

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Sonja M. Stojković Burić

MODEL ĆELIJA C6 GLIOMA PACOVA KAO  
ORUĐE ZA PRONALAZENJE NOVIH  
TERAPEUTSKIH STRATEGIJA:  
KARAKTERIZACIJA REZISTENTNOG  
FENOTIPA *IN VITRO* I *IN VIVO*

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Sonja M. Stojković Burić

RAT C6 GLIOMA MODEL AS A TOOL FOR  
DISCOVERING NEW THERAPEUTIC  
STRATEGIES:  
CHARACTERIZATION OF THE RESISTANT  
PHENOTYPE *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

## **MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE**

### **MENTORI:**

Prof. dr Goradana Matić, redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Milica Pešić, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerziteta u Beogradu

### **ČLANOVI KOMISIJE:**

dr Ana Podolski-Renić, naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“,  
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

## ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, Odeljenja za neurobiologiju, na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu, u okviru projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj, kojim rukovodi dr Nikola Tanić.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Milici Pešić koja je kvalitetno osmislila ovu disertaciju i nesebično mi pružila pomoć u njenoj realizaciji, naročito prilikom rešavanja problema i diskutovanja dobijenih rezultata. Veliko hvala na strpljenju, stručnoj i moralnoj podršci i što mi je omogućila da steknem novo naučno iskustvo u Laboratoriji grupe za strukturnu mehaniku i modelovanje materijala, Univerziteta u Saragosi.

Prof. dr Gordani Matić se zahvaljujem na podršci tokom doktorskih studija, kontinuiranom interesovanju za moj naučni rad, pokroviteljskom odnosu i pomoći u oblikovanju disertacije.

Dr Saberi Ruždijić i dr Nikoli Taniću se zahvaljujem na pruženoj prilici za rad u nauci.

Dr Vesni Pešić i Željku Pavkoviću se zahvaljujem na pomoći u izvođenju bihejvioralnih eksperimenata, obučavanju za rad na animalnom modelu kao i analizi i diskusiji dobijenih rezultata.

Puno hvala dragim kolegicama Jasni, Tijani, Jeleni, Zoki i kolegi Mikiju što su uvek spremni da pruže profesionalnu i prijateljsku pomoć i podršku, kao i na divnom druženju na Institutu i van njega. Stefanu Hadžiću se zahvaljujem na pomoći u uspostavljanju animalnog modela i lepom prijateljstvu.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ani Podolski-Renić jer me je upravo ona upoznala sa metodologijom i načinom rada, koji su doprineli mom naučnom stasavanju i osamostaljivanju, kao i na prijateljskom pomaganju i druženju.

Posebnu i neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i Saši, bez čije ljubavi, razumevanja, bodrenja i pomoći nijedan moj uspeh ne bi bio moguć.

## SAŽETAK

Uspešnost terapije glioblastoma, najčešćeg i najagresivnijeg malignog tumora centralnog nervnog sistema, je osujećena usled visokog stepena invazivnosti, kao i pojave rezistencije na hemioterapiju. Cilj ove doktorske disertacije je bio da se uspostavi i okarakteriše rezistentni gliomski model koji bi imao primenu u ispitivanju novih terapijskih strategija u lečenju ove teške bolesti. Kao početni materijal korišćena je pacovska C6 ćelijska linija glioma, fenotipski slična humanim glioblastomima. Za uspostavljanje rezistencije korišćen je prvi odobreni antigliomski lek 1,3-bis(2-hloroetil)-1-nitrozoureom (BCNU, karmustin), alkilirajući agens koji se koristi u terapiji primarnih i rekurentnih glioblastoma. Kontinuirana primena BCNU je dovela do razvoja rezistencije C6 ćelija ne samo na ovaj hemioterapeutik, već i na druge DNK oštećujuće agense, cisplatin (CpT) i temozolomid (TMZ). Novouspostavljena rezistentna ćelijska linija je označena kao RC6. Ispitivanje mehanizama rezistencije je obuhvatilo analizu promena na nivou apoptotske mašinerije i oštećenja DNK lanaca, kao i analizu promena u antioksidativnom kapacitetu između C6 i RC6 ćelija. Rezistentna RC6 linija pokazuje smanjenu osetljivost na indukciju ćelijske smrti koja je praćena smanjenjem ekspresije antiapoptotskog faktora Bcl-2, proapoptotskog faktora Bad i efektorske kaspaze 3 na nivou iRNK i proteina. Takođe je pokazano smanjenje ekspresije iRNK antiapoptotskog Bcl-XI i proapoptotskog Bax-a. Razvoj rezistencije je doveo i do značajnog povećanja produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i smanjenja odnosa koncentracije oksidovanog i redukovanog glutationa. Zapaženo je povećanje ekspresije iRNK komponenti antioksidativnog sistema (MnSOD, iNOS, GPx i MRP1) i smanjenje ekspresije iRNK za HIF-1 $\alpha$  kod RC6 ćelija u odnosu na C6 ćelije.

RC6 ćelije pokazuju povećanu osetljivost na delovanje doksorubicina (DOX). Utvrđeno je da RC6 ćelije akumuliraju više DOX-a od C6 ćelija čemu doprinosi značajno smanjenje ekspresije iRNK za ABCB1 membranski transporter, kao i smanjenje unutarćelijskog pH.

Pored toga, RC6 ćelije proliferišu znatno sporije u odnosu na C6 ćelije što je karakteristično za rezistentne ćelije, ali i za ćelije sa većim invazivnim sposobnostima. Rezultati potvrđuju da invazivnosti RC6 ćelija doprinosi povišena ekspresija iRNK za metaloproteinazu MMP9.

Za uspostavljanje animalnog modela, fluorescentno obeležene C6 i RC6 ćelije su inokulisane u mozak Wistar pacova. Kolokalizacijom fluorescence poreklom od inokuliranih ćelija i fluorescentno obeleženog antitela za marker proliferacije Ki67 utvrđena je veća sposobnost invazije RC6 ćelija u moždani parenhim u odnosu na C6 ćelije. Pored toga, testovi motoričke aktivnosti ukazuju na izraženije poremećaje u habituaciji i adaptaciji na sredinu kod životinja sa inokuliranim RC6 ćelijama.

RC6 model je zatim korišćen za ispitivanje efikasnosti kombinovanog tretmana antioksidanta CoQ10 sa antigliomskim agensom TMZ-om. Pokazano je da CoQ10 ne samo da povećava osetljivost RC6 ćelija na TMZ, već kombinacija ova dva agensa efikasno inhibira migraciju i invaziju RC6 ćelija i RC6 sferoida. Kombinovani tretman takođe dovodi do pojave širih regiona nekroze u odnosu na pojedinačne tretmane u 3D sistemu mikrofluidnih čipova. Kombinovani tretman u RC6 animalnom modelu dovodi do inhibicije proliferacije i invazije gliomskih ćelija što predstavlja potvrdu rezultata dobijenih u *in vitro* sistemima.

Mehanizmi rezistencije prisutni kod novouspostavljene rezistentne pacovske ćelijske linije glioma – RC6 uključuju promenu u ravnoteži pro- i antiapoptotskih članova i smanjenu osetljivost na apoptozu, kao i povećanje antioksidativnog kapaciteta i adaptaciju na oksidativni stres. Povećani sadržaj ROS-a je izazvao acidifikaciju citoplazme koja je doprinela većoj akumulaciji DOX-a i povećanoj osetljivosti RC6 ćelija na ovaj agens. Povećani sadržaj ROS-a kod RC6 ćelija je presudno uticao na stvaranje fenotipa sa većim invazivnim potencijalom *in vitro* i *in vivo*. Imajući u vidu da su invazivnost i rezistencija na hemioterapiju glavni uzroci neuspešnog lečenja glioblastoma, dobijeni rezultati opravdavaju korišćenje RC6 modela za ispitivanje novih antigliomskih terapijskih strategija. Takođe, ova doktorska disertacija pruža dokaze u svojim *in vitro* i *in vivo* studijama o korisnosti upotrebe CoQ10 kao suplementa u terapiji glioblastoma.

**KLJUČNE REČI:** Glioblastom, hemiorezistencija, karmustin (BCNU), temozolomid (TMZ), kolateralna senzitivnost, invazivnost, antigliomska terapija, CoQ10

**NAUČNA OBLAST:** Molekularna onkologija

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Kancerogeneza

## ABSTRACT

The most common and aggressive malignant tumor of the central nervous system is glioblastoma which successful treatment is compromised due to its high invasiveness, and resistance to chemotherapy. This study aimed to establish and characterize resistant glioma model for testing new therapeutic strategies for treatment of this serious disease. Rat C6 glioma cell line, which is phenotypically similar to human glioblastoma, was chosen as starting material. The first approved antiglioma drug, 1,3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea (BCNU, carmustine), an alkylating agent for treatment of primary and recurrent glioblastoma was used for establishing the resistant phenotype. Continuous treatment with BCNU led to the development of resistance not only to this chemotherapeutic, but also to other DNA damaging agents, cisplatin (CpT) and temozolomide (TMZ). The newly established drug resistant cell line was labeled as RC6. Resistance mechanisms analysis addressed the changes in apoptotic machinery and DNA damage, as well as the changes in antioxidant capacity between C6 and RC6 cells. Resistant RC6 line showed reduced sensitivity to cell death induction which was accompanied by a significant decrease in mRNA and protein expression of antiapoptotic factor Bcl-2, proapoptotic factor Bad and effector caspase 3. The mRNA expression of antiapoptotic factor Bcl-Xl and proapoptotic factor Bax was also decreased. The development of resistance was accompanied by significantly increased reactive oxygen species (ROS) production and decreased oxidized to reduced glutathione ratio. mRNA expression of antioxidant system components (MnSOD, iNOS, GPx and MRP1) was significantly increased in RC6 compared to C6 cells, while HIF-1 $\alpha$  mRNA expression was decreased.

RC6 cells exhibited increased sensitivity to doxorubicin (DOX). It was determined that RC6 cells accumulated more DOX than C6 cells as a result of decreased mRNA expression of ABCB1 membrane transporter, as well as lower intracellular pH.

In addition, RC6 cells proliferated significantly slower compared to C6 cells which is characteristic for drug resistant cells and cells with greater invasive capacity. The results confirmed that increased mRNA expression of metalloprotease MMP9 contributed to RC6 cells invasiveness.

To establish the animal model, fluorescently labeled C6 and RC6 cells were inoculated in the brain of Wistar rats. Colocalization of fluorescence derived from inoculated cells and a

fluorescently labeled antibody for proliferation marker Ki67 showed a greater invasive capacity of RC6 cells into brain parenchyma, compared to C6 cells. In addition, motor activity tests indicated more pronounced disturbances in the habituation and environment adaptation in animals inoculated with the RC6 cells.

RC6 model was subsequently used to investigate the efficacy of combined treatment with the antioxidant CoQ10 and antiglioma agent TMZ. Treatment with CoQ10 not only increased the sensitivity of RC6 cells to TMZ, but the combination of the two agents also efficiently inhibited migration and invasion of RC6 cells and RC6 spheroids. Combined treatment resulted in wider necrotic areas close to lateral channels compared to single treatments in the 3D microfluidic chips. Combined treatment in the RC6 animal model inhibited proliferation and invasion of glioma cells and confirmed the results obtained in *in vitro* systems.

Resistance mechanisms present in the newly established resistant rat glioma cell line RC6 included altered balance of pro- and antiapoptotic members, reduced sensitivity to apoptosis, increased antioxidant capacity and adaptation to oxidative stress. Increased ROS content caused acidification of the cytoplasm which increased DOX accumulation and sensitivity of RC6 cells to this agent. Elevated ROS level in RC6 cells was crucial for development of a phenotype with higher invasive potential *in vitro* and *in vivo*. Considering that invasion and resistance to chemotherapy are the main causes of glioblastoma treatment failure, the obtained results support the use of RC6 model for investigating new anti-glioma approaches. In addition, this study provides *in vitro* and *in vivo* evidence for the benefit of CoQ10 as a supplement in glioblastoma treatment.

**KEY WORDS:** Glioblastoma, chemoresistance, carmustine (BCNU), temozolomide (TMZ), collateral sensitivity, invasiveness, antiglioma therapy, CoQ10

**SCIENTIFIC FIELD:** Molecular oncology

**SCIENTIFIC SUBFIELD:** Cancerogenesis



## LISTA SKRAĆENICA

ABC - engl. ATP binding cassette (ATP vezujući transporteri)  
ADP - adenzin difosfat  
Akt - familija serin/treonin specifičnih protein kinaza  
ANOVA - engl. analysis of variance  
Arf – engl. ADP ribosylation factors  
ATCC – engl. American Type Culture Collection  
ATP - adenzin trifosfat  
ATRX – engl. alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked  
AV - aneksin-V-FITC  
Bad - engl. Bcl-2-associated death promoter  
Bak - engl. Bcl-2 homologous antagonist/killer  
Bax - engl. Bcl-2-associated X protein  
BCECF,AM - 2',7'-bis-(2-karboksietil)-5-(i-6)-karboksifluorescein, acetoksimetil estar  
Bcl-2 - engl. B cell lymphoma-2 (familija proapoptotskih i antiapoptotskih proteina, koja reguliše propustljivost na spoljnoj membrani mitohondrija)  
Bcl-Xl - engl. B cell lymphoma-extra large  
BCNU - 1,3-bis(2-hloroetil)-1-nitrozourea, karmustin  
BCRP - engl. breast cancer resistance protein  
Bid – engl. BH3 interacting-domain death agonist  
Bik – engl. Bcl-2-interacting killer  
Bim - engl. Bcl-2-interacting mediator of cell death  
Blk – engl. BH3-containing mouse protein  
Bok – engl. Bcl-2-related ovarian killer protein  
BSA - engl. bovine serum albumin (albumin goveđeg seruma)  
CAM - kalcein acetoksimetil estar  
CDK - engl. cyclin-dependent kinase (ciklin zavisna kinaza)  
CDKN2A – engl. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A  
CFSE - karboksifluorescein sukcinimidil estar  
CI – kombinacioni indeks  
CI – engl. cell index (ćelijski indeks)  
c-Jun - pripada familiji transkripcionih faktora ranog odgovora (sa c-Fos formira AP-1)  
CNS – centralni nervni sistem  
CoQ – koenzim Q  
CPt – cisplatin  
CRP – C reaktivni protein  
CXCL12 – engl. C-X-C motif chemokine 12  
CXCR4 – engl. C-X-C chemokine receptor type 4  
dATP – dezoksiadenozin-trifosfat  
dCTP - dezoksicitidin-trifosfat  
dGTP - dezoksiguanozin-trifosfat  
dNTP - dezoksiribonukleotid-trifosfat  
dTTP - dezoksitimidin-trifosfat  
DDR – engl. DNA Damage Response  
DEPC - dietil pirokarbonat  
DHE – dihidroetidijum  
DHR - dihidrorodamin  
DMEM - Dulbeko modifikovani minimalni esencijalni medijum  
DMSO - dimetilsulfoksid  
DNK - deoksiribonukleinska kiselina  
DOX – doksorubicin  
DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina  
DTT - ditioneitol  
EDTA - etilendiamin tetraacetat  
EGF - engl. epidermal growth factor (epidermalni faktor rasta)  
EGFR – engl. epidermal growth factor receptor (receptor za epidermalni faktor rasta)  
EGTA – engl. ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
ELISA - engl. enzyme-linked immuno sorbent assay  
ERK - engl. extracellular signal-regulated protein kinases (kinaza regulisana vanćelijskim signalima)

FAK – engl. focal adhesion kinase (fokalna adhezijska kinaza)  
 FB – engl. Fast Blue  
 FBS - engl. fetal bovine serum (fetalni goveđi serum)  
 FDA – engl. Food and Drug Administration (Uprava za hranu i lekove)  
 FGF - engl. fibroblast growth factor (faktor rasta fibroblasta)  
 gapdh - glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza  
 G-CIMP - engl. glioma CpG island methylator phenotype  
 GPx - eng. glutathion peroxidase (glutathion peroksidaza)  
 GSH - redukovani glutathion  
 GSSG – oksidovani glutathion, glutathion disulfid  
 HIF-1 - eng. hipoxia-inducible factor 1 (hipoksijom indukovani faktor 1)  
 Hrk – engl. harakiri, Bcl-2 interacting protein  
 HRP – engl. horseradish peroxidase (peroksidaza rena)  
 IC<sub>50</sub> - inhibitorna koncentracija (50% inhibicije ćelijskog rasta u odnosu na kontrolu)  
 IDH – engl. isocitrate dehydrogenase (izocitratna dehidrogenaza)  
 IgG - imunoglobulin G  
 IL-2 – interleukin 2  
 iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina  
 kDNK - komplementarna DNK ( engl. cDNA)  
 LSD – engl. least significant difference  
 MAPK – engl. mitogen-activated protein kinase  
 Mcl1 – engl. induced myeloid leukemia cell differentiation protein  
 MDM2 – engl. mouse double minute 2 homolog  
 MDM4 – engl. mouse double minute 4 homolog  
 MDR - engl. multidrug resistance  
 MDR1 - engl. multidrug resistance protein 1  
 MGMT – engl. methylguanine-DNA methyltransferase (metilguanin DNK metiltransferaza)  
 M-MLV - engl. Moloney murine leukemia virus  
 MMP – engl. matrix metalloproteinase (matriksna metaloproteinaza)  
 MMR – engl. mismatch repair (sistem za opravku pogrešno sparenih baznih parova)  
 MNU – metil nitrozo urea  
 MRP1 - engl. multidrug resistance-associated protein 1  
 MTIC - engl. 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazole-4-carboxamide  
 mTOR - engl. mammalian target of rapamycin  
 NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
 NF1 – neurofibromin 1  
 NF-κB - nuklearni faktor κB  
 NHE1 – engl. sodium-hydrogen antiporter 1  
 NOS - eng. nitric oxide synthase (azot oksid sintetaza)  
 Noxa – engl. NADPH oxidase activator  
 Nrf2 – engl. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2  
 oligo-dT - oligo-deoksitimidin  
 PAGE – engl. Polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforeza u poliakrilamidnom gelu)  
 PBS - fosfatni pufer  
 PCR - engl. polymerase chain reaction (lančana reakcija polimeraze)  
 PDGFR – engl. platelet-derived growth factor receptor  
 PDK1 - engl. phosphoinositide dependent kinase-1  
 PFA - paraformaldehid  
 P-gp - P-glikoprotein  
 PI - propidijum jodid  
 PI3K – engl. phosphoinositide 3-kinase (fosfatidil inozitol 3-kinaza)  
 PI3KCA – engl. phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit alpha  
 PI3KRI - engl. phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit  
 PS – fosfatidil serin  
 PTEN - engl. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10  
 Puma – engl. p53 upregulated modulator of apoptosis  
 PVDF- engl. polyvinylidene fluoride

RB – retinoblastoma protein  
Rho 123 - rodamin 123  
RNK - ribonukleinska kiselina  
ROS - eng. reactive oxygen species  
(reaktivne kiseonične vrste)  
RT - reverzna transkripcija  
RTCA - engl. xCELLigence real-time cell  
analysis system  
SDS – natrijum dodecil sulfat  
SGZ – subgranularna zona  
Smac - second mitochondria-derived  
activator of caspases  
SOD - eng. superoxide dismutase  
(superoksid dismutaza)  
SRB – sulforodamin B  
SSA - sulfosalicilna kiselina  
SVZ – subventrikularna zona  
TB – engl. trypan blue (tripan plavo)  
TBE - Tris boratni EDTA puffer  
TBS-T - Tris-boratni pufer sa dodatkom  
Tween-20 deterdženta

TCGA - engl. The Cancer Genome Atlas  
(Atlas genoma kancera)  
TEMED - tetrametiletilendiamin  
TERT – engl. telomerase reverse  
transcriptase (telomerazna reverzna  
transkriptaza)  
TIMP – engl. tissue inhibitor of  
metalloproteinase (tkivni inhibitor  
metalloproteinaza)  
TMZ – temozolomid  
TNF $\alpha$  – engl. tumor necrosis factor  $\alpha$   
(faktor tumorske nekroze)  
TRAIL – engl. TNF-related apoptosis-  
inducing ligand  
uPA – engl. urokinase, urinary  
plasminogen activator (urokinazni  
aktivator plazminogena)  
VEGF - engl. vascular endothelial growth  
factor (vaskularni endotelijalni faktor  
rasta)  
WHO – engl. World Health Organization  
(Svetska zdravstvena organizacija)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. OSNOVNE ODLIKE TUMORA.....	1
1.1.1. PODELA TUMORA.....	3
1.2. TUMORI CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA .....	4
1.2.1. GLIOMI – PODELA I GENETIČKE ODLIKE .....	7
1.2.1.1. MOLEKULARNI MEHANIZMI NASTANKA I PROGRESIJE GLIOMA .....	9
1.2.1.2. INVAZIVNE ODLIKE GLIOMA .....	12
1.2.1.3. TERAPIJA VISOKOGRADUSNIH GLIOMA .....	13
1.3. MEHANIZMI REZISTENCIJE NA HEMIOTERAPIJU .....	16
1.3.1. KOLATERALNA SENZITIVNOST .....	21
1.4. C6 ANIMALNI MODEL GLIOMA.....	22
1.5. REAKTIVE KISEONIČNE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES .....	24
1.5.1. ANTIOKSIDATIVNI SISTEM .....	25
1.5.2. HIPOKSIJA.....	26
1.5.3. ADAPTACIJA NA POVEĆANI NIVO ROS-a U ĆELIJAMA.....	27
1.5.4. ANTIOKSIDANT KOENZIM Q10.....	29
<b>2. CILJEVI.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>	<b>33</b>
3.1. LEKOVI I AGENSI.....	33
3.2. HEMIKALIJE I REAGENSI.....	33
3.3. ĆELIJSKE LINIJE .....	34
3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA .....	34
3.5. SRB TEST VIJABILNOSTI.....	34
3.5.1. JEDNOKRATNI TRETMANI I ISTOVREMENE KOMBINACIJE .....	35
3.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM AGENASA.....	35
3.7. ANALIZA ĆELIJSKOG RASTA U REALNOM VREMENU .....	36
3.8. ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI.....	36
3.9. IZOLACIJA RNK IZ ĆELIJA I REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije .....	37
3.9.1. IZOLACIJA RNK .....	37
3.9.2. PROVERA KVALITETA RNK .....	38
3.9.3. REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije.....	38
3.10. ANALIZA EKSPRESIJE GENA RT-PCR METODOM.....	38

3.11. ANALIZA EKSPRESIJE GENA METODOM KVANTITATIVNOG RT-PCR U REALNOM VREMENU .....	40
3.12. IZOLACIJA PROTEINA IZ ĆELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA .....	40
3.12.1. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA .....	40
3.12.2. ELEKTROFOREZA PROTEINA .....	41
3.12.3. ELEKTROTRANSFER PROTEINA.....	42
3.12.4. IMUNOLOŠKA DETEKCIJA IMOBILIZOVANIH PROTEINA .....	42
3.12.5 SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOBLOTOVA.....	43
3.13. ANALIZA PRISUSTVA REAKTIVNIH KISEONIĀNIH VRSTA.....	43
3.14. AKUMULACIJA DOKSORUBICINA .....	44
3.15. KOLORIMETRIJSKA DETEKCIJA GLUTATIONA .....	44
3.16. MERENJE UNUTARĆELIJSKOG pH.....	45
3.17. FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA.....	46
3.18. DEGRADACIJA ŹELATINA .....	47
3.19. TEST INVAZIVNOSTI ĆELIJA.....	48
3.20. FORMIRANJE SFEROIDA I 3D TEST INVAZIVNOSTI.....	49
3.21. MODEL GLIOMA U MIKROFLUIDNIM ĀIPOVIMA .....	50
3.22. FLUORESCENTNO OBELEŹAVANJE ĀELIJA.....	52
3.23. EKSPERIMENTALNE ŹIVOTINJE .....	53
3.24. EKSPERIMENTALNI DIZAJN ANIMALNOG MODELA .....	53
3.24.1. INTRAKRANIJALNA INOKULACIJA C6 I RC6 ĀELIJA .....	53
3.24.2. TRETMANI ŹIVOTINJA SA INOKULISANIM RC6 ĀELIJAMA.....	54
3.25. FLUORESCENTNO OBELEŹAVANJE MOŹDANIH PRESEKA .....	55
3.26. MERENJE MOTORIĀKE AKTIVNOSTI ŹIVOTINJA .....	56
3.27. STATISTIĀKA ANALIZA REZULTATA.....	57
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>58</b>
4.1. USPOSTAVLJANJE REZISTENCIJE NA BCNU KOD C6 ĀELIJSKE LINIJE PACOVSKOG GLIOMA .....	58
4.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE PRISUTNI KOD RC6 ĀELIJSKE LINIJE.....	59
4.2.1. UTVRĐIVANJE PROFILA REZISTENCIJE KOD RC6 ĀELIJA .....	59
4.2.2. PROMENE KOJE SU DOVELE DO SMANJENE OSETLJIVOSTI NA APOPTOZU RC6 ĀELIJA .....	62
4.2.3. PROMENE U ANTIOKSIDATIVNOM KAPACITETU RC6 ĀELIJA.....	65
4.3. PROUĀAVANJE MEHANIZAMA KOLATERALNE SENZITIVNOSTI RC6 ĀELIJA NA DOKSORUBICIN.....	70

4.4. RAZLIKA U STOPI RASTA C6 I RC6 ĆELIJA.....	72
4.5. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA C6 I RC6 ĆELIJA I SFEROIDA <i>IN VITRO</i> .....	73
4.6. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA C6 I RC6 ĆELIJA <i>IN VIVO</i> – USPOSTAVLJANJE ANIMALNOG MODELA.....	76
4.7. MOTORIČKA AKTIVNOST I HABITUACIJA ŽIVOTINJA SA INOKULISANIM C6 I RC6 ĆELIJAMA .....	81
4.8. ANTIOKSIDANT CoQ10 POVEĆAVA OSETLJIVOST RC6 ĆELIJA NA ANTIGLIOMSKI LEK TMZ.....	84
4.8.1. EFEKAT NA ĆELIJSKI RAST.....	84
4.8.2. EFEKAT NA ĆELIJSKU SMRT .....	87
4.8.3 . EFEKAT NA INVAZIJU ĆELIJA I SFEROIDA .....	88
4.9. MEHANIZAM CoQ10 .....	92
4.10. EFEKAT CoQ10 NA EFIKASNOST TMZ TRETMANA U RC6 ANIMALNOM MODELU.....	93
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>95</b>
5.1. REZISTENTAN FENOTIP RC6 ĆELIJA.....	95
5.2. KOLATERALNA SENZITIVNOST NA DOX .....	98
5.3. INVAZIVNOST RC6 ĆELIJA .....	100
5.4. C6 I RC6 ĆELIJE U ANIMALNOM MODELU .....	101
5.5. ISPITIVANJE NOVE KOMBINOVANE TERAPEUTSKE STRATEGIJE U RC6 MODELU.....	104
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>108</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>110</b>

# 1. UVOD

## 1.1. OSNOVNE ODLIKE TUMORA

Tumor predstavlja oboljenje koje odlikuje gubitak kontrole nad ćelijskom deobom. Normalne ćelije poseduju veliki broj kompleksnih kontrolnih mehanizama koji vrše regulaciju svih faza ćelijskog ciklusa, dok ćelije tumora zbog nakupljanja genetičkih promena gube ove mehanizme i stiču sposobnost nekontrolisanog rasta i proliferacije (Hanahan i Weinberg, 2000). Na nastanak tumora, pored genetičke osnove, utiču i životna sredina, i loše životne navike.

Kancerogeneza je višestepeni proces nagomilavanja genetičkih promena i transformacije normalnih ćelija u maligne. Ovaj proces obuhvata tri faze: inicijaciju, promociju i progresiju. Prva faza, inicijacija, je najčešće rezultat ireverzibilnih genetičkih promena, kao što su transferzije, tranzicije i male delecije u DNK molekulu. U fazi promocije ne dolazi do promena u strukturi DNK već do izmena na nivou genske ekspresije. Dok fazu promocije odlikuje reverzibilnost u početnim stadijumima, progresija je ireverzibilna faza koju karakteriše genomska nestabilnost i maligni rast (Pitot, 1993). Tokom kancerogeneze dolazi do promena u sledećim grupama gena:

- 1) onkogeni koji promovišu ćelijski rast,
- 2) tumor supresorni geni koji inhibiraju ćelijsku proliferaciju,
- 3) geni koji održavaju stabilnost genoma.

U ovom procesu dati geni mogu pretrpeti različite promene od tačkastih mutacija do velikih hromozomskih delecija i rearanžmana, kao i epigenetičke promene.

U procesu transformacije tumorska ćelija stiče određene karakteristike (Hanahan i Weinberg, 2011):

- **Autonomna proliferacija** – Tumorske ćelije stiču sposobnost proliferacije koja ne zavisi od mitogenih signala, kroz autonomnu produkciju faktora rasta, stimulaciju okolnih normalnih ćelija da produkuju faktore rasta, promene u broju receptora, kao i putem konstitutivne aktivacije receptora i različitih nizvodnih komponentni istog signalnog puta.
- **Neosetljivost na signale koji zaustavljaju ćelijski rast i deobu** – Normalne ćelije poseduju mehanizme za sprečavanje rasta i deobe koji su regulisani tumor

supresornim proteinima. U tumorskim ćelijama ovi proteini su izmenjeni i nisu efikasni u obavljanju svoje funkcije. Normalne ćelije takođe poseduju i mehanizam kontaktne inhibicije, odnosno sprečavanja deobe ako su u kontaktu sa drugim ćelijama oko sebe, što nije slučaj sa tumorskim ćelijama.

- **Izbegavanje ćelijske smrti** – Programirana ćelijska smrt apoptozom predstavlja prirodnu prepreku formiranju tumora. Tumorske ćelije sprečavaju proces apoptoze promenom mehanizama koji prepoznaju oštećenja u ćelijama i promenom ekspresije proteina uključenih u sam proces apoptoze.
- **Neograničen replikativni potencijal** – Normalne ćelije mogu proći kroz ograničeni broj deoba usled skraćivanja DNK na krajevima hromozoma, telomerama. Nakon određenog broja deoba, normalne ćelije ulaze u fazu mirovanja (engl. senescence) ili podležu apoptozi. Zahvaljujući promenama u telomeraznoj aktivnosti, tumorske ćelije stiču sposobnost neograničene replikacije.
- **Angiogeneza** – Tumorske, kao i normalne ćelije, zahtevaju dopremanje kiseonika i hranjivih materija i uklanjanje produkata metabolizma, što postižu aktivacijom angiogeneze, procesa stvaranja novih iz postojeće mreže krvnih sudova. Proces tumorske angiogeneze se pokreće u ranim stadijumima kancerogeneze.
- **Aktivacija procesa invazije i metastaze** – Proces invazije i metastaze, odnosno rasejavanja tumorskih ćelija u okolno i udaljena tkiva, je podeljen u više koraka i naziva se invaziono-metastatska kaskada. Ovaj proces započinje lokalnom invazijom, nakon čega sledi ulazak tumorskih ćelija u okolne krvne i limfatične sudove (intravazacija), prolazak tumorskih ćelija kroz krvni i limfni sistem praćen izlaskom tumorskih ćelija iz lumena sudova u parenhim udaljenih tkiva (ekstravazacija). U ovim tkivima, tumorske ćelije prvo formiraju male izrasline (mikrometastaze), nakon čega daljom proliferacijom formiraju makroskopske tumore.
- **Reprogramiranje ćelijskog metabolizma** – Tumorske ćelije sa aerobnog disanja mogu preći na alterativni put metabolizma glukoze (anaerobna glikoliza) koji im omogućava opstanak u anaerobnim uslovima.
- **Izbegavanje imunskog odgovora** – Imunski sistem učestvuje u odbrani organizma od nastanka i progresije tumora. Tumorske ćelije su razvile mehanizme kojim sprečavaju prepoznavanje i uklanjanje od strane imunskog sistema.



Sticanje navedenih karakteristika je omogućeno procesima:

- **Genomske nestabilnosti** – Akumulacijom genetičkih promena stvara se veliki broj različitih genotipova sposobnih da prevaziđu različite sredinske pritiske u kojima se tumorske ćelije mogu naći.
- **Inflamacije** – Regioni neoplastičnih lezija su mesta hronične inflamacije. Inflamacija doprinosi dopremanju bioaktivnih molekula u tumorsku mikrosredinu (faktora rasta, proangiogenih faktora, enzima koji vrše modifikaciju vanćelijskog matriksa).

Navedene karakteristike ukazuju na to da tumori nisu izdvojene mase proliferišućih ćelija, već kompleksna tkiva koja se odlikuju heterogenim tipovima ćelija sposobnim da interaguju na različite načine jedne sa drugima. Osim međućelijskih interakcija, ćelije tumora stupaju u interakcije sa stromalnim i drugim ćelijama formirajući specifične uslove tumorske mikrosredine koji pospešuju proces maligne transformacije.

### 1.1.1. PODELA TUMORA

Osnovna podela tumora se vrši prema njihovom potencijalu da se šire u okolno i udaljena tkiva. Ukoliko nemaju invazivni potencijal tumori se kategorišu kao benigni. Ovi tumori su najčešće obavijeni kapsulom od fibroznog vezivnog tkiva, a karakteriše ih spori rast i dobra diferenciranost ćelija. Za razliku od benignih, maligni tumori imaju izražen invazivni potencijal i slabu diferenciranost ćelija.

Prema tipu ćelija iz kojih nastaju, tumori se mogu podeliti na sledeće kategorije (Institute, 2015):

- **Karcinomi** – tumori poreklom od epitelijalnih ćelija. Oni su najprisutniji u humanoj populaciji i dalje se dele na adenokarcinome, koji potiču od epitelijalnih ćelija čija funkcija podrazumeva proizvodnju tečnosti ili mukusa (najučestaliji su karcinomi dojke, prostate, pluća, grlića materice, pankreasa i debelog creva), karcinome bazalnih ćelija (nodularni i superficijalni bazocelularni karcinom), karcinome skvamoznih ćelija (karcinomi kože, grlića materice, vagine, želuca, creva, pluća) i karcinome tranzicionih ćelija (najčešće karcinomi bubrega, uretre i bešike).
- **Sarkomi** – tumori poreklom od vezivnog tkiva (kostiju i mekog tkiva). Ovde spadaju osteosarkom (poreklom od osteoblasta) koji predstavlja najčešći maligni tumor kostiju, liomiosarkom (poreklom od ćelija glatke muskulature), liposarkom (poreklom od adipocita) i fibrosarkom (poreklom od fibroblasta).

- **Leukemije, limfomi i mijelomi** – tumori poreklom od hematopoetskih ćelija kostne srži, koji nastaju od pokretnih (cirkulišućih) ćelija, dok sve ostale kategorije predstavljaju solidne tumore. Prema brzini progresije bolesti mogu se podeliti na akutne i hronične, a prema tipu ćelija od kojih potiču na limfoblastični i mijeloidni tip leukemije. Limfomi potiču od limfocita, a osnovna podela je na Hodžkinov i Ne-Hodžkinov limfom. Mijelomi nastaju od ćelija plazme, a najčešći tip su multipli mijelomi.
- **Tumori centralnog nervnog sistema** – nastaju od ćelija mozga i kičmene moždine. ili su iz drugih delova tela metastazirali u region mozga.
- **Ostali tipovi tumora** – melanomi (poreklom od melanocita), tumori germinativnih ćelija i neuroendokrini tumori (tumori hipofize, štitne žlezde, pluća, gastrointestinalnog trakta, perifernog nervnog sistema).

