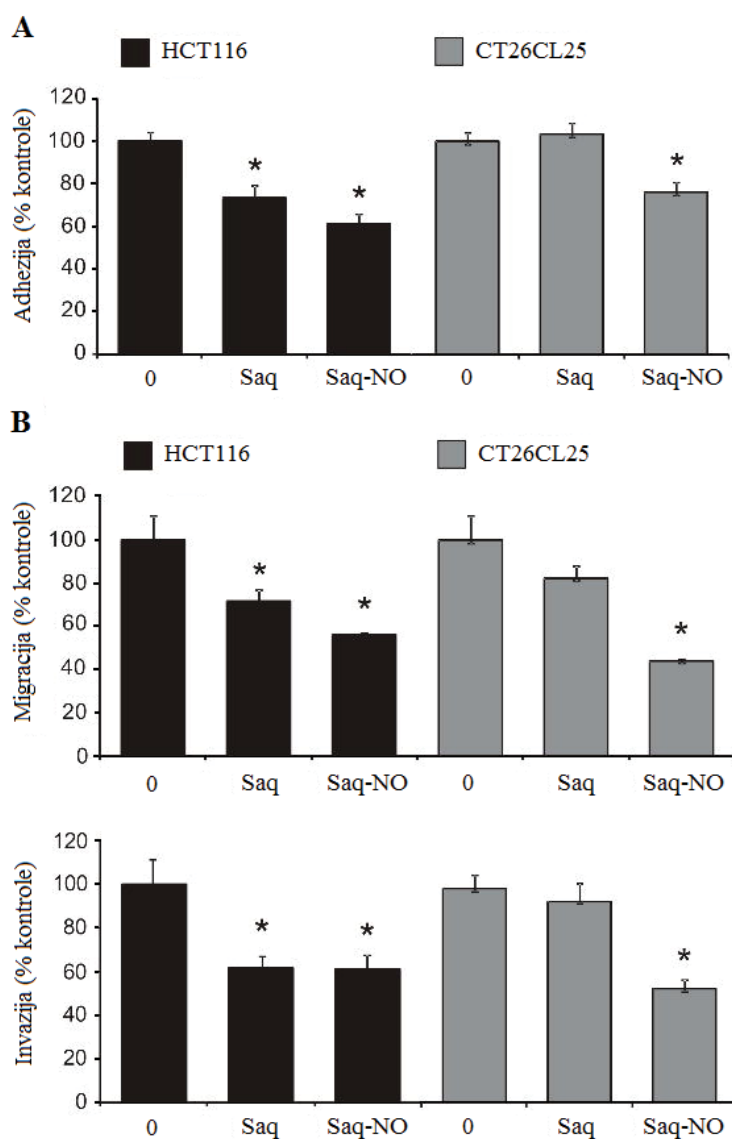
### CT26CL25



**Slika 21. Uticaj Saq i Saq-NO na rast ćelija kancera kolona u „3D“ kulturi**

HCT116 i CT26CL25 ćelije ( $5 \times 10^4$ ) su 72 h rasle u plastičnim pločama sa 96 bunarića, neobloženog dna ili sa tankim slojem Matrigel® (10 mg/ml), u prisustvu subtoksične doze Saq ili Saq-NO (9.4  $\mu$ M za HCT116 i 18.7  $\mu$ M za CT26CL25 ćelije). Kontrole su uzgajane u medijumu bez tretmana. Kulture ćelija su posmatrane Zeiss Axiovert mikroskopom i slikane pod uvećanjem od 100 puta.

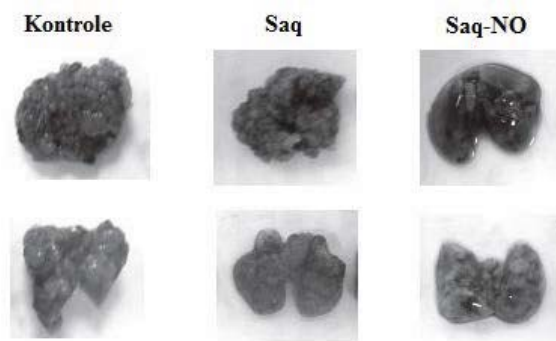
Dalje je višestepeni proces metastaziranja simuliran nizom *in vitro* eksperimenata u kojima je ispitivan potencijal Saq i Saq-NO da smanje adhezivnost, migratornost i invazivnost ćelija. Pre izvođenja svih testova, ćelije su 24 h tretirane subtoksičnom dozom Saq ili Saq-NO (9.4  $\mu\text{M}$  za HCT116 i 18.7  $\mu\text{M}$  za CT26CL25 ćelije). Najpre je određivana sposobnost ovako pretretiranih ćelija da, u ograničenom vremenskom okviru od 1 h, adheriraju za podlogu obloženu proteinima ekstraćelijskog matriksa. Rezultat eseja za kvantifikovanje adhezivnosti ćelija je pokazao da je pretretman Saq-NO smanjio procenat ćelija koji je adherirao kod obe ćelijske linije, dok je parentalno jedinjenje uticalo na adhezivnost samo HCT116, ali ne i CT26CL25 ćelija (slika 22A). Dalje je ispitivana sposobnost prethodno tretiranih ćelija da migriraju kroz pore membrane veličine 8  $\mu\text{M}$ , ali i kroz tanak sloj polimerizovanog Matrigel<sup>®</sup> u odgovoru na hemostimulus u vidu povećane koncentracije FBS u medijumu iza navedenih prepreka. U odnosu na kontrolni uzorak, Saq-NO pretretman je za 50 % redukovao broj ćelija sposobnih za migraciju i invaziju kod obe linije kancera kolona (slika 22B). U skladu sa rezultatima adhezionog testa, i ovde je Saq pretretman pokazao selektivnost u delovanju, smanjivši migratornost i invazivnost samo kod HCT116 ćelija, dok je pretretman dotičnim agansom ostao bez efekta na metastatski potencijal CT26CL25 ćelija (slika 22B). Dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju da Saq-NO, čak i u dozi koja ne smanjuje značajno vijabilitet, redukuje metastatski potencijal HCT116 i CT26CL25 ćelija u *in vitro* uslovima.



**Slika 22. Saq-NO smanjuje adhezivnost, migratornost i invazivnost ćelija kancera kolona.**

Ćelije kancera kolona su 24 h tretirane subtoksičnom dozom ( $18.7 \mu\text{M}$  za CT26CL25 i  $9.4 \mu\text{M}$  za HCT116 ćelije) Saq ili Saq-NO. A) Ćelije ( $6 \times 10^4$ ) su inkubirane 1 h na  $37^\circ\text{C}$  u pločama sa 96 bunarića čije je dno bilo obloženo sa  $20 \mu\text{g/ml}$  Matrigel®, nakon čega je broj ćelija koji je adherirao za proteine bazalne membrane određivan kristal violet testom. B) Prolazak ćelija kroz pore membrane veličine  $8 \mu\text{m}$  u odgovoru na hemostimulaciju, sa (invazija) ili bez (migracija) prisustva ekstraćelijskog matriksa, određivan je brojanjem pod svetlosnim mikroskopom nakon 12 i 24 h (CT26CL25) odnosno 24 i 36 h (HCT116). Rezultati su prikazani kao procentualni deo broja ćelija u kontrolnom uzorku, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100%. Prikazana je  $\text{SV} \pm \text{SD}$  reprezentativnog od dva nezavisno izvedena eksperimenta. \*  $p < 0.05$  se odnosi na kontrole.

Kako je pokazano da Saq-NO smanjuje parametre koji oslikavaju metastatski potencijal ćelija kancera kolona u *in vitro* uslovima, u narednom eksperimentu ispitana je permanantnost ovog efekta *in vivo*. CT26CL25 ćelije su pretretirane 24 h sa 37.5  $\mu\text{M}$  Saq ili Saq-NO ili uzgajane u medijumu bez navedenih agenasa (kontrola), a zatim skupljene i ubrizgane u repnu venu imunokompetentnih BALB/c miševa ( $3 \times 10^6$  ćelija/ml PBS). Tokom eksperimenta životinje nisu primale nikakav tretman. Nakon što je jedna životinja u kontrolnoj grupi uginula 18. dana od inokulacije, eksperiment je okončan. Miševima su izvađena pluća i prebrojani metastatski nodusi. Pluća životinja iz kontrolne grupe su bila potpuno deformisana masivnim metastatskim nodusima (slika 23). Za razliku od kontrolne grupe, u plućima životinja koje su primile ćelije pretretirane Saq-om uočen je manji broj metastatskih nodusa (slika 23). Takođe, i veličina nodusa je bila manja (tabela 5). U grupi životinja kojima su injecirane ćelije prethodno tretirane Saq-NO, samo je jedna razvila mikrometastaze (tabela 5). U celini, ovi rezultati su pokazali da vremenski ograničen tretman Saq-NO dovodi do trajnog smanjenja metastatskog potencijala CT26CL25 ćelija, koji je postojan i u *in vivo* uslovima.



**Slika 23. Saq-NO smanjuje broj metastatskih nodusa CT26CL25 ćelija u plućima BALB/c miševa**

Kultura CT26CL25 ćelija inkubirana je 24 h sa Saq ili Saq-NO (37.5  $\mu\text{M}$ ) ili uzgajana u medijumu bez tretmana (kontrola). Ćelije su sakupljene tripsinizacijom i 100  $\mu\text{l}$  odgovarajuće ćelijske suspenzije ( $3 \times 10^6$  ćelija/ml) je ubrizgano u repnu venu BALB/c miševa. Životinje su razvrstane u grupe od po 3, zavisno od pretretmana ćelija koji im je ubrizgan. Nakon 18 dana, životinje su žrtvovane i izvađena su im pluća. Prikazane su reprezentativne slike pluća iz svake grupe životinja.

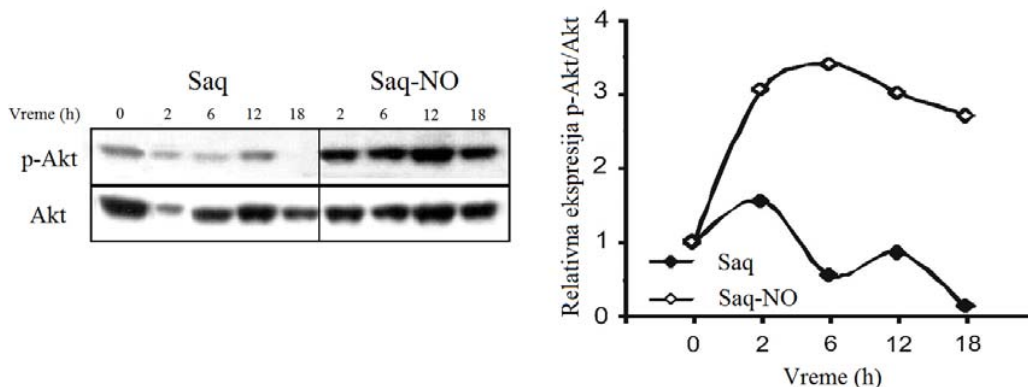
Tabela 5. Broj metastatskih nodusa po mišu i njihov prosečan dijametar (r).

	Kontrole	Saq	Saq-NO
miš #1	uginula	120, r≈3 mm	59, r≈1 mm
miš #2	120, r≈3 mm	90, r≈2 mm	bez metastaza
miš #3	120, r≈3 mm	30, r≈2 mm	bez metastaza

#### 4.2.2.4. Saq i Saq-NO različito regulišu ekspresiju i post-translacionu modifikaciju proteina bitnih za inhibiciju proliferacije i smanjenje metastatskog potencijala ćelija kancera kolona.

Sa ciljem da se determinišu unutarćelijski događaji u osnovi trajne inhibicije proliferacije i redukcije metastatskog potencijala ćelija tretiranih Saq-NO, ispitana je ekspresija proteina relevantnih za navedene procese.

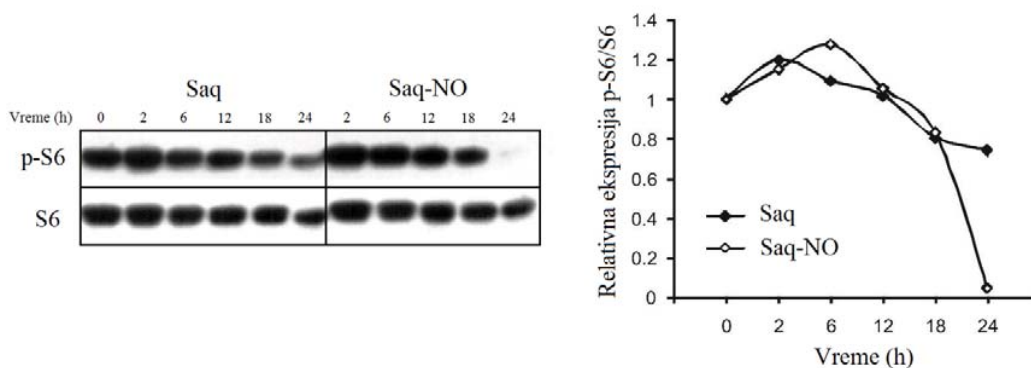
PI3K/Akt/mTOR signalni put je često prekomerno aktivan u ćelijama tumora, što dovodi do intenziviranja procesa, poput rasta, ćelijske deobe i metastaziranja, koji su njime regulisani (Vivanco i Sawyers, 2002; Vogt, 2001 Brazil i Hemmings, 2001). Budući da je pokazano da Saq-NO inhibira proliferaciju i metastatski potencijal ćelija kancera kolona, i da je poznato da se u osnovi antitumorskog delovanja parentalne supstance Saq nalazi inhibicija fosforilacije Akt proteina (Gupta i sar., 2005), nametnula se potreba da se ispita uticaj Saq-NO tretmana na aktivnost ovog signalnog puta. CT26CL25 kulture su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h i 18 h nakon čega je nivo fosforilacije Akt određivan imunoblotom. U skladu sa rezultatima dobijenim u prethodnim studijama (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Mijatovic i sar., 2011., Mojcic i sar., 2012) Saq-NO je, za razliku od parentalnog agensa, i u ćelijama kancera kolona doveo do prolaznog povećanja fosforilacije, odnosno aktivnosti Akt kinaze (slika 24). Pošto se snažnom inhibicijom fosforilacije Akt objašnjavaju potencijalno letalna, neželjena dejstva parentalne supstance (Plastaras i sar., 2008; Gupta i sar., 2005; Chow i sar., 2009), razlika u regulaciji PI3K/Akt/mTOR signalnog puta na ovom nivou između Saq i Saq-NO bi mogla biti odgovor zašto se u *in vivo* modelu uočava smanjena toksičnost agensa modifikovanog NO.



**Slika 24. Saq i Saq-NO različito regulišu aktivnost Akt signalnog molekula**

CT26CL25 ćelije su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h i 24 h. Kontrole su uzgajane u medijumu bez tretmana. Količina fosforilisanog Akt (Ser 473) kao i totalnog Akt u uzorcima je analizirana imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od tri izvedena imunoblota.

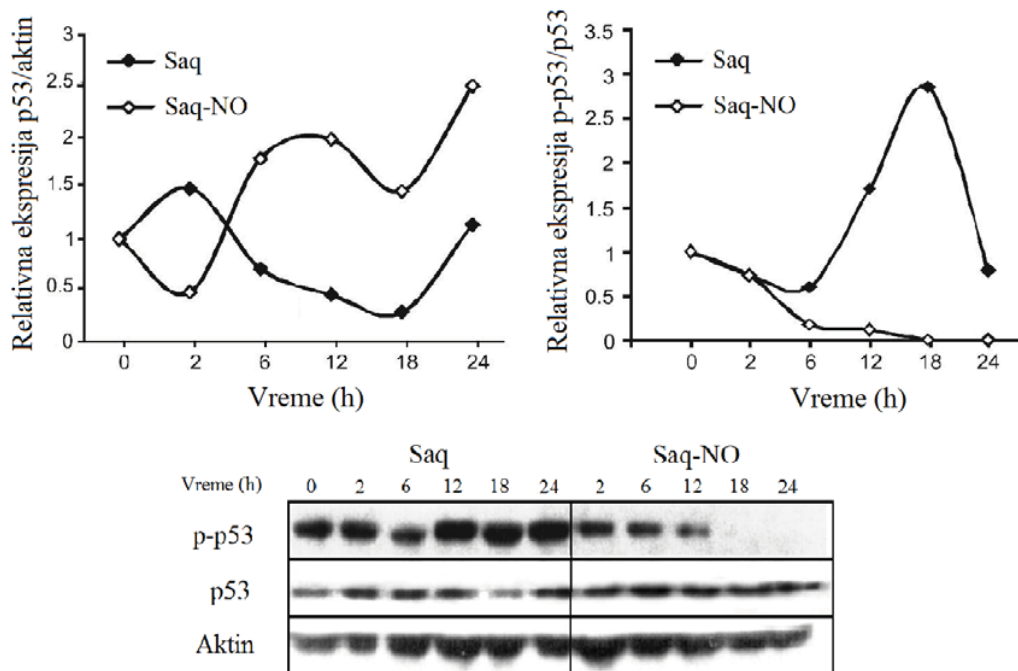
Nedavno je na ćelijskoj liniji kancera prostate otkriveno da tretman Saq-NO ambivalentno deluje na članove PI3K/Akt/mTOR signalnog puta: prolazno povećava aktivnost Akt kinaze dok snažno inhibira fosforilaciju nishodno smeštenog ribozomalnog S6 proteina (Mojic i sar., 2012). Uticaj parentalnog jedinjenja Saq na aktivnost S6 proteina nije istražen. Sa ciljem da se ispita uticaj Saq, odnosno Saq-NO na fosforilaciju S6 proteina u ćelijama kancera kolona, ona je određivana imunoblotom u CT26CL25 ćelijama nakon 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h tretmana. Rezultati su pokazali da Saq-NO, za razliku od parentalne supstance, u potpunosti inhibira fosforilaciju S6 proteina, što je događaj koji je očigledan tek nakon 24 h (slika 25.). Potencijal da inhibira aktivnost datog proteina postoji i kod Saq, ali je on znatno slabiji, na osnovu čega se može zaključiti da je modifikacija NO rezultovala nastankom forme koja potentnije inhibira aktivnost samog S6 ribozomalnog proteina ili kinaze odgovorne za njegovu fosforilaciju, p70 S6K. Kako je pokazana uloga S6 proteina ribozoma u regulaciji translacije iRNK sa 5' oligopirimidinskim traktom koji kodiraju proteine bitne za progresiju ćelijskog ciklusa, snažna inhibicija fosforilacije datog proteina nakon Saq-NO tretmana mogla bi biti u osnovi njegovog citostatskog delovanja.



**Slika 25. Saq-NO snažnije od Saq inhibira fosforilaciju ribozomalnog S6 proteina**

CT26CL25 ćelije su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h. Kontrolne ćelije su uzgajane u medijumu bez tretmana. Količina fosforilisanog S6 (Ser 240/244) kao i totalnog S6 proteina u uzorcima je analizirana imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od tri izvedena imunoblota.

Okarakterisan kao čuvar genoma, tumor supresor p53 ima ulogu da zaustavi ćelijsku deobu ukoliko postoji neki metabolički poremećaj ili oštećenje DNK koje treba popraviti (Kastan i sar., 1995; Sionov i Haupt, 1999; Green i Evan, 2002). U ranijim studijama pokazano je da Saq-NO tretman dovodi do povećanog prisustva p53 proteina, što je za posledicu takođe imalo inhibiciju proliferacije ali i diferencijacije malignih ćelija u primarni fenotip (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Radi ispitivanja uticaja Saq i Saq-NO tretmana na ekspresiju p53 proteina u ćelijama kancera kolona, CT26CL25 kulture su inkubirane 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h u prisustvu navedenih aganasa. Rezultati imunoblota su pokazali da i u ćelijama kancera kolona Saq-NO povećava ekspresiju p53 proteina (slika 26), koja nije posledica brze stabilizacije usled fosforilacije serina na poziciji 20 (Ser20). Za razliku od agensa modifikovanog NO, nakon tretmana Saq uočen je skok u fosforilaciji p53 na Ser20, koji nije uticao na nivo ekspresije totalnog proteina (slika 26). Navedena fosforilacija p53 je indikator oštećenja DNK, koje se javlja nakon Saq, ali ne i nakon Saq-NO tretmana, što takođe može biti razlog smanjene toksičnosti NO-modifikovane forme.

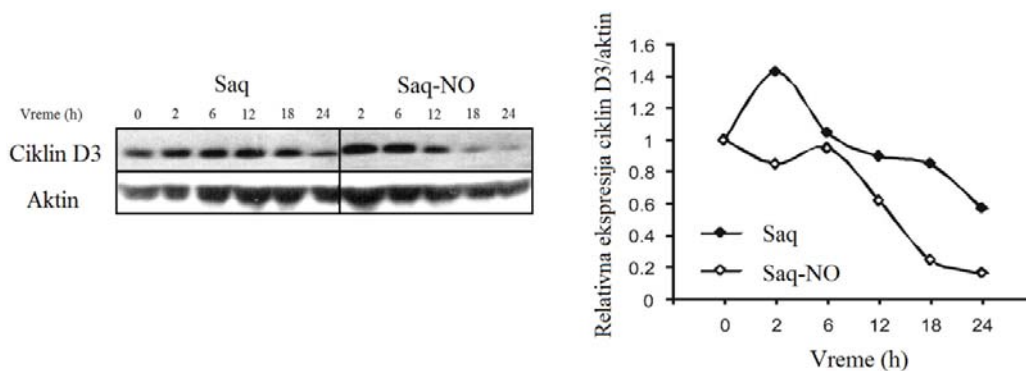


**Slika 26. Saq i Saq-NO različito utiču na ekspresiju i fosforilaciju p53 proteina**

CT26CL25 ćelije su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h. Kontrole su uzgajane u medijumu bez tretmana. Količina fosforilisanog p53 (Ser20) kao i totalnog p53 proteina u uzorcima je analizirana imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od tri izvedena imunoblota.

Ciklin D3 je, zajedno sa njemu pridruženim kinazama, neophodan za prelazak iz G<sub>1</sub> u S fazu ćelijskog ciklusa (Sherr, 1995; Miyatake i sar., 1995). Smanjenje njegove ekspresije rezultuje zaustavljanjem ćelijskog ciklusa u G<sub>1</sub> fazi, što je takozvani „G<sub>1</sub> blok“ kakav se uočava i kod ćelija kancera kolona nakon Saq-NO tretmana. Da bi se ispitao uticaj Saq i Saq-NO na ekspresiju ciklina D3 u CT26CL25 ćelijama, ona je analizirana imunoblotom nakon 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h tretmana. Oba ispitivana agensa su pokazala potencijal da inhibiraju ekspresiju ispitivanog proteina, ali je Saq-NO to činio brže i intenzivnije od parentalne supstance (slika 27).

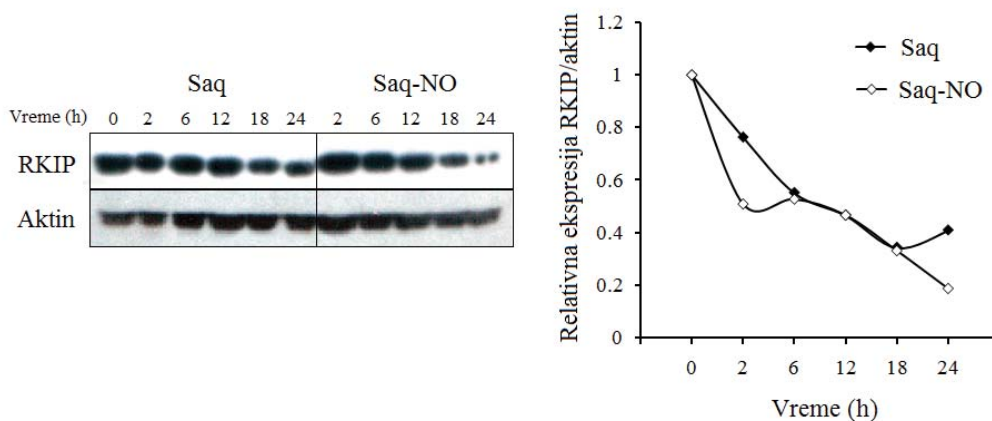




**Slika 27. Saq-NO snažnije od Saq snižava ekspresiju ciklina D3**

CT26CL25 ćelije su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h. Kontrolne ćelije su uzgajane u medijumu bez tretmana. Nivo ekspresije ciklina D3 u uzorcima analiziran je imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od tri izvedena imunoblota.

Protein inhibitor Raf-1 kinaze, RKIP (engl. *Raf-1 kinase inhibitor protein*) je jedan od malobrojnih proteina koji je okarakterisan kao supresor metastaziranja tumora (Escara-Wilke i sar., 2012). Kako bi se utvrdilo da li je uočena inhibicija metastatskog potencijala ćelija kancera kolona posledica povećanog prisustva RKIP proteina, njegov nivo ekspresije određivan je imunoblotom nakon 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h Saq ili Saq-NO tretmana CT26CL25 ćelija. Analiza dobijenih rezultata ukazala je na irelevantnost učešća RKIP proteina u smanjenju metastatskog potencijala CT26CL25 ćelija tretiranih Saq-NO, ali i parentalnim jedinjenjem, budući da oba agensa snažno i kontinuirano inhibiraju njegovu ekspresiju (slika 28).



**Slika 28. Saq i Saq-NO inhibiraju RKIP ekspresiju**

CT26CL25 ćelije su tretirane sa 37.5  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h, 12 h, 18 h i 24 h. Kontrolne ćelije su uzgajane u medijumu bez tretmana. Nivo ekspresije RKIP u uzorcima analiziran je imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od dva izvedena imunoblota.

U celini, Saq-NO tretman rezultuje trajnom inhibicijom proliferacije i metastatskog potencijala ćelija kancera kolona, povećavajući prisustvo tumor supresora p53, smanjujući aktivnost ribozomalnog S6 proteina i snažno suprimirajući ekspresiju ciklina D3.

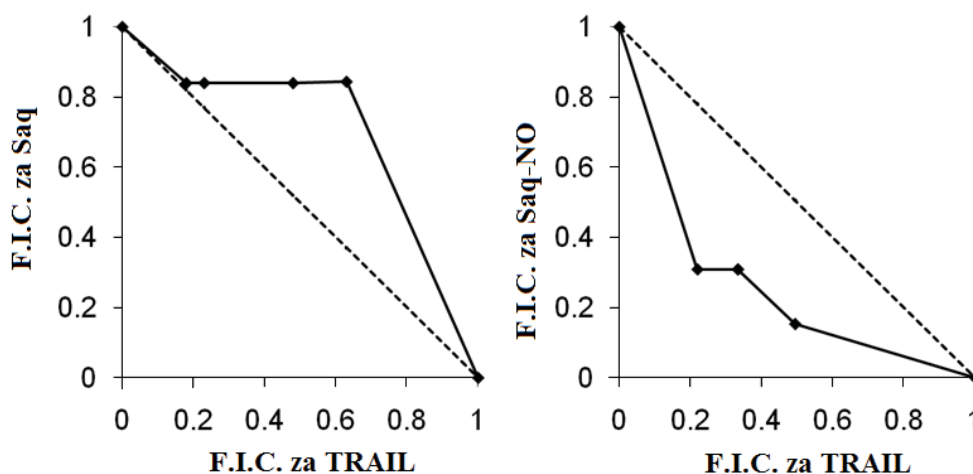
### **4.3. Ispitivanje uticaja GIT-27NO i Saq-NO na osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom**

#### **4.3.1. Saq-NO vraća osetljivost HCT116 ćelija na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom**

U literaturi postoje podaci da su HCT116 ćelije kancera kolona neosetljive na antitumorski imunski odgovor posredovan citotoksičnim molekulom TRAIL (Van Geelen i sar, 2004). Kako bi se ispitalo da li Saq i Saq-NO imaju potencijal da povrate osetljivost HCT116 ćelija na apoptozu indukovanu TRAIL, one su paralelno tretirane

različitim koncentracijama rekombinantnog humanog TRAIL u prisustvu ili odsustvu navedenih agenasa. Nakon 24 h relativan broj živih ćelija u uzorcima je određivan kristal violet testom, a efekti kombinovanog tretmana su procenjivani izobologram analizom.

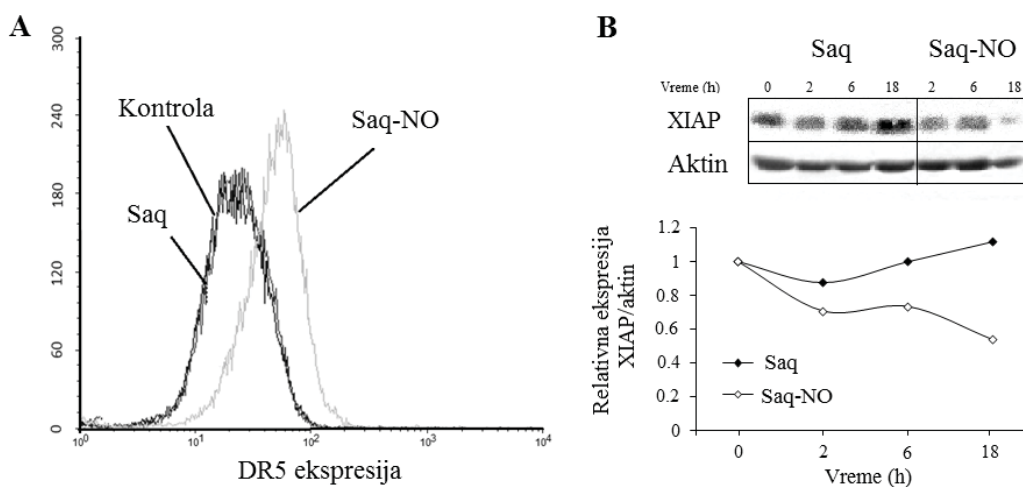
Izobologram analiza paralelnog tretmana ćelija sa TRAIL i Saq-NO je ukazala na sinergističko delovanje ovih molekula u smanjenju vijabiliteta HCT116 ćelija (slika 29, desno). Ovakav nalaz implicira da je Saq-NO sposoban da ukine rezistenciju navedenih ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL. Sasvim neočekivano, ista analiza je okarakterisala paralelni tretman TRAIL i parentalnim jedinjenjem Saq kao antagonistički (slika 29, levo). U ovom slučaju antagonizam znači da Saq tretman, ne samo da ne ukida rezistenciju HCT116 ćelija na TRAIL, nego i da u kombinaciji sa datim citotoksičnim molekulom dodatno stimuliše rast kultura.