## 1.2. TUMORI CENTRALNOG NERVNOG SISTEMA

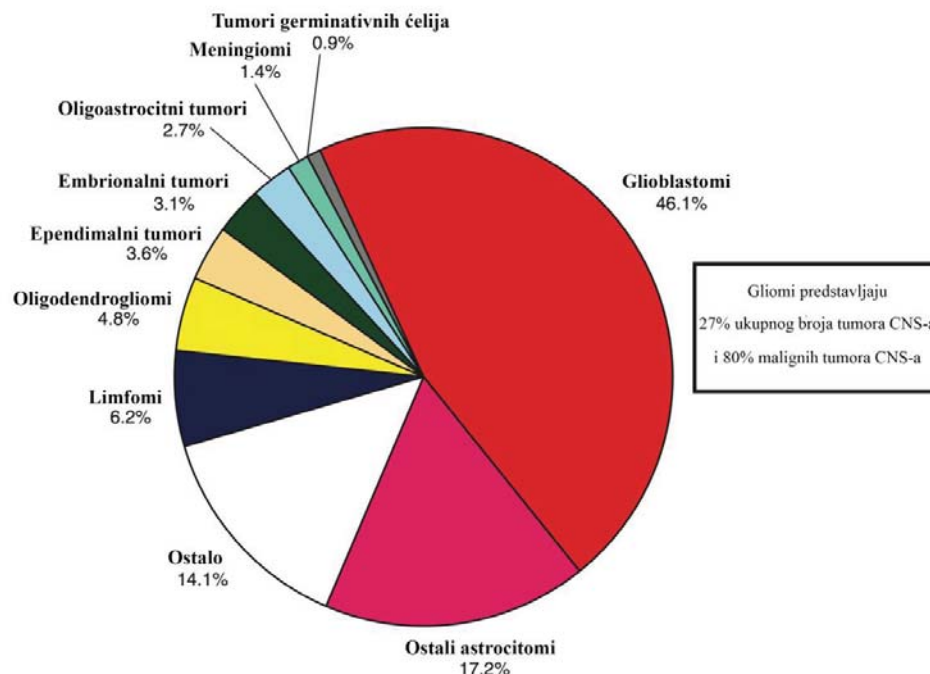
Postoji veliki broj tipova tumora koji nastaju u mozgu i ostalim delovima centralnog nervnog sistema, a mogu biti primarni i sekundarni (metastaze primarnih tumora iz drugih tkiva). Benigni tumori svojim rastom pritiskaju okolno tkivo, ali se ne šire u okolna tkiva, dok se maligni odlikuju brzim rastom i širenjem u druge delove moždanog tkiva. Bilo da tumor difuzno raste u tkivo oko sebe ili dovodi do njegovog pritiskanja, on time sprečava pravilno funkcionisanje tog dela mozga. Stoga oba tipa tumora prouzrokuju niz različitih neuroloških simptoma i zahtevaju lečenje.

Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (engl. World Health Organization, WHO) tumori centralnog nervnog sistema se dele na sledeće glavne kategorije koje imaju više potkategorija (Louis i saradnici, 2016):

- Difuzne astrocitome i oligodendroglijalne tumore
- Ostale astocitne tumore
- Ependimalne tumore
- Ostale gliome
- Tumore horoidnog pleksusa
- Neuronalne i mešane neuro-glijalne tumore
- Tumore pinealnog regiona

- Embriionalne tumore
- Tumore kranijalnih i perifernih nerava
- Meningealne tumore (tumore moždanih ovojnica)
- Mezenhimalne tumore
- Melanocistične tumore
- Limfome
- Histiocistične tumore
- Tumore embrionalnih ćelija
- Tumore područja turskog sedla
- Metastatske tumore

Prema statističkim podacima, svake godine se zabeleži 28,57 novih slučajeva obolelih od tumora centralnog nervnog sistema (benignih i malignih) na 100 000 ljudi. Ovaj podatak ukazuje na to tumori CNS-a nisu frekventna kategorija tumora. Međutim, predstavljaju najčešći tip tumora u mlađoj populaciji (0-19 godina) sa 5,57 slučajeva na 100 000 ljudi, kao i vodeći uzrok smrti od tumora u ovoj starosnoj grupi. Najčešći benigni tumor je meningiom (53,4% slučajeva), dok je najčešći maligni tumor CNS-a glioblastom (46,1% slučajeva). Na gliome otpada 27% ukupnih i 80% malignih tumora CNS-a (Slika 1), a glioblastomi su zastupljeni sa 55,1% od ukupnog broja glioma. Maligni tumori CNS-a se sa najvećom učestalošću javljaju u oblasti čeonog režnja (23,3%) zatim u oblasti slepoočnog (17,2%), temenog (10,8%) i potiljačnog (2,8%) režnja. Rizik od pojave glioblastoma raste sa starošću. Najučestaliji je između 74 i 85 godine života i češće se javlja kod muškaraca (Ostrom i saradnici, 2015).



**Slika 1. Zastupljenost malignih tumora CNS-a.** Distribucija je određena na osnovu uzorka veličine n=117 023. Glioblastomi (astrocitomi IV gradusa) su najbrojnija kategorija i čine skoro polovinu malignih tumora CNS-a. Preuzeto i modifikovano po (Ostrom i saradnici, 2015).

Prema morfološkim i histopatološkim karakteristikama Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je izvršila podelu tumora CNS-a na sledeće graduse:

**Gradus I (niskogradusni)** – ćelije tumora podsećaju izgledom na ćelije normalnog okolnog tkiva, imaju nizak proliferativni i invazivni potencijal, moguće je kompletno uklanjanje hiruškom operacijom.

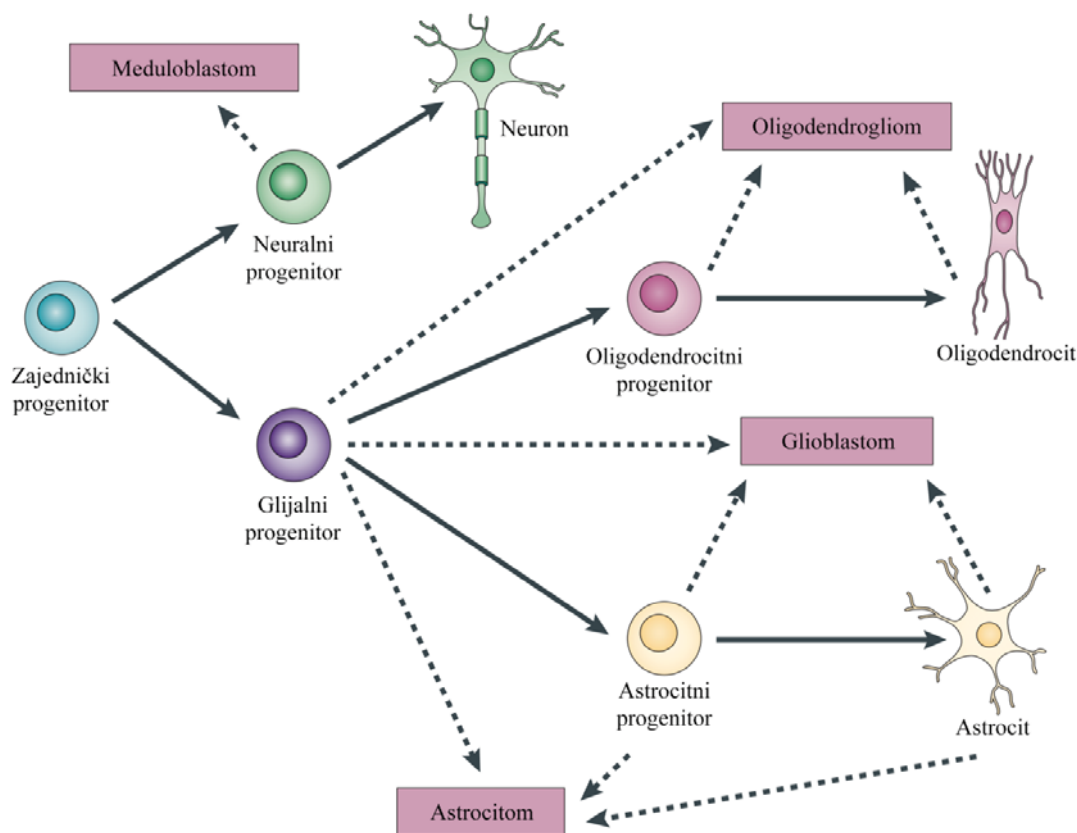
**Gradus II (niskogradusni)** – sporo proliferišuće ćelije, ali sa većim invazivnim potencijalom i mogućnošću progresije u više graduse.

**Gradus III (visokogradusni)** – slabije diferencirane ćelije sa većim proliferativnim i invazivnim potencijalom.

**Gradus IV (visokogradusni)** – slabo diferencirane ćelije, izraženi proliferativni i invazivni potencijal, pojava regiona nekroze i angiogeneza.

### 1.2.1. GLIOMI – PODELA I GENETIČKE ODLIKE

Gliomi predstavljaju veliku grupu neuroektodermalnih tumora koji vode poreklo od glijalnih ćelija ili njihovih manje diferenciranih prekursorskih ćelija i mogu biti grubo podeljeni u astrocitnu i oligodendroglialnu kategoriju (Slika 2).



**Slika 2. Poreklo tumora CNS-a.** Tumori CNS-a mogu nastati iz ćelijskih progenitora na različitim stupnjevima diferenciranosti, kao i iz krajnje diferenciranog ćelijskog stadijuma, astrocita i oligodendrocita. Glioblastom se tako može razviti iz glijalnog i astrocitnog progenitora, ali i iz astrocita. Preuzeto i modificovano po (Huse i Holland, 2010).

**Pilocistični astrocitom** je primer neinvazivnih, lokalizovanih glioma WHO gradusa I. Anaplastična progresija ovih tumora je redak slučaj i zapažena je u manje od 1% slučajeva. Pilocistični astrocitomi se uspešno leče hiruškom resekcijom i ne zahtevaju postoperativnu primenu radio- i hemioterapije (Tomlinson i saradnici, 1994). U gliome WHO gradusa II spadaju **difuzni astrocitom** i **oligodendrogliom**. Iako histološki pripadaju niskogradusnim gliomima, ovi tumori skoro uvek prelaze u više graduse tokom vremena (4-6 godina nakon primarne dijagnoze). Učestale genetičke promene difuznog astrocitoma su mutacije u tumor-supresorskom genu *TP53*, delecije *ATRX* i amplifikacija gena *PDGFR $\alpha$*  i *PDGFR $\beta$*  (Louis, 2006). Kod oligodendroglioma najčešće dolazi do kodelecije 1p i 19q kraka što predstavlja

pozitivan prognostički faktor, kao i inaktivacije tumor-supresorskog *PTEN* gena (Louis, 2006). U oba tipa tumora je česta mutacija gena *IDH1/2* (Watanabe i saradnici, 2009). Osnovu terapije čini maksimalna hiruška resekcija i tretman radio- i hemioterapijom po proceni lekara.

**Anaplastični astrocitomi** i **anaplastični oligodendrogliomi** spadaju u gliome WHO gradusa III i njih karakteriše dalje nakupljanje genetičkih promena, najčešće gubitak tumor-supresorskog *RB1* gena i homozigotna delecija *CDKN2A* genskog lokusa, koji kodira proteine p16 (Ink4a) i Afr (Ueki i saradnici, 1996). **Glioblastomi** su gliomi WHO gradusa IV. Najčešće genomske promene glioblastoma su mutacije u promotoru gena *TERT*, mutacija *TP53*, mutacija *ATRX*, amplifikacija *EGFR*, mutacija *PTEN* i mutacije gena *IDH1/2* (Aldape i saradnici, 2015).

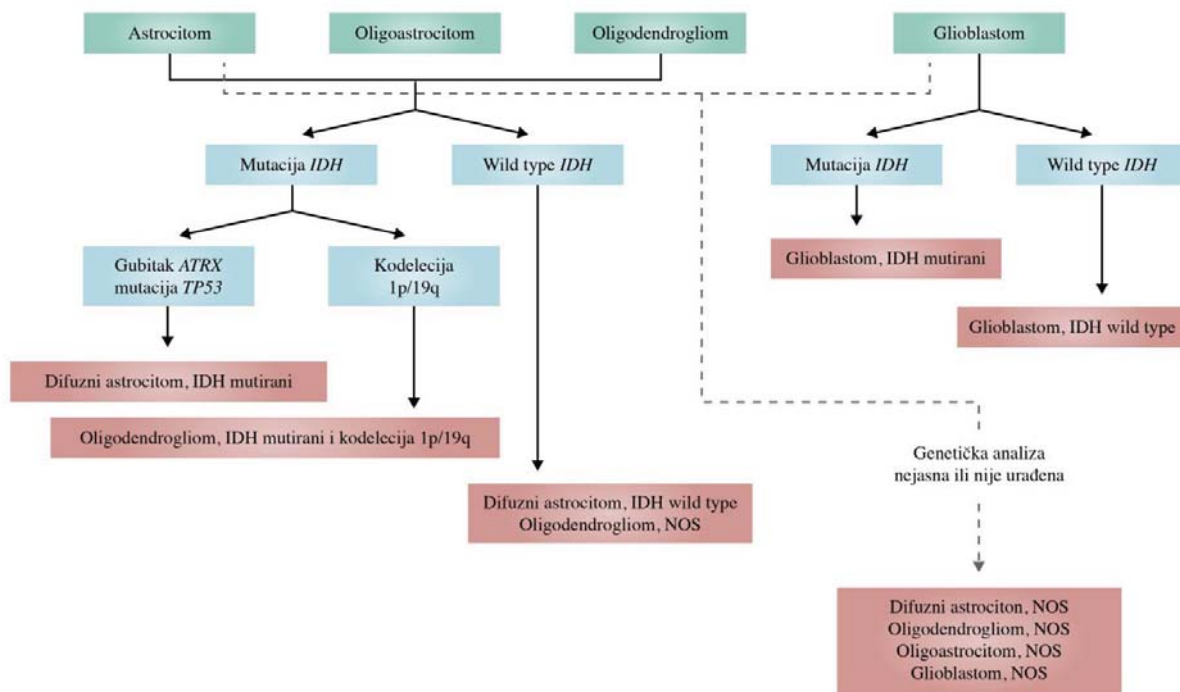
Imajući u vidu kompleksne genetičke promene koje su pored histoloških karakteristika specifične za svaki tip tumora, Svetska zdravstvena organizacija (WHO) je ažurirala klasifikaciju tumora CNS-a na osnovu integrisanih fenotipskih i genotipskih parametara.

Glioblastomi se po novoj klasifikaciji dele na:

1) glioblastom, IDH-„wild type“ (90% slučajeva) koji odgovara prethodno klasifikovanom primarnom ili *de novo* tipu glioblastoma i javlja se kod starijih pacijenata (preko 55 godina starosti) i

2) glioblastom, IDH-mutirani (oko 10% slučajeva), odgovara po staroj klasifikaciji sekundarnim glioblastomima koji nastaju progresijom iz nižih gradusa i predominantno se javlja kod mlađih pacijenata (oko 45 godina starosti) (Slika 3) (Louis i saradnici, 2016).

Gen *IDH1* kodira enzim izocitratnu dehidrogenazu 1, koja vrši prevođenje izocitrata u  $\alpha$ -ketoglutarat u Krepsovom ciklusu. Mutacije ovog enzima dovode do smanjenja njegove aktivnosti i produkcije 2-hidroksiglutarata što povećava nivo HIF-1 $\alpha$ . Ova mutacija je u sprezi sa hipermetilacijom CpG ostrvaca kod IDH-mutiranih glioblastoma i definiše se kao metilator fenotip (engl. glioma CpG island methylator phenotype, G-CIMP), a koreliše sa boljom kliničkom prognozom (Aldape i saradnici, 2015). Uvođenje molekularnih parametara u WHO klasifikaciju ima za cilj da ovakvim integrativnim definisanjem tumora omogući precizniju klasifikaciju u kliničkim i eksperimentalnim studijama, kao i personalizovanu terapiju pacijenata.



**Slika 3. Shema WHO klasifikacije difuznih glioma.** Integrativna dijagnoza uzima u obzir histološke i molekularno genetičke odlike tumora, s tim što molekularne odlike često imaju primat nad histološkim u ovom tipu klasifikacije. Ako se u procesu analize isključe glavni molekularni markeri koji karakterišu dati podtip tumora, moguće je taj podtip svrstati u kategoriju nedovoljno okarakterisanih glioma - NOS (engl. not otherwise specified). Modifikovano po (Louis i saradnici, 2016).

#### 1.2.1.1. MOLEKULARNI MEHANIZMI NASTANKA I PROGRESIJE GLIOMA

Projekat američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) - Atlas genoma kancera (engl. The Cancer Genome Atlas, TCGA), je završio opsežnu studiju molekularne karakterizacije difuznih glioma na osnovu kombinovanih analiza sekvenciranja i ekspresionih profila velikog broja gena iz uzoraka pacijenata. Rezultati ovog projekta i sličnih manjih studija su ukazali na specifične molekularne markere i signalne puteve odgovorne za nastanak i progresiju glioma (Network, 2008).

Mutacije u tumor supresornom genu *TP53* su još pre 20 godina povezane sa procesom geneze glioma, usled povećane učestalosti pojave glioma (naročito astrocitoma) kod pacijenata sa Li-Fraumeni sindromom, retkim genetičkim oboljenjem prouzrokovanim mutacijama u *TP53* (Srivastava i saradnici, 1990). Protein p53 je transkripcioni regulator koji u odgovoru na različite stresne stimulse (DNK oštećenja, onkogene mutacije) vrši zaustavljanje ćelijskog ciklusa i inicira procese popravke DNK ili apoptozu. Mutacije ovog

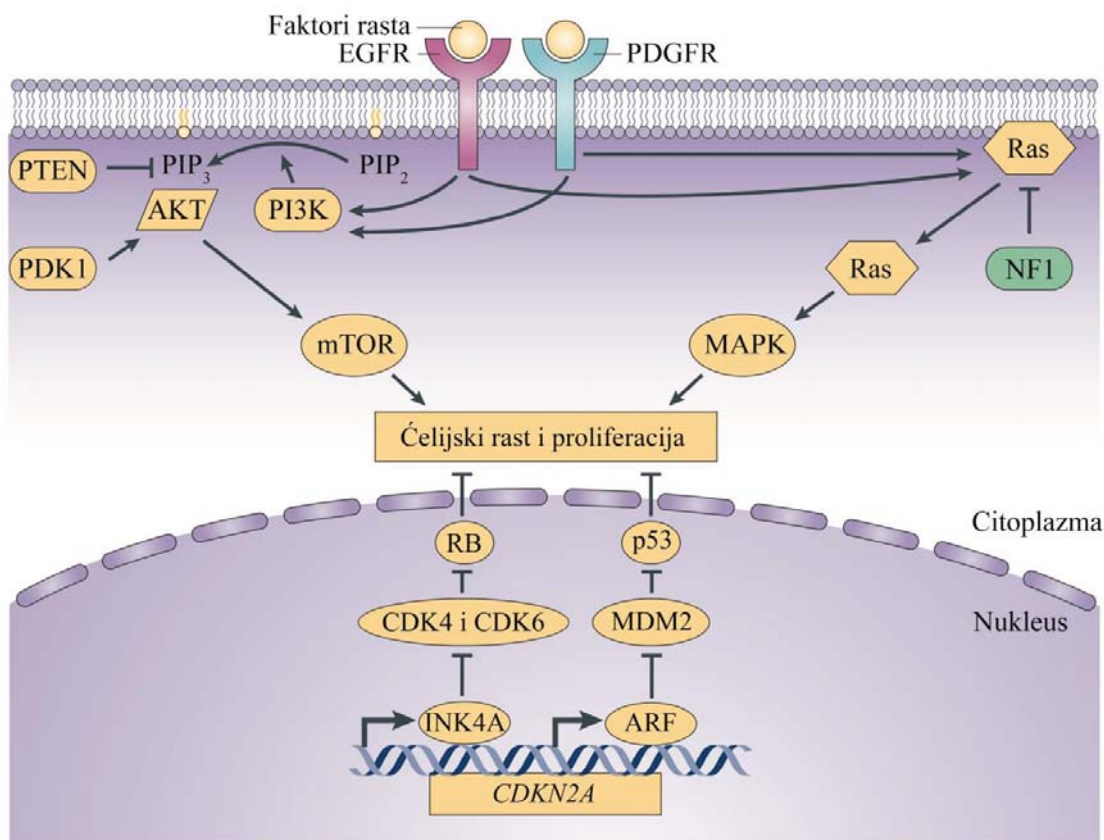
gena su česta pojava kod niskogradusnih astrocitoma i sekundarnih (IDH-mutiranih) glioblastoma. Inaktivacija *TP53* se najčešće dešava usled tačkastih mutacija u genu i delecija 17p regiona u kom se nalazi ovaj gen (Ohgaki i saradnici, 2004). Mutacije *TP53* su primećene u 81% IDH-mutiranih i 27% IDH-„wild type“ glioblastoma. Pored ovih mutacija dolazi i do delecije *CDKN2A* genskog lokusa (kodira Ink4a (p16) i Arf proteine koji su pozitivni regulatori p53 i Rb proteina), što je pre odlika IDH-„wild type“ (40%) nego IDH-mutiranih glioblastoma (4%), kao i do amplifikacije *MDM2* i *MDM4* (kodiraju proteine tzv. negativne regulatore p53 proteina) (Ueki i saradnici, 1996).

Važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa pored p53 ima i Rb (retinoblastoma) protein. U ćelijama koje se ne dele, Rb protein je hipofosforilisan i vezuje za sebe E2F transkripcioni faktor. U odgovoru na proliferativne signale, Rb protein biva delimično fosforilisan od strane ciklin zavisne kinaze 4 i 6 (CDK4 i 6) ili kompletno fosforilisan delovanjem CDK2. Fosforilisani Rb protein oslobađa E2F transkripcioni faktor koji dalje reguliše ekspresiju seta gena odgovornih za G1/S tranziciju i inicijaciju sinteze DNK. Izmenjena aktivacija Rb signalnog puta je karakteristika astrocitoma viših gradusa i javlja se u 78% glioblastoma. Inaktivacija gena *RBI* je posledica mutacija u genu, gubitka 13q kraka i metilacije promotora. Pored ovih promena javljaju se i amplifikacije *CDK4* i *CDK6* (Zhu i Parada, 2002).

Povećana aktivacija onkogenih signalnih puteva koji uključuju receptor-zavisne tirozin kinaze je često prisutna kod malignih glioma. Povećana ekspresija *EGFR*-a je karakteristična za 60% IDH-„wild type“ i samo 10% IDH-mutiranih glioblastoma. Najčešće dolazi do amplifikacije gena kao i do delecija koje dovode do ekspresije konstitutivno aktivne varijante EGFR vIII. Kod manjeg broja pacijenata javlja se amplifikacija gena *PDGFRA* (14%) i *MET* (4%) (Frederick i saradnici, 2000). Promene u komponentama PI3K-Akt-mTOR i Ras-MAPK signalnih puteva su takođe odlika ovih tumora. Mutacije u genu koji kodira katalitički (PI3KCA) ili regulatorni (PI3KRI) domen PI3K i dovodi do njegove aktivacije je primećen u 15% slučajeva glioblastoma (McBride i saradnici, 2010). Gubitak PTEN-a, glavnog negativnog regulatora PI3K signalnog puta, usled delecija ili epigenetičkih promena je primećen u 30% IDH-„wild type“ i samo 4% IDH-mutiranih glioblastoma (Wiencke i saradnici, 2007). Mutacije u genu koji predstavlja negativni regulator Ras proteina, *NF1* (neurofibrominu 1) dovode do aktivacije Ras signalnog puta i javljaju se kod neurofibroma i astrocitoma, a primećene su kod 15-18% IDH-„wild type“ glioblastoma (Network, 2008).



Aktivacija oba signalna puta pozitivno reguliše ćelijski rast, proliferaciju i preživljavanje i podstiče razvoj glioma (Slika 4).



**Slika 4. Shematski prikaz signalnih puteva i molekula uključenih u patogenezu glioma.** Izmene u ekspresiji i aktivaciji receptora tirozin kinaza, EGFR i PDGFR, kao i nizvodnih članova signalnih puteva PI3K-AKT-mTOR i Ras-MAPK su karakteristika glioma. Defekti u signalnim putevima u čiju regulaciju su uključeni p53 i Rb tumor supresori su takođe česta pojava u procesu nastanka i progresije glioma. Preuzeto i modifikovano po (Huse i Holland, 2010).

Telomerazna reverzna transkriptaza (TERT) je katalitička subjedinica telomeraznog kompleksa koji reguliše dužinu DNK na krajevima hromozoma i njena aktivnost ima ulogu u kancerogenezi. Pokazano je da u 70-80% slučajeva IDH-, „wild type“ glioblastoma dolazi do mutacija u promotoru *TERT*-a, dok su znatno ređe kod IDH-mutiranih glioblastoma.

Jedan od klinički najznačajnijih markera je svakako metilacioni status *MGMT* promotora. Hipermetilacija *MGMT* služi kao prediktivni marker za uspešnost terapije alkilirajućim agensima i često se poklapa sa hipermetilacijom CpG ostrvaca, G-CIMP (Aldape i saradnici, 2015).

Sve navedene genetičke promene ukazuju na kompleksnu prirodu nastanka i veliku tumorsku heterogenost glioma koja predstavlja prepreku u dijagnozi i terapiji pacijenata. Dalja ispitivanja postojećih promena i identifikacija novih gena uključenih u patogenezu glioma bi u velikoj meri unapredila poznavanje mehanizama koji leže u osnovi inicijacije, promocije i progresije glioma, a time i uspešnost njihovog lečenja.

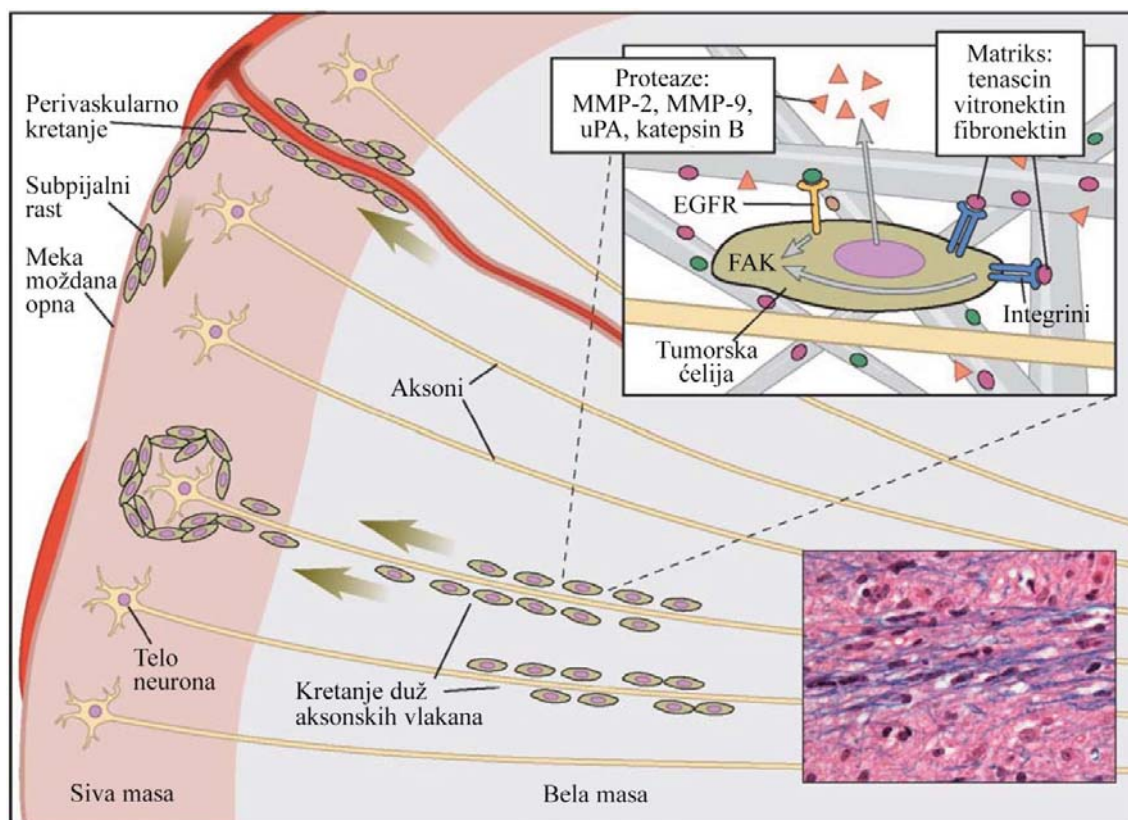
### 1.2.1.2. INVAZIVNE ODLIKE GLIOMA

Infiltracija u moždani parenhim je karakteristika kako niskogradusnih, tako i visokogradusnih glioma. U vreme hirurške intervencije izvestan broj ćelija je već naselio okolno tkivo i zato se preko 90% recidiva javlja u neposrednoj blizini prethodno uklonjenog tumora. Invazija gliomskih ćelija je složen proces koji zavisi od međusobnih interakcija gliomskih ćelija, kao i njihove komunikacije sa vanćelijskim matriksom, pri čemu dolazi do proteolitičke degradacije vanćelijskog matriksa i aktivnog kretanja ćelija.

Najčešći put invazije gliomskih ćelija je duž aksonskih vlakana bele mase i bazalne membrane krvnih sudova, dok se proliferacija odvija oko tela neurona u sivoj masi i u prostoru ispod meke moždane opne (subpialno) (Bernstein i Woodard, 1995). Proces invazije i migracije se drugačije odvija kod glioma u odnosu na druge tumore za koje je karakteristična diseminacija krvnim i limfnim sistemom. Gliomske ćelije nemaju sposobnost da prodru kroz bazalnu membranu krvnih sudova usled čega su metastaze glioma u udaljenija tkiva zabeležene kao sporadični slučajevi (Hamilton i saradnici, 2014).

Različiti geni i njihovi proteinski produkti su u uključeni u proces invazije glioma uključujući članove familije matriksnih metaloproteinaza (MMP) i njihovih inhibitora (TIMP). Pokazano je da nivo ekspresije MMP-2 i MMP-9 koreliše sa stepenom invazivnosti i proliferacije ćelija glioma i predstavlja negativni prognostički marker (Wang i saradnici, 2003). Ekspresija urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA), njegovog receptora, kao i cisteinske proteaze katepsin B raste sa gradusom glioma i utiče na povećanje invazivnog potencijala (Rao, 2003). Većina difuznih glioma eksprimira niz integrinskih receptora preko kojih vrši interakciju sa komponentama vanćelijskog matriksa. Integrinski receptori najčešće povezivani sa invazijom glioma su  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  i  $\alpha v\beta 1$ , a oni interaguju sa tenascinom, fibronektinom, lamininom i vitronektinom u vanćelijskom matriksu (Slika 5) (Uhm i saradnici, 1999). Aktivacija integrina dovodi do promene u organizaciji citoskeleta i promoviše kretanje tumorskih ćelija. Prekomerna aktivacija fokalne adhezije kinaze (FAK) (Natarajan i saradnici, 2003) i ekspresija mnogih faktora rasta (FGF, EGF, VEGF) pozitivno

utiče na proces invazije i migracije. Istraživanja su pokazala da se ćelije glioma sa amplifikovanim *EGFR*-om često nalaze u zoni invazije, dok *EGFR* vIII varijanta indukuje povećanu ekspresiju metaloproteinaza (u prvom redu *MMP-1* i *MMP-13*) i kolagenaza (Lal i saradnici, 2002). Pojava invazivnog fenotipa je povezana i sa kodelecijom 1p i 19q, jer kod oligodendroglioma sa ovom genetičkom promenom češće dolazi do pojave bilateralnih tumora (u obe moždane hemisfere) (Megyesi i saradnici, 2004).



**Slika 5. Proces invazije gliomskih ćelija.** Maligne ćelije glioma se kreću duž aksonskih vlakana i bazalnih membrana krvnih sudova u mozgu i u tom procesu aktiviraju signalne puteve koji im omogućavaju kretanje, vrše sekreciju niza proteaza i interaguju sa komponentama vanćelijskog matriksa. U donjem desnom uglu je prikazan histopatološki nalaz mozga (Luxol fast blue i hematoksilin/eozin bojenje) na kom se vide individualni, izduženi, hiperhromatični nukleusi ćelija glioma uz mijelinska vlakna aksona. Preuzeto i modifikovano po (Louis, 2006).

### 1.2.1.3. TERAPIJA VISOKOGRADUSNIH GLIOMA

Trenutni standard u terapiji visokogradusnih glioma (u prvom redu glioblastoma), uključuje, ukoliko je to moguće izvesti bez oštećenja vitalnih funkcija mozga, potpuno hiruško odstranjivanje (oko 98%), praćeno istovremenom primenom zračenja i hemioterapeutika temozolomida, nakon čega se nastavlja samostalna terapija temozolomidom

(tzv. Stupov protokol) (Stupp i saradnici, 2009). Međutim, pored ovako radikalnog lečenja, preživljavanje pacijenata obolelih od glioblastoma je u proseku 12 do 14 meseci nakon prvobitne dijagnoze. Kod skoro svih pacijenata dolazi do pojave recidiva, a 90% recidiva se javlja na mestu primarnog tumora (Wen i Kesari, 2008). Veoma agresivna priroda glioblastoma onemogućava njegovo kompletno uklanjanje, veliki regioni su zahvaćeni hipoksijom, prisutna je abnormalna vaskularizacija i pojava hemiorezistencije na terapiju.

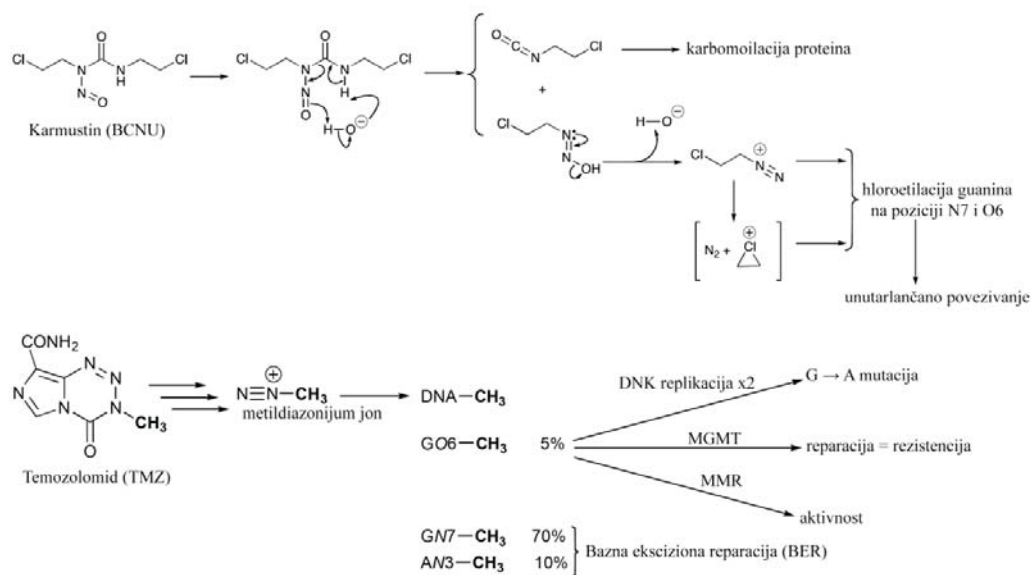
Jedina dva FDA (engl. U.S. Food and Drug Administration) odobrena hemioterapeutika za lečenje glioblastoma (do sad) su 1,3-bis(2-hloroetil)-1-nitrozourea (BCNU, karmustin) i temozolomid (TMZ).