**Slika 29. Saq i Saq-NO različito utiču na osetljivost HCT116 ćelija na TRAIL**

HCT116 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) su tretirane 4.7, 9.4 i 18.7  $\mu\text{M}$  koncentracijom Saq ili Saq-NO paralelno sa opsegom doza TRAIL-a (1.2, 2.5, 5 i 10 nM). Nakon 24 h kultivacije relativan broj živih ćelija određen je kristal violet testom. Rezultat reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta je predstavljen izobologramom. F.I.C. > 1 se smatra antagonizmom; F.I.C. < 1 se smatra sinergizmom.

Ćelije tumora razvijaju rezistenciju na TRAIL na dva nivoa: na membranskom, regrutovanjem funkcionalnih receptora za TRAIL (DR4 i DR5) i povećavanjem ekspresije defektnih receptora, i na unutarćelijskom, blokiranjem nishodno pokrenutog apoptotskog signalnog puta (Makimovis-Ivanic i sar., 2012). Kako bi se ispitalo da li je uočena senzitivizacija na TRAIL HCT116 ćelija tretiranih sa Saq-NO posledica povećanja membranske ekspresije DR5 receptora, kulture su 24 h tretirane odabranom dozom navedenog agensa. Kvantifikacija membranske ekspresije DR5 receptora vršena je protočnom citofluorimetrijom upotrebom florescentno obeleženog sekundarnog antitela. Analiza ovako dobijenih rezultata pokazala je da, u odnosu na kontrolni uzorak, dolazi do dramatičnog skoka u ekspresiji DR5 receptora za TRAIL na membranama ćelija tretiranih Saq-NO (slika 30A). Očekivano, tretman istom dozom Saq nije uticao na zastupljenost DR5 receptora u membranama HCT116 ćelija (slika 30A).



**Slika 30. Saq-NO ukida rezistenciju HCT116 na apoptozu pokrenutu TRAIL-om na membranskom i unutarćelijskom nivou**

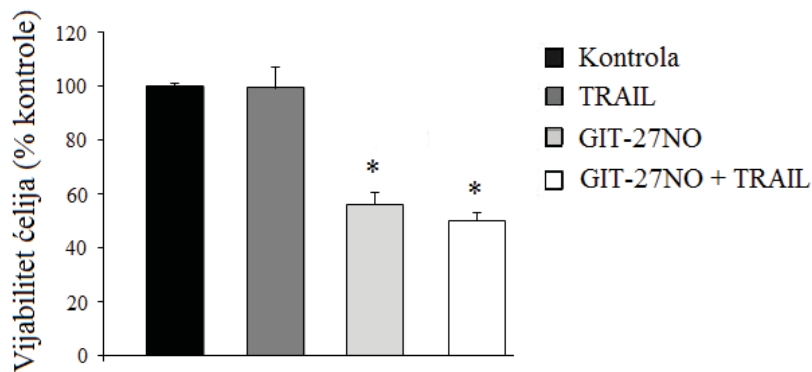
A) HCT116 ćelije su tretirane 24 h sa 18.7  $\mu$ M Saq ili Saq-NO, dok su kontrolne ćelije uzgajane u medijumu bez tretmana. Membranska ekspresija DR5 receptora analizirana je protočnom citofluorimetrijom. B) HCT116 ćelije su tretirane sa 18.7  $\mu$ M Saq ili Saq-NO u trajanju od 2 h, 6 h i 18 h. Kontrolne ćelije su uzgajane u medijumu bez tretmana. Nivo ekspresije XIAP u uzorcima analiziran je imunoblotom. Prikazana je denzitometrijska analiza ekspresije proteina iz reprezentativnog od tri izvedena imunoblota.

Budući da eliminacija X-vezanog proteina inhibitora apoptoze (XIAP, engl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*) povećava osetljivost HCT116 ćelija na apoptozu pokrenutu TRAIL (Cummins i sar., 2004), ispitan je nivo ekspresije ovog proteina nakon 2 h, 6 h i 18 h tretmana sa 18.7  $\mu$ M Saq ili Saq-NO. Analiza rezultata dobijenih imunoblotom pokazala je da, za razliku od parentalnog jedinjenja koje dovodi do porasta nivoa ekspresije ovog antiapoptotskog proteina (slika 30B), tretman Saq-NO već nakon 2 h tretmana smanjuje prisustvo XIAP u HCT116 ćelijama.

Rezimirano, Saq-NO vraća osetljivost HCT116 ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL delujući na najmanje dva načina – povećanjem zastupljenosti DR5 receptora na membranama ćelija i ukidanjem blokade apoptotskog signalnog puta smanjenjem ekspresije XIAP.

#### **4.3.2. GIT-27NO ne ukida rezistenciju HCT116 ćelija na apoptozu pokrenutu TRAIL molekulom**

Antitumorsko delovanje NO ogleda se i u sposobnosti da izmeni fenotip ćelija kancera u pravcu veće osetljivosti na apoptozu pokrenutu TRAIL molekulom (Huerta-Yepes i sar., 2009). Kako bi se ispitalo da li GIT-27NO, budući da je donor NO, ima potencijal da senzitivizuje ćelije kancera kolona na rekombinantni humani TRAIL, HCT116 ćelije su paralelno tretirane navedenim agensima u trajanju od 24 h nakon čega je vijabilitet kultura procenjivan kristal violet testom. Odabrana doza GIT-27NO je očekivano redukovala vijabilitet kultura, ali statistički značajnog dodatnog pada vijabiliteta nije bilo prilikom kombinovane primene sa TRAIL (slika 31). Na osnovu navedenog rezultata zaključeno je da GIT-27NO nema potencijal da vrati osetljivost ćelija kancera kolona na apoptozu pokrenutu TRAIL molekulom.



**Slika 31. Tretman GIT-27NO ne ukida rezistenciju HCT116 ćelija na apoptozu indukovanu TRAIL molekulom**

HCT116 ćelije ( $1 \times 10^4$ ) tretirane su 24 h sa  $75 \mu\text{M}$  GIT-27NO, sa  $10 \text{ nM}$  rekombinantnog humanog TRAIL ili sa oba agensa istovremeno. Kontrolne kulture gajene su u medijumu bez tretmana. Vijabilitet tretiranih ćelija određivan je kristal violet testom i prikazan je kao procentualni deo broja živih ćelija u kontrolnim kulturama, kojima je arbitrarno dato maksimalnih 100 % vijabiliteta. Prikazana je  $\text{SV} \pm \text{SD}$  rezultata reprezentativnog od tri nezavisno izvedena ekspreimenta. \*  $p < 0.05$  odnosi se na kontrolne uzorke.

# **5. DISKUSIJA**

Prema zvaničnim podacima, u proteklih deset godina značajno je smanjena učestalost pojave novih slučajeva obolelih od kancera kolona (Wolpin i Mayer, 2008; Labianca i Merelli, 2010). Ovaj uspeh posledica je boljeg definisanja i praćenja rizičnih grupa bolesnika koji imaju veću verovatnoću razvitka kancera kolona usled nasleđenih mutacija, stečenih bolesti, starosti ili određenih navika savremenog načina života, kao i pouzdanije rane detekcije neoplastičnih promena u tkivima (Hagggar i Boushey, 2009; Watson i Collins, 2011; Labianca i Merelli, 2010). Paradoksalno, uprkos vrhunskoj metodologiji primenjenoj u savremenim istraživanjima, poznavanje ove bolesti je i dalje nedovoljno, te je terapija bolesnika kod kojih je tumor uznapredovao već decenijama bez suštinskog napretka. Konvencionalna hemioterapija kancera kolona najčešće podrazumeva davanje kombinacije različitih citotoksičnih agenasa, sposobnih da u određenom vremenskom okviru zaustave progres tumora (Wolpin i Mayer, 2008). Vremenom neminovno dolazi do selekcije klonova neosetljivih na delovanje raspoloživih hemioterapeutika, usled čega tumor neometano raste i metastazira vodeći do konačnog višestrukog kolapsa organa i smrti obolelih (Zhang i sar., 2012; Gallagher i Kemeny, 2010; Fidler, 2003). Obzirom da ni „personalizovani“ pristup u terapiji tumora nije značajnije unapredio njenu efikasnost kancer kolona je ostao među vodećim uzrocima smrtnosti (Duffy i Crown, 2008; Catenacci i sar., 2011).

U potrazi za novim agensima koji bi se mogli koristiti u terapiji kancera kolona, ispitan je antitumorski potencijal lekova primarno namenjenih terapiji inflamacije i infekcije (Kashfi, 2009; Rayburn i sar., 2009; Chow WA i sar., 2009). Eventualno proširivanje primene ovih lekova poznatog farmakološkog profila na lečenje kancera je i ekonomski isplativo i naučno opravdano, budući da postoji uzročno-posledična veza inflamacije odnosno infekcije, i nastanka, progresije i metastaziranja tumora. U konkretnom slučaju, poznato je da hronična inflamacija koja prati ulcerativni kolitis i Kronovu bolest creva, kao i latentne infekcije JC ili humanim papiloma virusom, doprinosi nastanku i progresiji kancera kolona (Monteleone i sar., 2012; Shacter i Weitzman, 2002; Chen i sar., 2012; Laghi i sar., 1999). Takođe, navedeni virusi i sami doprinose karcinogenezi destabilizacijom genomske DNK epitelnih ćelija kolona (Chen i sar., 2012; Laghi i sar., 1999). Sa druge strane se, tumori epitelnog porekla kakav je kancer kolona, često u literaturi opisuju kao „rane koje nikada ne zarastaju“ (Novak, 2005; Lin i Pollard, 2004), budući da promovišu hroničnu inflamaciju u svojoj mikrosredini radi



obezbeđivanja priliva nutrijenata, faktora rasta i migracije, kao i ćelija strome, koje će remodelovanjem matriksa doprineti daljoj progresiji i metastaziranju tumora (Allavena i sar., 2008; McLean i sar., 2011).

Brojne studije ukazuju da nesteroidni anti-inflamatorni lekovi poseduju antitumorsko delovanje, u čijoj osnovi se nalazi inhibicija ciklooksigenaze-2 (COX-2), enzima prekomerno eksprimiranog na mestu inflamacije i u ćelijama kancera (Kashfi, 2009; Wu i sar., 2004; Wang i Dubois, 2010). Svoj maksimum ovi lekovi su postigli kao hemopreventivni agensi, budući da se njihovom dugoročnom primenom čak dvostruko smanjuje incidenca kancera kolona (Kraus i sar., 2013; Tinsley i sar., 2013). Dok je inhibicija COX-2 poželjna, neselektivna inhibicija COX-1, enzima neophodnog za očuvanje želudačne mukoze, regulatora renalnog krvotoka i agregacije trombocita (Tinsley i sar., 2013), je odgovorna za neželjene posledice upotrebe nesteroidnih anti-inflamatornih lekova i predstavlja ozbiljnu prepreku za njihovu dugotrajnu primenu (Gabriel i sar., 1991, Hernández-Díaz i Rodríguez, 2000). Problem toksičnosti je prevaziđen modifikovanjem originalne supstance kovalentnim vezivanjem hemijske grupe, koja doniranjem NO kompenzuje nedostatak citoprotektivnih prostaglandina nastao usled inhibicije COX-1 enzima (Brzozowski i sar., 2000; Uno i sar., 1997). Međutim, pokazalo se da su nakon ove hemijske intervencije modifikovani agensi potentnije od parentalnih jedinjenja redukovali vijabilitet brojnih ćelijskih linija kancera *in vitro* i *in vivo* (Williams i sar., 2001). Zbog mogućnosti višestrukog poboljšanja farmakološkog profila supstanci, koncept „NO-modifikovanja“ je proširen van granica nesteroidnih anti-inflamatornih lekova te sada postoji velika grupa jedinjenja, kod kojih je navedenom hemijskom manipulacijom toksičnost smanjena, a antitumorski potencijal višestruko osnažen (Rigas i Williams, 2008).

U ovoj studiji je na modelu kancera kolona ispitano antitumorsko delovanje GIT-27NO i Saq-NO *in vitro* i *in vivo*, dva nova agensa nastala direktnim, kovalentnim vezivanjem hemijske grupe koja donira NO za anti-inflamatorno, odnosno antiviralno jedinjenje. Ispitan je značaj otpuštanja NO u antitumorskom delovanju supstanci, mehanizmi u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija tumora kao i promene u ekspresiji i post-translacionim modifikacijama molekula relevantnih za uočene efekte. Takođe, ispitana je njihova sposobnost da ukinu rezistenciju ćelija kancera kolona na antitumorski

imunski odgovor posredovan TRAIL molekulom, a koja se razvija pod selektivnim pritiskom aktivnosti ćelija specifične i nespecifične imunosti (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012; Zhang i Fang, 2005). Ovom studijom je zaokruženo pretkliničko ispitivanje GIT-27NO i Saq-NO, a dobijeni rezultati su dali mnogo razloga da se u fazi kliničkih istraživanja ozbiljno razmotri njihovo testiranje na pacijentima obolelim od kancera kolona.

Prvi rezultati ovog istraživanja su pokazali da GIT-27NO u *in vitro* uslovima dozno-zavisno smanjuje vijabilitet ćelijskih linija kancera kolona poreklom od miša ili čoveka, čime je proširena lista tumora osetljivih na delovanje ispitivanog agensa. U prethodnim studijama je pokazano antitumorsko delovanje GIT-27NO na velikom broju linija različitog porekla i karakteristika poput Ta3Ha i BT20 tumora dojke, na androgen-osetljivim LNCaP i androgen-neosetljivim PC3 ćelijama kancera prostate, A375 i B16 ćelijama melanoma, C6 glioma, L929 fibrosarkoma i HeLa ćelijama kancera cerviksa (Mijatovic i sar., 2008, 2010; Donia i sar., 2009; Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Od izuzetnog značaja je i podatak da je GIT-27NO ispoljio snažno delovanje i u slučaju ćelija melanoma koje su razvile rezistenciju na konvencionalni hemioterapeutik cisplatinu (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Antitumorsko delovanje ispitivanog agensa je pokazalo značajnu, ali ne i apsolutnu selektivnost prema maligno transformisanim ćelijama, budući da je toksičnost tretmana bila manja u kulturi primarnih ćelijskih linija astrocita i fibroblasta (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Pošto u svim navedenim modelima tumora, kao i kod ćelijskih linija kancera kolona, tretman parentalnim agensom VGX-1027 nije uticao na vijabilitet (Mijatovic i sar., 2008, 2010; Donia i sar., 2009; Maksimovic-Ivanic i sar., 2008), jasno je da je primenjena hemijska modifikacija odgovorna za sticanje antitumorskih svojstava novonastalog jedinjenja. Povoljni nalazi dobijeni *in vitro* na ćelijama kancera kolona potvrđeni su u adekvatnom modelu *in vivo*, gde je terapijski režim administracije GIT-27NO rezultovao značajnim smanjenjem volumena tumora, u miševima singenog BALB/c soja. Potencijal GIT-27NO da smanji volumen tumora prethodno je pokazan na modelu solidnog melanoma indukovano u miševima singenog C57BL/6 soja (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008), kao i u ksenograft modelima kancera prostate (Donia i sar., 2009). Obzirom da je uspostavljanje tumorskog modela humanog porekla moguće jedino u imunodeficientnim životinjama sa neformiranim ili neefikasnim T i B ćelijskim repertoarom, kako bi se sprečilo

odbacivanje istog putem indukcije antigen specifičnog odgovora, ksenograft modeli nam inicijalno uskraćuju veoma važan aspekt u proceni delovanja nekog agensa na razvoj maligniteta, te su stoga rezultati dobijeni na singenim miševima daleko pouzdaniji (Céspedes i sar., 2006). Takođe, neadekvatne interakcije između strome mišijeg i tumorske ćelije humanog porekla, usled nezanemarljivih interspecijskih razlika, dovode do aberantne aktivacije unutarćelijskih signalnih puteva, što može potencijalno dati iskrivljenu sliku o delovanju ispitivanog agensa (Céspedes i sar., 2006).