BCNU ili karmustin je odobren za tretman različitih tipova moždanih maligniteta (glioblastoma, astrocitoma, meduloblastoma), multiplih mijeloma i limfoma (Hočkinov i Ne-Hočkinov). Zbog svog lipofilnog karaktera, karmustin prolazi kroz krvno-moždanu barijeru. U normalnim fiziološkim ulovima dolazi do njegove hidrolize i oslobađanja hloroetildiazonijum jona i izocijanata (Bota i saradnici, 2007). Reakcija izocijanata sa biološkim molekulima nema značajniji farmakološki efekat, dok hloroetildiazonijum jon vrši alkilaciju DNK i formira N1,O6 etanoguanin. Ovaj adukt dovodi do unakrsnog povezivanja i prekida DNK lanaca.

Alkilirajuća aktivnost karmustina uzrokuje i sporedne neželjene pojave kao što su pneumonitis i supresija funkcije koštane srži. Period poluraspada je između 15 i 30 min nakon intravenske aplikacije, a usled kompromitovane tumorske vaskulature dopire jako plitko u moždano tkivo (oko 2 mm od površine endima). Da bi se izbegle navedene neželjene pojave, razvijen je Gliadel®, biorazgradivi nosač karmustina koji se implantira na mesto hiruške resekcije tumora, a pre tretmana radijacijom. Gliadel® nosači ispuštaju visoku koncentraciju karmustina lokalno u tkivo u čijoj se neposrednoj blizini nalazio tumor, oslobađaju hemioterapeutik nekoliko nedelja i pokazuju minimalnu sistemsku toksičnost, zbog čega su odobreni za terapiju kako primarnih glioma tako i recidiva (Lin i Kleinberg, 2008). U toku je više malih studija koje ispituju delovanje kombinacije Gliadel® nosača sa karmustinom i radijacije sa primenom temozolomida postoperativno. Uskoro bi trebalo da otpočne faza III kliničkih ispitivanja, ali dosadašnji rezultati ne ukazuju na značajno produženje preživljavanja kod ovih pacijenata (Ashby i saradnici, 2016).

TMZ je mali lipofilni molekul, stabilan u kiseloj sredini usled čega je pogodan za oralnu primenu. Nakon unošenja u organizam dolazi do hidrolitičkog otvaranja prstena

molekula i formiranja aktivnog intermedijera MTIC (engl. 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide) iz kojeg nastaje metildiazonijum jon sposoban da vrši metilaciju DNK. Najveći procenat metilacije metildiazonijum obavlja na N7 poziciji guanina (70%), 10% na N3 poziciji adenina i samo 5% na O6 poziciji guanina preko koga ostvaruje najznačajnije citotoksično dejstvo. O6-metilguanin se sparuje sa timinom umesto sa citozinom u procesu replikacije, što za posledicu ima aktivaciju sistema za popravku DNK, zaustavljanje ćelijskog ciklusa i apoptozu (Slika 6) (Ramirez i saradnici, 2013).



**Slika 6. Mehanizam delovanja karmustina (BCNU) i temozolomida (TMZ).** Transformacije BCNU i TMZ do molekula koji vrše alkilaciju DNK. Preuzeto i modifikovano po (Ramirez i saradnici, 2013).

Popravku O6-alkilguanin adukta vrši protein MGMT (engl. O6-methylguanine-DNA methyltransferase) i to u jednom koraku, nezavisno od drugih proteina ili kofaktora. MGMT je mali protein, prisutan primarno u citoplazmi, dok nakon DNK alkilacije dolazi do njegove translokacije u nukleus. O6-alkil grupa se prebacuje sa guanina na aktivno mesto MGMT u stohiometrijskoj reakciji koja dovodi do inaktivacije MGMT proteina (Zhang i saradnici, 2012). Prisustvo MGMT obrnuto proporcionalno koreliše sa osetljivošću gliomskih ćelija na aliklirajuće agense, karmustin i TMZ (Hermisson i saradnici, 2006). Stoga, DNK popravka od strane MGMT je jedan od primarnih mehanizama rezistencije na anti-gliomske hemioterapeutike.

Sistem za popravku pogrešno sparenih baznih parova (engl. mismatch repair, MMR) prepoznaje pogrešno spareni O6-alkilguanin sa timinom (umesto sa citozinom) i iseca ga. Zbog velike učestalosti ovog tipa oštećenja, dolazi do prekida DNK lanaca i aktivacije apoptoze (Zhang i saradnici, 2012). Čelije karcinoma debelog creva koje imaju deficit u MMR sistemu pokazuju rezistenciju na TMZ. U takvim ćelijama ne dolazi do popravke DNK, O6-alkilguanin lezije se tolerišu, ćelijska deoba se odvija nesmetano, a to dovodi do nakupljanja novih mutacija (Karran, 2001). Studije su pokazale da doze TMZ-a koje se koriste u klinici mogu dovesti do pojave autofagije bez pokretanja apoptoze. Dodavanje inhibitora autofagije (bafilomicin A) aktivira kaspazu 3 i proces apoptoze (Kanzawa i saradnici, 2004), što ukazuje na to da se ćelije glioma štite autofagijom od dejstva TMZ-a. Tako, autofagija predstavlja još jedan od bitnih mehanizama rezistencije na anti-gliomske hemioterapeutike.

### **1.3. MEHANIZMI REZISTENCIJE NA HEMIOTERAPIJU**

Problem rezistencije na hemioterapiju je davno uočen. U kliničkoj praksi je poznato da neki tumori već na samom početku terapije ne reaguju tj. nisu osetljivi na terapiju. Takvi tumori su urođeno rezistentni. Suprotno tome, neki tumori inicijalno pokazuju odličan terapijski odgovor, ali postaju rezistentni tokom vremena. Kod takvih tumora se radi o stečenoj rezistenciji. Rezistencija može biti ograničena samo na agens koji se koristi u terapiji (pojedinačna rezistencija) ili se može razviti tzv. višestruka rezistencija (engl. multidrug resistance, MDR) na više strukturno i funkcionalno nesrodnih agenasa (Gottesman, 2002). U suštini, postoji veliko preklapanje između mehanizama koji su odgovorni za razvitak, održavanje i evoluciju maligno transformisanih ćelija i mehanizama odgovornih za rezistenciju na hemioterapiju.

Fenomen rezistencije na hemioterapiju predstavlja veliki problem kada efikasne doze hemioterapeutika postanu toliko visoke da ih je nemoguće koristiti u kliničkom lečenju a da ne dođe do pojave ozbiljnih neželjenih efekata kod pacijenata. Kako veliki broj agenasa ima nizak terapijski indeks (nepovoljan odnos koncentracije koja daje adekvatan terapijski odgovor i koncentracije koja ima toksični efekat na pacijenta), nesvrishodno je povećavati dozu nakon kliničke pojave rezistencije. Mehanizmi odgovorni za neuspeh terapije mogu se klasifikovati u dve kategorije, kao farmakološki i ćelijski mehanizmi.

Farmakološki mehanizmi rezistencije obuhvataju:

- neadekvatno dopremanje agenasa
- slabu metaboličku aktivaciju u slučaju upotrebe proleka
- nepovoljnu farmakokinetiku agenasa u krvnoj plazmi, odnosno način na koji se vrši njihovo metabolisanje i ekskrecija
- nepovoljne uslove tumorske mikrosredine, odnosno pojavu vaskularizacije i hipoksije
- ograničen pristup agenasa određenim strukturama usled arhitekture tkiva, npr. postojanje krvno-moždane barijere.

Pored farmakoloških postoji veliki broj mehanizama rezistencije na nivou same tumorske ćelije koji se mogu aktivirati jedan za drugim ili zajedno u toku uspostavljanja rezistentnog fenotipa (Lage, 2008).

Jedan od glavnih ćelijskih mehanizama rezistencije je smanjena akumulacija hemioterapeutika u ćelijama koja može biti posledica smanjenog unosa u ćeliju i povećanog izbacivanja leka iz ćelije. Obzirom da većina hemioterapeutika ulazi u ćeliju kroz membranu pasivnom difuzijom, sama struktura membrane može uticati na unos leka u tumorsku ćeliju. Ipak, glavni razlog smanjene akumulacije predstavlja efikasno izbacivanje hemioterapeutika iz ćelije delovanjem članova familije ATP-vezujućih (engl. ATP Binding Cassette - ABC) transportera. Strukturu ovih transportera čine visoko konzervirani unutarćelijski ATP vezujući domen i varijabilniji transmembranski domen. Kada se supstrat veže za transmembranski domen, dolazi do hidrolize ATP-a koja pokreće konformacionu promenu transportera što za posledicu ima izbacivanje supstrata iz ćelije. Pored prisustva ovih transportera u ćelijskoj membrani, pokazana je njihova ekspresija u jedarnoj membrani i membranama vezikula, gde sprečavaju ulazak toksina u jedro i vrše njihovo zarobljavanje u specijalnim strukturama unutar ćelija (Sauna i Ambudkar, 2001). Njihova glavna uloga je sprečavanje akumulacije toksina u ćelijama. Samim tim, povišena ekspresija ABC transportera je karakteristična za epitel creva i jetre, gde imaju zaštitnu ulogu u izbacivanju štetnih molekula u žučni kanal i lumen creva (Borst i Elferink, 2002), a takođe imaju ulogu u funkcionisanju krvno-moždane barijere (Schinkel i saradnici, 1994). Pored fizioloških uloga, ovi proteini učestvuju u uspostavljanju i održavanju rezistentnog fenotipa kod tumorskih ćelija. Tri transportera se najčešće dovode u vezu sa rezistencijom: P-glikoprotein (engl. multidrug resistance protein 1, MDR1, ABCB1), MRP1 (engl. multidrug resistance-associated protein 1, ABCC1) i BCRP (engl. breast cancer resistance protein, ABCG2). Sva tri transportera vrše izbacivanje širokog

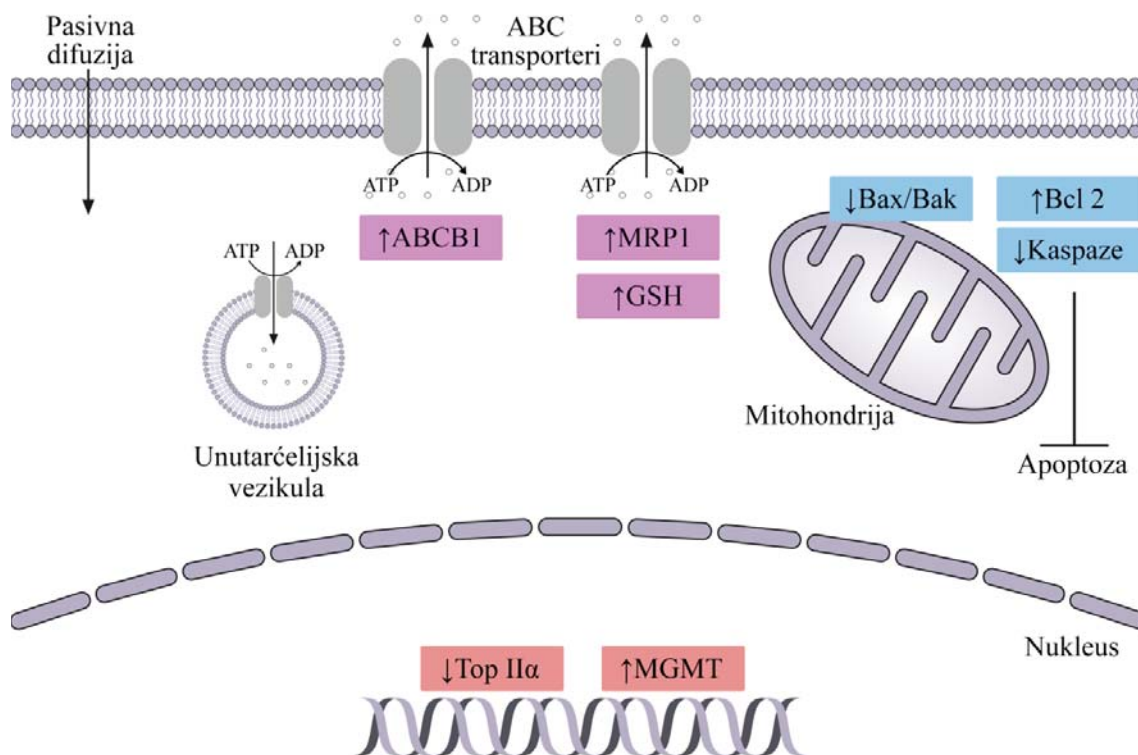
spektra ksenobiotika, *vinca* alkaloida, epipodofilotoksina, antraciklina, taksana i raznih kinaznih inhibitora iz ćelija. Karcinomi debelog creva i bubrega, adenokortikalni i hepatocelularni karcinomi potiču od tkiva koja inicijano imaju povišenu ekspresiju MDR1 i stoga se često odlikuju urođenom rezistencijom (Fojo i saradnici, 1987). U slučajevima akutne mijeloidne leukemije, karcinoma pluća i različitih pedijatrijskih tumora povišena ekspresija MDR1 proteina se javlja nakon primene terapije i koreliše sa lošom kliničkom prognozom (Arceci, 1993; Chan i saradnici, 1990). Za razliku od MDR1 proteina koji vrši izbacivanje nemoifikovanih neutralnih i pozitivno naelektrisanih hidrofobnih jedinjenja, MRP1 protein vrši transport organskih anjona i produkata II faze metabolizma ksenobiotika. Stoga su supstrati MRP1 transportera najčešće konjugati sa glutationom, glukuronskom kiselinom i sulfonatima. Povišena ekspresija MRP1 proteina je pronađena kod karcinoma dojke, jajnika i u neuroblastomima gde koreliše sa lošom kliničkom prognozom (Arts i saradnici, 1999; Haber i saradnici, 2006; Nooter i saradnici, 1997).

Izbegavanje ćelijske smrti kao neminovne posledice brojnih oštećenja unutar ćelije, predstavlja jednu od glavnih karakteristika tumora i ima veliki udeo u sticanju rezistencije na terapiju. Apoptoza predstavlja programirani tip ćelijske smrti koju odlikuju specifične morfološke promene kao što su pupljenje ćelijske membrane, gubitak veze sa okolnim ćelijama i ćelijske simetrije, kondenzacija hromatina i fragmentacija DNK molekula. Postoje dva puta apoptoze, unutrašnji ili mitohondrijalni koji je posredovan članovima Bcl-2 familije proteina i spoljašnji put koji se aktivira preko receptora smrti na membrani ćelija. Oba puta se sustiču na nivou aktivacije efektorske kaspaze 3 koja dovodi do jedinstvene egzekutorne faze apoptoze. Familija Bcl-2 proteina se sastoji iz više od 30 članova sa anti- i pro-apoptotskim funkcijama. Svi oni sadrže najmanje jedan od četiri konzervirana Bcl-2 domena, BH1-4. Pro-apoptotski proteini Bcl-2 familije su podeljeni u dve podfamilije, Bax podfamiliju čiji članovi sadrže BH1-BH3 domene (Bax, Bak i Bok) i podfamiliju koja sadži samo BH3 domen (Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk, Noxa i Puma). Ovi proteini učestvuju u otvaranju mitohondrijalne permeabilizacione pore, pri čemu dolazi do izlaska citohroma C iz unutarmembranskog prostora mitohondrija u citosol i formiranja apoptozoma. Njihova funkcija je regulisana anti-apoptotskim proteinima koji sadrže sva četiri BH domena (Bcl-2, Bcl-Xl i Mcl-1) (Youle i Strasser, 2008). Uzimajući u obzir da je za pravilnu apoptotsku signalizaciju neophodan balans između članova Bcl-2 familije proteina, tokom razvoja rezistencije dolazi do promena u ravnoteži ovih proteina, što se može odraziti kroz povećanu i/ili smanjenu ekspresiju jednog ili više članova ove familije. Pokazano je da povećana ekspresija Bcl-2 štiti ćelije karcinoma



prostate od apoptoze (Raffo i saradnici, 1995), kao i da sprečava apoptozu indukovanu TRAIL molekulom u ćelijama neuroblastoma, glioblastoma i karcinoma dojke (Fulda i saradnici, 2002). U slučaju hronične limfocitne leukemije, maligne ćelije pokazuju povećanu ekspresiju Bcl-2 u kombinaciji sa smanjenom ekspresijom pro-apoptotskog Bax proteina, a povećanje odnosa Bcl-2/Bax je pokazatelj inhibicije procesa apoptoze (Goolsby i saradnici, 2005).

Hemioterapeutici veoma često ostvaruju dejstvo neposredno na ciljnom molekulu u ćeliji i promene koje uključuju mutacije i modifikaciju nivoa ekspresije ciljnog molekula mogu dovesti do rezistencije na dati agens. Npr. određeni agensi imaju za ciljni molekul topoizomerazu II, enzim koji vrši relaksiranje supernavoja tokom replikacije DNK. Kompleks koji se formira između DNK i topoizomeraze II je prolazan, ali pod dejstvom hemioterapeutika ovaj kompleks se stabilizuje, što dovodi do oštećenja i prekida sinteze DNK. Određene ćelijske linije, koje su stekle rezistenciju na inhibitore topoizomeraze II, imaju mutacije u genu za ovaj enzim (Slika 7) (Zwelling i saradnici, 1989). Rezistencija se uglavnom javlja na daunorubicin, doksorubicin, mitoksantron i etoposid. Većina supstanci koja interaguje sa topoizomerazom II su ujedno i supstrati za MDR1 i MRP1 transportere.



**Slika 7. Shematski prikaz ćelijskih mehanizama rezistencije na hemioterapiju.** Rezistencija na hemioterapiju se javlja kao posledica promene u ekspresiji i aktivnosti 1) transportnih pumpi koje vrše izbacivanje agenasa iz ćelije (ABC B1 i MRP1), 2) komponenti apoptotskog puta čime se blokira ovaj proces (Bax/Bak, Bcl-2, kaspaze), 3) ciljnih molekula (Topo II $\alpha$ ), 4) molekula koji vrše uklanjanje alkilirajućih adukta na DNK (MGMT) i 5) posledica zarobljavanja agenasa u unutarćelijskim vezikulama nakon čega se izbacuju iz ćelije.

Imajući u vidu da je DNK ciljni molekul mnogih klasičnih citotoksičnih agenasa uključujući antracikline, alkilirajuće agense i jedinjenja koja sadrže platinu (cisplatin i karboplatin), promene u aktivaciji sistema za popravku DNK predstavljaju jedan od mehanizama rezistencije na ove hemioterapeutike. Cisplatin ispoljava svoje citotoksično dejstvo preko unakrsnog povezivanja DNK lanaca što posledično dovodi do apoptoze. Rezistencija na cisplatin se često javlja usled povećane aktivnosti sistema za isecanje nukleotida i homologne rekombinacije (Bonanno i saradnici, 2014).

Pored ovih mehanizama na fenomen rezistencije utiču i epigenetički događaji, epitelijano mezenhimalna tranzicija, tumorska heterogenost, kao i kombinacije bilo kojih od navedenih mehanizama (Housman i saradnici, 2014). Nastavak istraživanja mehanizama koji leže u osnovi rezistencije na hemioterapiju, kao i pronalaženje novih modaliteta koji bi se koristili u lečenju tumora rezistentnih na aktuelnu terapiju je od presudnog značaja za pacijente, posebno za personalizovanu terapiju kojoj se u savremenoj kliničkoj praksi teži.

### 1.3.1. KOLATERALNA SENZITIVNOST

Postoji veliki broj strategija za prevazilaženje problema višestruke rezistencije. Jedan od njih se oslanja na svojstvo određenih supstanci da sa većom efikasnošću ubijaju rezistentne ćelije u odnosu na ostatak populacije tumorskih ćelija. Ovaj fenomen se naziva kolateralna senzitivnost i prvi put je upotrebljen za opisivanje povećane osetljivosti rezistentnog bakterijskog soja *Escherichia coli* na više nesrodnih agenasa (Szybalski i Bryson, 1952). Genetičke i fenotipske promene zaslužne za razvoj rezistencije na određeni agens, mogu proizvesti osetljivost na neke druge agense, koji se mogu iskoristiti za ciljano i selektivno ubijanje rezistentnih ćelija. Kolateralna senzitivnost se određuje *in vitro* u testovima citotoksičnosti, upoređivanjem efekta datog agensa na izvornu i rezistentnu ćelijsku liniju (obično upoređivanjem koncentracija neophodnih da inhibiraju rast ćelija za 50% -  $IC_{50}$  vrednosti). Ukoliko dato jedinjenje ispoljava veći efekat na izvornu u odnosu na rezistentnu ćelijsku liniju, tj. odnos između  $IC_{50}$  vrednosti za rezistentne i senzitivne ćelije, koji predstavlja faktor rezistencije je veći od 1, tada je prisutna ukrštena rezistencija. Međutim, ukoliko rezistentna linija pokazuje veću osetljivost na dato jedinjenje u odnosu na izvornu, faktor rezistencije je manji od 1 i tada govorimo o kolateralnoj senzitivnosti.

Postoji više mehanizama koji dovode do kolateralne senzitivnosti. Određen broj agenasa koji su supstrati za P-gp pumpu dovode do prekomerne stimulacije ATPazne aktivnosti pumpe i u tom procesu se ubrzano vrši hidroliza ATP-a. Ćelija pokušava da proizvede dovoljne količine ATP-a i dolazi do oksidativnog stresa usled povećane oksidativne fosforilacije. Kada nivo oksidativnog stresa postane dovoljno veliki, dolazi do pokretanja procesa ćelijske smrti. Tako, npr. verapamil selektivno deluje na rezistentne ćelije sa prekomernom ekspresijom P-gp-a, izazivajući povećanu potrošnju ATP-a, što povećava produkciju superoksidnog anjona i smanjuje nivo glutationa (Karwatsky i saradnici, 2003).

Rezistentne ćelije koje ekspimiraju P-gp imaju značajno povećane energetske zahteve u odnosu na izvorne ćelije i zato pokazuju povećanu osetljivost na inhibitor glikolize, 2-deoksi-D-glukozu, kao i na inhibitore elektrontranspornog lanca, rotenon i antimicin A.

Tokom procesa sticanja rezistencije na određeni agens vrlo često dolazi i do promena u biofizičkim svojstvima ćelijske membrane, pa rezistentne ćelije mogu postati osetljivije na dejstvo deterdženata i lokalnih anestetika koji utiču na fluidnost membrana ovih ćelija (Pluchino i saradnici, 2012).

Ćelije sitnoćelijskog karcinoma pluća rezistentne na cisplatin pokazuju kolateralnu senzitivnost na inhibitor topoizomeraze I usled povećanja nivoa ovog enzima u ćelijama (Moritaka i saradnici, 1998). Ćelije karcinoma kolona rezistentne na diarilsulfonil ureu pokazuju kolateralnu senzitivnost na vinkristin usled smanjene ekspresije P-gp-a, dok su ksenografti rabdomiosarkoma rezistentni na melfalan i karmustin senzitivni na etoposid usled povećane ekspresije i aktivnosti topoizomeraze II, koja predstavlja ciljni protein etoposida (Friedman i saradnici, 1994; Sosinski i saradnici, 1994).

Identifikacijom odgovarajućih agenasa koji dovode do kolateralne senzitivnosti kod rezistentnih ćelija potencijano je moguće sprečiti pojavu ukrštene rezistencije adjuvantom primenom ovih agenasa sa standardnom terapijom i vršiti senzitivizaciju rezistentnih tumora kroz selektivno uklanjanje rezistentnih ćelija u heterogenoj tumorskoj populaciji.

#### **1.4. C6 ANIMALNI MODEL GLIOMA**

Animalni modeli u neuroonkologiji se koriste za procenu efikasnosti novih terapijskih strategija u lečenju moždanih tumora. Validni modeli glioma moraju da ispunjavaju sledeće kriterijume (Barth i Kaur, 2009):

- da imaju glijalno poreklo
- mogućnost rasta i propagacije kroz više pasaža *in vitro*
- stopa tumorskog rasta mora biti predvidljiva i reproducibilna
- da poseduju karakteristike glioma *in vivo* kao što su neovaskularizacija, narušavanje krvno-moždane barijere, infiltrativni rast i odusustvo inkapsulacije
- preživljavanje životinje nakon intrakranijalne inokulacije mora biti dovoljno dugo da bi se mogla primeniti terapija i proceniti njena efikasnost
- tumor ne treba da izazove ili može da izazove blagu imunološku reakciju kod životinja
- tumor ne sme da raste u epiduralni prostor ili van granica mozga

U svrhu uspostavljanja hemijski indukovanih modela tumora mozga najčešće je korišćen pacov i od sredine sedamdesetih godina razvijeno je više pacovskih modela tumora mozga.

Jedan od njih je i C6 animalni model koji se koristi dugi niz godina za ispitivanje hemioterapije, genske i radijacione terapije, kao i antiangiogene terapije. Međutim, značajno ograničenje ovog modela je pojava imunskog odgovora. Uprkos tome, C6 model glioma je

opšte prihvaćen model za proučavanje invazije, migracije, tumorskog rasta, neovaskularizacije i narušavanja krvno-moždane barijere (Barth i Kaur, 2009).

C6 pacovska linija glioma je uspostavljena kontinuiranim davanjem metil nitrozo uree (MNU) nesrodnom soju (engl. outbred) Wistar pacova tokom perioda od 8 meseci do razvitka tumora (Schmidek i saradnici, 1971). Čelije koje potiču od tumora su histopatološki okarakterisane kao gliom i postale su komercijalno dostupne pod kataloškim brojem ATCC# CCL-107. Genetičkom analizom je utvrđeno da ove ćelije imaju mutiran *p16/Cdkn2a/Ink4a* lokus i nije detektovana ekspresija *p16* iRNK. Poseduju „wild type“ *p53* ali pokazuju smanjenu ekspresiju *PTEN* i povećanu ekspresiju *PDGFβ*, *IGF-1*, *EGFR* i *Erb3/Her3* gena, što odgovara profilu ekspresije ovih gena kod humanih glioblastoma. Kod humanih glioblastoma je često povećana aktivnost Ras signalnog puta, što je još jedna sličnost sa C6 ćelijama koje karakteriše povećana ekspresija Ras proteina i Ras guanozin trifosfat aktivator proteina. U skladu sa ovim rezultatima, C6 ćelijska linija je pokazala najveći stepen sličnosti sa humanim glioblastomima od svih ispitivanih pacovskih gliomskih linija (Sibenaller i saradnici, 2005).

Animalni modeli dobijeni inokulacijom C6 ćelija su uspostavljeni kod sojeva pacova Wistar, Sprague-Dawley i Long-Evans. Tumori formirani u Wistar pacovima pokazuju najveću histološku i patološku sličnost sa humanim jer ih odlikuje izražena mitotska sposobnost, nuklearni polimorfizam, regioni nekroze i difuzna invazija u moždani parenhim. Najčešća putanja migracije prati neuronalna vlakna a C6 ćelije pokazuju jak afinitet za membranu endotelijalnih ćelija mozga. Invaziju uglavnom vrše pojedinačne ćelije koje dejstvom proteolitičkih enzima prilikom migracije stvaraju oko sebe prostor – mikrodžep, najčešće invadiraju u belu moždanu masu i retko formiraju sekundarne tumore. Tumori koje formiraju C6 ćelije pokazuju znatno veću aktivnost kolagenaze MMP2 u odnosu na okolno normalno tkivo mozga, dok pojedinačne ćelije koje invadiraju parenhim imaju povećanu aktivnost MMP2 u odnosu na tumorsku masu. Pored ovoga, C6 ćelije pokazuju povećanu ekspresiju integrina  $\alpha3\beta1$  i  $\alpha5\beta1$  i sekreciju bFGF-a i VEGF-a u odgovoru na hipoksiju (Grobber i saradnici, 2002). Analize C6 ćelija su pokazale da određene populacije pokazuju karakteristike matičnih ćelija tumora, kao što je sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u različite tipove ćelija i sposobnost stvaranja tumora *in vivo* (Shen i saradnici, 2008).

## 1.5. REAKTIVE KISEONIČNE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES

Ćelijska redoks homeostaza predstavlja balans između stepena proizvodnje oksidanata i stepena i brzine njihovog uklanjanja što je neophodno u održavanju normalnih ćelijskih funkcija. Oksidativni stres nastaje kao posledica povećane akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS) usled neravnoteže u njihovoj proizvodnji i uklanjanju od strane antioksidativnog sistema.

ROS u širem smislu predstavlja reaktivne hemijske vrste koje sadrže kiseonik. Postoje dva tipa ROS-a, slobodni radikali koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj molekulskoj orbitali i neradikalni ROS koji nema nesparene elektrone ali je hemijski reaktivan i u ćeliji može biti pretvoren u radikalni ROS. Primeri radikalnog ROS-a pristunog u ćelijama su superoksid ( $O_2^-$ ), azot monoksid ( $NO\cdot$ ) i hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ). Neradikalni ROS pored ostalih uključuje vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) i hidroksid ( $OH^-$ ).

Umerena proizvodnja ROS-a je značajna za pravilno funkcionisanje ćelija jer ima ulogu u regulisanju puteva signalne transdukcije na taj način što reaguje sa i vrši modifikaciju transkripcionih regulatora i gena. ROS ima uticaj na ćelijski rast i diferencijaciju (Boonstra i Post, 2004; Schafer i Buettner, 2001) jer reguliše aktivnost različitih enzima, posreduje u procesima inflamacije preko stimulacije proizvodnje citokina i učestvuje u eliminaciji patogena. Prekomerna proizvodnja ROS-a može dovesti do oštećenja DNK, proteina i lipida jer dovodi do oksidativne modifikacije ovih molekula čime menja ili sprečava njihovu biološku funkciju (Perry i saradnici, 2000).

ROS uglavnom nastaje iz kiseonika potrebnog za odvijanje različitih metaboličkih procesa koji se dešavaju u mitohondrijama, peroksizomima i endoplazmatičnom retikulumu. Procenjeno je da oko 2% kiseonika koji se utroši u procesu anaerobnog metabolizma u mitohondrijama bude pretvoren u  $O_2^-$ , što mitohondrije čini glavnim izvorom ROS-a u ćeliji (Finkel, 2012; Handy i Loscalzo, 2012).  $H_2O_2$  nastaje ili dismutacijom iz  $O_2^-$  ili u peroksizomima iz molekularnog kiseonika (Mates i Sanchez-Jimenez, 2000). Za razliku od reaktivnijeg  $O_2^-$  koji ostaje blizu mesta svog nastanka,  $H_2O_2$  iako manje reaktivan ima sposobnost da difunduje kroz membrane u citosol i dovede do različitih tipova oštećenja (Mates i Sanchez-Jimenez, 2000). Najveća oštećenja biološkim sistemima zadaje  $OH\cdot$ . Usled svoje nestabilne elektronske strukture nakon nastanka on reaguje jako brzo sa praktično bilo kojom ćelijskom komponentom (Valko i saradnici, 2004). Najveći deo  $OH\cdot$  se produkuje u

prisustvu redukovanih prelaznih metala (jona Fe, Cu, Ni ili Co), uglavnom u Fentonovoj reakciji kada  $\text{Fe}^{2+}$  reaguje sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{OH}^\cdot$  radikal izaziva oštećenja DNK molekula i dovodi do stvaranja 8-hidroksideoksiguanozina (8-OHdG). 8-OHdG je uključen u progresiju kancerogeneze. Pokazano je višestruko povećanje ovog molekula u uzorcima tumora dojke u odnosu na normalno tkivo dojke (Matsui i saradnici, 2000).  $\text{NO}^\cdot$  je slobodni radikal koji je takođe povezan sa procesom kancerogeneze.  $\text{NO}^\cdot$  se sintetiše iz L-arginina od strane enzima azot oksid sintetaza (eng. nitric oxide synthase, NOS). Konstitutivne izoforme ovog enzima, neuronalna NOS (nNOS) i endotelijana NOS (eNOS), proizvode male količine  $\text{NO}^\cdot$  koje imaju ulogu u neurotransmisiji i vazodilataciji (Moncada i Higgs, 1993). Inducibilna izoforma (iNOS) proizvode znatno veće količine  $\text{NO}^\cdot$  i ekspresira se uglavnom u procesu inflamacije (Nathan i Xie, 1994).

### 1.5.1. ANTIOKSIDATIVNI SISTEM

Balans između produkcije i uklanjanja ROS-a kontroliše niz antioksidanasa u ćeliji. Antioksidativni sistem za regulaciju i uklanjanje ROS-a čine egzogeni i endogeni, enzimatski i neenzimatski antioksidansi.

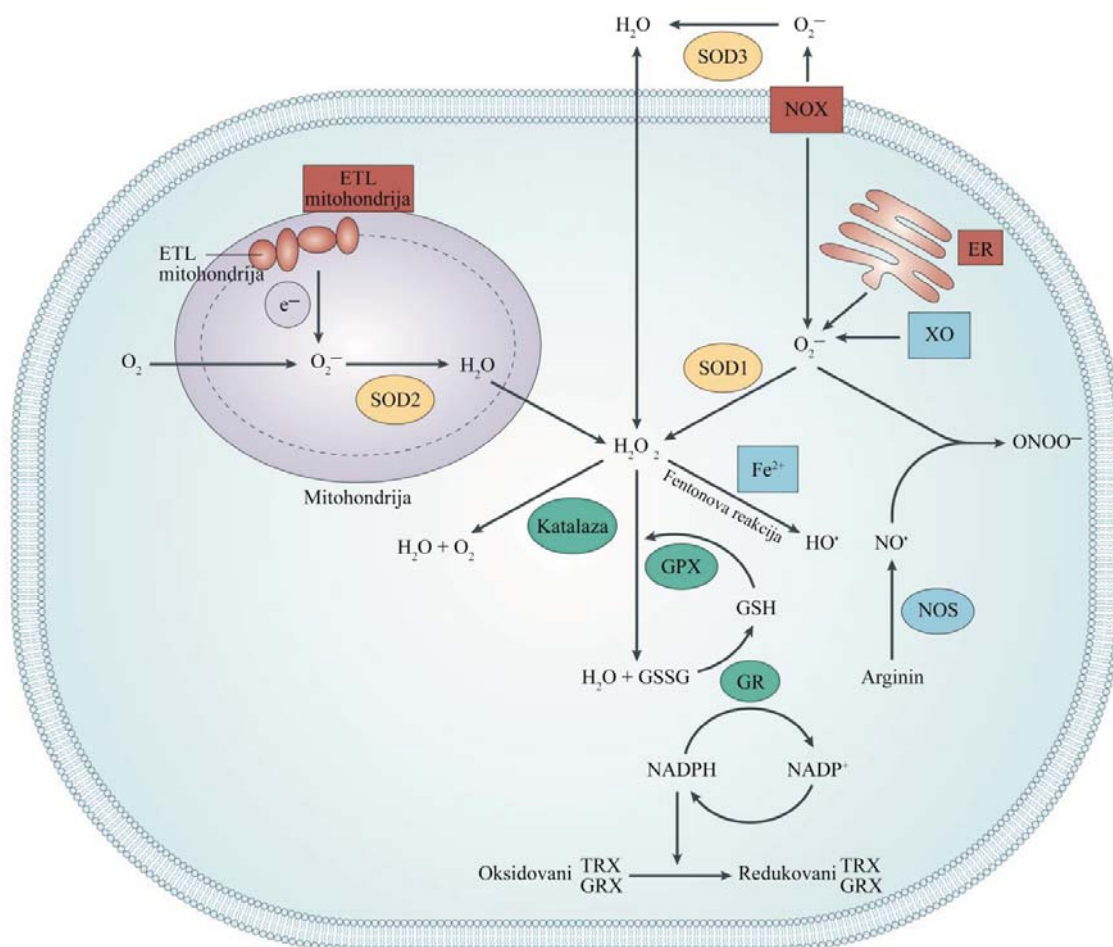
Superoksid dismutaze (eng. superoxide dismutase, SOD) su prvi okarakterisani antioksidativni enzimi. Tri različita tipa SOD-a su ekspimirana u humanim ćelijama, bakar-cink SOD (Cu-ZnSOD, SOD1), mangan SOD (MnSOD, SOD2) i vanćelijska SOD (EC-SOD, SOD3). Sve one vrše dismutazu dva  $\text{O}_2^-$  anjona u  $\text{H}_2\text{O}_2$  i molekularni kiseonik. Katalaze vrše detoksifikaciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  do vode.

Glutation (GSH) je tripeptid (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicin) sa različitim funkcijama u živim organizmima. Kao nosilac aktivne tiol grupe u formi cisteinskog ostatka, GSH deluje kao antioksidant direktno, interakcijom sa reaktivnim molekulima ili kao kofaktor mnogobrojnih enzima. GSH učestvuje u II fazi metabolizma ksenobiotika i pomaže njihovo izbacivanje iz ćelije (Lushchak, 2012).

Glutation peroksidaze (eng. glutathion peroxidase, GPx) vrše redukciju vodonik peroksida, uključujući lipidne hidroperokside, koristeći pritom GSH kao supstrat. Oksidovana forma glutacion disulfida (GSSG) se zatim redukuje delovanjem glutacion reduktaze čime se vrši recikliranje GSH molekula.

Tioredoxini i glutaredoxini su grupe malih antioksidativnih proteina prisutnih u skoro svim organizmima. Tioredoxine redukuje tioredoxin reduktaza, a glutaredoxin

glutation redukaza, oba u reakciji redukcije koriste NADPH (Slika 8). Pored GSH, veoma rasprostranjeni neenzimatski antioksidanti su i vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), redukovana forma CoQ ( $\text{CoQH}_2$ ), flavonoidi i  $\beta$ -karoten.



**Slika 8. Shematska ilustracija ćelijske redoks homeostaze.** Glavna mesta u ćeliji gde dolazi do stvaranja ROS-a su elektron-transportni lanac (ETL) mitohondrija, endoplazmatični retikulum (ER) i kompleks NADPH oksidaze (NOX). Superoksidni anjon ( $\text{O}_2^-$ ) najčešće nastaje kao posledica curenja elektrona iz ETL mitohondrija usled ćelijskog disanja.  $\text{O}_2^-$  se prevodi u vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) delovanjem superoksid dismutaza (SOD).  $\text{H}_2\text{O}_2$  u prisutvu tranzicionih metala ( $\text{Fe}^{2+}$ ) može generisati hidroksilni radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) ili dejstvom katalaze može nastati  $\text{H}_2\text{O}$ . Azot monoksid ( $\text{NO}^\bullet$ ) nastaje iz L-arginina dejstvom azot oksid sintetaze (NOS). Ćelije regulišu nivo ROS-a preko kompleksnog sistema antioksidativne odbrane. Preuzeto i modifikovano po (Trachootham i saradnici, 2009).

### 1.5.2. HIPOKSIJA

U rastućoj tumorskoj masi ćelije su izložene stalno cikličnim promenama uslova od hipoksije do reoksigenacije (Dewhirst i saradnici, 2008). Budući da se tumori sastoje od ćelija koje ubrzano proliferišu povećavajući tumorsku masu, potrebe tumora za kiseonikom se povećavaju, a dopremanje kiseonika se smanjuje. Glavni razlozi za ovo su nedovoljna



prokrvljenost, jer pojava novih krvnih sudova ne može adekvatno da isprati rast tumora i povećanje difuzionog rastojanja između krvnih sudova i tumorskih ćelija. Tako hipoksija prisutna u regionima tumorske mase, dovodi do aktivacije procesa angiogeneze (Giordano i Johnson, 2001). Hipoksija indukuje ekspresiju više transkripcionih regulatora među kojima je i HIF-1 (eng. hipoxia-inducible factor 1, HIF-1). HIF-1 je heterodimerni protein koji se sastoji iz HIF-1 $\alpha$  i HIF-1 $\beta$  subjedinice. HIF-1 $\beta$  je nuklearni protein čija ekspresija ne zavisi od koncentracije O<sub>2</sub> u ćeliji. HIF-1 $\alpha$  je protein lokalizovan u citoplazmi u uslovima adekvatne koncentracije O<sub>2</sub> u ćeliji gde se razgrađuje od strane ubikvitin proteaznog sistema. U uslovima hipoksije, HIF-1 $\alpha$  subjedinica se translocira u nukleus gde sa HIF-1 $\beta$  formira aktivni HIF-1 heterodimer. HIF-1 se zatim vezuje za specifične sekvence gena i vrši funkciju transkripcionog regulatora za eritropoetin, VEGF, različite enzime glikolize, transferin i mnoge druge. Povećana ekspresija ovih gena je pokazana u različitim tumorima, što ukazuje na to da HIF-1 zavisne promene učestvuju u progresiji bolesti (Semenza, 2000). Osim toga, smenjivanje ciklusa hipoksije i reoksigenacije dovodi do povećane produkcije ROS-a što uslovljava nastanak novih mutacija i takođe doprinosi tumorskoj progresiji (Cairns i saradnici, 2001).

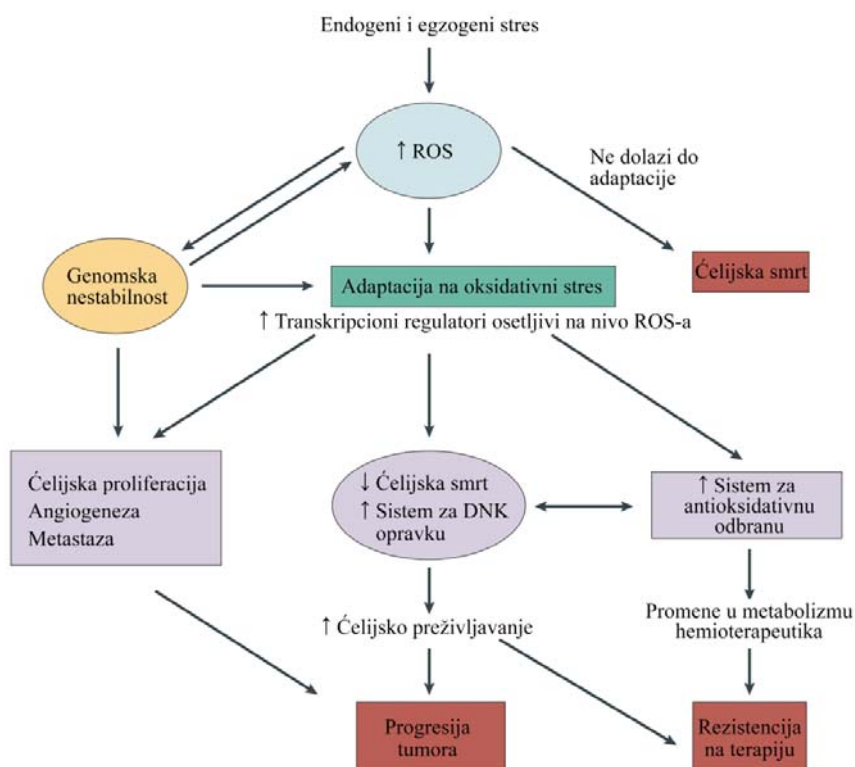
### 1.5.3. ADAPTACIJA NA POVEĆANI NIVO ROS-a U ĆELIJAMA

U poređenju sa normalnim ćelijama istog tkiva, tumorske ćelije pokazuju znatno veći nivo ROS-a i oksidativnog stresa, kako *in vitro* tako i *in vivo* (Szatrowski i Nathan, 1991). Različiti mehanizmi dovode do pojave oksidativnog stresa tokom razvoja i progresije tumora, a uključuju aktivaciju onkogeni, atipične promene metabolizma, mitohondrijalnu disfunkciju i gubitak funkcionalnog p53 molekula (Brandon i saradnici, 2006; Horn i Vousden, 2007; Rodrigues i saradnici, 2008). Značajno povećana akumulacija ROS-a usled različitog endogenog i egzogenog stresa može dovesti do letalnog oštećenja ćelija koje ne poseduju adekvatne mehanizme za odgovor na stres. Međutim, u određenim ćelijama tumora konstantni oksidativni stres će dovesti do adaptacije na novonastale uslove. Tako, DNK mutacije nastale kao posledica delovanja ROS-a dovode do pojave genomske nestabilnosti i stvaranja različitih tumorskih fenotipova sposobnih da opstanu u raznovrsnim nepovoljnim uslovima.

Mehanizmi redoks adaptacije uključuju mnogobrojne puteve aktivacije transkripcionih regulatora osetljivih na nivo ROS-a, kao što su NF- $\kappa$ B, Nrf-2, c-Jun i HIF-1 što za posledicu ima povećanje ekspresije antioksidativnih molekula SOD, katalaze, tioredoksina i GSH antioksidativnog sistema. Neki od pomenutih transkripcionih regulatora takođe utiču na

ekspresiju članova Bcl-2 familije proteina, Akt signalnog puta i kaspaza na ćelijsko preživljavanje i osetljivost na hemioterapiju (Chen i saradnici, 2007). Pored toga, ovi transkripcioni regulatori utiču i na ekspresiju gena za ćelijsku proliferaciju, angiogenezu, ćelijsku pokretljivost i metastaziranje. Porast nivoa GSH usled adaptacije na oksidativni stres povećava i izbacivanje, i inaktivaciju određenih anti-tumorskih agenasa, čime doprinosi razvoju rezistencije na hemioterapiju (Slika 9) (Xia i saradnici, 2007; Yadav i saradnici, 2007).

Tretman tumorskih ćelija sa  $H_2O_2$  pre intravenoznog injektovanja u animalnom modelu miša dovodi do povećanog metastaskog potencijala. Subpopulacije MCF-7 ćelijske linije tumora dojke koje imaju povećan nivo ROS-a u odnosu na parentalnu liniju pokazuju povećanu pokretljivost, a ortotopni tumori nastali od ovih ćelija metastaziraju u pluća, jetru i slezinu (Kundu i saradnici, 1995; Pelicano i saradnici, 2009).

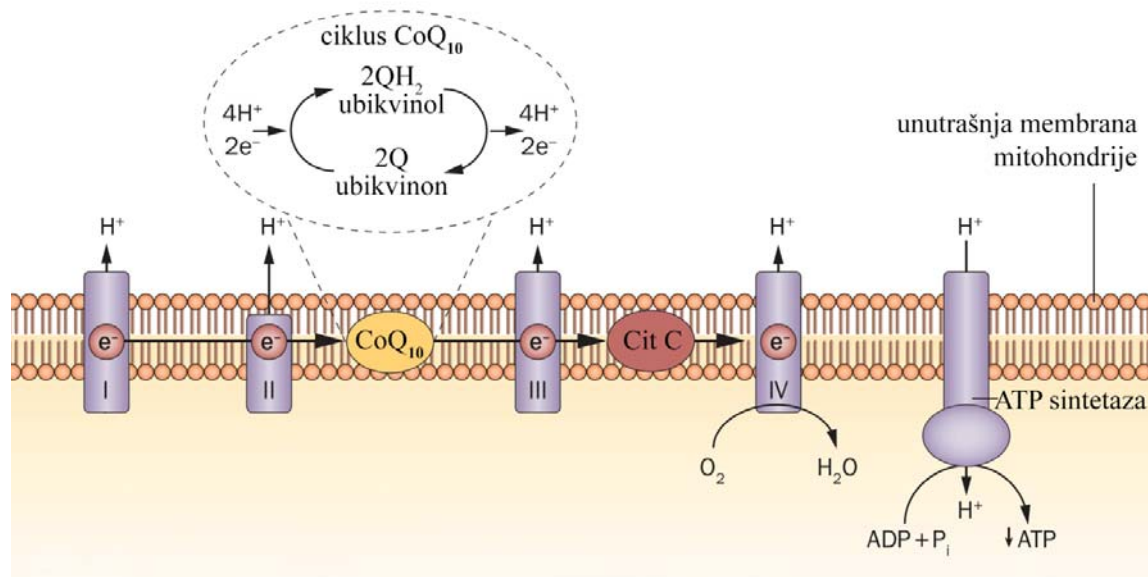


**Slika 9. Uloga adaptacije na povećani nivo ROS-a i oksidativni stres u progresiji tumora i rezistenciji na terapiju.** Hronično povećani nivo ROS-a može dovesti do adaptivnog odgovora posredovanog aktivacijom transkripcionih regulatora koji utiču na proces ćelijske smrti, sistem za popravku DNK i antioksidativnu odbranu. ROS dovodi do povećanja genomske nestabilnosti koja dodatno doprinosi progresiji tumora i rezistenciji na terapiju. Preuzeto i modifikovano po (Trachootham i saradnici, 2009).

#### 1.5.4. ANTIOKSIDANT KOENZIM Q10

Koenzim Q ili ubikvinon (CoQ) se sastoji iz benzokvinonskog prstena i bočnog lanca sastavljenog iz različitog broja izoprenoidnih jedinica čiji je broj specifičan za određenu vrstu. *Saccharomyces cerevisiae* sintetizira CoQ sa 6 izoprenoidnih jedinica (CoQ6), *Caenorhabditis elegans* sa 9 izoprenoidnih jedinica (CoQ9), dok sisari imaju različit odnos CoQ9 i CoQ10. Uloga CoQ u redoks regulaciji se ogleda u mogućnosti prenošenja 2 elektrona čime stalno prelazi iz potpuno oksidovane (CoQ, ubikvinon) u potpuno redukovanu (CoQH<sub>2</sub>, ubikvinol) formu. Ovaj proces se može odvijati u jednom koraku ili se može prenositi jedan po jedan elektron pri čemu nastaje posredna semikvinonska (CoQH) forma. Postojanje različitih redoks formi omogućava CoQ da deluje kao antioksidant, mada ispoljava i prooksidativno dejstvo kroz delovanje semikvinonskog intermedijera (Navas i saradnici, 2007).

CoQ je jedini lipidni antioksidant koga sintetiziraju sve ćelije sisara i ima veoma kompleksnu biosintezu (Turunen i saradnici, 2004), a ulazi u sastav plazma membrana, membrana mitohondrija, lizozoma i Goldžijevog aparata. Zbog svoje lipofilnosti ima veliku pokretljivost u membranama, a otuda i njegova uloga u elektron transportnom lancu mitohondrija. U unutrašnjoj membrani mitohondrija, elektroni sa NADH i sukcinata prelaze u elektron transportnom lancu do kiseonika koji usled toga biva redukovano do H<sub>2</sub>O. Transfer elektrona je praćen ispumpavanjem H<sup>+</sup>, čime se stvara protonski gradijent kroz membranu koji ATP sintetaza koristi za proizvodnju ATP-a. CoQ vrši prenos elektrona preko enzima respiratornog kompleksa I i II do enzima respiratornog kompleksa III i samim tim ima ključnu ulogu u procesima oksidativne fosforilacije i stvaranja ATP-a (Slika 10) (Turunen i saradnici, 2004). CoQ ispoljava svoje antioksidativno dejstvo direktno, kroz reakciju sa slobodnim radikalima, čime sprečava proces lipidne peroksidacije u ćelijama i indirektno, u procesu regeneracije askorbata i vitamina E (Crane, 2001).



**Slika 10. Ciklus CoQ10 u elektron transportnom lancu mitohondrija.** Antioksidant CoQ10 vrši transport elektrona sa respiratornog kompleksa I i II do kompleksa III u unutrašnjoj membrani mitohondrija što je neophodno za stvaranje protonskog gradijenta i produkciju ATP-a. U tom procesu prelazi iz redukovane (ubikvinol) u oksidativnu (ubikvinon) formu u ciklusu CoQ10. Preuzeto i modificirano po (Okonko i Shah, 2015).

Koncentracija CoQ10 u plućima, srcu, slezini, jetri i bubrezima ljudi je najveća oko 20 godine života nakon čega postepeno opada sa starenjem (Kalen i saradnici, 1989). Pokazan je smanjen nivo CoQ10 u miokardu pacijenata obolelih od kardiovaskularnih bolesti, kao i smanjeni nivo CoQ10 u plazmi pacijenata sa dijabetesom, što je povezano sa povećanim oksidativnim stresom (Miyake i saradnici, 1999; Sarter, 2002). Dodavanje egzogenog CoQ10 redukuje koncentraciju markera oksidativnog stresa, malondialdehida, u plazmi pacova nakon mišićne povrede i smanjuje inflamaciju i oksidativni stres u jetri gojaznih miševa (Kon i saradnici, 2007; Sohet i saradnici, 2009). Smanjeni nivo CoQ10 je pronađen u plazmi i tumorskom tkivu žena obolelih od tumora dojke koji koreliše sa lošijom prognozom, kao i u cervikalnom kanceru (Jolliet i saradnici, 1998; Palan i saradnici, 2003). Kod pacijenata koji primaju antraciklinsku terapiju, npr. doksorubicin, CoQ10 pruža zaštitu od toksičnog efekta na srce i jetru, bez uticaja na efikasnost terapije (Roffe i saradnici, 2004).

## 2. CILJEVI

Na osnovu uvida u postojeću literaturu i aktuelnosti problema rezistencije glioblastoma na terapiju, ciljevi ove doktorske disertacije su osmišljeni tako da uz odgovarajući metodološki pristup, disertacija da odgovor na pitanja vezana za razvoj rezistencije i mogućnosti njenog prevazilaženja u lečenju glioblastoma.

**1. Uspostaviti rezistenciju na karmustin (BCNU) kod pacovske C6 gliomske ćelijske linije i okarakterisati rezistentni fenotip *in vitro*. U okviru ovog cilja postavljeni su sledeći zadaci:**

- 1) Indukovati rezistenciju kod C6 ćelijske linije postepenim kontinuiranim tretmanom sa BCNU
- 2) Utvrditi prisustvo rezistencije na druge DNK oštećujuće agense kod novouspostavljene rezistentne RC6 ćelijske linije
- 3) Izvršiti karakterizaciju rezistentnog RC6 fenotipa na osnovu promena u apoptotskoj mašineriji, oštećenja na DNK lancima, stepena produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), promena u antioksidativnom kapacitetu, kao i u ekspresiji transportnih pumpi
- 4) Ispitati razlike u stopi proliferacije i invazivnosti između parentalne C6 i rezistentne RC6 ćelijske linije

**2. Razviti animalni model rezistentnog RC6 glioma inokulacijom ćelija u mozak Wistar pacova (alograf):**

- 1) Uporediti C6 i RC6 animalni model u pogledu infiltracije ćelija u moždani parenhim
- 2) Uporediti C6 i RC6 animalni model u pogledu eventualnih neuroloških promena na nivou ponašanja životinja

**3. Ispitati efikasnost nove antigliomske terapijske strategije u RC6 modelu:**

- 1) Ispitati efikasnost antioksidanta, koenzima Q10 (CoQ10) za povećanje osetljivosti RC6 ćelija na antigliomski hemioterapeutik, temozolomid (TMZ)
- 2) Uporediti efekat pojedinačnih i kombinovanog tretmana CoQ10 sa TMZ na indukciju smrti RC6 ćelija u 2D i 3D sistemima
- 3) Ispitati uticaj CoQ10 na invaziju RC6 ćelija u 2D i 3D sistemima, samostalno i u kombinaciji sa TMZ-om

- 4) Proceniti efikasnost predložene terapijske strategije u RC6 animalnom modelu pacovskog glioma

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. LEKOVI I AGENSI

U ovoj studiji je ispitivano dejstvo sledećih lekova i agenasa: 1,3-bis(2-hloroetil)-1-nitrozourea (BCNU, karmustin) (Ben Venue Laboratories, SAD), cisplatina (CpT) (Pfizer (Perth) Pty Ltd, Australija), doksorubicin (DOX) (EBEWE Arzneimittel GmbH, Austrija) i temozolomid (TMZ) (Schering-Plough, laboNV, Belgija). GM6001 (galardin, inhibitor matriksnih metaloproteinaza) je nabavljen od SelleckChem, SAD dok je koenzim Q10 (CoQ10) dobijen na poklon od dr Mario Duran Prado sa Medicinskog fakulteta Univerziteta Kastilja - La Manča, Španija.

BCNU je rastvoren u 95% etanolu i 100 mM alikvoti su čuvani na -20 °C. DOX je rastvoren u sterilnoj vodi i 1 mM alikvoti su čuvani na -20 °C. CpT je rastvoren u sterilnoj vodi i čuvan na sobnoj temperaturi u koncentraciji od 1mM. TMZ i GM6001 su rastvoreni u dimetilsulfoksidu (DMSO) i 50 mM alikvoti su čuvani na sobnoj temperaturi i +4 °C. CoQ10 je rastvoren u DMSO i za svaki tretman je pravljen novi alikvot od 2 mM. Pre tretmana, svi lekovi i agensi su rastvarani u sterilnoj vodi.

#### 3.2. HEMIKALIJE I REAGENSI

Za potrebe eksperimentalnog rada, korišćene su sledeće hemikalije i reagensi: Dulbeko modifikovani minimalni esencijalni medijum (DMEM), L-glutamin i tripsin/EDTA (Biological Industries, Izrael), fetalni goveđi serum (FBS), smeša penicilin-streptomycin, sulforodamin B (SRB), dimetilsulfoksid (DMSO), metilceluloza, Fast Blue (FB), Hoechst 33342, propidijum jodid (PI) i tripan plavo (TB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka), Triton™ X-100 (MerckKgaA, Nemačka), aneksin-V-FITC (AV)/propidijum jodid (PI) paket (Abcam, Velika Britanija), dihidroetidijum (DHE), dihidrorodamin (DHR), 2',7'-bis-(2-karboksietil)-5-(i-6)-karboksifluoroscein, acetoksimetil estar (BCECF,AM) i karboksifluorescein sukimidil estar (CFSE) (Molecular Probes ®, Invitrogen, SAD), kalcein acetoksimetil estar (CAM) (Thermo Fisher Scientific, SAD), kolagen tip I (Corning ®, SAD), nembital (Serva, Nemačka), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zorka, Šabac, Srbija), RNKaza A i Trizol ® (Invitrogen Life Technologies, SAD), etidijum bromid (Merck, Nemačka) i agaroz (Applichem GmbH, Nemačka).

### 3.3. ĆELIJSKE LINIJE

C6 ćelijska linija pacovskog glioma je nabavljena od American Type Culture Collection (ATCC, SAD), gde se vodi pod oznakom CCL-107. Odgovarajuća rezistentna ćelijska linija RC6 je dobijena nakon izlaganja C6 ćelija postepeno rastućim koncentracijama BCNU (10-300  $\mu\text{M}$ ) u periodu od 9 meseci. C6 i RC6 ćelije su kultivisane u DMEM medijumu uz dodatak 10% FBS, 4,5 g/l glukoze, 2 mM L-glutamina i smeše antibiotika 5 000 U/ml penicilina i 5 mg/ml streptomocina u inkubatoru (Sanyo Instruments, Japan) na 37 °C, u vlažnoj atmosferi (90%) sa 5% CO<sub>2</sub>. Pasaža ćelija je vršena dva puta nedeljno po dostizanju 80-90% konfluentnosti u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup> i 75 cm<sup>2</sup> (Nunc Inc., Rosklid, Danska). Nakon postupka tripsinizacije ćelije su brojane na DM IL invertnom mikroskopu (Leica, Portugal). Ćelije su potom zasejavane u odgovarajućoj gustini u svež medijum za dalje eksperimente ili za dalje umnožavanje i održavanje u kulturi (8 000 ćelija/cm<sup>2</sup> za obe ćelije linije).

### 3.4. ODREĐIVANJE BROJA ĆELIJA

Bojenje ćelija tripan plavim (engl. trypan blue, TB) daje uvid u njihovu brojnost i kvalitet. Princip bojenja se zasniva na činjenici da TB ne prodire u unutrašnjost živih ćelija koje imaju intaktnu ćelijsku membranu, te one ostaju nebojene (pod mikroskopom svetle beličaste ćelije). Na taj način, vijabilne ćelije se mogu razlikovati od mrtvih ćelija. Brojanje ćelija je vršeno mikroskopski na hemocitometru. Za postavljanje eksperimenata brojanja odnos razblaženja 0,4% TB rastvora u 1x PBS, 1x PBS i ćelija u medijumu je bio 5:3:2. U periodu od 5 min je omogućeno prodiranje TB u mrtve ćelije. Zatim je po 10  $\mu\text{l}$  obojene ćelijske suspenzije ubrizgano u obe izbrazdane komorice hemocitometra. Ćelije su brojane u obe komorice hemocitometra, u po 5 pet polja. Ukupan broj živih ćelija je određivan po sledećem obrascu:

ukupan broj ćelija/ml = prosečan broj ćelija po kvadrantu komorice x razblaženje ćelija x 10<sup>4</sup>, gde je 10<sup>4</sup> faktor komorice.

### 3.5. SRB TEST VIJABILNOSTI

Sulforodamin B (SRB) je negativno naelektrisna supstanca sa dve sulfonske grupe kojima se elektrostatički vezuje za bazne ostatke aminokiselina, bojeći ukupne proteine ćelija ružičastom bojom. Test je izveden prema modifikovanoj proceduri (Skehan i saradnici, 1990).



Ukratko, na kraju perioda predviđenog za tretman ćelija, u mikrotitar ploče sa 96 bunarića dodavano je po 50 µl 50% trihlor-sirćetne kiseline u svaki bunarić radi fiksacije ćelija. Fiksacija je trajala 1 h na 4 °C. Ćelije su potom ispirane pet puta tekućom vodom. Nakon toga, po 50 µl 0,4% rastvora SRB boje u 1% sirćetnoj kiselini je dodavano u svaki bunarić i ostavljano 30 min na sobnoj temperaturi. Višak boje je potom uklanjan ispiranjem 3 puta sa 200 µl 1% sirćetne kiseline po bunariću. Ploča je zatim sušena na 45 °C u termostatu. SRB koji je vezan za proteine je posle sušenja rastvoren u 10 mM TRIS-u (200 µl po bunariću). Na kraju testa apsorbancija je određivana na ELISA čitaču (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija), na talasnoj dužini 540 nm sa korekcijom na 670 nm.

### **3.5.1. JEDNOKRATNI TRETMANI I ISTOVREMENE KOMBINACIJE**

Za ispitivanje jednokratnog efekta lekova (BCNU, CPT, DOX, TMZ) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na inhibiciju rasta C6 i RC6 ćelija, ćelije su zasejavane 24 h pre tretmana. Nakon adaptacije ćelija, tretman lekovima je trajao 72 h. Opseg koncentracija korišćenih u tretmanima je varirao za različite lekove: BCNU (50–1000 µM), CPT (5–100 µM), DOX (25–500 nM), TMZ (5–250 µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10–250 nM). Za potrebe testova vijabilnosti ćelije su zasejavane u mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Gustina C6 i RC6 ćelija je bila 2 000 po bunariću u 100 µl medijuma. Kao kontrola su korišćene istovremeno zasejane netretirane ćelije. Pored pojedinačnih efekata lekova, ispitan je i istovremeni kombinovani efekat TMZ i CoQ10 u trajanju od 72 h na RC6 ćelijama. U istovremenim tretmanima korišćene su 3 koncentracije CoQ10 (5, 10 i 25 µM) u kombinaciji sa TMZ (10–250 µM).

### **3.6. ANALIZA EFEKATA DOBIJENIH KOMBINOVANJEM AGENASA**

Priroda međudejstva (sinergizam, antagonizam ili aditivni efekat) dva agensa je određena na osnovu rezultata dobijenih u SRB testu, a primenom CalcuSyn kompjuterskog softvera. Ovaj program koristi metod kombinacionog indeksa (Chou i Talalay, 1984), koji se zasniva na jednačini srednjeg efekta više agenasa. Metod uzima u obzir efekat svake supstance pojedinačno, efekat dve supstance u kombinaciji, kao i njihovih doza - efekat linearnog grafikona. Ova analiza zahteva da se raspolaže vrednostima inhibicije za po najmanje tri doze svake supstance pojedinačno. CalcuSyn program pruža mogućnost prikaza rezultata međudejstva dve supstance klasičnim izobologramom ili tabelarno sa vrednostima kombinacionog indeksa (CI). Raspodela vrednosti kombinacionog indeksa, koje opisuju prirodu međudejstva: sinergizam (CI < 0,9), antagonizam (CI > 1,1) i aditivni efekat (CI =

0,9-1,1), preuzeta je iz prethodno objavljenog rada (Peters i saradnici, 2000). CI vrednosti prikazane u ovom radu su reprezentativni rezultati dve sprovedene analize.

### 3.7. ANALIZA ĆELIJSKOG RASTA U REALNOM VREMENU

Razlika u stopi rasta C6 i RC6 ćelija, kao i stopa rasta RC6 ćelija u pojedinačnom i kombinovanom tretmanu sa CoQ10 i TMZ je ispitivana pomoću xCELLigence sistema za analiziranje ćelijskog rasta u realnom vremenu (engl. xCELLigence real-time cell analysis system – RTCA). RTCA sistem se sastoji iz sledećih delova: kompjutera opremljenog sa RTCA softverom za analizu podataka, mikrotitar ploče sa 96 bunarića opremljenih zlatnim elektrodama (E-ploča) i RTCA jedinice - nosača E-ploče, koja se tokom analize smešta u inkubator. Dodavanje medijuma ili pufera i aplikacija struje niske voltaže dovodi do stvaranja električnog polja između elektroda u bunarićima, dok u prisustvu ćelija dolazi do pojave otpora. Očitavanje otpora se vrši u realnom vremenu i predstavlja se kao CI vrednost (engl. Cell Index – CI), a direktno zavisi od ćelijskog pričvršćivanja za dno bunarića i deobe ćelija. CI vrednost u svakoj vremenskoj tački je definisana po formuli  $(R_n - R_b)/R_b$ , gde je  $R_n$  otpor između elektroda u bunariću koji sadrži medijum sa ćelijama, a  $R_b$  je osnovni (engl. background) otpor u bunariću koji sadrži samo medijum.

Pre sejanja ćelija u bunariće je sipano 50  $\mu$ l medijuma, nakon čega je E-ploča ostavljena 30 min u inkubatoru na 37 °C radi očitavanja osnovnog otpora. Po isteku ovog vremena u E-ploču je zasejano 4 000 C6 ili RC6 ćelija po bunariću i dodat je medijum do finalnih 200  $\mu$ l. Za tretman RC6 ćelija, nakon 6 h od sejanja, ćelije su tretirane sa 10  $\mu$ M CoQ10, posle 24 h sa 160  $\mu$ M TMZ i nakon 30 h ponovo sa 10  $\mu$ M CoQ10. Ispitivani su kako pojedinačni, tako i kombinovani tretmani u istom vremenskom rasporedu aplikacije. Vrednost otpora je automatski merena na svakih 30 min u trajanju od 96 h ili 120 h. Dobijeni rezultati su obrađeni u RTCA softveru i izraženi kao CI vrednost. Stopa ćelijskog rasta je izračunata iz nagiba krive rasta između dve izabrane vremenske tačke, koje ograničavaju deo krivulje sa logaritamskim rastom kontrolnih netretiranih ćelija.

### 3.8. ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI

Procenat živih, apoptotskih i nekrotskih ćelija je ispitivan aneksin V-FITC (AV)/propidijum jodid (PI) paketom. Obeležavanje aneksinom je karakteristično za ćelije u apoptozi jer aneksin ima visok afinitet vezivanja za membranski fosfatidil serin (PS), koji se već u ranoj fazi apoptoze premešta sa unutrašnje strane ćelijske membrane na površinu ćelije.

PI ulazi u ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane i na taj način obeležava već mrtve tzv. nekrotične ćelije. Kombinovanjem ova dva agensa mogu se razlikovati žive ćelije (AP-PI-), ćelije u apoptozi (AP+PI-), kasno apoptotske i/ili ćelije u nekrozi (AP+PI+) i sekundarno nekrotične ili mrtve ćelije (AP-PI+).

Za potrebe ovog eksperimenta, C6 i RC6 ćelije su inkubirane preko noći u adherentnim pločama sa 6 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska), nakon čega su podrgute jednokratnom tretmanu sa 100  $\mu$ M BCNU, 5  $\mu$ M CPt, 25  $\mu$ M TMZ i 25 nM DOX. Pored pojedinačnih efekata lekova, ispitan je i istovremeni kombinovani efekat TMZ i CoQ10 na RC6 ćelije. U istovremenim tretmanima korišćeno je 160  $\mu$ M TMZ u kombinaciji sa 10  $\mu$ M CoQ10. Gustina C6 i RC6 ćelija je bila 100 000 po bunariću u 2 ml medijuma. Tretmani su trajali 72 h nakon čega su sakupljene i adherentne i plivajuće ćelije. Ćelijski talog je resuspendovan u 100  $\mu$ l 1 x pufera za vezivanje u koji je dodato 2  $\mu$ l AV i 2  $\mu$ l PI. Ćelije su zatim inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija je stopirana dodavanjem 200  $\mu$ l 1 x pufera za vezivanje. Analiza ćelijske smrti je ispitivana na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Zelena fluorescencija AV je merena na kanalu za fluorescenciju 1 (FLH-1), dok je crvena fluorescencija PI merena na kanalu za fluorescenciju 2 (FLH-2). Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja. Rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro.

### **3.9. IZOLACIJA RNK IZ ĆELIJA I REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCije**

#### **3.9.1. IZOLACIJA RNK**

Ukupna RNK iz ćelija je izolovana Trizol® reagensom prema proceduri proizvođača: Liziranje i homogenizacija – C6 i RC6 ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup>. Ćelije su tripsinizirane i centrifugirane 5 min na 1 800 rpm. Po odlivanju supernatanta, ćelije su resuspendovane u PBS-u nakon čega su ponovo centrifugirane 5 min na 1 800 rpm. Supernatant je odliven, pa su ćelije lizirane 5 min sa 1 ml Trizol-a. Ovako lizirani i homogenizovani uzorci čuvani su na -80 °C najviše mesec dana.

Razdvajanje faza – Homogenizovani uzorci su otapani na sobnoj temperaturi, ukoliko su zamrznuti, da bi nukleoproteinski kompleksi u potpunosti disosovali. U svaki uzorak je zatim dodavano 200  $\mu$ l hloroforma. Pošto se snažno protresu, uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi još 2-3 min. Zatim sledi centrifugiranje 15 min na 12 000 x g pri 4 °C na centrifugi sa hlađenjem (Centrifuge 5427R Eppendorf, Nemačka). Na taj način smeša je

razdvajana na tri faze, donju crvenu fenol-hloroformsku, interfazu i gornju bezbojnu vodenu fazu u kojoj se nalazi RNK. Vodenu fazu čini 60% zapremine Trizol-a korišćenog za liziranje. Precipitacija RNK – Vodena faza se pažljivo prenosi u nove tubice i dodaje 500 µl izopropanola. Uzorci se zatim inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi, pa centrifugiraju 10 min na 12 000 x g pri 4 °C. Na taj način RNK precipitira formirajući beličasti talog na dnu tubica.