Ambivalentnost delovanja NO na tumorsku ćeliju najčešće se svodi na pitanje njegove kvantitativne zastupljenosti; ukoliko je prisutan u niskim koncentracijama ostvaruje citoprotektivni efekat, dok je u visokim, mikromolarnim koncentracijama njegovo delovanje citotoksično (Singh i Gupta, 2011; Huerta i sar., 2008). Međutim kako je i ovom studijom pokazano, interakcija NO sa tumorskom ćelijom daleko je kompleksnija od prostog svođenja na kvantitet, te je i finalni ishod uslovljen kako mestom nastanka, načinom i dinamikom njegovog ulaska ili geneze u ćeliji, tako i karakteristikama same ćelije i njene mikrosredine (Singh i Gupta, 2011; Huerta i sar., 2008). U poređenju sa odabranim konvencionalnim donorima NO čiji je antitumorski potencijal opisan u velikom broju radova (Huerta i sar., 2008; Wang i MacNaughton, 2005; Ferry-Dumazet i sar., 2002; Sogawa i sar., 1998; Kitamura i sar., 1998; Wang i sar., 2007), GIT-27NO je u vanćelijskim uslovima otpuštao značajno manje koncentracije NO, dok je istovremeno efikasnije smanjivao vijabilitet ćelija kancera kolona. Objašnjenje paradoksa leži u činjenici da, za razliku od pomenutih donora, GIT-27NO ne otpušta NO spontano već isključivo u kontaktu sa ćelijom ili njenim solubilnim produktima (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Posmatrano sa terapijske strane, time je smanjena mogućnost pojave neželjenih dejstava usled nekontrolisanog otpuštanja NO, poput hipotenzije, kardiodepresije i neurovaskularnih oštećenja (Kirkeboen i Strand, 1999; Massion i sar., 2003; Tao i sar., 2012). Istovremeno, obezbeđena je veća koncentracija NO na samom mestu delovanja – u tumorskoj ćeliji, što je od posebne važnosti imajući u vidu već pomenutu činjenicu da ovaj nestabilni, slobodni radikal u niskim koncentracijama može promovisati rast tumora (Hickok i Thomas, 2010). Specifičan profil otpuštanja NO od strane GIT-27NO je korelirao sa efikasnijom internalizacijom ovog slobodnog radikala od strane ćelija kancera kolona u poređenju sa

konvencionalnim donorima NO. Osim u ćelijama kancera kolona, tretman GIT-27NO je doveo do povećane koncentracije NO i unutar ćelija C6 glioma, A375 melanoma i TA3Ha tumora dojke (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008; Mijatovic i sar., 2008, 2010). Da je internalizacija NO otpuštenog u vanćelijskom prostoru ključna za antitumorsko delovanje GIT-27NO, potvrđeno je paralelnim tretmanom sa hemoglobinom, koji je trajnim uklanjanjem NO u vanćelijskom prostoru doveo do potpunog oporavka vijabiliteta ćelija kancera kolona.

Iako je GIT-27NO nastao vezivanjem NO grupe za antiinflamatorni agens VGX1027, njegovo poređenje sa NO-NSAID ne bi bilo adekvatno iz više razloga. Najpre, kod NO-NSAID je grupa koja donira NO povezana sa originalnom supstancom preko alifatičnog ili aromatičnog lanca, tzv „nosača“. Pokazano je da sâm „nosač“ poseduje antitumorska svojstva čime je relativizovan značaj NO u intenziviranom antitumorskom kapacitetu modifikovanih NSAID (Rigas i Williams, 2008; Dunlap i sar., 2008). Dodatno, antraciklinska struktura „nosača“ je potencijalno genotoksična što u ozbiljnoj meri ugrožava primenljivost ovih jedinjenja (Rigas i Williams, 2008; Dunlap i sar., 2008). U skladu sa tim, GIT-27NO u kvalitativnom smislu značajno odstupa od NO-NSAID jer je grupa koja donira NO direktno vezana za parentalnu supstrancu (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). Ovom hemijskom intervencijom, prvobitni lek je stekao antitumorska svojstva koja su, kako se pokazalo, isključivo posredovana otpuštanjem NO. Ispitivani agens, međutim, i kao donor ima značajnu prednost u odnosu na do sada poznate agense ove grupe jer efikasnije i u nižem doznom opsegu isporučuje NO malignoj ćeliji.

Unutar ćelije, NO brzo ulazi u reakciju sa stalno prisutnim molekularnim kiseonikom i/ili superoksid anjonom ( $O_2^-$ ), čime nastaje čitav spektar reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) i azota (RNS, od engl. *reactive nitrogen species*) (Wink i sar., 1993; Pryor i Squadrito, 1995). Zavisno od koncentracije u kojoj su prisutni, opseg delovanja NO, i njime generisanim ROS i RNS, može ići od fine regulacije signalnih puteva do indukcije smrti ćelije usled oštećenja nastalih kao posledica snažnog oksidativnog i nitrozativnog stresa (Bogdan, 2001; Pacher i sar., 2007). Porast koncentracije NO u ćelijama kancera kolona po tretmanu GIT-27NO pokrenuo je konsekventno produkciju ROS i RNS, nasuprot konvencionalnim donorima NO koji u istoj primenjenoj dozi nisu uticali na redoks status ovih ćelija. Prethodno je

pokazano da paralelni tretman C6 linije glioma sa N-acetil cisteinom, prekursorom glavnog unutarćelijskog antioksidansa glutaciona (Dodd i sar., 2008; Wu i sar., 2004), delimično neutrališe citotoksičnu aktivnost GIT-27NO (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008). U istim ćelijama je nakon tretmana ovim agensom detektovano i povećano prisustvo nitrotirozinskih rezidua (Maksimovic-Ivanic i sar., 2008), izazvano sekundarnim produktima oksidacije NO: peroksinitritom ( $\text{ONOO}^-$ ) i/ili azot dioksidom ( $\text{NO}_2$ ), (Radi, 2004), čime je onemogućena fosforilacija istih i blokiran prenos signala unutar ćelije (Pacher i sar., 2007; Monteiro i sar., 2008). Sve je više dokaza da je za citotoksično delovanje NO odgovoran reaktivni anjon peroksinitrit koji neselektivno oštećujući DNK, lipide i proteine, i dovodi do kolapsa ćelije (Bogdan, 2001; Pacher i sar., 2007). Oporavak vijabiliteta ćelija kancera kolona tretiranih GIT-27NO nakon eliminacije unutarćelijskog peroksinitrita MEG-sulfatom, ukazuje da je ovaj anjon glavni medijator toksičnosti ispitivanog agensa. Međutim, treba imati u vidu da citotoksičnost peroksinitrita nije uslovljena samo njegovom koncentracijom, već u velikoj meri zavisi od odlika same ćelije, to jest od njenih rezervi glutaciona i aktivnosti niza enzima poput katalaze, superoksid dismutaze, glutation reduktaze itd. (Pacher i sar., 2007). Osobnost HCT116 ćelijske linije kancera kolona korišćenih u ovoj studiji, jeste manja osetljivost na oksidativni i nitrozativni stres usled prekomerno eksprimiranog antioksidativnog enzima glutation S-transferaze  $\pi 1$  (Dang i sar., 2005). Činjenica da je upravo kinetika delovanja GIT-27NO na ćelije ove linije nešto sporija od očekivane, te i da je apoptoza detektovana nakon 48, a ne 24 h kako je uobičajeno, upravo se može dovesti u vezu sa opisanim svojstvom HCT116 ćelija da su tolerantnije prema reaktivnim jedinjenjima azota i kiseonika.

U literaturi se mogu naći brojni podaci o ćelijskoj smrti apoptozom u ćelijama kancera kolona indukovanoj otpuštanjem NO i generisanjem oksidativnog i nitrozativnog stresa. Tako je pokazano da NO donori DetaNONOat i SNP indukuju apoptozu RKO ćelija kancera kolona, uzrokovanu oksidativnim i nitrozativnim stresom, i realizovanu oslobađanjem citohroma i pokretanjem unutrašnje apoptotske kaskade (Wang i MacNaughton, 2005). Antitumorsko delovanje NO-aspirina pokazano je najpre na ćelijama kancera kolona u kojima je pokrenuta apoptotska signalna kaskada bila posledica indukovanih oksidativnog stresa i inhibiranog Wnt signalnog puta (Gao i sar., 2005). Gubljenje asimetričnosti ćelijske membrane uz očuvanje njenog integriteta i

porast frakcije ćelija sa fragmentisanom DNK nakon tretmana potvrdili su da je indukcija apoptoze u osnovi antitumorskog delovanja GIT-27NO. Uvođenje ćelije u stanje oksidativnog i nitrozativnog stresa, kao i oštećenja biomolekula koja su neminovna posledica visokih koncentracija ROS i RNS, dovode do brze akumulacije tumor supresora p53 (Bonavida i sar., 2006; Lala i Chakraborty, 2001; Umansky i Schirmacher, 2001) ključnog molekula za donošenje „odluke” da se pokrene program ćelijske smrti apoptozom (Kastan i sar., 1995; Sionov i Haupt, 1999; Green i Evan, 2002). P53 protein poseduje DNK vezujući domen i kao transkripcioni faktor reguliše ekspresiju mnogih proteina bitnih za egzekuciju ovog tipa ćelijske smrti, menjajući odnos pro- i antiapoptoskih molekula (Kastan i sar., 1995; Sionov i Haupt, 1999; Green i Evan, 2002). Tako je pokazano da p53, vezivanjem za promotor, povećava transkripciju Bax gena (Miyashita i Reed, 1995), dok sa druge strane deluje kao represor transkripcije gena anti-apoptoskih molekula iz Bcl-2 familije (Miyashita i sar., 1994). Pored njegove uloge u transkripciji relevantnih gena, ovaj protein ima značajnu regulatornu ulogu u ćeliji. Naime, pokazano je da vezujući se za Bcl-2 onemogućava njegovo citoprotektivno delovanje, čime potencira formiranje pora na membrani mitohondrija i konsekvantnu propagaciju apoptotskog signala (Tomita i sar., 2006). GIT-27NO je u ćelijama kancera dojke doveo do akumulacije p53 (Mijatovic i sar., 2010) izazvane *de novo* sintezom već fosforilacijom postojećeg molekula na Ser 20, čime je pomenuti protein zaštićen od proteolitičke degradacije (Chehab i sar., 1999). Ishod tretmana ovim agensom je u testiranoj ćelijskoj liniji doveo do smrti apoptozom koja nije bila posredovana aktivacijom egzekutorskih kaspaza, što je još jednom potvrdilo plastičnost njegovog delovanja (Mijatovic i sar., 2010). Kao posledica tretmana GIT-27NO u ćelijama kancera kolona je zaista detektovano pomeranje balansa pro- i antiapoptotskih molekula u smeru koji favorizuje pokretanje apoptoze u uslovima povećane ekspresije p53. Dodatno, egzekucija ovog tipa ćelijske smrti kod ćelija kancera kolona je barem delom bila zavisna od aktivnosti kaspaza, čija je transkripcija bila višestruko intenzivirana u prisustvu GIT-27NO.

Za razliku od VGX-1027, prvi sinteisani inhibitor HIV1 proteaze odobren za terapiju AIDS, sakvinavir, inicijalno poseduje antitumorski potencijal. U okviru kliničkih studija u kojima je ispitivano anti-retroviralno delovanje ovog preparata primećeno je da, nezavisno od rekonstitucije imunskog odgovora usled uspostavljanja kontrole nad

replikacijom virusa, dolazi do smanjenja incidence kao i do regresije već prisutnih tumora tipičnih za HIV pozitivne pacijente, poput Kapoši sarkoma i nekih tipova non-Hodžkin limfoma (Sgadari i sar., 2002, 2003). Zbog loše iskoristljivosti i brzog razvijanja rezistencije na lek (Mouly i sar., 2004), vremenom je bilo neophodno povećavati terapijsku dozu Saq, što je rezultovalo pojavom niza neželjenih posledica, poput neosetljivosti na insulin i razvoja dijabetesa, kardiovaskularnih komplikacija, osteopatije i redistribucije masti (Ben-Romano i sar., 2003; Carr i sar., 1998; Bergersen, 2006). Upravo je prevazilaženje problema toksičnosti bio glavni motiv za modifikovanje Saq kovalentnim vezivanjem NO.

Kao i u slučaju NO-NSAID, modifikacija Saq azot-monoksidom je dovela do osnaživanja njegovog antitumorskog delovanja *in vitro* i *in vivo*, što je pokazano na brojnim ćelijskim linijama kancera poreklom od čoveka, miša ili pacova: na ćelijskoj liniji HCC1419 tumora dojke, androgen-osetljivim LNCaP i androgen-neosetljivim PC3 ćelijama kancera prostate, A375 i B16 ćelijama melanoma, C6 glioma, L929 fibrosarkoma i HeLa ćelijama kancera cerviksa (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Donia i sar., 2011; Mijatovic i sar., 2011; Mojic i sar., 2012). Ispitan prvi put na modelu kancera kolona, Saq-NO je pri znatno nižim dozama od parentalnog jedinjenja smanjio vijabilitet ćelijskih linija HCT116 i CT26CL25, dok su oba agensa podjednako potentno redukovala volumen solidnog tumora indukovano u miševima singenog soja. Opšte stanje životinja tretiranih Saq-NO je bilo evidentno bolje u odnosu na one tretirane originalnom supstancom, što korelira sa prethodno dobijenim nalazima da je modifikacija NO rezultovala smanjenjem toksičnosti Saq. Naime, pokazano je da je, za razliku od Saq, Saq-NO u svim ispitivanim dozama bio apsolutno netoksičan za primarne kulture actrocita i fibroblasta (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Što je još impresivnije, miševi koji su primili Saq-NO u dozi, u kojoj Saq dovodi do smrti 100 % životinja, nisu ispoljavali vidljive znakove intoksikacije dok je studija subakutne toksičnosti pokazala da su biohemijski parametri u optimalnim okvirima (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009).

Iako je ista hemijska manipulacija primenjena na VGX-1027 i Saq, značaj koji NO ima u antitumorskom delovanju ishodnih jedinjenja je potpuno različit. Za razliku od GIT-27NO koji se ponaša kao donor NO, nakon tretmana Saq-NO nije moguće detektovati

akumulaciju ovog slobodnog radikala u supernatantima kultura niti unutar ćelija kancera kolona. Izostanak oporavka vijabiliteta prilikom ko-tretmana sa „hvatačem“ peroksinitrita, glavnog produkta oksidacije NO i egzekutorom njegove toksičnosti (Pryor i Squadrito, 1995) je još jedan dokaz da je modifikacijom Saq nastao novi hemijski entitet, čije antitumorsko delovanje ne zavisi od oslobađanja kvantitativno značajnih količina NO.

Modifikacija NO je rezultovala i promenom mehanizma antitumorskog delovanja Saq-NO u odnosu na parentalnu supstancu. Za razliku od Saq, koji je u literaturi opisan kao agens citocidnog delovanja (Pajonk i sar., 2002; Ikezoe i sar., 2004; McLean i sar., 2009), uočeni pad vijabiliteta nakon tretmana Saq-NO je kod većine ćelijskih linija tumora bio posledica inhibicije proliferacije (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Mojic i sar., 2012). Izuzetak su ćelije kancera kod kojih je usled specifičnog fenotipa, poput odsustva tumor supresora p53 ili konstitutivno aktivne inducibilne forme NO sintaze, ispitivani agens indukovao apoptozu (Mijatovic i sar., 2011; Donia i sar., 2011). U ovoj studiji, tretman Saq-NO nije rezultovao akumulacijom ćelija sa fragmentisanom DNK, niti inteziviranjem procesa autofagije, što sugerise da indukcija ćelijske smrti nije u osnovi smanjenja vijabiliteta ćelija kancera kolona. Kao i u slučaju ćelija C6 glioma, B16 melanoma i LNCaP kancera prostate (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Mojic i sar., 2012), tretman Saq-NO je snažno inhibirao proliferaciju ćelija kancera kolona. Od posebnog značaja je činjenica da je primećeni gubitak deobnog potencijala bio permanentnog karaktera i nezavisan od stalnog prisustva supstance. Iako je efekat slabiji od onog na CT26CL25, od posebne važnosti je mogućnost Saq-NO da zaustavi deobu HCT116 ćelija, budući da one nemaju funkcionalan tumor supresor p16<sup>INK4a</sup>, „kočnicu“ koji blokira izlaz iz G<sub>1</sub> faze ćelijskog ciklusa (Benzeno i sar., 2004). Činjenica da ćelije tumora, nakon jednokratnog tretmana Saq-NO trajno gube proliferativnu sposobnosti i trpe evidentnu promenu morfologije koja se može uočiti pod mikroskopom, implicira sposobnost Saq-NO da makar delimično ponovo uspostavi njihov netransformisani fenotip. Prethodna istraživanja su to i pokazala, u kojima je pored inhibicije proliferacije, tretman Saq-NO promovisao diferencijaciju C6 ćelija glioma u oligodendrocite, kao i transdiferencijaciju B16 melanoma u ćelije slične Švanovim (od engl Schwann-like cells) (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Zbog ovog specifičnog načina antitumorskog delovanja, pretpostavilo se da Saq-NO može uticati i na



metastatski potencijal ćelija tumora, što je u ovoj studiji na modelu kancera kolona prvi put detaljno ispitano.

Prognoza za izlečenje kancera postaje drastično lošija od onog trenutka kad se razviju metastaze - mase transformisanih ćelija udaljene od primarnog mesta nastanka (Glimelius i Cavalli-Björkman, 2012; Leung i sar., 2012; Gaber i sar., 2009). Zapravo su metastaze te, a ne primarni tumori, koje su odgovorne za čak 90 % smrtnog ishoda kod obolelih od kancera, do kojeg dolazi zbog višestrukog kolapsa organa (Chaffer i Weinberg, 2011). Kako ne postoji hirurška praksa uklanjanja metastaza, koje su uz to otporne na delovanje svih konvencionalnih hemioterapeutika (Kerbel i sar., 1994; Gu i sar., 2004), izučavanje kompleksnog metastatskog procesa i razvijanje novih terapijskih pristupa predstavlja glavni izazov u oblasti onkologije. Metastaziranje tumora epitelnog porekla, poput kancera kolona, otpočinje remodelovanjem i razgradnjom prve fizičke barijere - bazalne membrane. Ćelije dalje prodiru u stromu tkiva, gde imaju pristup krvnim i limfatičnim sudovima (Nguyen i sar., 2009; Hanahan i Weinberg, 2011). U lumenu sudova, jak selektivni pritisak rezultuje smrću 99,9 % ćelija, koje najčešće umiru usled nemogućnosti da izdrže pritisak jakih hidrodinamičkih sila ili zbog anoikisa, apoptoze pokrenute nakon gubitka kontakta sa „čvrstom podlogom“ (Kim i sar., 2012; Tsuruo i sar., 2008). Nakon ekstrasvazacije – izlaska iz lumena sudova – pred tumorskom ćelijom se nalazi poslednji i ujedno najkompleksniji zadatak: kolonizacija novog organa, čija uspešnost zavisi od specifičnog dijaloga sa novom mikrosredinom (Bhowmick, 2012; Gangadhara i sar., 2012; Psaila i Lyden, 2009). Aktuelno je stanovište pod nazivom „razvitak semena u povoljnoj zemlji“ (od engl. „*seed and soil*“) koje predstavlja opservaciju da određeni tipovi tumora preferiraju određene organe za kolonizaciju (Mathot i Steninger, 2012; Langley i Fidler, 2011; Nguyen i sar., 2009; Psaila i Lyden, 2009). U slučaju kancera kolona jetra i pluća su najčešći organi metastaziranja (Iwasaki i sar., 2005; Hatoum i sar., 2011). Zbog čega je jedan organ povoljniji od drugog za rast i razvoj metastatskih ćelija, na žalost još uvek nije do kraja razjašnjeno.

Sve je više podataka da su retke ćelije, sposobne da prevaziđu selekcionu pritiske procesa metastaziranja, zapravo matične kancer ćelije (Chaffer i Weinberg, 2011; Książkiewicz i sar., 2012; Grotenhuis i sar., 2012). To su visoko pokretljive i invazivne

ćelije, sa urođenom rezistencijom na hemioterapeutike koje predstavljaju izuzetno malu frakcija ćelija primarnog tumora što otežava njihovo izučavanje (Chaffer i Weinberg, 2011; Książkiewicz i sar., 2012; Grotenhuis i sar., 2012). U slučaju tumora epitelnog porekla, takve ćelije su prošle kroz epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju (EMT), koja dovodi do drastične promene fenotipa usled gašenja epitelnog i aktiviranja mezenhimalnog obrasca ekspresije gena (Polyak i Weinberg, 2009; Chaffer i Weinberg, 2011; Książkiewicz i sar., 2012; Hanahan i Weinberg, 2011). U ćeliji dolazi do smanjenja ekspresije E-kadherina i citokeratina, dok se istovremeno intenzivno proizvode markeri mezenhimalnih ćelija: vimentin, fibronektin i N-kadherin (Hanahan i Weinberg, 2011; Lee i sar., 2006). EMT omogućuje ćeliji veću pokretljivost, zahvaljujući intenzivnom remodelovanju citoskeleta aktivnošću članova familije Rho kinaza (Sanz-Moreno i sar., 2008, 2011; Calvo i sar., 2011; Olson i Sahai, 2009) i veću invazivnost, kao posledicu povećane sinteze i sekrecije matriksnih metaloproteinaza (MMP), enzima za remodelovanje i razgradnju komponenata ekstraćelijskog matriksa (Rucci i sar., 2011; Raffo i sar., 2011). Nažalost, pomoć u metastaziranju stiže i od ćelija mikrosredine tumora, poput tumor-asociranih fibroblasta i makrofaga (*engl tumor-associated fibroblasts, TAF* i *tumor-associated macrophages, TAM*), koji promovišu EMT ćelija tumora, sticanje matičnog fenotipa i invazivnost aktivno remodelujući stromu tkiva (Spaeth i sar., 2009; Yue i sar., 2012; Mathias i sar., 2012).

U ovoj studiji je na modelu kancera kolona prvi put detaljno ispitan anti-metastatski potencijal Saq-NO. Primenjen u dozi koja ne utiče na vijabilitet ćelija, Saq-NO predtretman je kod obe ćelijske linije *in vitro* redukovao mobilnost, invazivnost i adhezivnost za proteine ekstraćelijskog matriksa. U saglasnosti sa prethodno uočenom trajnom inhibicijom proliferacije i svim fenotipskim promenama koje su se odrazile na gubitak metastatskog potencijala u *in vitro* uslovima, aplikacija ćelija prethodno izloženih delovanju Saq-NO u trajanju od 24 h rezultovala je formiranjem neznatnog broja metastaza u plućima singenih životinja u poredjenju sa kontrolama. Zanimljivo je da je učinak modifikovanog Saq bio intenzivniji nego u sličaju predtretmana ćelija originalnim lekom, za koga je poznato da inhibicijom angiogeneze kao i inhibicijom ekspresije i aktivacije MMP 2 i 9 ostvaruje svoje anti-metastatsko delovanje (Barillari i sar., 2003, 2012; Cuneo i sar., 2007; Sgadari i sar., 2003). Odabrane ćelijske linije, HCT116 i CT26CL25, pripadaju različitim morfološkim tipovima, vretenastom i

zaokrugljenom, koji se mogu povezati sa različitim načinom remodeliranja citoskeleta prilikom migracije i sa različitim zahtevom ćelija za aktivnošću ekstraćelijskih proteaza prilikom invazije kroz tkivo (Sahai i Marshall, 2003). Tako je u osnovi invazivnosti HCT116 ćelija zaokrugljene morfologije povećana aktivnost Rho kinaza i dinamično remodelovanje citoskeleta, dok kod ćelija vretenaste morfologije poput CT26CL25 centralno mesto zauzima sekrecija MMP (Sahai i Marshall, 2003). Budući da metastatske ćelije mogu menjati morfološki tip i način invazije (Sahai i Marshall, 2003), sposobnost Saq-NO da smanji metastatski potencijal oba tipa ćelija predstavlja ogromnu prednost u odnosu na pojedinačne inhibitore Rho kinaza i MMP, koji su pokazali polovične učinke u kliničkim studijama.

Jasno je da su trajna inhibicija proliferacije i redukcija metastatskog potencijala ćelija kancera kolona tretiranih Saq-NO ispraćene istovetnim promenama na unutarćelijskom nivou. PI3K/Akt/mTOR signalni put, često prekomerno aktivan u ćelijama tumora, odgovoran je za intenziviranje proliferacije, rasta i metastaziranja kao i za neosetljivost ovih ćelija na indukciju ćelijske smrti apoptozom (Vivanco i Sawyers, 2002; Vogt, 2001; Brazil i Hemmings, 2001). Upravo je snažna inhibicija ovog signalnog puta, preko smanjenja fosforilacije Akt proteina, odgovorna za antitumorsko delovanje Saq, ali i za brojne neželjene, potencijalno letalne efekte koje prate primenu ove supstance (Plastaras i sar., 2008; Gupta i sar., 2005; Chow i sar., 2009). U skladu sa prethodno dobijenim rezultatima na drugim ćelijskim linijama (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009; Mijatovic i sar., 2011; Mojic i sar., 2012), Saq-NO je, za razliku od parentalnog agensa, u ćelijama kancera kolona doveo do prolaznog povećanja fosforilacije, odnosno aktivnosti Akt kinaze. Značaj prolaznog aktiviranja Akt kinaze za antitumorsko delovanje Saq-NO zavisi od specifičnosti same ćelije – tako je u slučaju ćelija B16 melonama i C6 glioma, paralelna upotreba 3-metiladenina, inhibitora PI3K, preusmerila način delovanja Saq-NO sa citostatskog na citocidno (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Sa druge strane, kod A253 ćelija melanoma, gde Saq-NO primarno deluje indukujući apoptozu, na isti način postignuta inhibicija fosforilacije Akt rezultuje potpunim neutralisanjem antitumorskog potencijala Saq-NO (Mijatovic i sar., 2011). Međutim, rezultati ove studije, zajedno sa podacima nedavno dobijenim na ćelijskoj liniji kancera prostate LNCaP (Mojic i sar., 2012), da Saq-NO kontinuirano inhibira fosforilaciju ribozomalnog S6 proteina, impliciraju da se ključni molekul nalazi u donjem delu signalne kaskade

PI3K/Akt/mTOR, dok je prolazna aktivacija Akt zaslužna za smanjenje toksičnosti Saq-NO u odnosu na parentalni agens.

Originalno jedinjenje Saq je peptidomimetik, sintetički analog gag-pol poliproteina, koji vezujući se za aktivno mesto, snažno inhibira viralnu HIV1 proteazu (De Clercq, 2002; Speck i sar., 2000; Randolph i DeGoey, 2004). Ispostavilo se da Saq ne utiče isključivo na aktivnost pomenutog viralnog enzima, već da može da interaguje sa „eukariotskim“ proteinima koji poseduju peptidnu sekvencu odnosno sekundarnu strukturu homologu aktivnom centru HIV1 proteaze. Tako je pokazano da, osim inhibicije pomenutog viralnog proteina, Saq može da inhibira i aktivnost 20S i 26S subjedinica proteazoma kao i proteolitičku aktivaciju MMP (Chow i sar., 2009; Pajonk i sar., 2002; Barillari i sar., 2012). Bioinformatička analiza sprovedena u našoj laboratoriji (neobjavljeni podaci), kojom se upoređivala sličnost aminokiselinskih sekvenci, pokazala je visoku homologiju između katalitičkog mesta HIV1 proteaze sa jedne strane i autoinhibitornog domena kinaze ribozomalnog proteina S6  $\beta$ 1 (S6K1), odnosno katalitičkog domena kinaze ribozomalnog proteina S6  $\beta$ 2 (S6K2) sa druge strane (Dufner i Thomas, 1999; Fenton i Gout, 2011). U navedenim domenima nalaze se fosforilaciona mesta ključna za aktivaciju S6K1 i S6K2 (S6K) kinaza koje se nalaze u nishodnom delu mnogih signalnih kaskada: PI3K/Akt, MEK/ERK, mTOR, Rho kinazne kaskade, protein kinaze  $C\zeta$  (Dufner i Thomas, 1999; Fenton i Gout, 2011). Aktivirane S6K fosforilišu S6 protein ribozoma, što rezultuje povećanom translacijom posebne grupe informacionih RNK (iRNK) sa oligopirimidinskim traktom na 5' kraju, u koju potpada čak 20 % totalne iRNK ćelije (Ruvinsky i Meyuhas, 2006; Dufner i Thomas, 1999; Jefferies i sar., 1997; Meyuhas i Dreazen, 2009). Kontrolišući translaciju, S6K utiče na ključne ćelijske procese poput sinteze proteina, rearanžmana citoskeleta, proliferacije i preživljanja (Ruvinsky i Meyuhas, 2006; Fenton i Gout, 2011). Činjenica da Saq-NO u potpunosti inhibira fosforilaciju S6 proteina u ćelijama kancera kolona, indirektna je potvrda pretpostavke da S6K može biti meta delovanja antiviralnog leka, te i da je njegova inhibicija u osnovi antitumorskog delovanja ovog agensa. Hipoteza je dodatno podržana činjenicom da tretman Saq-NO dovodi do fosforilacije Akt na serinu 473, a da je ista fosforilacija u literaturi opisana kao posledica aktivnosti mTORC2 kompleksa u uslovima inhibiranog S6K1 (O'Reilly i sar., 2006; Delgoffe i sar., 2011). Paralelno, Saq je daleko slabije od Saq-NO inhibirao fosforilaciju S6 proteina ribozoma, što implicira

da je modifikacija NO rezultovala nastankom forme sa snažnijim afinitetom vezivanja za S6K. Bazalna aktivnost S6K u normalnim ćelijama i tumoru se bitno razlikuje i upravo bi ta razlika mogla objasniti odsustvo toksičnosti Saq-NO spram netransformisanih ćelija. Naime, kod normalnih ćelija se, u odsustvu mitogena, neaktivan S6K1 nalazi u kompleksu sa faktorom inicijacije translacije eIF3 što ga čini nedostupnim delovanju Saq-NO (Holz i sar., 2005). Aktivacija S6K1, koja se i bez mitogena dešava u ćelijama tumora, rezultuje disocijacijom eIF3 kompleksa (Holz i sar., 2005), čime pomenuti molekul postaje „osetljiv“ na inhibiciju Saq-NO.