Ispiranje RNK – Supernatant se uklanja i talog RNK se ispira sa 1 ml 75% rastvora etanola u 0,1% DEPC vodi. Uzorci se centrifugiraju 5 min na 7 500 x g pri 4 °C.

Rastvaranje RNK – Nakon centrifugiranja uzoraka, etanol je odlivan i talog je sušen na sobnoj temperaturi. RNK je rastvarana u 0,1% DEPC vodi. DEPC je potentni inhibitor RNKaze. Koncentracija RNK je merena spektrofotometrijski (Biophotometer, Eppendorf, Nemačka).

### **3.9.2. PROVERA KVALITETA RNK**

Kvalitet RNK je ispitivan elektroforezom uzoraka na 1,3% agaroznom gelu (1,3 g agaroze u 100 ml 1 x TBE pufera) sa 0,4 µg/ml etidijum bromida. Uzorak RNK je pre nanošenja na gel mešan sa 0,4% rastvorom bromfenol plavo u 50% glicerolu u zapreminskom odnosu 1:1.

Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu pri 100 V, RNK je vizualizovana na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Kvalitet izolovane RNK je utvrđivan upoređivanjem odnosa inteziteta 28S i 18S traka.

### **3.9.3. REAKCIJA REVERZNE TRANSKRIPCIJE**

Totalna RNK (2,5 µg) dopunjena sa 0,1% DEPC vodom do 25,5 µl je pripremana za RT reakciju zagrevanjem na 65 °C, 10 min. RT miks (0,65 µM oligo-dT<sub>16</sub>, 1 x pufer, 50 µM dATP, 50 µM dTTP, 50 µM dGTP, 50 µM dCTP, 10 mM DTT, 0,4 UI/µl RNazin i 4 UI/µl M-MLV reverzna transkriptaza) je zatim dodavan ohlađenim uzorcima RNK do finalne zapremine 50 µl. RT reakcija je trajala 2 sata na 37 °C, a zaustavljena je zagrevanjem uzoraka 5 min na 95 °C. Uzorci su ohlađeni i dobijena kDNK (100 ng/µl) je čuvana na -20 °C.

## **3.10. ANALIZA EKSPRESIJE GENA RT-PCR METODOM**

Semikvantitativnom RT-PCR analizom se istovremenom amplifikacijom određuje nivo ekspresije gena od interesa u odnosu na nivo ekspresije nekog kontrolnog gena.

Kontrolni gen (endogena ili interna kontrola) predstavlja konstitutivno eksprimirani gen sa stabilnom ekspresijom nezavisno od tkiva, sredinskih faktora i stanja u kojem se ćelija nalazi.

RT-PCR reakcija je korišćena za detekciju ekspresije iRNK u C6 i RC6 ćelijama sa odgovarajućim prajmerima za gene: *Bax*, *Bad*, *Bcl-2* (Ge i saradnici, 2004), *Bcl-Xl* (Bar-Am i saradnici, 2005), *kaspaza 3* (Liu i saradnici, 2002), *Hif-1 $\alpha$*  (Palladino i saradnici, 2011), *MnSOD* (Wu i saradnici, 2011), *iNOS* (Mattson i Wu, 2000) i *Topo2 $\alpha$*  (Bethel i saradnici, 2009). Kao interne kontrole korišćene su ekspresije iRNK sa odgovarajućim prajmerima za gene: *p1b15* (Marlier i saradnici, 1996) za normalizaciju ekspresije *Bad*, *gapdh* (glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza) (Wong i saradnici, 1994) za normalizaciju ekspresije *Bax*, *Bcl-2*, *Hif-1 $\alpha$* , *Topo2 $\alpha$*  i *Bcl-Xl*, a  $\beta$ -*aktin* (NicAmhlaobh i saradnici, 1999) za normalizaciju ekspresije *kaspaze 3*, *MnSOD* i *iNOS*. Različite endogene kontrole su korišćene kako bi se izbeglo preklapanje signala kontrolnih i ciljnih gena usled približno istih dužina umnoženih fragmenata. PCR reakcije su izvođene na GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD). Uslovi korišćeni za amplifikaciju gena *Bax*: inicijalna denaturacija na 94 °C 5 min, 27 ciklusa na 94 °C 15s, 60 °C 30s, 72 °C 30s i na 4 °C neograničeno dugo; za amplifikaciju gena *Bad*, broj ciklusa je povećan na 32, a temperatura hibridizacije amplimera na 62 °C, dok je za amplifikaciju gena *kaspaza 3* temperatura hibridizacije amplimera smanjena na 56 °C; za amplifikaciju gena *Bcl-2* i *Bcl-Xl*, temperatura hibridizacije amplimera se odvijala 26 ciklusa na 56 °C. Amplifikacija gena *Hif-1 $\alpha$*  i *Topo2 $\alpha$*  se odvijala 28 ciklusa na 56 °C, a amplifikacija gena *MnSOD* i *iNOS* na 30 i 32 ciklusa, redom. Da bi se postigla linearna amplifikacija, amplimer *gapdh* je korišćen u odnosu 1:2, 1:3, 1:6, 1:2 i 1:3 prema *Bax*, *Hif-1 $\alpha$* , *Bcl-2*, *Topo2 $\alpha$*  i *Bcl-Xl* amplimerima, redom. Odnos *p1b15:Bad* je bio 1:2. Amplimer  $\beta$ -*aktin* je korišćen u odnosu 1:3, 1:2 i 1:4 prema *kaspaza 3*, *MnSOD* i *iNOS* amplimerima, redom. 100 ng kDNK je upotrebjeno za amplifikaciju svih iRNK. U svim reakcijama koncentracija MgCl<sub>2</sub> je finalno iznosila 2 mM, a finalna koncentracija svakog dNTP 0,2 mM. Provera PCR reakcija je vršena višestrukim ponavljanjem amplifikacije uzoraka poreklom iz dve nezavisne RT reakcije.

PCR produkti su analizirani na 2% agaroznom gelu u sistemu za horizontalnu elektroforezu (Bio-Rad, SAD). Na gelu je analiziran ceo reakcioni volumen od 25  $\mu$ l sa dodatkom 5  $\mu$ l 0,4% bromfenol plavo u 50% glicerolu. Nakon elektroforeze u 1 x TBE puferu produkti su vizualizovani na „Gel-Doc“ sistemu (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Densitometrijska analiza i kvatifikacija dobijenog signala je vršena na „Multi-Analyst/PC Software Image Analysis System“ (Gel-Doc 1000, Bio Rad, SAD). Dobijene vrednosti signala za određeni gen u svakom uzorku su izražene relativno u odnosu na vrednost signala

interne kontrole. Tako dobijene relativne ekspresije su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

### **3.11. ANALIZA EKSPRESIJE GENA METODOM KVANTITATIVNOG RT-PCR U REALNOM VREMENU**

Kvantitativni RT-PCR omogućava određivanje nivoa PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu. U toku PCR reakcije se detektuje signal koji potiče od fluorescentne probe, a čiji je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo. Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se „*threshold cycle*“– Ct. Vrednost Ct je obrnuto proporcionalna količini ciljne sekvence u uzorku. Tako, što je veći početni broj kopija ciljne sekvence, Ct je niži, i obrnuto.

Kvantitativni PCR u realnom vremenu je korišćen za detekciju ekspresije sledećih iRNK u C6 i RC6 ćelijama: *Gpx* (Yeh i Yen, 2006), *Abcb1*, *Mrp1* (Angelastro i Lamé, 2010), *Mmp2* i *Mmp9* (Petkovic i saradnici, 2015). Pripremljena kDNK je amplifikovana korišćenjem Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, SAD), po uputstvu proizvođača. SYBR Green predstavlja interkalirajuću fluorescentnu boju koja se nespecifično vezuje za dvolančani DNK molekul. PCR reakcije su izvođene na ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, SAD) u ukupnom volumenu od 20 µl. Sledeći uslovi su korišćeni za amplifikaciju gena: inicijalni korak na 50 °C 5 min, zatim denaturacija na 95 °C 10 min i 40 ciklusa na 95 °C 15s i 60 °C 60s. Nakon završenog procesa ampifikacije, rezultati su analizirani korišćenjem 7000 System Software (Applied Biosystems, SAD) i predstavljeni kao  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak i Schmittgen, 2001).  $\Delta Ct$  predstavlja razliku između Ct vrednosti specifičnog gena, izražene u odnosu na ekspresiju  $\beta$ -aktina kao endogene kontrole.

### **3.12. IZOLACIJA PROTEINA IZ ĆELIJA I WESTERN BLOT ANALIZA**

#### **3.12.1. IZOLACIJA I ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA**

Za potrebe izolacije proteina,  $1 \times 10^6$  C6 i RC6 ćelija je homogenizovano na ledu u puferu za liziranje. Kao pufer za liziranje korišćen je RIPA pufer (50 mM Tris– HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Triton X-100, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) kome je neposredno pred upotrebu dodat kompletan koktel proteaznih inhibitora (Roche, Nemačka), kao i fosfatadni inhibitori (25 mM NaF, 5 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Homogenati su

sonifikovani i centrifugirani na 16 000 x g, 30 min na 4 °C, a supernatant sa solubilnim proteinima uzet je za dalje analize. Do analiza, uzorci su čuvani na -80<sup>0</sup>C.

Koncentracija ukupnih proteina određena je metodom po Loriju (Lowry i saradnici, 1951). U alkalnim uslovima, kupri joni bakra (Cu<sup>2+</sup>) se heliraju za peptidne veze proteina što rezultuje u njegovoj redukciji do kupro jona (Cu<sup>+</sup>). Kupro joni se mogu detektovati Folin Čikalteovim reagensom. Proizvod je plave boje i apsorbuje svetlost pri 650-750 nm, a intezitet boje odgovara količini peptidnih veza, odnosno proteina. Uzimano je 20 µl uzoraka razblaženih 10 puta u destilovanoj vodi i mešano (uz snažno vorteksiranje) sa 300 µl rastvora 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O i 2% K-Na-tartarat u H<sub>2</sub>O, pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 µl Folin Čikalteu reagensa razblaženog 5 puta u destilovanoj vodi. Narednih 30 min, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi uz povremeno vorteksiranje. Apsorbanca uzoraka merena je na 670 nm na ELISA čitaču (LKB 5060-006 Micro Plate Reader, Austrija). 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.

### 3.12.2. ELEKTROFOREZA PROTEINA

Elektroforetsko razdvajanje proteina prema molekularnoj težini vršeno je na SDS denaturišućim poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE). Korišćena je mini aparatura za elektroforezu (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Gel za razdvajanje je pored akrilamid/bisakrilamida (Sigma Aldrich, Nemačka) u odnosu 29:1, čija je finalna koncentracija u smeši iznosila 12%, sadržavao i 0,375 M Tris pH 8,8 i 0,1% SDS. Gel za koncentrisanje bio je sledećeg sastava: 5% akrilamid/bisakrilamid (29:1); 0,125 M Tris pH 6,8 i 0,1% SDS. Za polimerizaciju je korišćeno 60 µl 10% amonijum persulfata i 5 µl TEMED-a na 10 ml smeše, za oba gela.

Količina proteina koja je nanošena na gel je optimizovana eksperimentalno za svaki protein pomoću krivih sa sukcesivnim razblaženjima proteina, a sa koncentracijama primarnog antitela preporučenim od strane proizvođača. Kao optimalna količina proteina uzeta je ona koja se nalazi u linearnom opsegu krive u zavisnosti od intenziteta signala i količine nanetih proteina. Za analizu ekspresije proteina nanošeno je 30 µg proteina po bunariću. Kao pufer za nalivanje korišćen je 2 x Laemmli pufer (31,25 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 1% SDS; 5% 2-merkaptetanol; 0,025% bromfenol plavo) dodat uzorku u odnosu

1:1. Uzorci su pre nalivanja dodatno denaturisani kuvanjem 5 min na 95 °C. Kao standard za molekulska težinu korišćen je obojeni "Rainbow" marker širokog opsega (GE Healthcare, USA). Elektroforeza je vršena u puferu za elektroforezu standardnog sastava (192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3; 0.1% SDS) pod konstantnim naponom od 150 V na sobnoj temperaturi.

### **3.12.3. ELEKTROTRANSFER PROTEINA**

Prenos (transfer) proteina sa poliakrilamidnog gela na PVDF membranu je vršen korišćenjem sistema za transfer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, SAD). Nakon završene elektroforeze, gel za razdvajanje je pažljivo uklonjen sa staklene ploče i prenet u posudu sa puferom za transfer (20% metanol; 192 mM glicin; 25 mM Tris pH 8,3), gde je ostavljen narednih 30 min (ekvilibracija gela). PVDF (Hybond-P, GE Healthcare, Velika Britanija) je prvo aktivirana u metanolu a zatim isprana u destilovanoj vodi 5 min. Nakon toga je prebačena u posudu sa puferom za transfer gde je ekvilibrisana narednih 20 min. Pomoćne komponente (filter papir, Watman papir, sunđer) su takođe pripremljene potapanjem u pufer za transfer 20 min. Nakon slaganja svih komponenti u kasetu za transfer i ulaganja u tank sa puferom, elektrotransfer proteina je vršen preko noći, pod konstantnim naponom od 30 V. Po završenom transferu, membrane su sušene na sobnoj temperaturi (120 min, po preporuci proizvođača). Vizuelizacija proteinskih traka je vršena nakon aktivacije suvih membrana (kratko potapanje u metanol), potapanjem u Ponceau S boju (1% Ponceau S boja; 5% glacijalna sirćetna kiselina; destilovana voda). Gelovi su bojani Coomassie Brilliant Blue bojom (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250; 10% glacijalna sirćetna kiselina; 45% metanol; destilovana voda), u cilju dobijanja vizuelne potvrde uspešnosti transfera. Membrane su zatim odbojene ispiranjem u destilovanoj vodi.

### **3.12.4. IMUNOLOŠKA DETEKCIJA IMOBILIZOVANIH PROTEINA**

Detekcija je rađena na membranama koje su blokirane u rastvoru obranog mleka (5%) u Tris-boratnom puferu sa dodatkom Tween-20 deterdženta (TBS-T: 20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM natrijum hlorid; 0,05% Tween 20). Blokiranje membrane je trajalo oko 60 min na sobnoj temperaturi, a rađeno je u cilju smanjivanja intenziteta nespecifičnog vezivanja antitela. Nakon blokiranja membrane su ispirane u TBS-T puferu 15 min, koji je zatim odliven i zamenjen rastvorom za blokiranje u koji su dodata primarna antitela. Korišćena su sledeća primarna antitela: zečje poliklonsko antitelo za Bad (Santa Cruz Biotechnology, SAD; razblaženje 1:1000), zečje poliklonsko antitelo za Bcl-2 (Cell Signaling Technology,



SAD; razblaženje 1:1000), zečje poliklonsko antitelo za prokaspazu 3 (Santa Cruz Biotechnology, SAD; razblaženje 1:1000). Nakon inkubiranja sa primarnim antitelom preko noći na 4 °C, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u TBS-T puferu (da bi se uklonila primarna antitela koja se nisu specifično vezala), i potom dalje inkubirane 60 min na sobnoj temperaturi sa poliklonskim anti-zečijim antitelom IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, SAD; razblaženje 1:1000). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrane su ispirane 3 puta po 10 min u TBST-u, a zatim izložene dejstvu luminola (Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent, Solution A and Solution B, Santa Cruz Biotechnology, SAD). Membrana je inkubirana u substratu 1 minut, ocedena i izložena autoradiografskom filmu osetljivom na plavu svetlost (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, SAD) u trajanju od 1 do 5 min. Filmovi su razvijeni odmah po završetku ekspozicije membrane i skenirani radi dalje analize.

### **3.12.5 SEMIKVANTITATIVNA ANALIZA IMUNOBLOTOVA**

Intenzitet dobijenih signala kvantifikovan je denzitometrijski, korišćenjem kompjuterskog programa za analizu signala (TotalLab (Phoretix) v1.1). Vrednosti dobijene za ciljne proteine su normalizovane u odnosu na odgovarajući  $\beta$ -aktin, kao kontrolu za nanetu količinu totalnih proteina. Tako dobijene relativne vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje.

### **3.13. ANALIZA PRISUSTVA REAKTIVNIH KISEONIČNIH VRSTA**

Za analizu prisustva reaktivnih kiseoničnih vrsta:  $O_2^-$  (superoksidni anjon),  $H_2O_2$  (vodonik peroksid) i  $ONOO^-$  (peroksinitritni anjon) su korišćeni reagensi dihidroetidijum (DHE) i dihidrorodamin 6G (DHR). DHE, koji fluorescira plavo, u prisustvu kiseoničnog anjona prelazi u etidijum, jedinjenje koje emituje crvenu fluorescencu i ugrađuje se u molekul DNK. DHR je nefluorescentni molekul koji u kontaktu sa reaktivnim kiseoničnim vrstama biva oksidovan i preveden u rodamin 123 koji emituje fluorescencu u zelenom spektru. Intenzitet fluorescence proporcionalan koncentraciji reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćelijama je očitavan na protočnom citofluorimetru.

Za potrebe ovog eksperimenta C6 i RC6 ćelije su inkubirane preko noći u adherentnim pločama sa 6 bunarića (Nunc, Nalgene, Danska). Početni broj zasejanih C6 i RC6 ćelija je iznosio 100 000 po bunariću u 2 ml medijuma. Analiziran je nivo slobodnih radikala kod C6 i RC6 ćelija, kao i u jednokratnom tretmanu sa 100  $\mu$ M BCNU i 5  $\mu$ M Cpt. Nakon 24 h,

adherentne ćelije su tripsinizirane i inkubirane sa 1  $\mu$ l DHE ili DHR 30 min na 37 °C u mraku. Zatim su ćelije dva puta ispirane u hladnom PBS-u. Analiza je vršena na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Zelena fluorescencija poreklom od reakcije DHR sa kiseoničnim vrstama je merena na kanalu za fluorescenciju 1 (FLH-1), dok je crvena fluorescencija poreklom od reakcije DHE sa kiseoničnim vrstama merena na kanalu za fluorescenciju 2 (FLH-2). Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja. Rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro.

### **3.14. AKUMULACIJA DOKSORUBICINA**

Akumulacija DOX-a je analizirana metodom protočne citofluorimetrije korišćenjem sposobnosti DOX-a da emituje fluorescenciju. Citofluorimetrijski određen intenzitet fluorescencije DOX-a u vijabilnim ćelijama, je srazmeran njihovoj akumulaciji (Zheng i saradnici, 2009).

Za potrebe ovog eksperimenta C6 i RC6 ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup>. Nakon postizanja 80-90% konfluentnosti, ćelije su tripsinizirane i resuspendovane u tubama sa 1 ml medijuma. Zatim su ćelije tretirane 20  $\mu$ M DOX-om i inkubirane 30 min na temperaturi 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju, ćelije su nataložene centrifugiranjem 5 min na 1800 rpm. Zatim su isprane hladnim 1x PBS-om i ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Ćelije spremne za analizu na citofluorimetru su resuspendovane u 1x PBS-u sa 10% FBS-om i čuvane na 4 °C u mraku.

Akumulacija DOX-a je analizirana na protočnom citofluorimetru FACSCalibur (Becton Dickinson, Velika Britanija). Narandžasta fluorescencija DOX-a je merena na kanalu za fluorescenciju 2 (FLH-2) pri talasnoj dužini 530 nm. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja. Rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro.

### **3.15. KOLORIMETRIJSKA DETEKCIJA GLUTATIONA**

Koncentracija redukovano i ukupnog glutaciona u ćelijama je određivana korišćenjem APOGSH<sup>TM</sup> Glutathione Colorimetric Detection paketa (GSH Colorimetric Detection Kit, Bio-Vision, SAD). Esej se zasniva na reakciji DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) sa GSH pri čemu se stvaraju 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina i oksidovani glutation (GSSG). 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina je produkt žute boje srazmeran koncentraciji GSH u ćeliji. 5-

sulfosalicilna kiselina (SSA) uklanja proteine iz uzorka i štiti GSH od oksidovanja i delovanja  $\gamma$ -glutamil transpeptidaze.

Za potrebe eksperimenta ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup>. Nakon tripsinizacije, po  $1,5 \times 10^6$  C6 i RC6 ćelija je centrifugirano 5 min na 700 x g pri 4 °C. Nakon odlivanja supernatanta, ćelijski talog je resuspendovan u 0,5 ml hladnog PBS-a i uzorci su ponovo centrifugirani 5 min na 700 x g pri 4 °C. Talog ćelija je liziran dodavanjem 80  $\mu$ l hladnog glutationskog pufera 10 min na ledu. Zatim je u svaki uzorak dodato po 20  $\mu$ l 5% SSA. Uzorci su dobro promešani i centrifugirani 10 min na 8 000 x g pri 4 °C. Izdvojen supernatant je prenošen u nove tubice i korišćen za određivanje redukovano i ukupnog glutaciona. Za detekciju totalnog glutaciona, glutationski pufer (120  $\mu$ l) je sipan u svaki bunarić mikrotitar ploče sa 96 bunarića, zatim 20  $\mu$ l NADPH generišuće smeše, 20  $\mu$ l glutation reduktaze i 20  $\mu$ l standarda ili uzorka. Za detekciju redukovano glutaciona, umesto NADPH generišuće smeše i glutation reduktaze, korišćen je glutationski pufer. Finalno, žuta boja je razvijana pažljivim mešanjem uzoraka sa 20  $\mu$ l rastvora supstrata. Apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini 405 nm na ELISA čitaču (LKB 5060–006 Micro Plate Reader, Austrija). Koncentracija redukovano glutaciona ( $\mu$ g/ $\mu$ l) i totalnog glutaciona (ng/ $\mu$ l) je određivana na osnovu kalibracione standardne krive formirane za redukovani i totalni glutation u softverskom programu GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., SAD). Koncentracija oksidovanog glutaciona (GSSG) predstavlja razliku između totalnog i redukovano glutaciona (GSH).

### 3.16. MERENJE UNUTARĆELIJSKOG pH

Unutarćelijski pH je određivan pomoću BCECF AM, pH senzitivog indikatora. BCECF AM ima sposobnost da prolazi kroz ćelijsku membranu nesmetano. Nakon ulaska u ćeliju, lipofilne grupe bivaju isečene nespecifičnim esterazama, što prevodi nefluorescentni BCECF AM u fluorescentni BCECF i istovremeno sprečava njegov izlazak iz ćelije.

Za potrebe eksperimenta, ćelije su kultivisane u flaskovima površine 25 cm<sup>2</sup>. Nakon tripsinizacije, po  $1 \times 10^6$  C6 i RC6 ćelija je resuspendovano u 1 ml PBS-a (pH 7,4). Zatim je ćelijama dodato 4  $\mu$ l 1 mM rastvora BCECF AM i inkubacija je trajala 30 min na temperaturi 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub>. Na kraju perioda predviđenog za akumulaciju, ćelije su nataložene centrifugiranjem 5 min na 1800 rpm. Zatim su isprane dva puta 1x PBS-om i ponovo centrifugirane 5 min na 1800 rpm. Ćelije spremne za analizu na citofluorimetru su resuspendovane u 1x PBS-u i čuvane na ledu u mraku. Unutarćelijski pH je analiziran na

protočnom citofluorimetru BD FACSAria III (Becton Dickinson, Velika Britanija). Intenzitet fluorescence je očitavan na dve različite talasne dužine 525 i 640 nm, jer se rezultati dobijeni sa BCECF AM predstavljaju ratiometrijski. Tako, niže vrednosti odnosa 525/640 nm ukazuju na niži pH, a više vrednosti na viši pH. Za analizu u svakom uzorku je prikupljeno 10 000 pojedinačnih događaja. Rezultati su analizirani softverskim paketom CellQuest Pro.

### 3.17. FLUORESCENTNA MIKROSKOPIJA

Priprema ćelija za posmatranje na fluorescentnom mikroskopu, u ovde opisanim eksperimentima, je obuhvatala sejanje i inkubiranje C6 i RC6 ćelija preko noći u adherentnim predmetnim pločicama sa 8 komorica (Nunc, Nalgene, Danska). Gustina C6 i RC6 ćelija je bila 25 000 po komorici u 500  $\mu$ l medijuma.

Za detekciju DNK oštećenja ćelije su obeležene fosfo-histon H2A.X (Ser 139) antitelom. Ovo antitelo se koristi za detekciju fosforilisane forme histona H2A.X koji se nakuplja na mestima dvolančanih DNK prekida, što ujedno predstavlja prvi korak u regrutovanju sistema za opravku DNK. Analiziran je nivo DNK oštećenja kod C6 i RC6 ćelija nakon jednokratnog tretmana sa 100  $\mu$ M BCNU, 5  $\mu$ M CPT, 25  $\mu$ M TMZ i 25 nM DOX. Nakon 24 h tretmana, izvučen je medijum iz komorica i ćelije su isprane 3 puta PBS-om. Nakon toga je vršena fiksacija 4% rastvorom PFA 15 min. Ćelije su isprane 3 puta PBS-om i vršeno je blokiranje mesta za nespecifično vezivanje antitela 2% BSA u PBS-u sa 0,3% Triton<sup>TM</sup> X-100. Zatim su ćelije inkubirane sa zečjim poliklonskim fosfo-histon H2A.X antitelom (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:1000) na 4 °C preko noći. Usledilo je ispiranje 3 puta sa PBS-om, a potom su ćelije inkubirane sa sekundarnim Alexa Fluor 488 kozjim anti-zečjim antitelom (Invitrogen Life Technologies, SAD; razblaženje 1:1000) 2 h na sobnoj temperaturi.

Za analizu ćelijske smrti, C6 i RC6 ćelije su podvrgnute jednokratnom tretmanu sa 100  $\mu$ M BCNU, 5  $\mu$ M CPT, 25  $\mu$ M TMZ i 25 nM DOX. Nakon 72 h tretmana, izvučen je medijum iz komorica i ćelije su isprane 3 puta PBS-om. U komorice je dodato 250  $\mu$ l 1 x pufera za vezivanje sa 0,625  $\mu$ l AV. Inkubacija se odvijala 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon odlivanja, dodato je novih 250  $\mu$ l 1 x pufera za vezivanje sa 5  $\mu$ l PI. Inkubacija se odvijala 15 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su ćelije isprane 5 puta PBS-om.

Za detekciju prisustva reaktivnih kiseoničnih vrsta u C6 i RC6 ćelijama, direktno u medijum sa ćelijama je dodato 1  $\mu$ l DHE ili 1  $\mu$ l DHR, 1 h na 37 °C. Zatim su ćelije 3 puta ispirane u PBS-u.

U svim eksperimentima, na kraju procedure za bojenje ćelija, nakon poslednjeg ispiranja ili fiksiranja u 4% PFA, dodat je Hoechst 33342, 15 min na sobnoj temperaturi radi vizualizacije ćelijskih jedara, a zatim je vršeno montiranje pokrovne pločice u rastvoru glicerola. Svi pomenuti preparati su slikani na 20 puta uvećanju na Zeiss Axiowert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem AxioVision 4.8. softvera.

### 3.18. DEGRADACIJA ŽELATINA

Merenjem stepena degradacije želatina utvrđuje se sposobnost ćelija da degradiraju vanćelijski matriks. Kao model koristi se želatin od svinjske kože koji je konjugovan sa fluorescentno zelenom bojom (engl. Gelatin From Pig Skin, Oregon green 488 conjugate), proizvođača Life Technologies, SAD. Ovaj želatin je supstrat za matriksne metaloproteinaze MMP2 i MMP9. Praćena je sposobnost C6 i RC6 ćelijske linije da degradiraju vanćelijski matriks, kao i uticaj pojedinačnih i kombinovanog tretmana 10  $\mu$ M CoQ10 i 250  $\mu$ M TMZ na sposobnost RC6 ćelija da degraduju vanćelijski matriks. Postupak se sastoji iz više faza.

Pokrovna stakla su sterilisana 3 h na 180 °C i postavljena u ploče sa 6 bunarića.

Želatin je prethodno zagrejan 10 min na 37 °C i rastvoren u PBS puferu u odnosu 1:5. Ovako pripremljeni želatin (1 mg/ $\mu$ l finalno) je sipan na svako pokrovno staklo, a potom je dodato 50  $\mu$ l 0,25% gluteraldehida, koji služi sa umrežavanje želatina i stvaranje njegove nerastvorljive varijante.

Pokrovna stakla se okrenu tako da želatin bude sa donje strane i ploča sa 6 bunarića se inkubira 15 min na 4 °C, a zatim se pločice prebace u novu ploču sa 6 bunarića tako da želatin bude sa gornje strane pokrovnog stakla. Želatin se ispere 3 puta PBS-om i pokrovna stakla su tada spremna za eksperiment.

Prethodno umnožene C6 i RC6 ćelije su prebrojane i po 20 000 ćelija je zasejano od svake linije na pokrovna stakla. Ćelije su držane 3 h u inkubatoru na 37 °C. Nakon toga je dodato po 1 ml DMEM medijuma u sve bunariće. Za tretman je dodavano 10  $\mu$ M CoQ10, 250  $\mu$ M TMZ ili kombinacija ova dva agensa.

Nakon 24 h inkubacije, medijum je odliven i ćelije su fiksirane sa 4% PFA. Zatim je dodat 0.1% rastvor Triton<sup>TM</sup> X-100 u PBS puferu. Posle 10 min na pločice je sipan ActinRed<sup>TM</sup> 555 (Life Technologies, SAD) prema protokolu proizvođača. Nakon bojenja sa Hoechst 33342, pokrovna pločica se montira u glicerol rastvoru. ActinRed<sup>TM</sup> 555 služi za vizuelizaciju aktina, a Hoechst 33342 za vizuelizaciju ćelijskih jedara. Pločice su slikane na

40 puta uvećanju na Zeiss Axiowert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem AxioVision 4.8. softvera.

Rezultati su analizirani u programu ImageJ. Meren je broj ćelija koje su degradirale želatin kao i obim degradirane oblasti u želatinu. Izražen je odnos obima degradirane oblasti u odnosu na obim ćelija što predstavlja stepen degradacije pojedinačne ćelije. Analizirano je minimum 100 ćelija.

### 3.19. TEST INVAZIVNOSTI ĆELIJA

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 vanćelijskog matriksa ili bazalne membrane (invazija). Sposobnost invazije ćelija utvrđena je ispitivanjem migracije ćelija kroz poroznu membranu obloženu matrigelom. U tu svrhu se koristi komercijalno dostupan Matrigel® - smeša vanćelijskih proteina koje sekretuju Engelbret-Holm-Svarm (EHS) ćelije mišjeg sarkoma. Za procenu migracije ćelija *in vitro* korišćene su komorice čije je dno u vidu membrane, prečnika 6,4 mm, a dijametrom 8 µm (BD Labware, Bedford, SAD). Komorice 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 ng/ml finalno po membrani) kome je dozvoljeno da polimeriše 24 h na 37 °C. U bunariće se prvo sipa medijum (za pozitivne kontrole i tretmane se sipa medijum sa 10% FBS, dok se za negativnu kontrolu sipa medijum bez FBS), a zatim postavljaju komorice sa pripremljenim matrigelom. U same komorice, direktno na sloj matrigela, se sipa 70 000 ćelija u medijumu bez FBS. Pored razlike u invaziji između C6 i RC6 ćelija, analiziran je i uticaj tretmana na inhibiciju invazije (10 µM CoQ10, 250 µM TMZ i kombinacija ova dva agensa). Uvek se pored tretmana postavljaju pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola su ćelije resuspendovane u medijumu bez FBS-a koje se kreću ka hemoatraktantu (medijum sa FBS-om). Ovako pripremljen eksperiment se drži u inkubatoru 24 h i nakon toga se analizira. Ćelije sa gornje strane membrane, koje nisu migrirale, se odstrane skreperom, membrana se iseče i montira na pločicu u Hoechst 33342 i glicerol rastvoru. Hoescht 33342 služi za vizuelizaciju jedara. Svako polje sa ćelijama na membrani se slika 10 puta na 10 puta uvećanju na Zeiss Axiowert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem AxioVision 4.8. softvera. Slike dobijene na fluorescentnom mikroskopu se analiziraju u ImageJ programu. Broj ćelija u svakom bunariću se normalizuje u odnosu na

broj ćelija u pozitivnoj kontroli sto ukazuje na stepen invazije ćelija. Eksperiment se smatra uspešnim ukoliko je u negativnoj kontroli migriralo manje od 15% ćelija u odnosu na 100% ćelija u pozitivnoj kontroli. Eksperiment je ponovljen tri puta.

### 3.20. FORMIRANJE SFEROIDA I 3D TEST INVAZIVNOSTI

Višećelijski tumorski sferoidi predstavljaju trodimenzionalne (3D) *in vitro* modele koji se u istraživanjima koriste kao posredni model između *in vitro* ćelijskih linija u kulturi i *in vivo* tumorskih modela. Ovaj model vernije prikazuje organizaciju tumora usled pojave interakcija među ćelijama i uticaja mikrosredine na ćelije.

Formiranje sferoida zahteva pripremu specijalnog medijuma sa metil celulozom, inertnim jedinjenjem koje potpomaže agregaciju ćelija i formiranje sferoida. Medijum se priprema dodavanjem 6 g veoma viskozne metil celuloze (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) u 500 ml DMEM medijuma. Polovina medijuma se ugrije do 50 °C, dok se druga polovina ostavi na sobnoj temperaturi. U ugrijanu polovinu se doda metil celuloza i sve zajedno se vrti na magnetnoj mešalici 15 do 20 min, nakon čega se doda druga polovina medijuma i drži 2 h na 4 °C. Kada se rastvori metil celuloza, vrši se centrifugiranje na 5 000 g u trajanju od 2 h. Po isteku ovog vremena pojavljuje se gornja prozirna i donja zamućena faza. Donja faza sadrži ostatke metil celuloze i stoga se za eksperimente uzima i čuva samo prozirna gornja faza.

Višećelijski sferoidi su formirani metodom viseće kapljice (engl. hanging drop method) (Laib i saradnici, 2009). Prethodno umnožene C6 i RC6 ćelije su prebrojane. Ćelijska suspenzija rastvorena u medijumu je mešana sa medijumom sa metil celulozom u odnosu 5:1. Kapljice volumena 25 µl su pipetirane na poklopac Petri šolje. Poklopac je postavljan na donji deo Petri šolje u koji je sipana sterilna voda radi sprečavanja isparavanja kapljica. Svaka kapljica je imala 500 ćelija. Nakon 24 h inkubacije, svaka kapljica je sadržala jedan dobro definisan sferoid.

Za potrebe 3D testa invazivnosti mikrotitar ploča sa 96 bunarića je obložena smešom 25 µl medijuma sa 25 µl hidrogela (17,85 µl kolagena tipa I (4,01 mg/ml radni rastvor); 0,45 µl 1M NaOH; 5 µl 5X DMEM; 1,7 µl dH<sub>2</sub>O), nakon čega se odvijala polimerizacija u inkubatoru 15 min. Na vrh je onda dodato 25 µl medijuma sa sferoidima pomešanih sa 25 µl hidrogela i opet je vršena polimerizacija 15 min u inkubatoru nakon čega je dodato 100 µl medijuma. Pored invazije C6 i RC6 sferoida, analiziran je i uticaj tretmana na inhibiciju invazije RC6 sferoida (10 µM CoQ10, 250 µM TMZ i kombinacija ova dva agensa), kao i

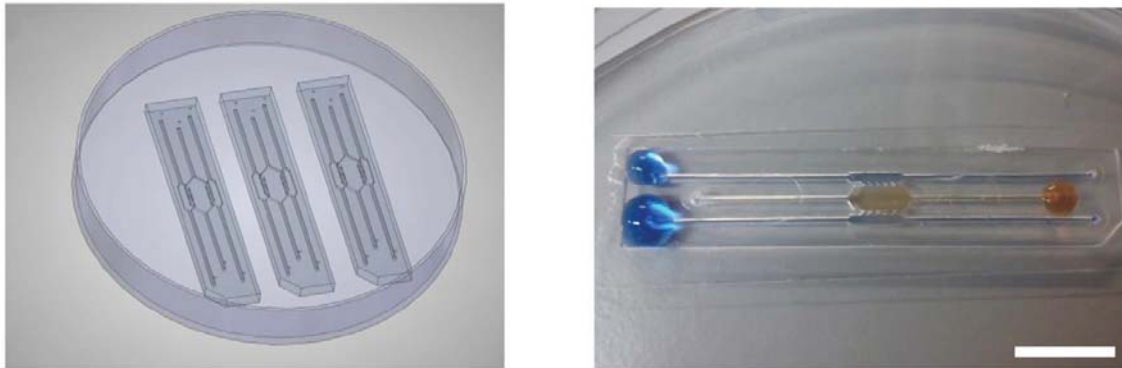
uticaj 50  $\mu\text{M}$  GM6001 na invaziju RC6 sferoida. Ovako pripremljen eksperiment se drži u inkubatoru 24 h i nakon toga se analizira.

Ćelijska vijabilnost je ispitivana kalcein acetoksimetil estar (CAM)/ propidijum jodid (PI) bojenjem. Nefluorescentni CAM (1:1000, 5 mg/ml radni rastvor) pasivno ulazi kroz ćelijsku membranu i u citoplazmi živih ćelija biva transformisan dejstvom esteraza u zeleno fluorescentni kalcein, koji otežano izlazi iz ćelije. PI (1:500, 2 mg/ml radni rastvor) ulazi u ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane i na taj način obeležava već mrtve ćelije. Bunarići sa sferoidima su slikani na 20 puta uvećanju na Nikon Eclipse Ti mikroskopu (Nikon Instruments Inc., Japan) opremljenim sa C1 modularnim konfokalnim sistemom. Rezultati su analizirani u programu Fiji®. Merena je veličina sferoida, odnosno površina koju on zauzima u hidrogelu, što ukazuje na stepen invazivnosti. Analizirano je najmanje 10 sferoida po eksperimentu. Eksperiment je ponavljen tri puta.

### **3.21. MODEL GLIOMA U MIKROFLUIDNIM ČIPOVIMA**

Mikrofluidni aparati predstavljaju novu generaciju bioloških testova i zahvaljujući specijalnom dizajnu i stacionarnom fluidnom protoku kroz aparat, u njima se uspostavljaju uslovi koji oponašaju uslove u tumorskoj mikrosredini. U ovom eksperimentu je korišćen mikrofluidni čip proizveden u Laboratoriji grupe za strukturnu mehaniku i modelovanje materijala (engl. Group of Structural Mechanics and Materials Modeling - GEMM), Univerziteta u Saragosi, Španija. Polistirenski mikrofluidni čip se sastoji iz centralne komore širine 2000  $\mu\text{m}$ , ograničene sa dva bočna kanala širine 700  $\mu\text{m}$ , dok je visina celog sistema 250  $\mu\text{m}$ . Specijanim dizajnom stubova koji ograničavaju centralnu komoru je sprečeno mešanje hidrogela u centralnoj komori i tečnosti koja se perfunduje kroz bočne kanale, kao i narušavanje strukture hidrogela. Odgovarajući prorezi na krajevima kanala omogućavaju ručno injektovanje pipetom (Slika 11). Pre upotrebe, čipovi su sterilisani potapanjem u 70% etanol. Nakon sušenja, ostavljeni su pod UV svetlom u laminaru 2 h.





**Slika 11. Izgled mikrofluidnog čipa.** Na slici levo su prikazana tri identična mikrofluidna čipa pričvršćena za dno Petri šolje biokompatibilnim adhezivom. Na desnoj strani je prikazan mikrofluidni čip sa hidrogelom u centralnoj komori, dok su bočni kanali perfundovani vodom obojenom u plavo, radi lakše vizualizacije. Kapljice su postavljene na krajevima proreza da bi se sprečilo isušivanje hidrogela i bočnih komora. Skala=1 cm. Preuzeto i modifikovano iz (Ayuso i saradnici, 2016).

Gliomske ćelije uronjene u hidrogel, koji oponaša vanćelijski matriks, se injektiraju u centralnu komoru. Obzirom na to da u bočne kanale ne prodire hidrogel, oni predstavljaju funkcionalnu zamenu za krvne sudove i služe za dopremanje hranjivih materija, kiseonika ili odgovarajućih supstanci po potrebi.

Prethodno umnožene RC6 ćelije su prebrojane i  $40 \times 10^6$  ćelija/ml je resuspendovano u 50  $\mu$ l medijuma. Tako pripremljenoj ćelijskoj suspenziji je dodato 50  $\mu$ l hidrogela (35,7  $\mu$ l kolagena tipa I (4,01 mg/ml radni rastvor); 0,89  $\mu$ l 1M NaOH; 10  $\mu$ l 5X DMEM; 3,4  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O) i po 10  $\mu$ l smeše je injektovano u centralnu komoru. Ostatak od 10  $\mu$ l u vidu kapljice se ostavlja na vrhu centralnog proreza da bi se sprečilo isušivanje hidrogela. Radi ravnomernog raspoređivanja ćelija u centralnoj komori na svakih 20 s u trajanju od 3 min se vrši okretanje čipova. Polimerizacija je vršena 15 min u inkubatoru, nakon čega su bočni kanali perfundovani medijumom u trajanju od 2 h. Po isteku ovog vremena uklanja se stari medijum i dodaje se svež medijum sa odgovarajućim agensima.

Za potrebe ispitivanja uticaja CoQ10 na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, 10  $\mu$ M CoQ10 rastvorenog u medijumu je perfundovano kroz bočne komore i ispitivan je nivo produkcije ROS-a nakon 2 h i 4 h. Po isteku predviđenog vremena, 25 mM CellROX® Orange reagensa (Thermo Fisher Scientific, SAD) je perfundovano kroz bočne komore. CellROX® Orange slobodno difunduje kroz ćelijsku membranu. U redukovanom stanju ne fluorescira, dok pri kontaktu sa ROS-om oksiduje i fluorescira narandžasto, sa maksimumom emisije na 565 nm. Mikrofluidni čipovi su slikani na 10 puta uvećanju na Nikon Eclipse Ti

mikroskopu (Nikon Instruments Inc., Japan) opremljenim sa C1 modularnim konfokalnim sistemom.

U eksperimentu u kom je ispitivan efekat tretmana na ćelijsku vijabilnost (10  $\mu$ M CoQ10, 250  $\mu$ M TMZ i kombinacija ova dva agensa) supstance rastvorene u medijumu su perfundovane kroz bočne komore. Nakon 72 h je ispitivana ćelijska vijabilnost upotrebom kalcein acetoksimetil estar (CAM) (1:1000, 5mg/ml radni rastvor)/ propidijum jodid (PI) (1:500, 2 mg/ml radni rastvor) bojenja. Mikrofluidni čipovi su slikani na 2 puta uvećanju na Nikon Eclipse Ti mikroskopu (Nikon Instruments Inc., Japan) opremljenim sa C1 modularnim konfokalnim sistemom.

Rezultati su analizirani u programu Fiji® i predstavljeni kao intezitet fluorescence u odnosu na poziciju u mikrofluidnom čipu. Eksperiment je ponovljen tri puta.

### 3.22. FLUORESCENTNO OBELEŽAVANJE ĆELIJA

Fast Blue (FB) i karboksifluorescein sukimidil estar (CFSE) se često koriste za fluorescentno obeležavanje ćelija.

FB boja se inkorporira u citoplazmu ćelija. Njeno prisustvo se može detektovati tokom 10 generacija ćelijskih deoba posmatranjem na fluorescentnom mikroskopu, pomoću filtera talasne dužine  $\lambda=365$  nm. Na ovaj način, moguće je identifikovati ćelije glioma obojene FB bojom bez narušavanja njihove vijabilnosti (Chicoine i Silbergeld, 1995). FB je korišćen za *in vivo* praćenje ćelija 10 dana nakon inokulacije u mozak Wistar pacova. Neophodno razblaženje za eksperiment postignuto je 1:100 razblaživanjem radnog rastvora koncentracije 10 mg/ml u DMEM medijumu za gajenje ćelija. Za potrebe eksperimenta  $1 \times 10^6$  C6 ili RC6 ćelija je prebrojano i rastvoreno u 1 ml prethodno pripremljenog medijuma sa FB bojom. Inkubacija je trajala 10 min na 37 °C u mraku. Ćelije su zatim ispirane tri puta u PBS-u i finalno rastvorene u 50  $\mu$ l PBS-a spremne za inokulaciju.

CFSE boja se vezuje kovalentno za sve slobodne amine na površini i u unutrašnjosti ćelije sa minimalnim efektom na proliferativnu sposobnost ćelija. Ova boja omogućava praćenje ćelija u dužem vremenskom intervalu, tokom 15 ćelijskih deoba (Kang i saradnici, 2005). CFSE boja je korišćena za *in vivo* praćenje C6 i RC6 ćelija, kao i efekta CoQ10 i TMZ u RC6 modelu, 25 dana nakon inokulacije u mozak Wistar pacova. Za potrebe eksperimenta,  $1 \times 10^6$  C6 ili RC6 ćelija je prebrojano i rastvoreno u 1 ml prethodno pripremljenog 10  $\mu$ M CFSE u PBS-u sa 0,1% FBS-om. Inkubacija je trajala 10 min na 37 °C u mraku. Ćelije su zatim ispirane tri puta u PBS-u i finalno rastvorene u 50  $\mu$ l PBS-a spremne za inokulaciju.

### 3.23. EKSPERIMENTALNE ŽIVOTINJE

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćeni mužjaci pacova soja Wistar iz vivarijuma Instituta za biološka istaživanja "Siniša Stanković" (IBISS). Starost životinja na početku eksperimenta je bila 3 meseca, dok im je težina bila 250 do 300 g. Životinje su u toku eksperimenta gajene po 2-4 u kavezu, pri standardnim uslovima u prostoriji (temperatura:  $23 \pm 2$  °C; relativna vlažnost vazduha: 60 - 70%), sa svetlosnim režimom 12 h svetlost/12 h mrak i slobodnim pristupom vodi i hrani). Svi eksperimenti na životinjama odobreni su od strane Etičkog komiteta IBISS-a (rešenje broj 2-04/13).

### 3.24. EKSPERIMENTALNI DIZAJN ANIMALNOG MODELA

#### 3.24.1. INTRAKRANIJALNA INOKULACIJA C6 I RC6 ĆELIJA

Životinje su anestetizirane intraperitonealnom injekcijom nembutala u dozi 50 mg/kg telesne težine.

Oformljeno je šest eksperimentalnih grupa (n=5 životinja po grupi) shodno tipu inokulisane ćelijske linije i korišćenoj fluorescentnoj boji (C6 ćelije obeležene sa FB, RC6 ćelije obeležene sa FB, C6 ćelije obeležene sa CFSE, RC6 ćelije obeležene sa CFSE, kontrolna grupa žrtvovana nakon 10 dana i kontrolna grupa žrtvovana nakon 25 dana). Sa frontalnog regiona površine glave anestetizirane životinje je očišćena dlaka i alkoholom očišćena koža. Skalpelom je uzdužno, načinjen mali rez i potkožno tkivo je uklonjeno tupom preparacijom. Na lobanji je određen položaj predviđen za inokulaciju ćelija, 3 mm anteriorno od bregme i 3 mm desno lateralno od koronarne suture i finim borerom promera 0.5 mm probušena lobanja bez oštećivanja površine mozga. Fluorescentno obeležene C6 i RC6 ćelije ( $10^5$  ćelija u 5  $\mu$ l PBS-a) su inokulisane pomoću Hamiltonovog šprica zapremine 10  $\mu$ l slobodnom rukom, u vremenskom periodu od 5 min na dubinu od 2,5 mm. Kontrolnim životinjama je ubrizgavan fiziološki rastvor, pod istim uslovima.

Nakon inokulacije ćelija, otvor na kosti je zatvoren koštanim voskom i koža je zašivena hirurškim koncem. Šav je tretiran antibiotskim praškom kako bi se sprečila moguća infekcija. Operisane životinje su čuvane u kavezima (2-3 životinje po kavezu) sa hranom i vodom *ad libitum*. Životinje su redovno nadgledane, kako bi se uočili eventualni neurološki deficiti.

Nakon predviđenog perioda (10 dana za ćelije obeležene sa FB, 25 dana za ćelije obeležene sa CFSE) životinje su kratkotrajno izložene dejstvu CO<sub>2</sub> i dekapitovane pomoću

giljotine. Nakon izolacije, mozgovi su fiksirani u 4% paraformaldehidu u trajanju od 48 h, a potom isprani u PBS-u 2 h. Dehidracija mozgov je vršena u 30% rastvoru saharoze (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemačka) najmanje 72 h, dok tkivo nije palo na dno staklene flašice. Zasićeni rastvor saharoze koristi se za krioprotekciju tkiva, zbog toga što saharoza potiskuje i zamenjuje vodu u tkivu. Nakon dehidracije u 30% rastvoru saharoze, tkivo je brzo zamrznuto i čuvano na -80 °C do sečenja. Poprečni i uzdužni preseki tkiva debljine 20 µm su isečeni na kriotomu (Leica, Nemačka) i postavljani na Superfrost® mikroskopske pločice (Thermo Fisher Scientific, SAD). Preseci su zatim sušeni 12 h na sobnoj temperaturi i odlagani na -20 °C do bojenja.

### **3.24.2. TRETMANI ŽIVOTINJA SA INOKULISANIM RC6 ĆELIJAMA**

Za potrebe ovog eksperimenta oformljene su četiri eksperimentalne grupe (n=5 životinja po grupi) prema tipu tretmana koje su primale (RC6 kontrola, tretman CoQ10, tretman TMZ, tretman CoQ10+TMZ). Životinje su tretirane intraperitonealno. CoQ10 je rastvaran u DMSO i sterilnoj vodi u odnosu 1:1. Doza CoQ10 koja je višekratno primenjena na životinjama je 10 mg/kg. TMZ je rastvaran u DMSO i sterilnoj vodi, takođe u odnosu 1:1, a doza višekratno primenjena na životinjama je 4 mg/kg. Ukupan volumen koji je davan intraperitonealno nije prelazio 1 ml ni pri kombinovanom tretmanu. Životinje tretirane samo sa CoQ10 su od petog dana nakon inokulacije RC6 ćelija tretirane 2 puta nedeljno u toku tri nedelje. Pacovi tretirani samo sa TMZ su prvu dozu primili 12 dana po inokulaciji, a zatim još 4 dana za redom. Kombinovani tretman (CoQ10+TMZ) je obuhvatio 2 pretretmana sa CoQ10 od petog dana nakon inokulacije, a zatim je tretman sa CoQ10 nastavljen istovetno kao i pri režimu samostalnog tretmana, s tim što je TMZ primenjen 5 puta za redom od 12. do 16. dana po inokulaciji. CoQ10 je nakon primene TMZ još 2 puta dat u naknadnom tretmanu. Raspored tretmana je prikazan u Tabeli 1.

**Tabela 1. Raspored tretmana sa težinama životinja**

Dan	Prosečna težina pacova po grupi (g)			
	Kontrola	CoQ	TMZ	CoQ + TMZ
1	300	310	267	290
2				
3				
4				
5	310	330	277	303
6				
7				
8				
9	300	340	267	313
10				
11				
12	333	340	280	317
13				
14				
15	333	350	270	303
16				
17				
18				
19	333	330	283	300
20				
21				
22				
23	340	330	285	300
24				
25	340	350	290	300

### 3.25. FLUORESCENTNO OBELEŽAVANJE MOŽDANIH PRESEKA

Za potvrđivanje prisustva gliomskih C6 i RC6 ćelija obeleženih sa CFSE u moždanom parenhimu, upotrebjeno je Ki67 antitelo. Ki67 je nehistonski nuklearni protein koji se eksprimira u proliferišućim ćelijama i može se detektovati u G1, S, G2 fazi i mitozu, dok je odsutan u G0 fazi.

Tkivni preseki su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, preseki su isprani dva puta PBS-om i vršeno je blokiranje mesta za nespecifično vezivanje antitela 2% BSA u PBS-

u. Zatim su preseći inkubirani sa zečjim monoklonskim anti-Ki67 antitelom (Cell Signaling Technology, SAD; razblaženje 1:1000) na 4 °C preko noći. Nakon ispiranja 3 puta sa PBS-om, ćelije su inkubirane sa sekundarnim Alexa Fluor 555 kozjim anti-zečjim antitelom (Invitrogen Life Technologies, SAD; razblaženje 1:1000) 2 h na sobnoj temperaturi.

Nakon ispiranja dodat je PI ili Hoechst 33342 15 min na sobnoj temperaturi, u zavisnosti od toga da li su ćelije prethodno obeležene sa FB ili CFSE, radi vizualizacije ćelijskih jedara, a zatim je vršeno montiranje pločica rastvorom glicerola. Tkivni preseći su slikani na 5 puta uveličanju na Zeiss Axiowert fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss Foundation, Nemačka) korišćenjem AxioVision 4.8. softvera i 20 puta uveličanju na Leica TCS SP8 konfokalnom mikroskopu (Leica Microsystems, Nemačka) opremljenim sa Leica Microsystems LAS AF-TCS SP8 softverom.

### **3.26. MERENJE MOTORIČKE AKTIVNOSTI ŽIVOTINJA**

Za potrebe ovog eksperimenta oformljene su tri eksperimentalne grupe (n=8 životinja po grupi) prema tipu inokulisane ćelijske linije (C6 grupa, RC6 grupa, Sham-operisana grupa). Testovi ponašanja su započeti 25 dana nakon hiruške intervencije radi procene motoričke aktivnosti i sposobnosti pamćenja životinja. Motorička aktivnost pacova je ispitivana testom individualno za svaku životinju u Opto-Varimex kavezu (Columbus Instruments, SAD) koji je povezan sa IBM-PC kompatibilnim kompjuterom. Kavezi su bili smešteni u zasebnu, svetlosno i zvučno izolovanu prostoriju sa indirektnim i homogenim osvetljenjem (150 lx u centru kaveza). Svaki kavez (44.2×43.2×20 cm) je opremljen sa 15 infracrvenih emitera lociranih na x i y osi. Jednak broj prijelnika je lociran na suprotnoj strani kaveza. Rezultati su prevođeni u digitalni zapis Auto-Track programom (Columbus Instruments, SAD) koji prikuplja podatke iz Opto-Varimex kaveza svaku desetinu sekunde i vrši kategorizaciju aktivnosti životinja. Lokomotorna aktivnost je definisana kao prekid tri uzastopna infracrvena zraka lasera. Vertikalna aktivnost je merena brojem zraka lasera prekinutih usled propinjanja životinje u kavezu. Svi eksperimenti su vršeni u identičnim uslovima i to u periodu između 09:00 i 14:00 h.

Testiranje je trajalo 3 uzastopna dana u trajanju od 30 min dnevno. Pad motoričke aktivnosti u toku prve test-sesije ukazivao je na sposobnost životinje da se navikne (habituiru) na novu sredinu (eksperimentalni kavez) nakon izlaganja istoj (engl. intra-session habituation), dok je aktivnost životinje drugog i trećeg dana izlaganja ukazivala na sposobnost životinje da prepozna eksperimentalni kavez kao familijarnu sredinu, tj. da formira memoriju,

i da znatno manje ispituje eksperimentalni prostor trećeg dana u odnosu na prvi dan (engl. inter-session habituation) (Pescic i saradnici, 2010).

### **3.27. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA**

Rezultati dobijeni u eksperimentima su dalje analizirani korišćenjem programa STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., SAD) i Graphpad Prism 6.01 (GraphPad Software, SAD). Setovi podataka koji su testiranjem pokazali normalnu distribuciju, analizirani su parametarskom statističkom analizom. T-test je korišćen za određivanje statistički značajne razlike između svake dve grupe podataka, uključujući i kontrolne grupe. Rezultati dobijeni u testovima ponašanja su analizirani dvofaktorskom ANOVA analizom (faktori: tretman i dan habituacije (ponovljeno merenje)) i nakon toga Fišerovim LSD testom. Podaci koji ne podležu normalnoj raspodeli analizirani su U-testom. Uočene razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je stepen verovatnoće bio  $p \leq 0,05$  i na graficima su obeležene simbolom \*.

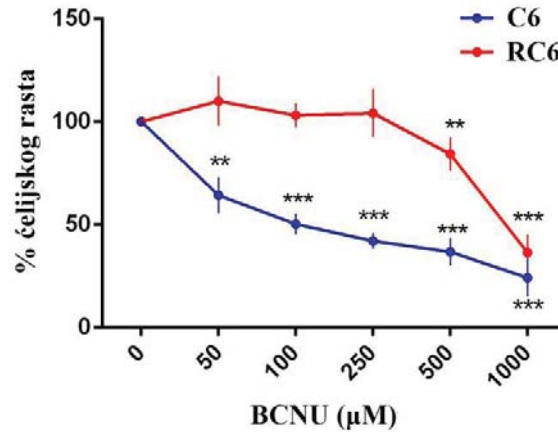
## 4. REZULTATI

### 4.1. USPOSTAVLJANJE REZISTENCIJE NA BCNU KOD C6 ĆELIJSKE LINIJE PACOVSKOG GLIOMA

Osetljivost C6 ćelija na antigliomski lek BCNU je određena SRB testom. Utvrđena  $IC_{50}$  vrednost za BCNU iznosi  $100 \mu M$  i predstavlja parametar efikasnosti ovog leka. Na osnovu osetljivosti C6 ćelija, određene su koncentracije BCNU za postepeno izazivanje rezistencije: 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250 i  $300 \mu M$ . Ćelije su tretirane dva puta u toku jedne nedelje istom koncentracijom, zatim su oslobođane prisustva BCNU tokom jedne pasaže (period oporavka 72 h), da bi nakon toga bile tretirane višom koncentracijom BCNU ponovo dva puta u toku jedne nedelje. Za koncentracije 200 i  $250 \mu M$  ciklus je ponovljen još tri puta.

Poslednja u nizu rastućih koncentracija BCNU ( $300 \mu M$ ) je primenjena dva puta u toku nedelju dana, a zatim je oporavak ćelija bez prisustva BCNU u medijumu obuhvatao dve pasaže. Ovako organizovan ciklus tretmana i oporavka je ponovljen još 4 puta. *C6/300  $\mu M$  BCNU* ćelije su označene kao RC6 rezistentna linija potekla od senzitivne, parentalne linije – C6. Nakon toga, SRB test je pokazao da postoji veoma značajna razlika u osetljivosti C6 i RC6 ćelija na BCNU. Značajno smanjenje rasta C6 ćelija je dobijeno pri tretmanu sa  $50 \mu M$  BCNU, dok je značajan efekat BCNU na RC6 ćelije dobijen tek pri  $500 \mu M$  (Slika 12). Faktor rezistencije koji predstavlja odnos  $IC_{50}$  vrednosti za BCNU između RC6 i C6 ćelija iznosi 8,33 (Tabela 2). Ovaj stepen rezistencije na BCNU se kod RC6 ćelija ne menja ni nakon mesec dana gajenja u čistom medijumu bez selektivnog pritiska BCNU.





**Slika 12. Osetljivost C6 i RC6 ćelija na hemioterapeutik BCNU.** Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana SRB testom nakon tretmana sa BCNU u trajanju od 72h. Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5). Statistički značajne razlike između netretirane kontrole i tretmana u okviru iste ćelijske linije su predstavljene kao:  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

## 4.2. MEHANIZMI REZISTENCIJE PRISUTNI KOD RC6 ĆELIJSKE LINIJE

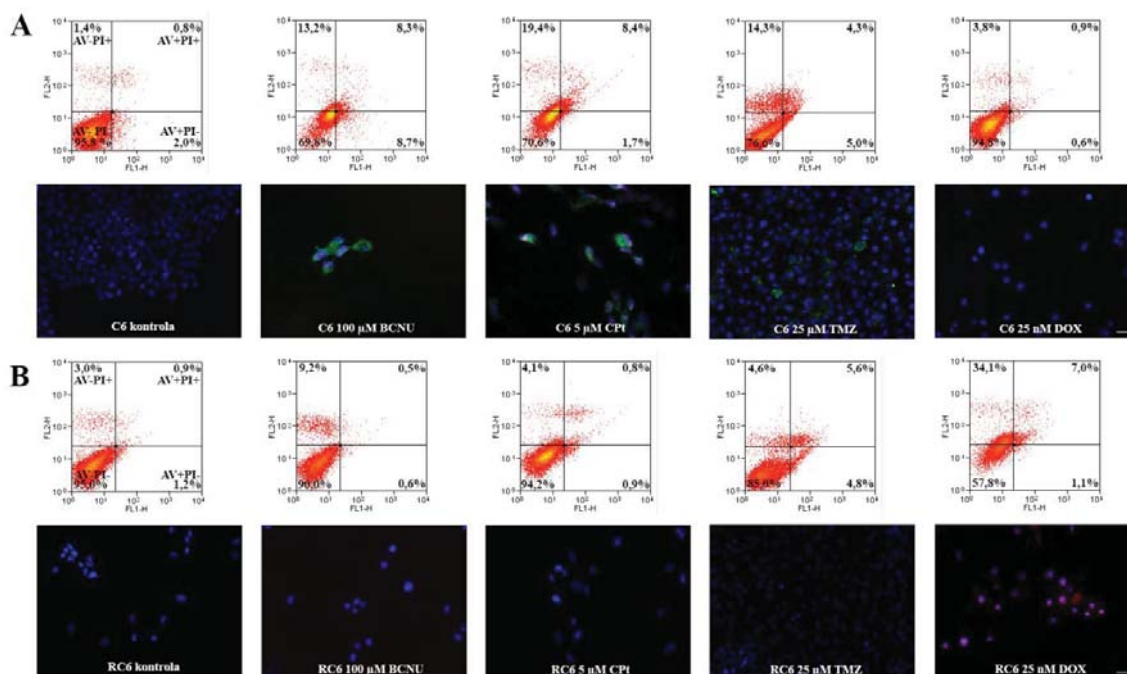
### 4.2.1. UTVRĐIVANJE PROFILA REZISTENCIJE KOD RC6 ĆELIJA

Relativna rezistencija RC6 ćelija na različite DNK oštećujuće agense određena je SRB testom.  $IC_{50}$  vrednosti za date agense kod senzitivne i rezistentne linije, kao i faktori rezistencije su prikazani u Tabeli 2.  $IC_{50}$  vrednost za BCNU kod C6 ćelija je 100 µM, dok je kod RC6 ćelija 833,3 µM, a faktor rezistencije je 8,33. RC6 ćelije su razvile rezistenciju na cisplatinu (CPT) i temozolomid (TMZ). Faktor rezistencije za CPT je 8,18, dok je za TMZ 9,6, što odgovara stepenu rezistencije na BCNU. Za razliku od razvijene rezistencije na ova dva DNK oštećujuća agensa, RC6 su bile osetljivije od C6 ćelija na doksorubicin (DOX), koji takođe deluje na nivou DNK.  $IC_{50}$  vrednost za DOX kod C6 ćelija je 46,4 nM, dok je kod RC6 ćelija 17,9 nM, a faktor rezistencije je manji od 1 (0,38) i pokazuje da su RC6 ćelije 2,5 puta osetljivije na dejstvo DOX-a.

**Tabela 2. Razlike u osetljivosti C6 i RC6 ćelija na hemioterapeutike**

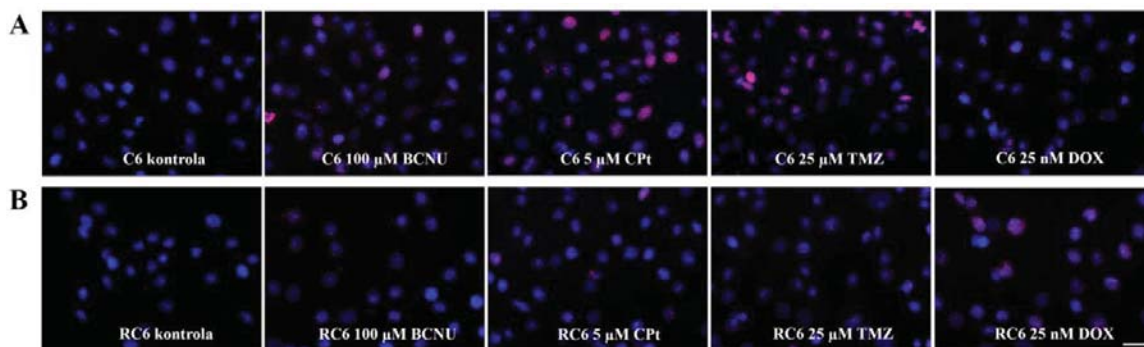
<b>Hemioterapeutici</b>	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>		<b>Faktor rezistencije</b>
	<b>C6</b>	<b>RC6</b>	
<b>BCNU</b>	100,0	833,3	8,33
<b>CPt</b>	4,5	36,8	8,18
<b>TMZ</b>	25	240	9,6
<b>DOX</b>	0,0464	0,0179	0,38

Razlike u efektu DNK oštećujućih agenasa na indukciju ćelijske smrti kod C6 i RC6 ćelija, utvrđene su nakon primene prethodno utvrđenih IC<sub>50</sub> koncentracija za BCNU, CPt, TMZ i DOX na C6 ćelijama. Tretman je kod obe ćelijske linije trajao 72 h. Step en i tip ćelijske smrti je određen Aneksin V/PI fluorescentnim bojenjem, kvantitativna analiza je izvršena protočnom citofluorimetrijom, a vizualizacija fluorescentnom mikroskopijom. Rezultati su prikazani na Slici 13. Procenat C6 mrtvih ćelija, kako u apoptozi, tako i u nekrozi se značajno povećava nakon BCNU, CPt i TMZ tretmana (Slika 13A). Procenat nekrotskih RC6 ćelija se značajno povećava samo pri tretmanu sa BCNU, dok TMZ povećava procenat RC6 ćelija u apoptozi (Slika 13B). Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom BCNU, CPt i TMZ je izrazito smanjena kod RC6 ćelija u odnosu na parentalne C6 ćelije. Nasuprot tome, procenat mrtvih C6 ćelija tretiranih DOX-om je zanemarljiv (Slika 13A), dok je indukcija apoptoze i nekroze kod RC6 ćelija tretiranih DOX-om vidna (Slika 13B).



**Slika 13. Indukcija ćelijske smrti pod dejstvom DNK oštećujućih agenasa.** Ćelijska smrt kod C6 (A) i RC6 (B) je ispitivana metodom protočne citofluorimetrije i fluorescentne mikroskopije AV/PI bojenjem. Metodom protočne citofluorimetrije (gornji paneli) na FL1-H zelenom kanalu je očitana AV fluorescencija, a na FL2-H crvenom kanalu PI fluorescencija. Ovo bojenje omogućava razlikovanje vijabilnih ćelija (AV- PI-), apoptotskih ćelija (AV+ PI-), kasno apoptotskih i ćelija u nekrozi (AV+ PI+) kao i sekundarno nekrotičnih ili mrtvih ćelija (AV- PI+). Na donjim panelima je prikazan odgovarajući rezultat dobijen fluorescentnom mikroskopijom. AV emituje zelenu, dok PI emituje crvenu fluorescenciju. Jedra su obojena Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Skala = 100  $\mu$ m.

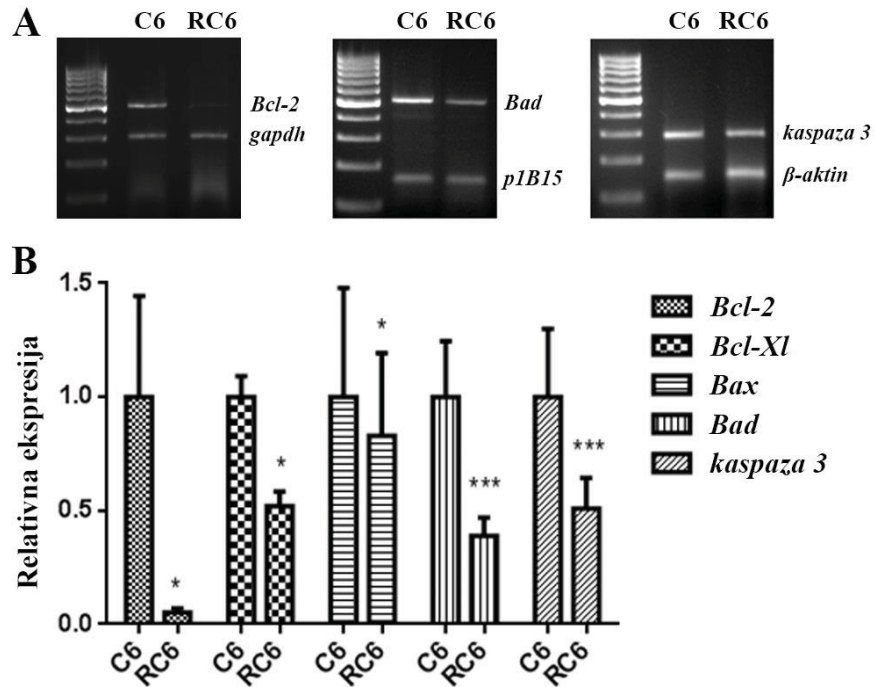
Radi procene efekta hemioterapeutika na stvaranje dvolančanih DNK prekida, C6 i RC6 ćelije su tretirane IC<sub>50</sub> koncentracijama BCNU, CPT, TMZ i DOX dobijenim na C6 ćelijama. Nakon 24 h tretmana, ćelije su obeležene fosforilisanom formom H2A.X (Ser 139) antitela (Slika 14). BCNU, CPT i TMZ su izazvali dvolančane DNK prekide kod velikog broja C6 ćelija, dok tretman DOX-om nije pokazao značajne promene u odnosu na netretiranu kontrolu (Slika 14A). Nasuprot efektu kod C6 ćelija, DOX je doveo do znatno povećanog broja RC6 ćelija sa dvolančanim DNK prekidima. BCNU, CPT i TMZ nisu pokazali značajan efekat na indukciju DNK oštećenja kod RC6 ćelija (Slika 14B).



**Slika 14. Indukcija DNK oštećenja.** Efekat BCNU, CPT, TMZ i DOX na DNK kod C6 (A) i RC6 (B) ćelija je proučavan pomoću fosfo-histon H2A.X (Ser 139) antitela (crvena fluoresenca) koje specifično obeležava dvolančane prekide na DNK molekulu. Jedra su obojena Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Skala = 20  $\mu$ m.