P53 status ćelija tumora u velikoj meri određuje mehanizam antitumorskog delovanja Saq-NO. Pokazano je da ukoliko ćelija nema funkcionalan p53 protein, kao što je slučaj kod kancera kolona PC3 ili kod HL60 ćelija akutne mijeloidne leukemije (Donia i sar., 2011; neobjavljeni podaci), Saq-NO smanjuje vijabilitet ćelija indukcijom apoptoze. Ćelije kancera kolona korišćene u ovoj studiji poseduju funkcionalan p53 molekul, stoga tretman sa Saq-NO, ali ne i sa Saq, rezultuje povećanjem nivoa ovog tumor supresora. To nije posledica njegove brze stabilizacije uzrokovane fosforilacijom serina na poziciji 20 (Ser20), koja inače štiti ovaj protein od proteozomalne degradacije (Chehab i sar., 1999). Povećavajući nivo inhibitora ciklin-zavisnih kinaza, poput p21 proteina, p53 zaustavlja ćelije u G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa, obezbeđujući dodatno vreme za saniranje metaboličkih problema ili popravku DNK oštećenja (Aylon i Oren, 2007). Osim u inhibiciji proliferacije, ranija istraživanja su ukazala na značaj porasta ekspresije p53 u indukciji diferencijacije pod delovanjem Saq-NO odnosno transdiferencijaciju ćelija C6 glioma i B16 melanoma (Maksimovic-Ivanic i sar., 2009). Zanimljivo je da se o ulozi p53 u metastaziranju ćelija relativno malo zna, budući da je velika većina dosadašnjih istraživanja bila orijentisana na što bolje definisanje njegove uloge kao čuvara genoma. Ipak, postoje podaci da negativnom regulacijom ekspresije kinaze fokalne adhezije (FAK od engl. *Focal Adhesion Kinase*), čija je prekomerna aktivnost detektovana u metastazama kancera kolona, p53 protein može smanjiti invazivnost i migratornost ćelija (Golubovskaya i Cance, 2010; Golubovskaya i sar., 2008). Za razliku od Saq-NO, kod ćelija tretiranih Saq je uočen skok u fosforilaciji p53 na Ser20, koja je indikator da je došlo do oštećenja DNK (Chehab i sar., 1999). Nalaz da tretman Saq, u dozi koja ne utiče značajno na vijabilitet ćelija, oštećuje DNK ćelija, ukazuje na potencijalno mutageno delovanje ovog agensa, koje do sada nije bilo ispitano.

Saq-NO, brže i potentnije od Saq inhibira ekspresiju ciklina D3 u ćelijama kancera kolona. Ciklin D3 je, zajedno sa njemu pridruženim kinazama, neophodan za prelazak iz G1 u S fazu ćelijskog ciklusa (Sherr, 1995; Miyatake i sar., 1995), a smanjenje njegove ekspresije rezultuje „G<sub>1</sub> blokom“ (Muisse-Helmericks i sar., 1998; Miyatake i sar., 1995), kakav se uočava kod ćelija kancera kolona nakon tretmana Saq-NO. Pored regulacije progresije ćelijskog ciklusa, postoje indikacije da bi ciklin D3 mogao doprineti metastatskom potencijalu kancera kolona, budući da je detektovana njegova povećana ekspresija u metastazama u odnosu na primarni tumor (Tanami i sar., 2005). U tom smislu, inhibicija njegove ekspresije nakon tretmana Saq-NO bi moglo biti još jedan, za sad neistražen, mehanizam anti-metastatskog delovanja agensa.

Budući da je RKIP jedan od retkih proteina koji je okarakterisan kao supresor metastaza (Escara-Wilke i sar., 2012), bilo je neizostavno ispitati njegov značaj za antimetastatsko delovanje Saq-NO. Reč je o inhibitoru kinaze Raf (od engl Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), učesnika MEK/ERK signalnog puta, čiji nivo ekspresije negativno korelira sa migratornošću i invazivnošću ćelija posmatranim *in vitro*, a takođe i sa incidencom pojave spontanih plućnih metastaza u *in vivo* modelima (Escara-Wilke i sar., 2012). Konkretni mehanizmi u osnovi anti-metastatskog delovanja RKIP su i dalje predmet brojnih studija, no zna se da smanjivanjem aktivnosti kinaze ERK (engl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*) utiče na remodelovanje citoskeleta Rho kinazama i inhibira transkripciju gena za MMP i faktore angiogeneze (Downward, 2003; Ahn i sar., 2012; Chong i sar., 2003). RKIP se koristi i kao prognostički marker kod osoba sa kancerom kolona: njegovo odsustvo u primarnim tumorima je asocirano sa brzim relapsom bolesti i pojavom brojnih, udaljenih metastaza (Al-Mulla i sar., 2006; Minoi i sar., 2007; Kim i Kim, 2013). Brojni agensi, poput inhibitora proteazoma, donora NO i modulatora aktivnosti histon deacetilaza (Bonavida B i sar., 2008; Baritaki i sar., 2009) su pokazali potencijal da podignu nivo ekspresije RKIP u ćelijama tumora. Iako je nastao modifikacijom agensa za koji je pokazano da inhibira funkciju proteazoma (Pajonk i sar., 2002), Saq-NO nije uticao na ekspresiju RKIP u ćelijama kancera kolona, što ukazuje da ovaj molekul nije značajan za njegovo anti-metastatsko delovanje.

Tumorske ćelije su u intenzivnoj komunikaciji između sebe, a potom i sa svojim neposrednim pa i udaljenim okruženjem. Jasno je da posmatranje maligniteta izdvojeno od mikrosredine, čiji dinamični uslovi definišu njegov rast, progresiju i metastatski potencijal, može odvesti u pogrešne zaključke (Swartz i sar., 2012; Mbeunkui i Johann, 2009; Joyce i Pollard, 2009). Mikrosredinu čine sve ćelije u okruženju kao i one koje su fizički udaljene, ali su putem medijatora u komunikaciji sa novonastalim neoplastičnim tkivom (Swartz i sar., 2012; Mbeunkui i Johann, 2009; Joyce i Pollard, 2009; Keibel i sar., 2009). Istorodne transformisane ćelije, ćelije čijom transformacijom su nastale, fibroblasti asocirani sa kancerom, vanćelijski matriks ćelije poreklom iz kosne srži pluripotentnog potencijala, endotel krvih sudova kao i ćelije urođene i adaptivne imunosti - preko direktnih međućelijskih kontakata i sekrecijom solubilnih produkata, neprekidno komuniciraju sa tumorom (Swartz i sar., 2012; Mbeunkui i Johann, 2009; Joyce i Pollard, 2009). Često se zanemaruje činjenica da ova komunikacija utiče na ishod primenjene hemioterapije, ali i da hemioterapija može modifikovati interakcije tumorske ćelije sa svojom okruženjem (Swartz i sar., 2012). U momentu kada je bolest simptomatski evidentna, imunski sistem je funkcionalno onemogućen da eliminiše maligne klonove (Pardoll, 2003; Shafer-Weaver i sar., 2007; O'Connell i sar., 1999). Preživeli klonovi su rezistenti na pojedinačne aktivnosti koje ćelije specifične i nespecifične imunosti preduzimaju u cilju saniranja novonastalog patološkog stanja (Igney i Krammer, 2002; Rivoltini i sar., 2002). U ovoj studiji ispitan je potencijal GIT-27NO i Saq-NO da povrate osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski odgovor posredovan TRAIL, molekulom iz TNF superfamilije koji, za razliku od ostalih članova ove grupe citokina, specifično indukuje apoptozu tumorskih, ali ne i normalnih, netransformisanih ćelija (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012; Hall i Cleveland, 2007; Lee i sar., 2007). TRAIL može biti prisutan kao membranski protein ili biti sekretovan od strane ćelija i urođene i adaptivne imunosti: aktiviranih i mirujućih B limfocita, aktiviranih T ćelija, ćelija prirodnih ubica, monocita, makrofaga i dendritičnih ćelija (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012; Lee i sar., 2007). Svoje delovanje TRAIL ostvaruje vezivanjem za takozvane „receptore smrti“ DR4 i DR5 (engl. death receptor, DR) i konsekventnim pokretanjem apoptotske kaskade (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012; Lee i sar., 2007). Zavisno od seta kaspaza čija je aktivacija neophodna za egzekuciju apoptoze, u odgovoru na TRAIL razlikuju se dva tipa ćelija tumora. Kod ćelija

takozvanog „prvog tipa“, egzekuciju apoptoze vrše kaspaza 8 i njome aktivirane efektorske kaspaze, dok je kod ćelija „drugog tipa“ neophodno amplifikovati signal smrti depolarizacijom mitohondrija i učešćem kaspaze 9 (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012). Prisustvo tumora i njegova progresija su jasni znaci da je došlo do selekcije tumorskih ćelija koje su rezistentne na indukciju apoptoze TRAIL molekulom. Rezistencija je rezultat promena na membrani i unutar ćelije tumora. Na membrani dolazi do smanjene ekspresije DR4 i DR5, funkcionalnih receptora za TRAIL, i do povećanog prisustva defektnih receptora DcR1 i DcR2 (od engl. *decoy receptor*) koji su, usled kraćeg ili potpuno odsutnog unutarćelijskog domena smrti, potpuno nesposobni da pokrenu apoptotsku kaskadu (Sheridan i sar., 1997; LeBlanc i Ashkenazi, 2003; Maksimovic-Ivanic i sar., 2012). Kod kancera kolona su prekomernom ekspresijom galektina-3 maskirani prisutni receptori čime je onemogućena ligacija TRAIL molekula (Mazurek i sar., 2012). Čak i nakon aktivacije receptora smrti ligacijom TRAIL, apoptotska signalna kaskada unutar ćelije može biti blokirana na više mesta (Maksimovic-Ivanic i sar., 2012). Tako je kod HCT116 ćelija kancera kolona povećanom sintezom FLIP proteina sprečena aktivacija kaspaze 8, eliminacijom proapoptotskog Bax molekula onemogućena depolarizacija mitohondrija i amplifikacija signala smrti i na kraju, prekomernom ekspresijom XIAP molekula sprečeno delovanje aktiviranih formi efektorskih kaspaza 3 i 7 (Van Geelen i sar., 2004).

Primenjen u dozi koja ne utiče značajno na vijabilitet, Saq-NO ukida rezistenciju ćelija kancera kolona na apoptozu indukovanu TRAIL molekulom. Saq primenjen u istoj dozi, ne samo da nije povratio osetljivost ćelija, već je u kombinaciji sa egzogeno dodatim TRAIL snažno stimulisao rast kultura. Navedeni rezultat sugerise da je, pored već pokazanog osnaživanja antitumorskog delovanja i eliminacije toksičnosti, imunosenzitivizacije ćelija tumora na TRAIL još jedna od poželjnih promena uzrokovanih modifikacijom Saq kovalentnim vezivanjem NO. Rezultati prethodnih istraživanja su pokazali da Saq-NO, povećavanjem prisustva DR5 receptora na membranama, vraća osetljivost tumora na TRAIL, ali i da je kaskada unutarćelijskih događaja u osnovi ovog fenomena uslovljena specifičnošću samih ćelija (Donia i sar., 2011; Mijatovic i sar., 2011). Tako je povećano prisustvo DR5 receptora na membranama A375 ćelija melanoma bilo posledica snažne inhibicije ekspresije YY1, represora transkripcije DR5 gena (Mijatovic i sar., 2011). Nasuprot njima, u p53<sup>-/-</sup> PC3 ćelijama kancera prostate



tretman Saq-NO je čak stimulisao ekspresiju YY1 represora, dok je za povećan membranski DR5 bio odgovoran NF- $\kappa$ B, koji je i u odsustvu p53 molekula uspeo da stimuliše prepis DR5 gena (Donia i sar., 2011). U ovoj studiji je pokazano da je u slučaju kancera kolona HCT116 tretiranog Saq-NO reverzija osetljivosti na TRAIL bila rezultat sinhronog povećanja zastupljenosti DR5 receptora na membranama ćelija i ukidanja blokade apoptotskog signalnog puta smanjenjem proteinske ekspresije XIAP. Kako se na 5' netranslirajućim regionu iRNK za XIAP nalazi oligopirimidinski trakt, jasno je da je translacija ovog molekula regulisana aktivnošću S6 ribozomalnog proteina, koja je kontinuirano inhibirana u prisustvu Saq-NO (Holcik i Korneluk, 2000).

U literaturi se mogu naći podaci da donori NO mogu senzitivizovati ćelije kancera na antitumorsko delovanje TRAIL molekula (Huerta-Yepez i sar., 2009). Međutim to nije bio slučaj sa GIT-27NO, koji primenjen paralelno sa TRAIL nije doveo do dodatnog smanjenja vijabiliteta ćelija kancera kolona. To implicira da GIT-27NO, delujući po principu sve ili ništa, ostvaruje direktan citocidni efekat, bez modulisanja odnosa ćelije tumora sa imunskom komponentom njene mikrosredine.

Opšte uzev, rezultati prikazavani u ovoj studiji zajedno sa rezultatima prethodnih istraživanja, zaokružuju pretklinička ispitivanja dve supstance i ukazuju na njihov veliki antitumorski potencijal, sa mehanizmom delovanja koji se može prilagoditi različitim tipovima tumora. Kako su ispitivani agensi nastali svojevrsnim „recikliranjem“ supstanci koje nisu primarno namenjene terapiji kancera, navedena istraživanja su opravdala intelektualnu i finansijsku racionalnost ovakvog pristupa i potvrdila istinitost rečenice Ser Džejmisa Bleka (Sir James W. Black), eminentnog farmakologa i dobitnika Nobelove nagrade da je „najplodnija osnova za otkriće novog leka - stari lek“.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobijenih rezultata, a u skladu sa postavljenim ciljevima istraživanja moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. GIT-27NO i Saq-NO smanjuju vijabilitet ćelijskih linija kancera kolona CT26CL25 poreklom od miša, i HCT116 poreklom od čoveka, *in vitro* i *in vivo*.
2. GIT-27NO ostvaruje antitumorsko delovanje unutarćelijskom akumulacijom visokih koncentracija NO otpuštenog van ćelija i posledičnim generisanjem oksidativnog i nitrozativnog stresa, dok je kod Saq-NO pad vijabiliteta ćelija kancera kolona nezavisan od oslobađanja kvantitativno značajnih količina NO.
3. Kod ćelija kancera kolona GIT-27NO indukuje apoptozu zavisnu od aktivacije kaspaza, koja je posledica akumulacije tumor supresora p53, povećanja ekspresije proapoptotskih molekula i kolapsa membranskog potencijala mitohondrija.
4. Antitumorsko delovanje Saq-NO ostvaruje trajnom inhibicijom proliferacije ćelija kancera kolona koja je nezavisna od kontinuiranog prisustva agensa.
5. Saq-NO trajno smanjuje metastatski potencijal ćelija kancera kolona *in vitro* i *in vivo*.
6. U osnovi trajne inhibicije proliferacije i redukcije metastatskog potencijala ćelija kancera kolona tretiranih Saq-NO nalazi se snažna inhibicija forforilacije ribozomalnog S6 proteina, a koja korelira sa prolaznom aktivacijom Akt, akumulacijom tumor supresora p53 i smanjenjem ekspresije ciklina D3.
7. Za razliku od GIT-27NO, Saq-NO revertuje osetljivost ćelija kancera kolona na antitumorski imunski odgovor posredovan TRAIL, ukidajući rezistenciju na membranskom i unutarćelijskom nivou kroz povećanje membranske ekspresije DR5 receptora i smanjenje nivoa XIAP.