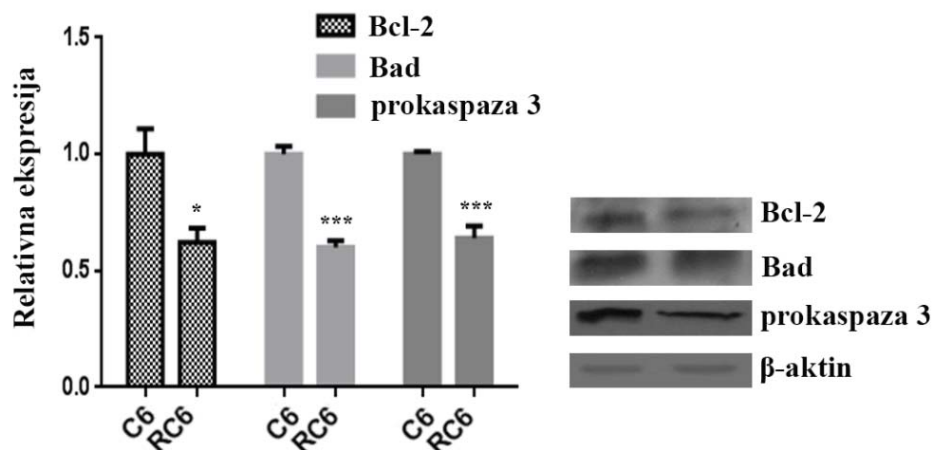
#### 4.2.2. PROMENE KOJE SU DOVELE DO SMANJENE OSETLJIVOSTI NA APOPTOZU RC6 ĆELIJA

Razlike u ekspresiji članova Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-Xl, Bad i Bax) familije koji kodiraju proteine unutrašnjeg (mitohondrijalnog) puta apoptoze i efektorske kaspaze 3 su ispitivane RT-PCR (Slika 15) i „Western blot“ (Slika 16) metodom uporedo između C6 i RC6 ćelija. Pokazano je da je ekspresija iRNK *Bcl-2*, *Bcl-Xl* i *Bad* značajno smanjena (20, 2 i 3 puta, redom) kod RC6 ćelija (Slika 15). Ekspresija iRNK *Bax* se takođe značajno smanjuje kod RC6 ćelija. Ove promene u Bcl-2 familiji kod RC6 ćelija su praćene i značajnim smanjenjem ekspresije iRNK efektorske *kaspaze 3* (2 puta, Slika 15).



**Slika 15. RT-PCR analiza ekspresije članova Bcl-2 familije i efektorske kaspaze 3 kod C6 i RC6 ćelijske linije.** Koamplifikacija *Bcl-2*, *Bad* i *kaspaza 3* je vršena sa *gapdh*, *p1b15* i  $\beta$ -*aktin*-om, kao internim kontrolama. Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Relativna ekspresija ispitivanih gena je preračunata u odnosu na ekspresiju odgovarajuće interne kontrole. Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5). Statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK između C6 i RC6 ćelijske linije su predstavljene kao:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

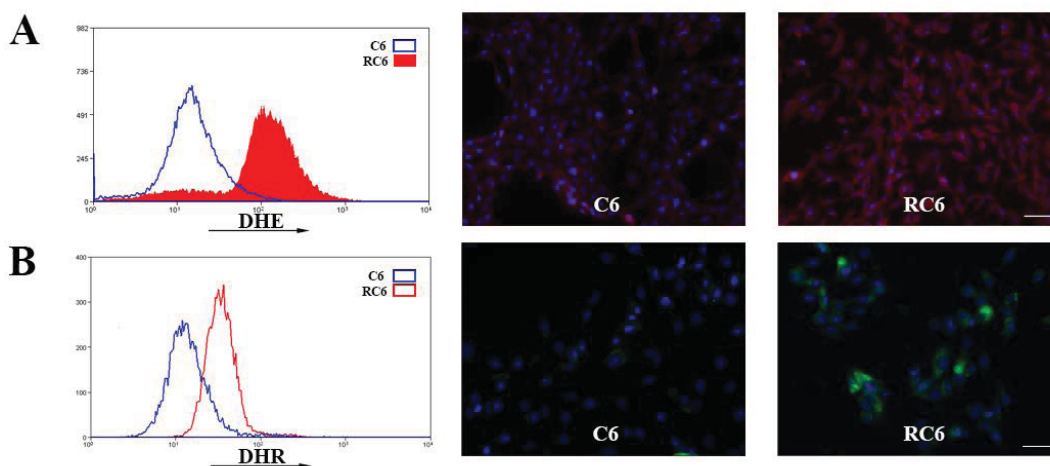
Dobijene promene na nivou iRNK su potvrđene ispitivanjem ekspresije proteina Bcl-2, Bad i prokaspaze 3. Pokazano je da se nivo Bcl-2, Bad i prokaspaze 3 značajno smanjuje kod RC6 ćelija u odnosu na nivo ovih proteina uočen kod C6 ćelija (2 puta, Slika 16).



**Slika 16. Western imunoblot analiza članova Bcl-2 familije i prokaspaze 3 kod C6 i RC6 ćelijske linije.** Na grafiku je predstavljena relativna ekspresija proteina Bcl-2, Bad i prokaspaze 3 koja je preračunata u odnosu na ekspresiju β-aktin-a kao interne kontrole. Pored grafika su prikazani reprezentativni imunoblotovi. Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5). Statistički značajne razlike u ekspresiji proteina između C6 i RC6 ćelijske linije su predstavljene kao:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

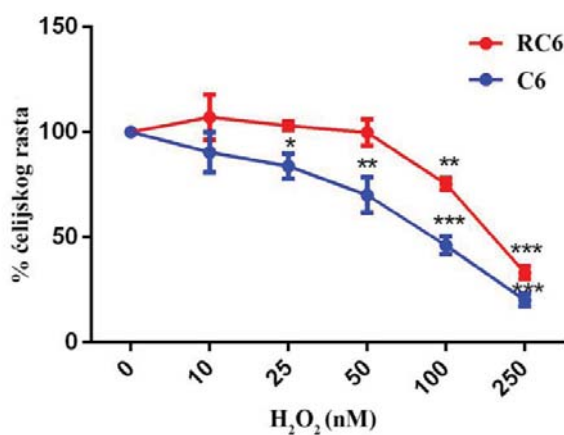
#### 4.2.3. PROMENE U ANTIOKSIDATIVNOM KAPACITETU RC6 ĆELIJA

Upoređivanje prisustva reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kod C6 i RC6 ćelija, izvršeno je upotrebom DHE i DHR fluorescentnih proba na protočnom citofluorimetru i fluorescentnom mikroskopu (Slika 17). Intenzitet DHE fluorescence, koji je proporcionalan zastupljenosti  $O_2^-$  (superoksidnog anjona), je 8 puta povećan (Slika 17A), dok je intenzitet DHR fluorescence, koji je proporcionalan količini  $H_2O_2$  (vodonik peroksida) i  $ONOO^-$  (peroksinitritnog anjona), 2 puta povećan kod RC6 ćelija u odnosu na C6 ćelije (Slika 17B). Rezultati su potvrđeni i vizualizovani na fluorescentnom mikroskopu.



**Slika 17. Razlika u nivou ROS-a kod C6 i RC6 ćelijske linije.** C6 i RC6 ćelije obeležene sa DHE (A) i DHR (B) su ispitivane metodama protočne citofluorimetrije i fluorescentne mikroskopije radi utvrđivanja bazalnog nivoa ROS-a. Na FL2-H kanalu je očitana DHE fluorescencija, a na FL1-H kanalu DHR fluorescencija. Izmereni intenzitet fluorescence je srazmeran količini slobodnih radikala. DHE emituje crvenu, dok DHR emituje zelenu fluorescenciju. Ćelijska jedra su obojena sa Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Skala = 50  $\mu$ m.

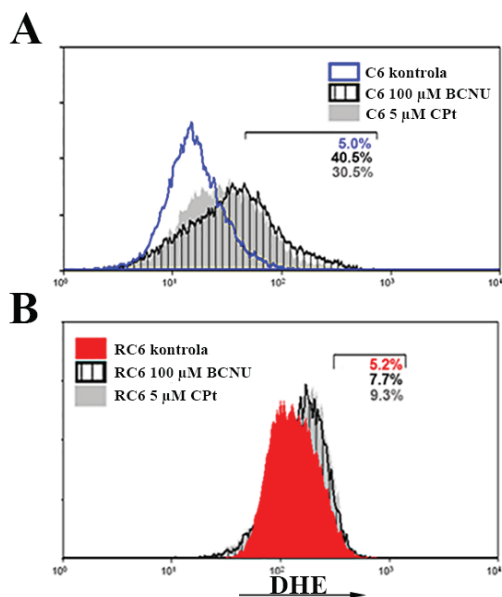
Pored prilagođenosti na visok sadržaj slobodnih radikala, kod RC6 ćelija je uočena i smanjena osetljivost na tretman vodonik peroksidom (Slika 18). Inhibicija ćelijskog rasta, praćena SRB testom, pokazala je da tretman vodonik peroksidom kod RC6 ćelija izaziva značajanu inhibiciju rasta tek pri koncentraciji 100 nM ( $p \leq 0,01$ ), dok je kod C6 ćelija značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolu postignuta pri 25 nM ( $p \leq 0,05$ ).



**Slika 18. Osetljivost C6 i RC6 ćelija na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Inhibicija ćelijskog rasta je ispitivana SRB testom nakon izlaganja ćelija vodonik peroksidu. Rezultati su očitavani posle 72 h. Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5). Statistički značajne razlike između netretirane kontrole i tretmana u okviru iste ćelijske linije su predstavljene kao:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)).

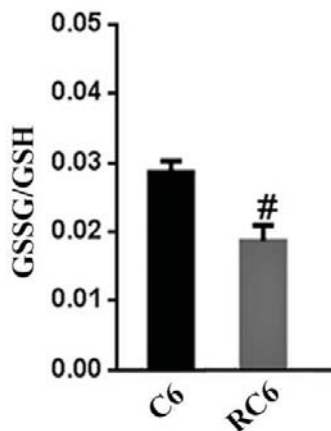


Takođe je ispitivan i efekat hemioterapeutika na produkciju superoksidnog anjona u obe ćelijske linije (Slika 19). Pojedinačni tretmani sa 100  $\mu\text{M}$  BCNU i 5  $\mu\text{M}$  CPT su doveli do značajnog povećanja inteziteta DHE fluorescence kod C6 ćelija sa 5,0% kod kontrole na 40,5% i 30,5%, redom (Slika 19A), dok isti tretman nije doveo do značajnih promena u intezitetu DHE fluorescence kod RC6 ćelija (sa 5,2% kod kontrole na 7,7% i 9,3%, redom, Slika 19B).



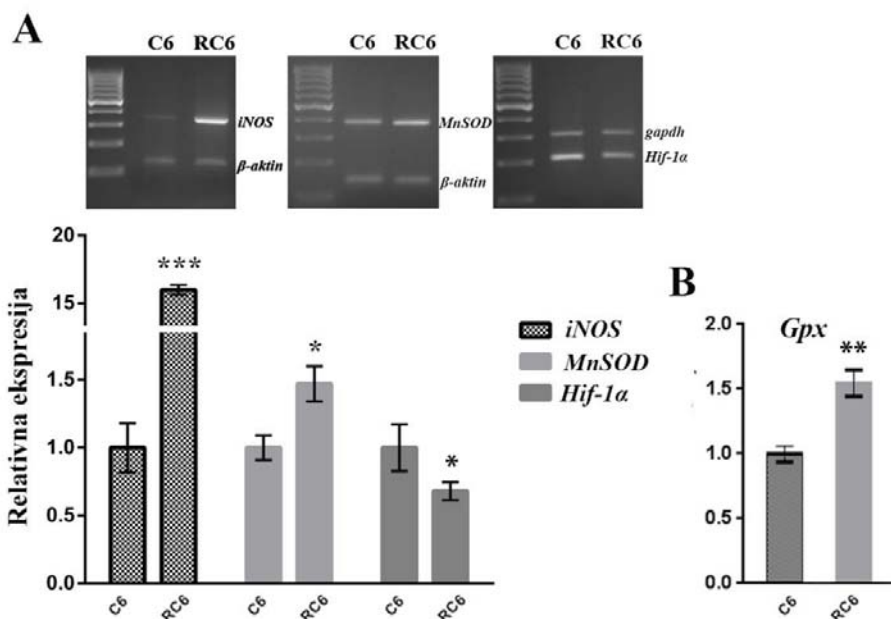
**Slika 19. Razlike u produkciji superoksidnog anjona kod C6 (A) i RC6 (B) ćelija nakon tretmana hemioterapeuticima.** DHE bojenje je korišćeno radi utvrđivanja produkcije superoksidnog anjona u ćelijama nakon jednokratnog tretmana. Efekti BCNU i CPT su analizirani metodom protočne citofluorimetrije. Na FL2-H kanalu je očitana DHE fluorescencija, a izmereni intenzitet fluorescencije je srazmeran količini superoksidnog anjona.

Odnos oksidovanog (GSSG) i redukovanog (GSH) glutationa unutar ćelije predstavlja merilo izloženosti ćelije oksidativnom stresu. Tako, kod RC6 ćelija, odnos GSSG/GSH je značajno smanjen u poređenju sa C6 ćelijama ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 20).



**Slika 20. Nivo oksidativnog stresa kod C6 i RC6 ćelijske linije.** Na grafiku je prikazan odnos oksidovanog (GSSG) i redukovanog (GSH) glutationa. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri nezavisna eksperimenta ( $n=4$ ). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,05$  (#).

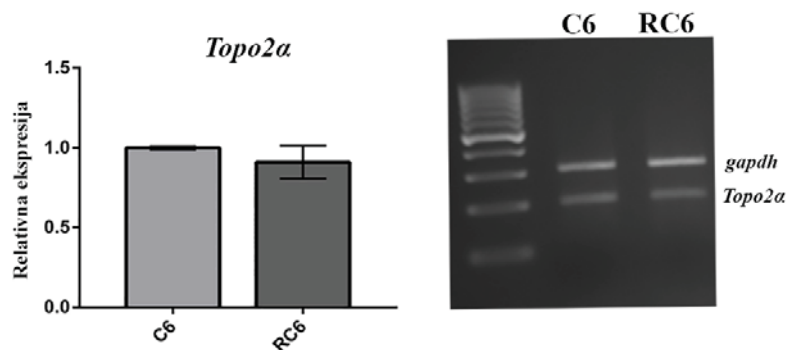
U cilju ispitivanja mehanizama koji leže u osnovi promena u antioksidativnom kapacitetu kod RC6 ćelija, uporedno je na uzorcima C6 i RC6 ćelija analizirana ekspresija iRNK enzima uključenih u antioksidativnu odbranu i oksidativni stres, *Hif-1 $\alpha$* , *MnSOD* i *iNOS*, RT-PCR metodom, dok je ekspresija *Gpx* ispitivana metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (Slika 21). Utvrđene su značajne promene u ekspresiji iRNK pomenutih enzima kod RC6 ćelija: nivo *iNOS* je povećan preko 15 puta, nivo *MnSOD* za 44%, dok je nivo *Hif-1 $\alpha$*  smanjen za 31% u poređenju sa senzitivnom ćelijskom linijom (Slika 21A). Ekspresija *Gpx* iRNK je povećana 1,5 puta kod RC6 ćelija u odnosu na C6 ćelije (Slika 21B).



**Slika 21. Ekspresija enzima oksidativnog stresa na nivou iRNK kod C6 i RC6 ćelijske linije. (A)** Ekspresija *iNOS*, *MnSOD* i *Hif-1α* je određena RT-PCR metodom. *iNOS* i *MnSOD* su koamplifikovani u prisustvu  $\beta$ -aktin-a, a *Hif-1α* u prisustvu *gapdh*. Relativna ekspresija ovih gena je preračunata u odnosu na ekspresiju odgovarajuće interne kontrole ( $\beta$ -aktin ili *gapdh*). Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5). **(B)** Metodom kvantitativnog RT-PCR-a u realnom vremenu je određena ekspresija *Gpx*.  $\beta$ -aktin je korišćen kao interna kontrola, a iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole je preračunata relativna ekspresija. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenata (n=3). Statistički značajne razlike u ekspresiji iRNK između C6 i RC6 ćelijske linije su predstavljene kao:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

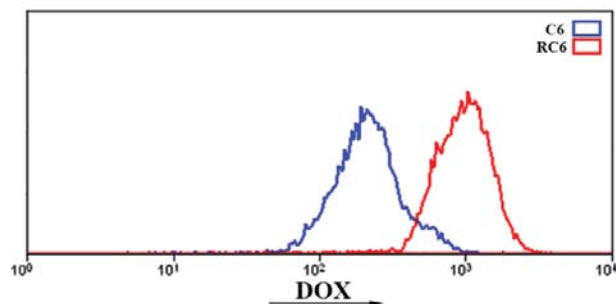
### 4.3. PROUČAVANJE MEHANIZAMA KOLATERALNE SENZITIVNOSTI RC6 ĆELIJA NA DOKSORUBICIN

Da bi se ispitali mehanizmi kolateralne senzitivnosti na doksorubicin (DOX), prvo je analizirana ekspresija iRNK enzima topoizomeraze II $\alpha$  RT-PCR metodom, obzirom da je glavni ciljni molekul DOX-a upravo ovaj enzim. Rezultati nisu pokazali značajnu razliku u nivou iRNK ekspresije *Topo2 $\alpha$*  između C6 i RC6 ćelija (Slika 22).



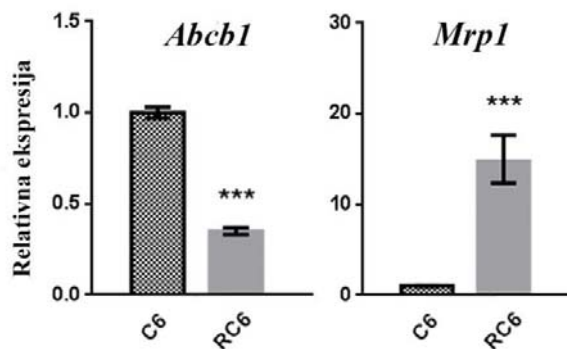
**Slika 22. RT-PCR analiza ekspresije iRNK topoizomeraze II $\alpha$  kod C6 i RC6 ćelijske linije.** *Topo2 $\alpha$*  je koamplifikovana u prisustvu *gapdh*, u odnosu na čiju ekspresiju je izračunata relativna ekspresija *Topo2 $\alpha$* . Amplifikovani uzorci su razdvojeni na agaroznom gelu pored DNK lestvice (100 bp). Srednje vrednosti su dobijene iz pet nezavisnih eksperimenata (n=5).

Razlika u unutarćelijskoj akumulaciji DOX-a između C6 i RC6 ćelija je analizirana metodom protočne citofluorimetrije, koristeći svojstvo DOX-a da nakon ekscitacije emituje fluorescencu u crveno-narandžastom opsegu talasnih dužina. Dobijeni rezultati su pokazali da je akumulacija DOX-a 4 puta veća u RC6 ćelijama u odnosu na senzitivne C6 ćelije (Slika 23).



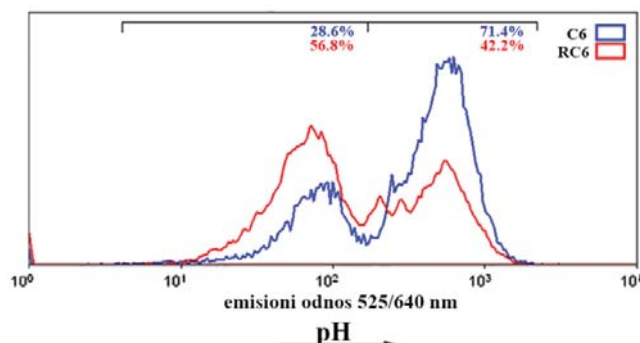
**Slika 23. Razlika u akumulaciji DOX-a između C6 i RC6 ćelija.** Analiza akumulacije DOX-a (20  $\mu$ M) nakon 120 minuta izlaganja kod C6 i RC6 ćelija metodom protočne citofluorimetrije. Na crvenom FL2-H kanalu je očitana DOX fluorescencija, a izmereni intenzitet fluorescence je srazmeran njegovoj akumulaciji u vijabilnim ćelijama.

Ispitana je ekspresija efluksnih pumpi, koje mogu uticati na unutarćelijsku akumulaciju DOX-a. Nivo *Abcb1* i *Mrp1* iRNK je upoređen između C6 i RC6 ćelija metodom kvantitativnog RT-PCR-a u realnom vremenu. Ekspresija *Abcb1* iRNK je smanjena 2,8 puta, dok je ekspresija *Mrp1* iRNK povećana 14,7 puta kod RC6 ćelija u odnosu na C6 ćelije (Slika 24).



**Slika 24. Ekspresija efluksnih pumpi na nivou iRNK kod C6 i RC6 ćelijske linije.** Metodom kvantitativnog RT-PCR-a u realnom vremenu je određena ekspresija *Abcb1* i *Mrp1* iRNK kod C6 i RC6 ćelija.  $\beta$ -aktin je korišćen kao interna kontrola, a iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole je preračunata relativna ekspresija. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

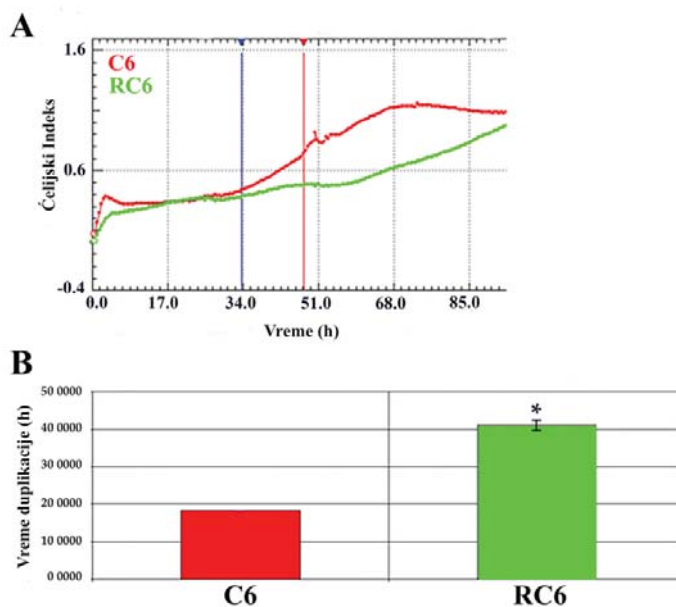
Upoređivanje unutarćelijskog pH C6 i RC6 ćelija je izvršeno metodom protočne citofluorimetrije pomoću reagensa BCECF-AM i prikazano kao odnos inteziteta fluorescence pri emisiji 525/640 nm. Analizom je pokazano prisustvo dve populacije ćelija (jednu sa normalnim pH, drugu sa kiselim pH) u obe ćelijske linije. Procenat ćelija sa normalim pH je 71,4% kod C6 ćelija i 42,2% kod RC6 ćelija, dok je procenat ćelija sa kiselim pH 28,6% kod C6 ćelija i 56,8% kod RC6 ćelija (Slika 25).



**Slika 25. Razlika u unutarćelijskom pH između C6 i RC6 ćelija.** Analiza unutarćelijskog pH (4  $\mu$ M BCECF-AM) nakon 30 minuta izlaganja kod C6 i RC6 ćelija metodom protočne citofluorimetrije. Nivo pH je meren kao odnos inteziteta fluorescence pri emisiji 525/640 nm, dok je ekscitacija bila na talasnoj dužini 488 nm. Niže vrednosti odnosa 525/640 nm ukazuju na niži pH.

#### 4.4. RAZLIKA U STOPI RASTA C6 I RC6 ĆELIJA

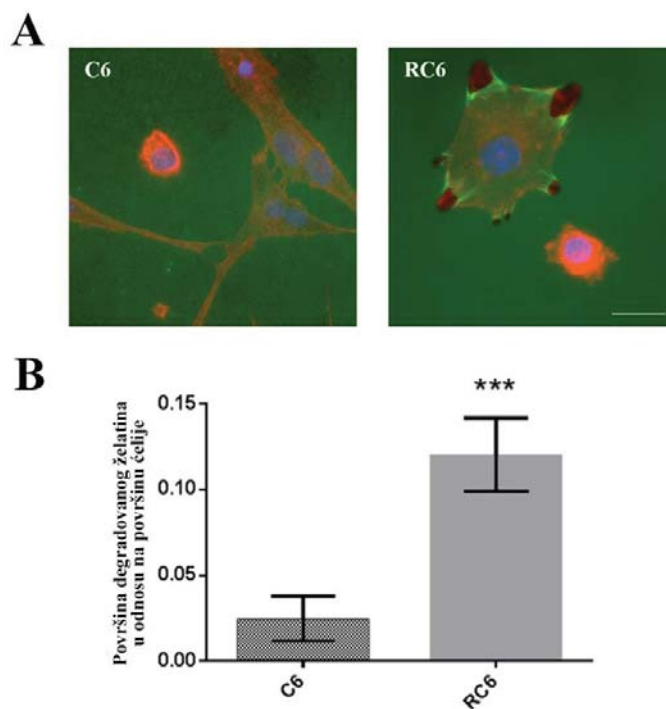
Razlika u stopi rasta kod C6 i RC6 ćelija je analizirana u realnom vremenu pomoću „xCELLigence“ aparata opremljenog RTCA softverom. C6 i RC6 ćelije su sejane u E-mikrotitar ploču sa 96 bunarića u čijem sastavu se nalazi elektroda od zlata (Slika 26). Rast ćelija je praćen tokom 96 h. Stopa rasta je predstavljena kao ćelijski indeks (engl. Cell Index, (CI)), a vreme duplikacije C6 i RC6 ćelija je izračunato analizom nagiba krive između dve vremenske tačke koji odgovara logaritamskom rastu ćelija (Slika 26A). Analizom rezultata je pokazano da C6 ćelije proliferišu značajno brže (2 puta) u odnosu na RC6 ćelije. Vreme duplikacije C6 ćelija je 20 h, dok se broj RC6 ćelija duplira nakon 40 h (Slika 26B).



**Slika 26. Analiza stope rasta C6 i RC6 ćelija u realnom vremenu.** (A) Grafik na gornjem panelu pokazuje razliku u ćelijskom indeksu između C6 (crvena linija) i RC6 (zeleno linija) ćelija. (B) Na donjem panelu histogram pokazuje vreme duplikacije C6 i RC6 ćelija koje je izračunato analizom logaritamske faze ćelijskog rasta između 34 h (plava vertikalna linija) i 48 h (crvena vertikalna linija). Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,05$  (\*).

#### 4.5. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA C6 I RC6 ĆELIJA I SFEROIDA *IN VITRO*

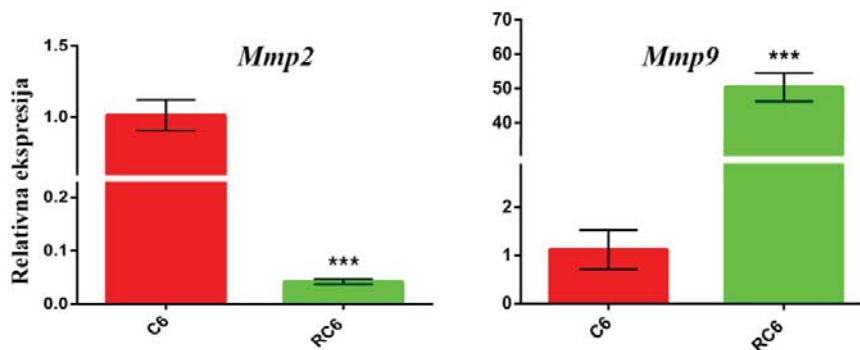
Razlike u invazivnim karakteristikama C6 i RC6 ćelija su utvrđene ispitivanjem njihove sposobnosti za degradaciju (razlaganje) želatina koja se podudara sa sposobnošću tumorskih ćelija da razlažu vanćelijski matriks. Želatin, u ovom testu, predstavlja supstrat za matriksne metaloproteinaze 2 i 9, pa je na taj način posredno izvršeno merenje njihove aktivnosti (Slika 27). Ćelije su gajene na želatinu 24 h, a zatim su fiksirane, obojene i slikane na fluorescentnom mikroskopu. Meren je obim tamne oblasti nastale degradacijom želatina i normalizovan u odnosu na veličinu (obim) ćelije (Slika 27A). Sve dobijene vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u „Graph Pad Prism 6“ programu. Pokazano je da RC6 ćelije bolje degradiraju želatin (4 puta) u odnosu na C6 ćelije i ta razlika između C6 i RC6 ćelija u stepenu degradacije želatina je statistički značajna ( $p \leq 0,001$ ) (Slika 27B).



**Slika 27. Razlike u stepenu degradacije želatina između C6 i RC6 ćelija.** (A) Prikazane su reprezentativne slike C6 i RC6 ćelija zasejanih na želatinu. Crvena fluorescencija potiče od fluorescentnog obeležavanja ćelija sa F-aktinom. Jedra su kontrastirana Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescenciju. Želatin fluorescira zelenom bojom. Degradovani želatin se detektuje kao smanjenje ili nedostatak fluorescentnog signala u području ispod ćelije ili na mestu gde se nalazila ćelija. Skala = 200  $\mu\text{m}$ . (B) Na histogramu je pokazana razlika u sposobnosti C6 i RC6 ćelija da degradiraju želatin. Intenzitet degradacije je izražen kao odnos površine degradovanog želatina i površine citoplazme ćelije. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta ( $n=3$ ). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

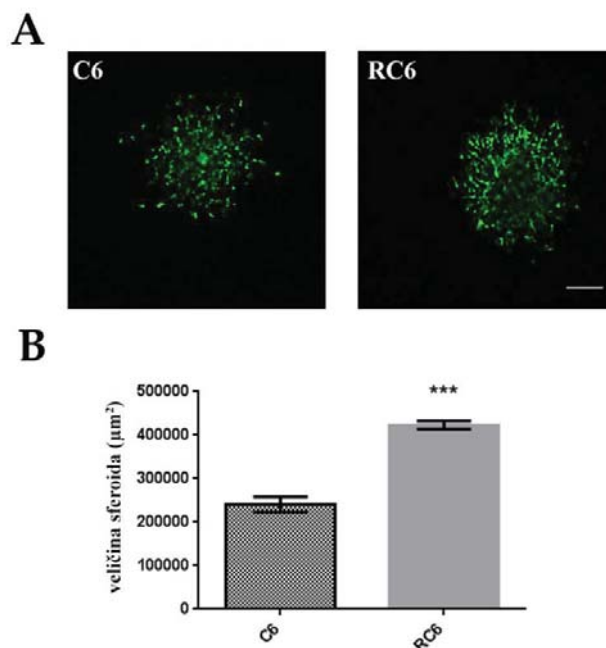
Takođe je ispitana ekspresija *Mmp2* i *Mmp9* iRNK kod C6 i RC6 ćelija metodom kvantitativnog RT-PCR-a u realnom vremenu. Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje ( $p \leq 0,001$ ) ekspresije *Mmp9* iRNK (50 puta), dok je ekspresija *Mmp2* iRNK statistički značajno smanjena ( $p \leq 0,001$ ) kod RC6 ćelija (25 puta) (Slika 28).





**Slika 28. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza 2 i 9 na nivou iRNK kod C6 i RC6 ćelijske linije.** Metodom kvantitativnog RT-PCR-a u realnom vremenu je određena ekspresija *Mmp2* i *Mmp9* iRNK kod C6 i RC6 ćelija.  $\beta$ -aktin je korišćen kao interna kontrola, a iz odnosa ekspresije gena od interesa i interne kontrole je preračunata relativna ekspresija. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

3D test invazivnosti sferoida ukazuje na sposobnost ćelija da se rasipaju od tela sferoida i vrše invaziju u okolni vanćelijski matriks, u ovom slučaju hidrogel. Pokazano je da nakon 24 h obe ćelijske linije formiraju dobro definisane sferoide jednake veličine, a za njihovo formiranje je korišćena metoda viseće kapiljice. Sferoidi su zatim uronjeni u hidrogel na 24 h, nakon čega su obojeni kalceinom (CAM) i propidijum jodidom (PI) i slikani na konfokalnom mikroskopu (Slika 29). Merena je veličina koju zauzima sferoid u hidrogelu zajedno sa ćelijama koje se rasipaju u odnosu na telo sferoida, što ukazuje na stepen invazivnosti (Slika 29A). Sve dobijene vrednosti su dalje korišćene za statističku obradu rezultata i njihovo grafičko predstavljanje u „Graph Pad Prism 6“ programu. Pokazano je da je invazivna sposobnost RC6 sferoida značajno povećana (2 puta) u odnosu na C6 sferoide ( $p \leq 0,001$ ) (Slika 29B).



**Slika 29. 3D sposobnost invazije C6 i RC6 sferoida.** (A) Prikazane su reprezentativne slike C6 i RC6 sferoida nakon 24 h u hidrogelu. CAM, koji emituje zelenu fluorescenciju, služi za detekciju živih ćelija, dok PI emituje crvenu fluorescenciju i služi za detekciju mrtvih ćelija. Skala = 200 µm. (B) Na histogramu je predstavljena veličina sferoida. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između C6 i RC6 ćelijske linije je predstavljena kao  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)).

#### 4.6. RAZLIKE U INVAZIVNIM KARAKTERISTIKAMA C6 I RC6 ĆELIJA *IN VIVO* USPOSTAVLJANJE ANIMALNOG MODELA

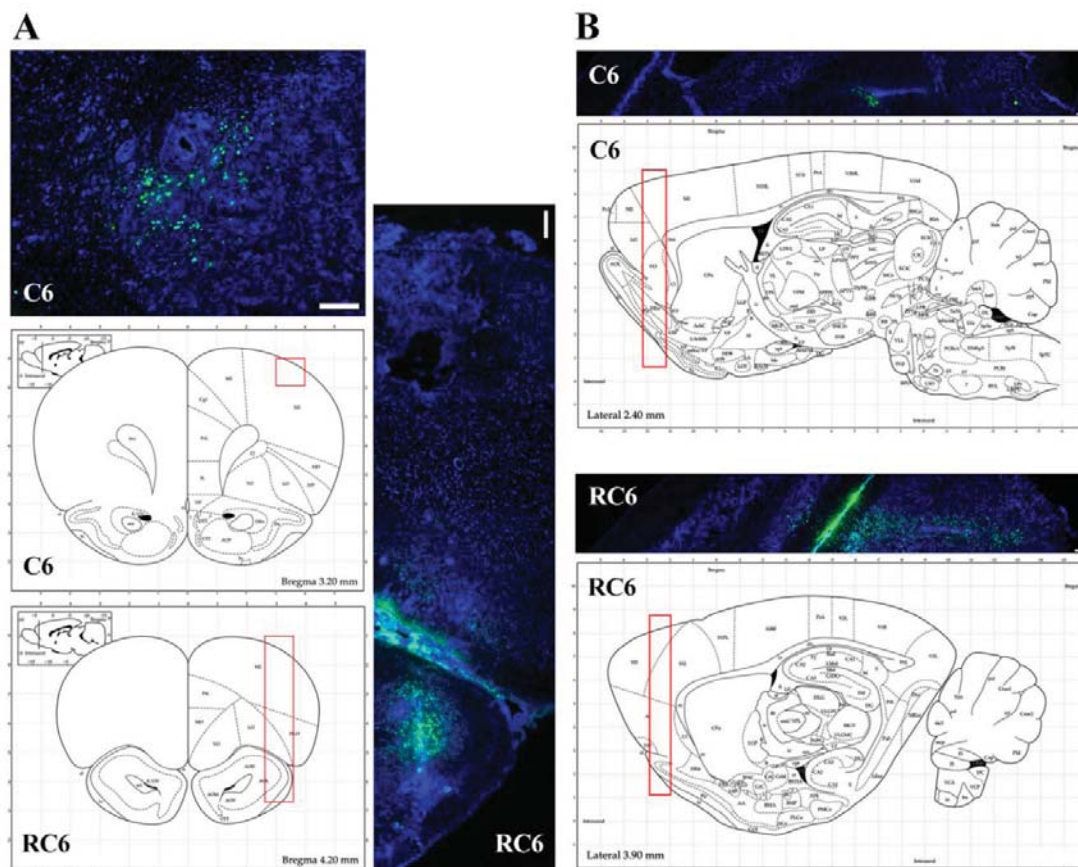
Praćenje invazivnog potencijala C6 i RC6 ćelija *in vivo* je omogućeno obeležavanjem ćelija sa fluorescentnim reagensom neposredno pred njihovo ubrizgavanje u moždano tkivo Wistar pacova. U svaku životinju je ubrizgavano po 100 000 ćelija resuspendovanih u 5 µl PBS-a. Životinje su žrtvovane 10. dan nakon inokulacije ili 25. dan nakon inokulacije u zavisnosti od toga da li su ćelije bile obeležene FB ili CFSE fluorescentnim reagensom. Stanje operisanih pacova praćeno je u toku eksperimenata na dnevnoj bazi.