# **7. LITERATURA**

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997;16(13):3797-804.
2. Abraham A, Habermann EB, Rothenberger DA, Kwaan M, Weinberg AD, Parsons HM, Gupta P, Al-Refaie WB. Adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer in the oldest old: Results beyond clinical guidelines. *Cancer.* 2013; 119(2):395-403
3. Ahn JK, Hwang JW, Bae EK, Lee J, Jeon CH, Koh EM, Cha HS. The role of Raf kinase inhibitor protein in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes invasiveness and cytokine and matrix metalloproteinase expression. *Inflammation.* 2012;35(2):474-83.
4. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):39-53.
5. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;66(1):1-9.
6. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, Bitar MS, George SS, Going JJ, García JJ, Scott L, Fyfe N, Murray GI, Kolch W. Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5672-9.
7. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(9):675-84.
8. Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell.* 2007;130(4):597-600.
9. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science.* 1990;249(4971):912-5.
10. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1990;50(23):7717-22.

11. Barillari G, Iovane A, Bacigalupo I, Palladino C, Bellino S, Leone P, Monini P, Ensoli B. Ritonavir or saquinavir impairs the invasion of cervical intraepithelial neoplasia cells via a reduction of MMP expression and activity. *AIDS*. 2012;26(8):909-19.
12. Barillari G, Sgadari C, Toschi E, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors as new treatment options for Kaposi's sarcoma. *Drug Resist Updat*. 2003;6(4):173-81.
13. Baritaki S, Chapman A, Yeung K, Spandidos DA, Palladino M, Bonavida B. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052: pivotal roles of Snail repression and RKIP induction. *Oncogene*. 2009;28(40):3573-85.
14. Ben-Romano R, Rudich A, Török D, Vanounou S, Riesenberg K, Schlaeffer F, Klip A, Bashan N. Agent and cell-type specificity in the induction of insulin resistance by HIV protease inhibitors. *AIDS*. 2003;17(1):23-32.
15. Benzeno S, Narla G, Allina J, Cheng GZ, Reeves HL, Banck MS, Odin JA, Diehl JA, Germain D, Friedman SL. Cyclin-dependent kinase inhibition by the KLF6 tumor suppressor protein through interaction with cyclin D1. *Cancer Res*. 2004;64(11):3885-91.
16. Berenbaum MC. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res*. 1981;35:269-335.
17. Bergersen BM. Cardiovascular risk in patients with HIV Infection: impact of antiretroviral therapy. *Drugs*. 2006;66(15):1971-87.
18. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91(4):854-62.
19. Bhowmick NA. Metastatic ability: adapting to a tissue site unseen. *Cancer Cell*. 2012;22(5):563-4.
20. Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*. 2001;11(2):66-75.

21. Bonavida B, Baritaki S, Huerta-Yepe S, Vega MI, Chatterjee D, Yeung K. Novel therapeutic applications of nitric oxide donors in cancer: roles in chemo- and immunosensitization to apoptosis and inhibition of metastases. *Nitric Oxide*. 2008;19(2):152-7.
22. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepe S, Garbán H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist Updat*. 2006;9(3):157-73.
23. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull*. 2002;64:1-25.
24. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005;179(1-2):56-65.
25. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res*. 1981;41(5):1751-6.
26. Brattain MG, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res*. 1980;40(7):2142-6.
27. Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(11):657-64.
28. Brüne B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ*. 2003;10(8):864-9.
29. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Kwiecień S, Pajdo R, Ptak A, Pawlik M, Hahn E. Gastroprotective and ulcer healing effects of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Dig Liver Dis*. 2000;32(7):583-94.
30. Buess G, Kipfmüller K, Hack D, Grüssner R, Heintz A, Junginger T. Technique of transanal endoscopic microsurgery. *Surg Endosc*. 1988;2(2):71-5.
31. Calvo F, Sanz-Moreno V, Agudo-Ibáñez L, Wallberg F, Sahai E, Marshall CJ, Crespo P. RasGRF suppresses Cdc42-mediated tumour cell movement, cytoskeletal dynamics and transformation. *Nat Cell Biol*. 2011;13(7):819-26.

32. Carr A, Samaras K, Burton S, Law M, Freund J, Chisholm DJ, Cooper DA. A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. *AIDS*. 1998;12(7):F51-8.
33. Catenacci D, Kozloff M, Kindler H, Polite B. Personalized colon cancer care in 2010. *Semin Oncol*. 2011;38(2):284-308.
34. Céspedes MV, Casanova I, Parreño M, Manges R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(5):318-29.
35. Chabot GG. Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33(4):245-59.
36. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331(6024):1559-64.
37. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol*. 2002;3(3):166-74.
38. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13777-82.
39. Chen B, Keshive M, Deen WM. Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. *Biophys J*. 1998;75(2):745-54.
40. Chen TH, Huang CC, Yeh KT, Chang SH, Chang SW, Sung WW, Cheng YW, Lee H. Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2012;18(30):4051-8.
41. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15(5):463-9.
42. Chow WA, Jiang C, Guan M. Anti-HIV drugs for cancer therapeutics: back to the future? *Lancet Oncol*. 2009;10(1):61-71.
43. Cifone MG, Ulisse S, Santoni A. Natural killer cells and nitric oxide. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1513-24.
44. Cohen LB, Waye JD. Treatment of colonic polyps--practical considerations. *Clin Gastroenterol*. 1986;15(2):359-76.
45. Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan RF, Maguire C, Hind D, Tappenden P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2010;14(32):1-206.



46. Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan RF, Maguire C, Hind D, Tappenden P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2010;14(32):1-206.
47. Cummins JM, Kohli M, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B, Bunz F. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(9):3006-8.
48. Cuneo KC, Tu T, Geng L, Fu A, Hallahan DE, Willey CD. HIV protease inhibitors enhance the efficacy of irradiation. *Cancer Res.* 2007;67(10):4886-93.
49. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. *Lancet.* 2010;375(9719):1030-47.
50. Dang DT, Chen F, Kohli M, Rago C, Cummins JM, Dang LH. Glutathione S-transferase p11 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(20):9485-94.
51. De Clercq E. New anti-HIV agents and targets. *Med Res Rev.* 2002;22(6):531-65.
52. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, Ichas F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J.* 2002;16(6):607-9.
53. Delgoffe GM, Pollizzi KN, Waickman AT, Heikamp E, Meyers DJ, Horton MR, Xiao B, Worley PF, Powell JD. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol.* 2011;12(4):295-303
54. Demchenko AP. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology.* 2012. doi: 10.1007/s10616-012-9481-y.
55. Dixon K, Kopras E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(6):441-8.
56. Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther.* 2008;8(12):1955-62.

57. Donia M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Mojic M, Miljkovic D, Timotijevic G, Fagone P, Caponnetto S, Al-Abed Y, McCubrey J, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. In vitro and in vivo anticancer action of Saquinavir-NO, a novel nitric oxide-derivative of the protease inhibitor saquinavir, on hormone resistant prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 2011;10(3):492-9.
58. Donia M, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Miljkovic D, Mangano K, Tumino S, Biondi A, Basile F, Al-Abed Y, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The novel NO-donating compound GIT-27NO inhibits in vivo growth of human prostate cancer cells and prevents murine immunoinflammatory hepatitis. *Eur J Pharmacol*. 2009;615(1-3):228-33.
59. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22.
60. Duffy M, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem*. 2008;54(11):1770-9.
61. Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res*. 1999;253(1):100-9.
62. Dunlap T, Abdul-Hay SO, Chandrasena RE, Hagos GK, Sinha V, Wang Z, Wang H, Thatcher GR. Nitrates and NO-NSAIDs in cancer chemoprevention and therapy: in vitro evidence querying the NO donor functionality. *Nitric Oxide*. 2008;19(2):115-24.
63. Escara-Wilke J, Yeung K, Keller ET. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(3-4):615-20
64. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol*. 2005;6(5):322-7.
65. Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(1):47-59.
66. Ferry-Dumazet H, Mamani-Matsuda M, Dupouy M, Belloc F, Thiolat D, Marit G, Arock M, Reiffers J, Mossalayi MD. Nitric oxide induces the apoptosis of human BCR-ABL-positive myeloid leukemia cells: evidence for the chelation of intracellular iron. *Leukemia*. 2002;16(4):708-15.
67. Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453-8

68. Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*. 1984;68(1-2):167-75.
69. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(7):521-34.
70. Gaber A, Johansson M, Stenman UH, Hotakainen K, Pontén F, Glimelius B, Bjartell A, Jirström K, Birgisson H. High expression of tumour-associated trypsin inhibitor correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1540-8.
71. Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. *Ann Intern Med*. 1991;115(10):787-96.
72. Gallagher D, Kemeny N. Metastatic colorectal cancer: from improved survival to potential cure. *Oncology*. 2010;78(3-4):237-48.
73. Gangadhara S, Barrett-Lee P, Nicholson RI, Hiscox S. Pro-metastatic tumor-stroma interactions in breast cancer. *Future Oncol*. 2012;8(11):1427-42
74. Gao J, Liu X, Rigas B. Nitric oxide-donating aspirin induces apoptosis in human colon cancer cells through induction of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(47):17207-12.
75. Ghoshal K, Jacob ST. Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res*. 1994;54(3):632-6.
76. Glimelius B, Cavalli-Björkman N. Metastatic colorectal cancer: current treatment and future options for improved survival. Medical approach-present status. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47(3):296-314
77. Golubovskaya VM, Cance W. Focal adhesion kinase and p53 signal transduction pathways in cancer. *Front Biosci*. 2010;15:901-12.
78. Golubovskaya VM, Finch R, Kweh F, Massoll NA, Campbell-Thompson M, Wallace MR, Cance WG. p53 regulates FAK expression in human tumor cells. *Mol Carcinog*. 2008;47(5):373-82.
79. Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*. 1998;391(6663):169-73.

80. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004;23(16):2891-906.
81. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:101-28.
82. Graham J, Mushin M, Kirkpatrick P. Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):11-2.
83. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002;1(1):19-30.
84. Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*. 2000;18(4):299-313.
85. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber*. 1879; 12: 426-8.
86. Grotenhuis BA, Wijnhoven BP, van Lanschot JJ. Cancer stem cells and their potential implications for the treatment of solid tumors. *J Surg Oncol*. 2012;106(2):209-15.
87. Gu B, España L, Méndez O, Torregrosa A, Sierra A. Organ-selective chemoresistance in metastasis from human breast cancer cells: inhibition of apoptosis, genetic variability and microenvironment at the metastatic focus. *Carcinogenesis*. 2004;25(12):2293-301.
88. Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, McKenna WG, Muschel RJ. HIV protease inhibitors block Akt signaling and radiosensitize tumor cells both in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2005;65(18):8256-65.
89. Gwyn K, Sinicrope FA. Chemoprevention of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(1):13-21.
90. Haggard F, Boushey R. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22(4):191-7.
91. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*. 2009;22(4):191-7.
92. Hall MA, Cleveland JL. Clearing the TRAIL for Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 2007;12(1):4-6.
93. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

94. Hatoum HA, Abi Saad GS, Otrrock ZK, Barada KA, Shamseddine AI. Metastasis of colorectal carcinoma to the testes: clinical presentation and possible pathways. *Int J Clin Oncol*. 2011;16(3):203-9.
95. Hernández-Díaz S, Rodríguez LA. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding/perforation: an overview of epidemiologic studies published in the 1990s. *Arch Intern Med*. 2000;160(14):2093-9.
96. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;157(1):87-94.
97. Hickok JR, Thomas DD. Nitric oxide and cancer therapy: the emperor has NO clothes. *Curr Pharm Des*. 2010;16(4):381-91.
98. Holcik M, Korneluk RG. Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4648-57.
99. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*. 2005;123(4):569-80.
100. Huerta S, Chilka S, Bonavida B. Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics. *Int J Oncol*. 2008;33(5):909-27.
101. Huerta-Yeppez S, Vega M, Escoto-Chavez SE, Murdock B, Sakai T, Baritaki S, Bonavida B. Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide*. 2009;20(1):39-52.
102. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer*. 2009;61(1):47-69.
103. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.
104. Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*. 2002;71(6):907-20.

105. Ikezoe T, Saito T, Bandobashi K, Yang Y, Koeffler HP, Taguchi H. HIV-1 protease inhibitor induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of signal transducer and activator of transcription3 and extracellularsignal-regulatedkinase1/2. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(4):473-9.
106. Iwasaki A, Shirakusa T, Yamashita Y, Noritomi T, Maekawa T, Hamada T. Characteristic differences between patients who have undergone surgical treatment for lung metastasis or hepatic metastasis from colorectal cancer. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;53(6):358-64.
107. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 1997;16(12):3693-704.
108. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res.* 1995;55(7):1407-12.
109. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):239-52.
110. Kashfi K. Anti-inflammatory agents as cancer therapeutics. *Adv Pharmacol.* 2009;57:31-89.
111. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14(1):3-15.
112. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des.* 2009;15(17):1949-55.
113. Kerbel RS, Kobayashi H, Graham CH. Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? *J Cell Biochem.* 1994;56(1):37-47.
114. Kim K, Lu Z, Hay ED. Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int.* 2002;26(5):463-76.
115. Kim SO, Kim MR. (-)-Epigallocatechin 3-gallate inhibits invasion by inducing the expression of Raf kinase inhibitor protein in AsPC 1 human pancreatic adenocarcinoma cells through the modulation of histone deacetylase activity. *Int J Oncol.* 2013;42(1):349-58.

116. Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:306879
117. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70.
118. Kirkebøen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43(3):275-88.
119. Kitamura Y, Kamoshima W, Shimohama S, Nomura Y, Taniguchi T. Nitric oxide donor-induced p53-sensitive cell death is enhanced by Bcl-2 reduction in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int.* 1998;32:93-102.
120. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry.* 1982;21(24):6188-93.
121. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem.* 1998;70(13):2446-53.
122. Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T. Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1998;46(2):373-5.
123. 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(21):3209-3212.
124. Kraus S, Naumov I, Arber N. COX-2 active agents in the chemoprevention of colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2013;191:95-103.
125. Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology.* 2012;79(4):195-208.
126. Labianca R, Merelli B. Screening and diagnosis for colorectal cancer: present and future. *Tumori.* 2010;96(6):889-901.
127. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

128. Laghi L, Randolph A, Chauhan D, Marra G, Major E, Neel J, Boland C. JC virusDNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7484-9.
129. Lai D, Visser-Grieve S, Yang X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci Rep*. 2012;32(4):361-74.
130. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001;2(3):149-56.
131. Lancaster JR Jr, Xie K. Tumors face NO problems? *Cancer Res*. 2006;66(13):6459-62.
132. Langley RR, Fidler IJ. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2527-35
133. Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH, Lyu LC. Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer. *Cancer Res*. 1997;57(21):4787-94.
134. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):66-75.
135. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006;172(7):973-81.
136. Lee JY, Huerta-Yepez S, Vega M, Baritaki S, Spandidos DA, Bonavida B. The NO TRAIL to YES TRAIL in cancer therapy (review). *Int J Oncol*. 2007;31(4):685-91.
137. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*. 2002;89(7):845-60.
138. Leung AM, Hari DM, Morton DL. Surgery for distant melanoma metastasis. *Cancer J*. 2012;18(2):176-84.
139. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005;115(10):2679-88.
140. Lin EY, Pollard JW. Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found Symp*. 2004;256:158-68;168-72, 259-69.



141. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837-47.
142. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
143. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
144. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Harhaji L, Miljkovic D, Dabideen D, Fan Cheng K, Mangano K, Malaponte G, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S. Anticancer properties of the novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(3):510-20.
145. Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Miljkovic D, Harhaji-Trajkovic L, Timotijevic G, Mojic M, Dabideen D, Cheng KF, McCubrey JA, Mangano K, Al-Abed Y, Libra M, Garotta G, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. The antitumor properties of a nontoxic, nitric oxide-modified version of saquinavir are independent of Akt. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(5):1169-78.
146. Maksimovic-Ivanic D, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F, Mijatovic S. Resistance to TRAIL and how to surmount it. *Immunol Res*. 2012;52(1-2):157-68.
147. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2449-60.
148. Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry*. 2001;40(6):1688-93.
149. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*. 2003;93(5):388-98.
150. Mathias RA, Gopal SK, Simpson RJ. Contribution of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to the tumour microenvironment. *J Proteomics*. 2012; doi: pii: S1874-3919(12)00711-7.10.1016/j.jprot.2012.10.016.
151. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*. 2001;7(8):2182-94.

152. Mathot L, Steninger J. Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding. *Cancer Sci.* 2012;103(4):626-31
153. Mazurek N, Byrd JC, Sun Y, Hafley M, Ramirez K, Burks J, Bresalier RS. Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death receptors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* 2012;19(3):523-33.
154. Mbeunkui F, Johann DJ Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(4):571-82.
155. McLean K, Van De Ven NA, Sorenson DR, Daudi S, Liu JR. The HIV protease inhibitor saquinavir induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2009;112(3):623-30.
156. McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat NA, Drew JE, El-Omar EM. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One.* 2011;6(1):e15366
157. Meyuhas O, Drezzen A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009;90:109-53.
158. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Mojic M, Malaponte G, Libra M, Cardile V, Miljkovic D, Harhaji L, Dabideen D, Cheng KF, Bevelacqua Y, Donia M, Garotta G, Al-Abed Y, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Novel nitric oxide-donating compound (S,R)-3-phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid-nitric oxide (GIT-27NO) induces p53 mediated apoptosis in human A375 melanoma cells. *Nitric Oxide.* 2008;19(2):177-83.
159. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Mojic M, Timotijevic G, Miljkovic D, Mangano K, Donia M, Di Cataldo A, Al-Abed Y, Cheng KF, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Cytotoxic and immune-sensitizing properties of nitric oxide-modified Saquinavir in iNOS-positive human melanoma cells. *J Cell Physiol.* 2011;226(7):1803-12
160. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Timotijevic G, Miljkovic D, Donia M, Libra M, Coco M, McCubrey J, Al-Abed Y, Korac A, Stosic-Grujicic S, Nicoletti F. Induction of caspase-independent apoptotic-like cell death of mouse mammary tumor TA3Ha cells in vitro and reduction of their lethality in vivo by the novel chemotherapeutic agent GIT-27NO. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(8):1090-9.

161. Minoo P, Zlobec I, Baker K, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2007;127(5):820-7.
162. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res.* 1994;54(12):3131-5.
163. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
164. Miyatake S, Nakano H, Park SY, Yamazaki T, Takase K, Matsushime H, Kato A, Saito T. Induction of G1 arrest by down-regulation of cyclinD3 in Tcell hybridomas. *J Exp Med.* 1995;182(2):401-8.
165. Mocellin S, Bronte V, Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev.* 2007;27(3):317-52.
166. Mojic M, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Dinic S, Grdovic N, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Tumino S, Fagone P, Mangano K, Zocca MB, Al-Abed Y, McCubrey JA, Nicoletti F. Saquinavir-NO-targeted S6 protein mediates sensitivity of androgen-dependent prostate cancer cells to TRAIL. *Cell Cycle.* 2012;11(6):1174-82.
167. Monteiro HP, Arai RJ, Travassos LR. Protein tyrosine phosphorylation and protein tyrosine nitration in redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(5):843-89
168. Monteleone G, Pallone F, Stolfi C. The dual role of inflammation in colon carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):11071-84.
169. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science.* 1997;275(5307):1787-90.
170. Mouly SJ, Paine MF, Watkins PB. Contributions of CYP3A4, P-glycoprotein, and serumproteinbinding to the intestinalfirst-passextraction of saquinavir. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):941-8.

171. Muise-Helmericks RC, Grimes HL, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29864-72.
172. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011;192(2):209-18.
173. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):274-84.
174. Novak K. A healing process. *Nature Reviews Cancer.* 2005;5:244.
175. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol.* 2001;3(3):67-70.
176. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today.* 1999;20(1):46-52.
177. Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(4):273-87.
178. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609-19.
179. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 2006;66(3):1500-8.
180. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424.
181. Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(18):5230-5.

182. Pajonk F, Himmelsbach J, Riess K, Sommer A, McBride WH. The human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease inhibitor saquinavir inhibits proteasome function and causes apoptosis and radiosensitization in non-HIV-associated human cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(18):5230-5.
183. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.* 2003;21:807-39.
184. Parish CR, Warren HS. Use of the intracellular fluorescent dye CFSE to monitor lymphocyte migration and proliferation. *Curr Protoc Immunol.* 2002;Chapter 4:Unit 4.9.
185. Pastorino JG, Chen ST, Tafani M, Snyder JW, Farber JL. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 1998;273(13):7770-5.
186. Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL. Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31734-9.
187. Pfannschmidt J, Dienemann H, Hoffmann H. Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(1):324-38.
188. Plastaras JP, Vapiwala N, Ahmed MS, Gudonis D, Cerniglia GJ, Feldman MD, Frank I, Gupta AK. Validation and toxicity of PI3K/Akt pathway inhibition by HIV protease inhibitors in humans. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(5):628-35.
189. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):265-73.
190. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 1):L699-722.
191. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):285-93.
192. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(12):4003-8.

193. Raffo D, Pontiggia O, Simian M. Role of MMPs in metastatic dissemination: implications for therapeutic advances. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(11):1937-47.
194. Rama N, Monteiro A, Bernardo JE, Eugénio L, Antunes MJ. Lung metastases from colorectal cancer: surgical resection and prognostic factors. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009;35(3):444-9.
195. Randolph JT, DeGoey DA. Peptidomimetic inhibitors of HIV protease. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(10):1079-95.
196. Rayburn ER, Ezell SJ, Zhang R. Anti-Inflammatory Agents for Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol.* 2009;1(1):29-43.
197. Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(24):8945-50.
198. Rigas B, Williams JL. NO-donatingNSAIDs and cancer: an overview with a note on whether NO is required for their action. *Nitric Oxide.* 2008;19(2):199-204.
199. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, Mortarini R, Arancia G, Anichini A, Fais S, Parmiani G. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev.* 2002;188:97-113.
200. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
201. Rothenberg ML. Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond. *Oncologist.* 2001;6(1):66-80.
202. Rothweiler F, Michaelis M, Brauer P, Otte J, Weber K, Fehse B, Doerr HW, Wiese M, Kreuter J, Al-Abed Y, Nicoletti F, Cinatl J Jr. Anticancer effects of the nitric oxide-modified saquinavir derivative saquinavir-NO against multidrug-resistant cancer cells. *Neoplasia.* 2010;12(12):1023-30.
203. Rucci N, Sanità P, Angelucci A. Roles of metalloproteases in metastatic niche. *Curr Mol Med.* 2011;11(8):609-22.
204. Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(6):342-8.

205. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 2003;5(8):711-9.
206. Sakurai F, Terada T, Maruyama M, Watanabe Y, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Therapeutic effect of intravenous delivery of lipoplexes containing the interferon-beta gene and poly I: poly C in a murine lung metastasis model. *Cancer Gene Ther.* 2003;10(9):661-8.
207. Samowitz WS, Slattery ML, Sweeney C, Herrick J, Wolff RK, Albertsen H. APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Mol Cancer Res.* 2007;5(2):165-70.
208. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 2008;135(3):510-23.
209. Sanz-Moreno V, Gaggioli C, Yeo M, Albregues J, Wallberg F, Viros A, Hooper S, Mitter R, Féral CC, Cook M, Larkin J, Marais R, Meneguzzi G, Sahai E, Marshall CJ. ROCK and JAK1 signaling cooperate to control actomyosin contractility in tumor cells and stroma. *Cancer Cell.* 2011;20(2):229-45.
210. Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M, Chauffert B. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002;49(6):445-52.
211. Sgadari C, Barillari G, Toschi E, Carlei D, Bacigalupo I, Baccarini S, Palladino C, Leone P, Bugarini R, Malavasi L, Cafaro A, Falchi M, Valdembri D, Rezza G, Bussolino F, Monini P, Ensoli B. HIV protease inhibitors are potent anti-angiogenic molecules and promote regression of Kaposi sarcoma. *Nat Med.* 2002;8(3):225-32.
212. Sgadari C, Monini P, Barillari G, Ensoli B. Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth. *Lancet Oncol.* 2003;4(9):537-47.
213. Shacter E, Weitzman S. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park).* 2002;16(2):217-32.
214. Shafer-Weaver K, Anderson M, Malyguine A, Hurwitz AA. T cell tolerance to tumors and cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:357-68.

215. Shapiro H. *Practical Flow Cytometry*, 4<sup>th</sup> edition, 2003, Willey, NY, USA
216. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277(5327):818-21.
217. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(5):187-90.
218. Shinya H, Wolff WI. Morphology, anatomic distribution and cancer potential of colonic polyps. *Ann Surg*. 1979;190(6):679-83.
219. Singh S, Gupta AK. Nitric oxide: role in tumour biology and iNOS/NO-based anticancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(6):1211-24.
220. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999;18(45):6145-57.
221. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9433-8.
222. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7368-73.
223. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblast contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992.
224. Speck RR, Flexner C, Tian CJ, Yu XF. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag) and Pr160(Gag-pol) processing intermediates that accumulate in primary and transformed cells treated with peptidic and nonpeptidic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(5):1397-403.



225. Stojanovic I, Cuzzocrea S, Mangano K, Mazzon E, Miljkovic D, Wang M, Donia M, Al Abed Y, Kim J, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S, Claesson M. In vitro, ex vivo and in vivo immunopharmacological activities of the isoxazoline compound VGX-1027: modulation of cytokine synthesis and prevention of both organ-specific and systemic autoimmune diseases in murine models. *Clin Immunol.* 2007;123(3):311-23.
226. Stosic-Grujicic S, Cvetkovic I, Mangano K, Fresta M, Maksimovic-Ivanic D, Harhaji L, Popadic D, Momcilovic M, Miljkovic D, Kim J, Al-Abed Y, Nicoletti F. A potent immunomodulatory compound, (S,R)-3-Phenyl-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid, prevents spontaneous and accelerated forms of autoimmune diabetes in NOD mice and inhibits the immunoinflammatory diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in CBA/H mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320(3):1038-49.
227. Ströhle A, Wolters M, Hahn A. Folic acid and colorectal cancer prevention: molecular mechanisms and epidemiological evidence (Review). *Int J Oncol.* 2005;26(6):1449-64.
228. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM, DeClerck YA. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 2012;72(10):2473-80.
229. Takachi R, Tsubono Y, Baba K, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Tsugane S, Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group. Red meat intake may increase the risk of colon cancer in Japanese, a population with relatively low red meat consumption. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2011;20(4):603-12.
230. Tanami H, Tsuda H, Okabe S, Iwai T, Sugihara K, Imoto I, Inazawa J. Involvement of cyclin D3 in liver metastasis of colorectal cancer, revealed by genome-wide copy-number analysis. *Lab Invest.* 2005;85(9):1118-29.
231. Tao RR, Ji YL, Lu YM, Fukunaga K, Han F. Targeting nitrosative stress for neurovascular protection: new implications in brain diseases. *Curr Drug Targets.* 2012;13(2):272-84.
232. Timeus F, Crescenzo N, Ricotti E, Doria A, Bertin D, Saglio G, Tovo PA. The effects of saquinavir on imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cell lines. *Haematologica.* 2006;91(5):711-2.

233. Tinsley HN, Grizzle WE, Abadi A, Keeton A, Zhu B, Xi Y, Piazza GA. New NSAID targets and derivatives for colorectal cancer chemoprevention. *Recent Results Cancer Res.* 2013;191:105-20.
234. Tomita Y, Marchenko N, Erster S, Nemajerova A, Dehner A, Klein C, Pan H, Kessler H, Pancoska P, Moll UM. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem.* 2006;281(13):8600-6.
235. Tsuruo T, Fujita N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(6):189-98.
236. Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer Res.* 2009;69(10):4167-74.
237. Umansky V, Schirmacher V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. *Adv Cancer Res.* 2001;82:107-31.
238. Uno H, Arakawa T, Fukuda T, Yu H, Fujiwara Y, Higuchi K, Inoue M, Kobayashi K. Nitric oxide stimulates prostaglandin synthesis in cultured rabbit gastric cells. *Prostaglandins.* 1997;53(3):153-62.
239. Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat.* 2004;7(6):345-58.
240. 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(1):39-51.
241. 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(1):39-51.
242. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(7):489-501.
243. Vogt PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol Med.* 2001;7(11):482-4.

244. Wang D, Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene*. 2010;29(6):781-8.
245. Wang D, Lu S, Dong Z. Regulation of TGF-beta1 gene transcription in human prostate cancer cells by nitric oxide. *Prostate*. 2007;67:1825-33.
246. Wang H, MacNaughton WK. Overexpressed beta-catenin blocks nitric oxide-induced apoptosis in colonic cancer cells. *Cancer Res*. 2005;65:8604-7.
247. Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. *J Immunol*. 1995;154(9):4685-92.
248. Watson A, Collins P. Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis*. 2011;29(2):222-8.
249. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresch D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*. 2004;167(2):223-9.
250. Williams JL, Borgo S, Hasan I, Castillo E, Traganos F, Rigas B. Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) alter the kinetics of human colon cancer cell lines more effectively than traditional NSAIDs: implications for colon cancer chemoprevention. *Cancer Res*. 2001;61(8):3285-9.
251. Wink DA, Darbyshire JF, Nims RW, Saavedra JE, Ford PC. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol*. 1993;6(1):23-7.
252. Wolpin B, Mayer R. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310.
253. Wu AW, Gu J, Li ZF, Ji JF, Xu GW. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004;10(16):2323-6.
254. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 2004;134(3):489-92.
255. Yue ZQ, Liu YP, Ruan JS, Zhou L, Lu Y. Tumor-associated macrophages: a novel potential target for cancer treatment. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(18):3305-11.

256. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(3):228-37.
257. Zhang Y, Yuan J, Zhang HY, Simayi D, Li PD, Wang YH, Li F, Zhang WJ. Natural resistance to apoptosis correlates with resistance to chemotherapy in colorectal cancer cells. *Clin Exp Med.* 2012;12(2):97-103.

## **BIOGRAFIJA**

Marija Mojić rođena je 16. 10. 1984. godine u Beogradu. Studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Molekularna biologija i fiziologija, završila je 2008. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Diplomski rad pod naslovom: „Uticaj novosintetisanog donora azot monoksida GIT-27NO na rast A375 ćelijske linije humanog melanoma“ uradila je u Laboratoriji za imunologiju Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod mentorstvom dr Sanje Mijatović i odbranila ga 24. aprila 2008. godine sa ocenom 10. Iste godine započela je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru Molekularna biologija eukariota. Zvanje Istaživač saradnik stiče 2010. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za imunologiju Odeljenja za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod rukovodstvom dr Sanje Mijatović, a 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.

Marija Mojić je sedam meseci 2008. godine radila u Bazelu, Švajcarska, kao stipendista farmaceutske kuće “Novartis” i tri meseca 2009. godine u Tokiju, Japan, kao dobitnica stipendije Tokijskog Univerziteta.

Marija Mojić je do danas objavila 9 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima 9 saopštenja na međunarodnim i 6 na domaćim naučnim skupovima.