U Tabeli 3 je prikazana imunološka slika iz krvi pacova 10. dan nakon ubrizgavanja ćelija. Kao kontrolna grupa korišćeni su pacovi kojima je umesto ćelija ubrizgana ista zapremina PBS-a. Urađena je detaljna leukocitna formula i koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP). Vrednosti parametara kontrolnih životinja i životinja kojima su ubrizgane C6 i RC6 ćelije se nalaze u okviru referentnih vrednosti za pacove (Tabela 3).

**Tabela 3. Imunološka slika iz krvi pacova 10. dan nakon inokulacije**

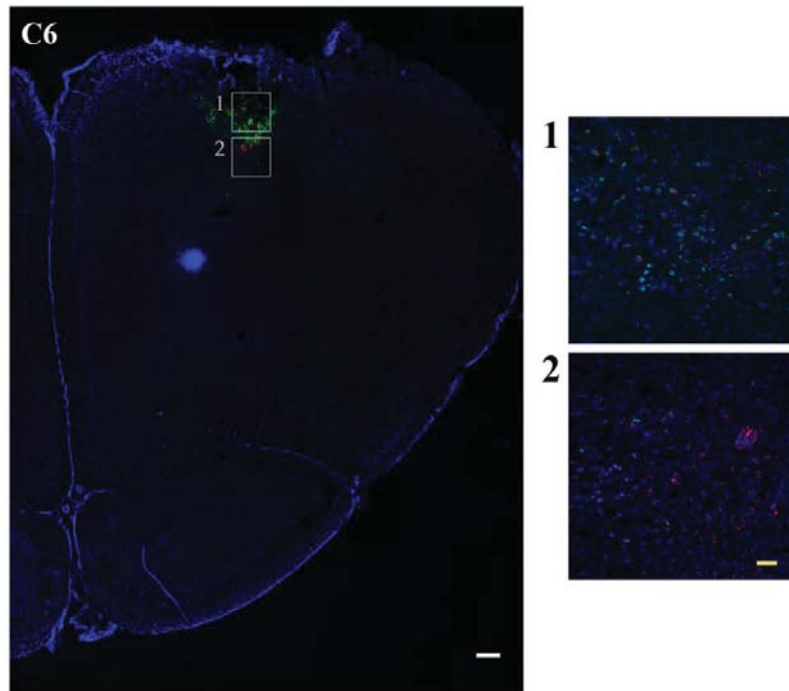
	<b>Referentne vredosti za pacova</b>	<b>Kontrola (PBS)</b>	<b>C6 ćelije</b>	<b>RC6 ćelije</b>
<b>Leukociti</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>6-18</b>	10,73	10,65	9,80
<b>CRP</b> (mg/L)	<b>0,0-5.0</b>	0,7	1,1	1,2
<b>Limfociti</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>65-85</b>	65,1	71,1	74,7
<b>Monociti</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>0-5</b>	3,9	2,8	3,0
<b>Eozinofili</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>0-6</b>	2,0	4,4	0,7
<b>Bazofili</b> (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	<b>0-1</b>	0,4	0,4	0,4

FB fluorescentna boja je korišćena za praćenje lokalizacije C6 i RC6 ćelija 10. dan nakon ubrizgavanja (Slika 30). Poprečni (Slika 30A) i uzdužni (Slika 30B) moždani preseki su slikani na fluorescentnom mikroskopu. Ćelije moždanog tkiva su obeležene sa PI radi utvrđivanja u kojim regionima mozga se nalaze fluorescentno obeležene ćelije. C6 ćelije su uočene plitko u moždanom tkivu i njihova lokalizacija je ograničena na predeo oko uboda. Nakupina C6 ćelija je nejasno razgraničena, što se poklapa sa karakterizacijom ovih ćelija kao infiltrativnih. RC6 ćelije, za razliku od C6 ćelija, migriraju dublje u moždano tkivo (Slika 30A i 30B). Fluorescentni signal poreklom od obeleženih RC6 ćelija je mnogo intenzivniji nego što je to slučaj sa signalom koji je poreklom od C6 ćelija. RC6 ćelije se uočavaju u ipsilateralnom olfaktornom bulbusu i u regionu na prelazu ka olfaktornom bulbusu (Slika 30A i 30B).



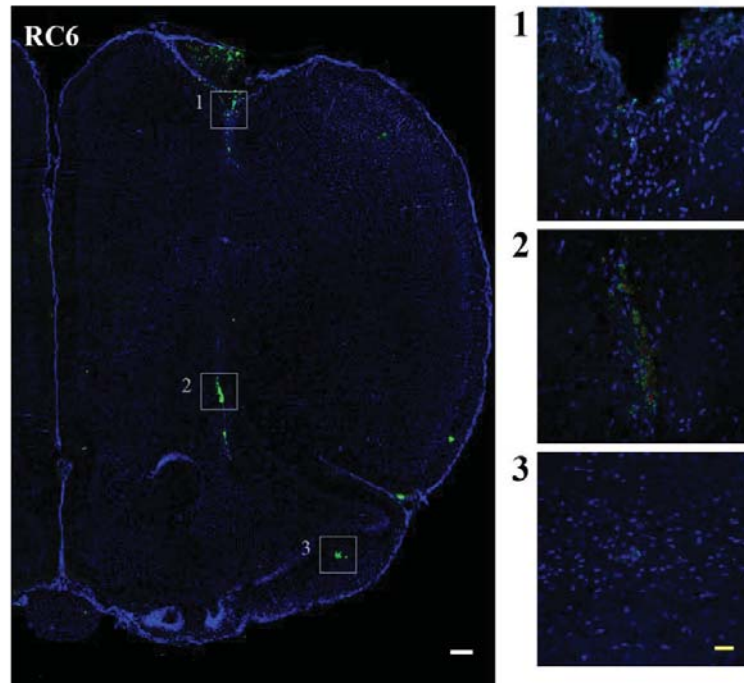
**Slika 30. Invazivna sposobnost C6 i RC6 ćelija 10. dana.** Prikazane su reprezentativne slike poprečnih (A) i uzdužnih (B) moždanih preseka Wistar pacova sa C6 ili RC6 ćelijama. C6 i RC6 ćelije su obeležene sa FB fluorescentnom bojom (zeleno), dok su ćelijska jedra mozga obeležena sa PI bojom (plavo). Skala = 200  $\mu$ m. Svaka slika je praćena odgovarajućom mapom poprečnog (A) i uzdužnog (B) moždanog preseka pacova na kojima je obeležena lokacija u mozgu gde su C6 ili RC6 ćelije uočene. Mape moždanih preseka pacova su preuzete i modifikovane iz Rat Brain Atlas (Paxinos i Watson, 2006).

CFSE fluorescentna boja je korišćena za duže praćenje C6 i RC6 ćelija u mozgu Wistar pacova. Poprečni moždani preseki uzeti 25. dana nakon ubrizgavanja ćelija su slikani na fluorescentnom i konfokalnom mikroskopu. Ćelijska jedra moždanog tkiva su obeležena Hoechst 33342 bojom, dok su ćelije u proliferaciji obeležene antitelom za Ki-67 protein. Kolokalizacija Ki-67 u ćelijama obeleženih CFSE bojom predstavlja dodatnu potvrdu prisustva ubrizganih gliomskih ćelija u moždanom parenhimu. C6 ćelije obeležene CFSE bojom pozitivne na Ki67 protein su primećene u blizini mesta ubrizgavanja, u regionu invazivnog fronta koji formiraju C6 ćelije (Slika 31).



**Slika 31. Invazivna sposobnost C6 ćelija 25. dana.** Levo je prikazana reprezentativna slika poprečnog moždanog preseka pacova dobijena na fluorescentnom mikroskopu, dok su na slikama desno prikazani segmenti slikani na konfokalnom mikroskopu. C6 ćelije su obeležene CFSE fluorescentnom bojom (zeleno) i proliferativnim markerom anti-Ki67 antitelom (crveno). Ćelijska jedra mozga su obeležene Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Skala = 200  $\mu\text{m}$  (belo), skala = 25  $\mu\text{m}$  (žuto).

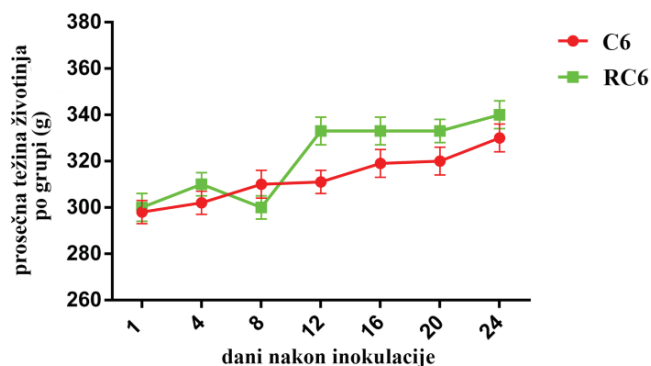
RC6 ćelije invadiraju dublje u ipsilateralne moždane strukture u odnosu na C6 ćelije. Ćelije obeležene CFSE bojom pozitivne na Ki67 protein su primećene u različitim moždanim regionima (Slika 32).



**Slika 32. Invazivna sposobnost RC6 ćelija 25. dana.** Levo je prikazana reprezentativna slika poprečnog moždanog preseka pacova dobijena na fluorescentnom mikroskopu, dok su na slikama desno prikazani segmenti slikani na konfokalnom mikroskopu. RC6 ćelije su obeležene CFSE fluorescentnom bojom (zeleno) i proliferativnim markerom anti-Ki67 antitelom (crveno). Ćelijska jedra mozga su obeležene Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Skala = 200  $\mu\text{m}$  (belo), skala = 25  $\mu\text{m}$  (žuto).

#### 4.7. MOTORIČKA AKTIVNOST I HABITUACIJA ŽIVOTINJA SA INOKULISANIM C6 I RC6 ČELIJAMA

Testovi ponašanja su rađeni na životinjama koje nisu imale negativne promene fizioloških parametara (nije došlo do značajnih promena u njihovoj težini). Šta više, primećen je trend dobijanja na težini kod C6 i RC6 grupe životinja tokom perioda od 24 dana (Slika 33).



Slika 33. Prosečna težina životinja u C6 i RC6 grupi tokom 24 dana nakon inokulacije ćelija.

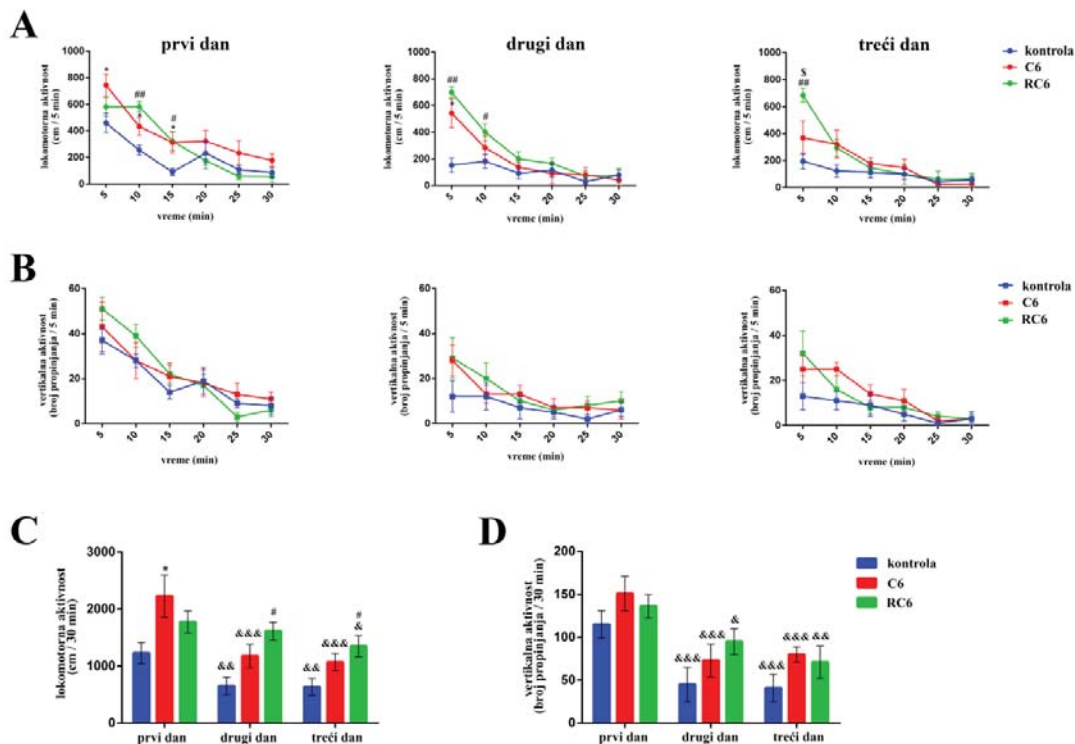
Sve testirane grupe životinja su ispoljile habituaciju u okviru test sesije, što je manifestovano kroz smanjenje lokomotorne (Slika 34A) i vertikalne (Slika 34B) aktivnosti u toku ispitivanog perioda. U poređenju sa kontrolnom grupom, C6 grupa je pokazala značajno povećanu lokomotornu aktivnost u prvom danu testiranja tokom prvih 15 min merenja (Slika 34A, \*  $p = 0,043$ , U test), kao i u drugom danu testiranja u prvih 5 min merenja (\*  $p = 0,011$ ). U poređenju sa kontrolnom grupom, RC6 grupa je pokazala značajno povećanu lokomotornu aktivnost u prvom danu testiranja tokom drugih (Slika 34A, ##  $p = 0,004$ ) i trećih 5 min merenja (#  $p = 0,045$ ), u drugom danu testiranja u prvih (##  $p = 0,004$ ) i drugih (#  $p = 0,037$ ) 5 min merenja i u trećem danu testiranja u prvih 5 min merenja (##  $p = 0,004$ ). Osim toga, u trećem danu testiranja RC6 grupa je imala značajno povećanu lokomotornu aktivnost tokom prvih 5 minuta merenja u poređenju sa C6 grupom (\$  $p = 0,028$ ). Nije pokazana značajna razlika između kontrolne, C6 i RC6 grupe životinja u pogledu petominutnih testova vertikalne aktivnosti (Slika 34B).

Habituacija kroz tri uzastopna dana testiranja u pogledu lokomotorne aktivnosti je pokazana kod svih eksperimentalnih grupa životinja, što se ispoljava smanjenjem lokomocije kroz uzastopne test-sesije (Slika 34C). Statistički test je ukazao na značajnost tipa ćelijske linije koja je inokulisana ( $F(2, 14) = 6,295$ ,  $p = 0,011$ ), vremena ( $F(2, 28) = 24,339$ ,  $p <$

0,001) i njihove interakcije ( $F(2, 28) = 3,134, p = 0,031$ ). Poređenja u okviru grupa su ukazala da je u odnosu na prvi dan ispitivani parametar značajno smanjen drugog i trećeg dana testiranja u kontrolnoj grupi ( $p = 0,004$  i  $p = 0,003$ , redom) i C6 grupi ( $p < 0,001$ ), dok je u RC6 grupi značajno smanjenje postignuto samo u trećem danu ( $p = 0,031$ ). U poređenju sa kontrolnom grupom lokomotorna aktivnost C6 grupe je značajno povećana tokom prvog dana testiranja ( $p = 0,029$ ), dok je aktivnost RC6 grupe značajno povećana tokom drugog ( $p = 0,027$ ) i trećeg ( $p = 0,045$ ) dana. Druga poređenja nisu ukazala na značajnije promene.

Promene u vertikalnoj aktivnosti eksperimentalnih životinja tokom 3 dana merenja su predstavljene na Slici 34D. Statistička analiza ukazuje na značajni uticaj vremena ( $F(2, 28) = 25,831, p < 0,001$ ), dok nije pokazan značajni uticaj tipa inokulisane ćelijske linije ( $F(2, 14) = 2,423, p = 0,128$ ) kao ni interakcije ova dva faktora ( $F(2, 28) = 0,603, p = 0,664$ ). U poređenju sa aktivnošću detektovanom tokom prvog dana merenja ispitivani parametar je značajno smanjen tokom drugog i trećeg dana merenja u kontrolnoj grupi ( $p < 0,001$ ), C6 grupi ( $p < 0,001$ ) i RC6 grupi ( $p = 0,041$  i  $p = 0,002$ , redom). Poređenja između grupa nisu pokazala značajne razlike ni u jednom danu merenja.



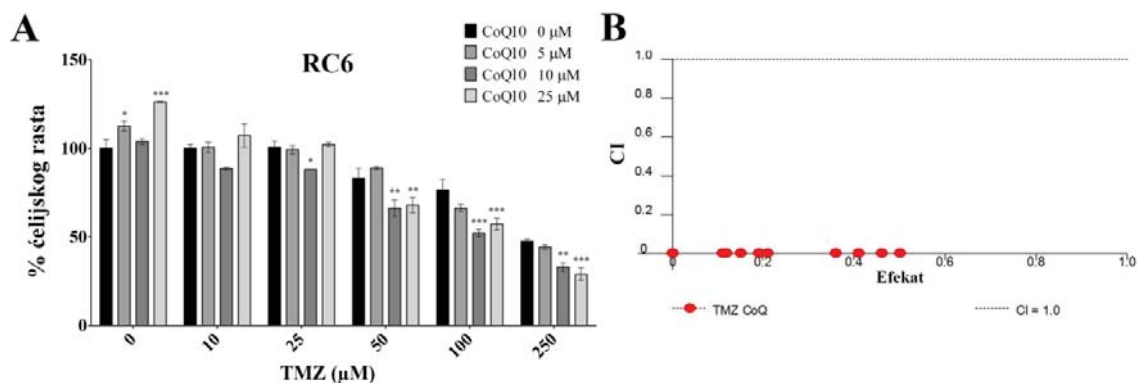


**Slika 34. Motorička aktivnost i habituacija kontrolne, C6 i RC6 grupe životinja.** Lokomotorna (A) i vertikalna (B) aktivnost životinja u periodu od 30 min (habituacija u okviru ispitivanog perioda) tokom 3 uzastopna dana. Ukupna lokomotorna (C) i vertikalna (D) aktivnost životinja za 30 min period tokom 3 uzastopna dana merenja (habituacija kroz ponovljena merenja). Simbol \* označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između kontrolne i C6 grupe, simboli # i ## označavaju značajnu razliku između kontrolne i RC6 grupe ( $p < 0.05$  i  $p < 0.01$ , redom), a simbol \$ označava statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ) između C6 i RC6 grupa. Statistički značajna razlika između prvog i druga dva dana merenja u okviru iste eksperimentalne grupe je označena kao & ( $p < 0.05$ ), && ( $p < 0.01$ ) ili &&& ( $p < 0.001$ ).

## 4.8. ANTIOKSIDANT CoQ10 POVEĆAVA OSETLJIVOST RC6 ĆELIJA NA ANTIGLIOMSKI LEK TMZ

### 4.8.1. EFEKAT NA ĆELIJSKI RAST

Efekat istovremenog tretmana CoQ10 i TMZ na RC6 ćelije je ispitan SRB testom. Ćelije su pretretirane 6 h sa 5, 10 i 25  $\mu\text{M}$  CoQ10, nakon čega je izvršen tretman rastućim koncentracijama TMZ (10-250  $\mu\text{M}$ ) u trajanju od 72 h. Efekat pojedinačnih i kombinovanih tretmana na ćelijski rast je prikazan na Slici 35A. Priroda uzajamnog dejstva CoQ10 sa TMZ utvrđena je izračunavanjem kombinacionog indeksa (CI) u programu „CalcuSyn“. Ispitane kombinacije tretmana sa vrednostima CI < 1 ukazuju na sinergističku interakciju CoQ10 i TMZ kod RC6 ćelija (Slika 35B).



**Slika 35. Kombinovani efekat CoQ10 i TMZ-a na rast RC6 ćelija.** (A) Efekat kombinacije CoQ10 i TMZ-a je određen SRB testom. Srednje vrednosti su dobijene iz četiri nezavisna eksperimenta ( $n = 4$ ). (B) Priroda međudejstva CoQ10 i TMZ-a predstavljena je odgovarajućim izobologramom. Interakcija između CoQ10 i TMZ-a je određena primenom CalcuSyn kompjuterskog softvera. Vrednosti  $CI < 1$  ukazuju na sinergistički efekat.

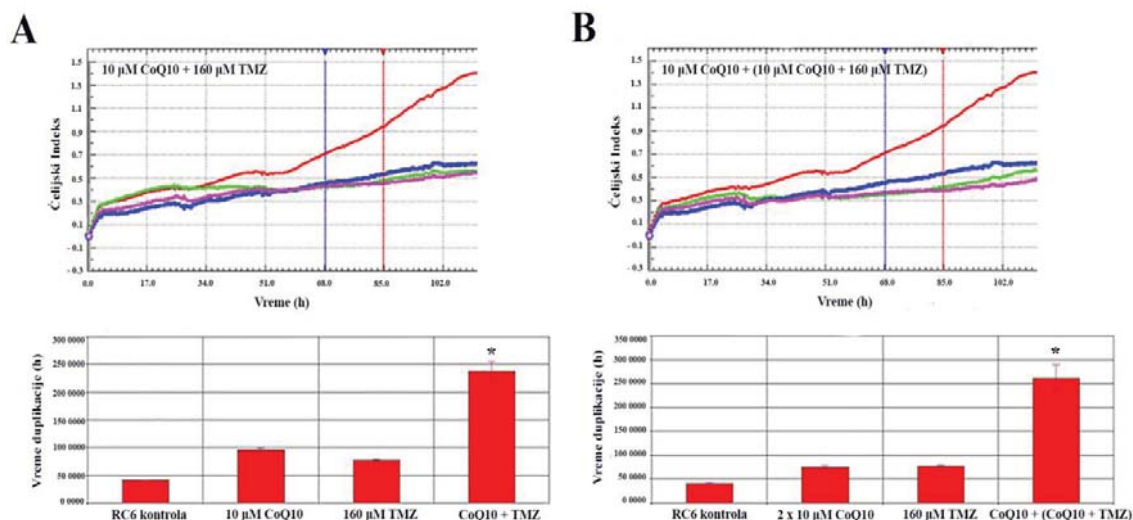
Smanjenje  $IC_{50}$  vrednosti za TMZ kod RC6 ćelija pretretiranih sa CoQ10 prikazano je u Tabeli 4. Relativna reverzija rezistencije je dobijena kao odnos  $IC_{50}$  vrednosti za TMZ i  $IC_{50}$  vrednosti za TMZ u kombinaciji sa određenom koncentracijom CoQ10. Sve tri koncentracije dovode do povećanja osetljivosti na TMZ, dok 25  $\mu$ M CoQ10 pokazuje najveći potencijal za reverziju rezistencije sa koeficijentom relativne reverzije 3,3.

**Tabela 4. Efekat CoQ10 na relativnu reverziju rezistencije na TMZ kod RC6 ćelija**

R6 ćelijska linija	$IC_{50}$ ( $\mu$ M) $\pm$ SD	Relativna reverzija rezistencije
TMZ	239,7 $\pm$ 4,8	/
5 $\mu$ M CoQ10 +TMZ	167,5 $\pm$ 6,7	1,4
10 $\mu$ M CoQ10 +TMZ	100,0 $\pm$ 4,0	2,4
25 $\mu$ M CoQ10 +TMZ	72,2 $\pm$ 4,3	3,3

Efekat pojedinačnih i kombinovanog tretmana sa CoQ10 i TMZ na stopu rasta RC6 ćelija je analiziran u realnom vremenu pomoću „xCELLigence“ sistema (Slika 36). RC6 ćelije su sejane u E-mikrotitar ploču sa 96 bunarića opremljenu elektrodom od zlata na dnu svakog bunarića i rast ćelija pod tretmanom je praćen tokom 120 h. Ispitivan je efekat jednokratnog (Slika 36A), kao i dvokratnog pretretmana sa 10  $\mu$ M CoQ10 (Slika 36B) u kombinaciji sa 160  $\mu$ M TMZ. Stopa rasta je predstavljena kao ćelijski indeks (engl. Cell Index, (CI)). Vreme duplikacije RC6 ćelija je dobijeno analizom nagiba krive između dve vremenske tačke koji odgovara logaritamskom rastu ćelija. Vreme duplikacije RC6 ćelija je 45 h, dok se u jednokratnom tretmanu sa CoQ10 povećava na 95 h (Slika 36A). Broj RC6 ćelija se duplira nakon 80 h pod tretmanom sa TMZ (Slika 36A i B). Izrazito usporavanje ćelijskog rasta je uočeno u kombinovanom tretmanu, gde vreme duplikacije iznosi 240 h (Slika 36A). U dvokratnom tretmanu sa CoQ10, vreme duplikacije je 75 h dok kombinacija TMZ sa dvokratnim CoQ10 pretremanom smanjuje stepen ćelijske proliferacije i povećava broj sati

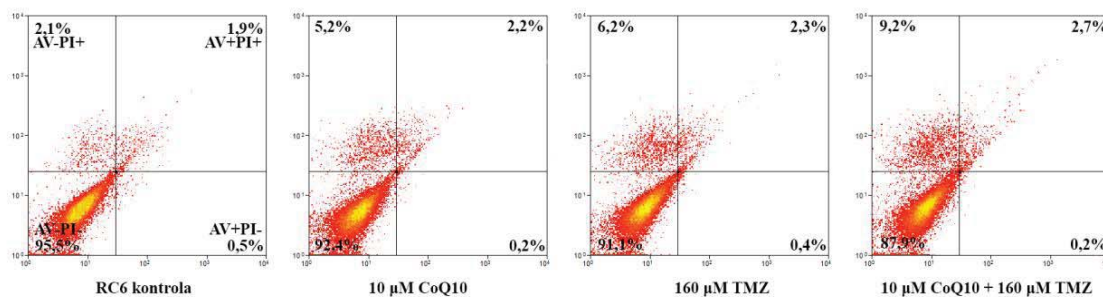
neophodnih za dupliranje RC6 ćelija na 260 h (Slika 36B). RC6 ćelije proliferišu značajno sporije u prisustvu pojedinačnih agenasa CoQ10 i TMZ, ali je usporavanje proliferacije tj. citostatsko dejstvo daleko izraženije kada su izložene kombinaciji CoQ10 i TMZ.



**Slika 36. Analiza stope rasta RC6 ćelija nakon primene kombinovanog tretmana CoQ10 sa TMZ u realnom vremenu.** (A) jednokratni pretretman sa 10 µM CoQ10 u kombinaciji sa 160 µM TMZ; (B) dvokratni pretretman sa 10 µM CoQ10 u kombinaciji sa 160 µM TMZ. Grafici na gornjem panelu pokazuju razliku u ćelijskom indeksu između RC6 kontrole (crvena linija), CoQ10 tretmana (plava linija), TMZ tretmana (zelena linija) i kombinacije CoQ10 i TMZ (ljubičasta linija). Na donjim panelima, histogrami pokazuju vreme duplikacije RC6 ćelija dobijeno analizom logaritamske faze ćelijskog rasta između 68 h (plava vertikalna linija) i 85 h (crvena vertikalna linija). Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između netretirane kontrole i tretmana je predstavljena kao  $p \leq 0,05$  (\*).

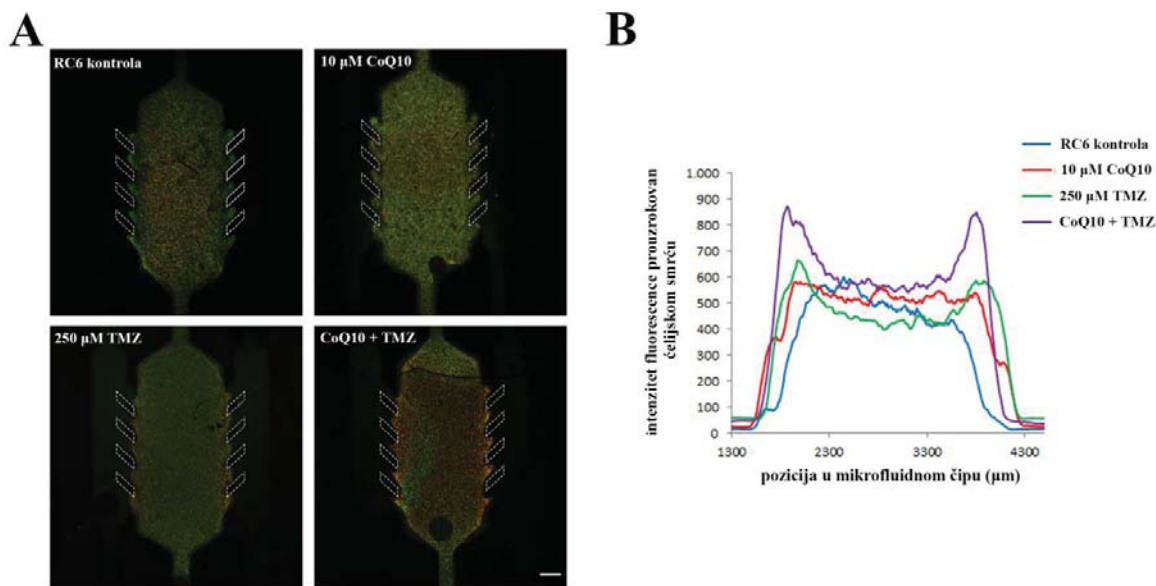
#### 4.8.2. EFEKAT NA ČELIJSKU SMRT

Doprinos CoQ10 indukciji ćelijske smrti izazvane tretmanom sa TMZ, analiziran je protočnom citofluorimetrijom. Efekat pojedinačnih i kombinovanog tretmana je ispitivan nakon 72 h. Zbirni procenat apoptotskih i nekrotskih RC6 ćelija (AV+PI+ i AV-PI+) je povećan sa 4,5% u kontroli na 7,6% u tretmanu sa CoQ10, 8,9% u tretmanu sa TMZ i 12,1% u kombinovanom tretmanu. Procentualno najveći udeo ćelija se nalazi u nekrozi (AV-PI+, Slika 37).



**Slika 37. Indukcija ćelijske smrti kod RC6 ćelija nakon pojedinačnih i kombinovanog tretmana sa CoQ10 i TMZ.** RC6 ćelije tretirane sa 10  $\mu$ M CoQ10, 160  $\mu$ M TMZ i kombinacijom ova dva agensa, analizirane su metodom protočne citofluorimetrije pomoću AV/PI bojenja. Ovo bojenje omogućava razlikovanje vijabilnih ćelija (AV-PI-), apoptotskih ćelija (AV+PI-), kasno apoptotskih i ćelija u nekrozi (AV+PI+) kao i sekundarno nekrotičnih ili mrtvih ćelija (AV-PI+).

Ćelijska smrt je takođe ispitivana u sistemu koji oponaša uslove tumorske mikrosredine. RC6 ćelije su zasejane u gustini od  $40 \times 10^6$  ćelija/ml u centralnu komoru mikrofluidnog čipa, dok je kroz lateralnu komoru perfundovan čist medijum, medijum sa 10  $\mu$ M CoQ10, 250  $\mu$ M TMZ ili njihova kombinacija. Nakon 72 h, ćelije su obojene sa CAM i PI, a mikrofluidni čipovi su slikani na konfokalnom mikroskopu (Slika 38A). TMZ dovodi do povećanja inteziteta fluorescence poreklom od PI, koji služi za detekciju mrtvih ćelija, po obodu mikrofluidnog čipa, uz lateralne komore gde su supstance perfundovane. Ovaj efekat je daleko izraženiji u kombinaciji CoQ10 sa TMZ, gde je intezitet PI fluorescence jači i u mnogo širem regionu uz lateralne komore mikrofluidnog čipa nego pri pojedinačnom tretmanu sa TMZ (Slika 38B).

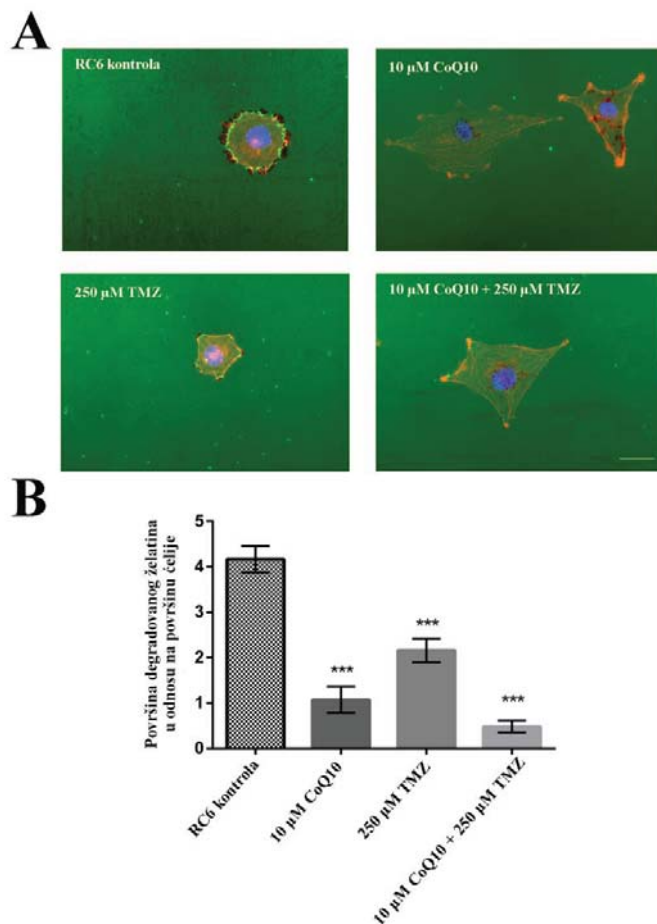


**Slika 38. Indukcija smrti RC6 ćelija u mikrofluidnom čipu . (A)** Prikazane su reprezentativne slike mikrofluidnih čipova. RC6 ćelije se nalaze u centralnoj komori, dok je kroz lateralne komore perfundovan čist medijum u kontroli, medijum sa 10 µM CoQ10, 250 µM TMZ ili kombinacijom ova dva agensa. CAM emituje zelenu fluorescenciju i služi za detekciju živih ćelija, dok PI emituje crvenu fluorescenciju i služi za detekciju mrtvih ćelija. Skala = 500 µm. **(B)** Na histogramu je kvantifikovan intenzitet PI fluorescencije kroz mikrofluidni čip u kontroli, pri tretmanu sa CoQ10, TMZ i njihovom kombinacijom.

#### 4.8.3. EFEKAT NA INVAZIJU ĆELIJA I SFEROIDA

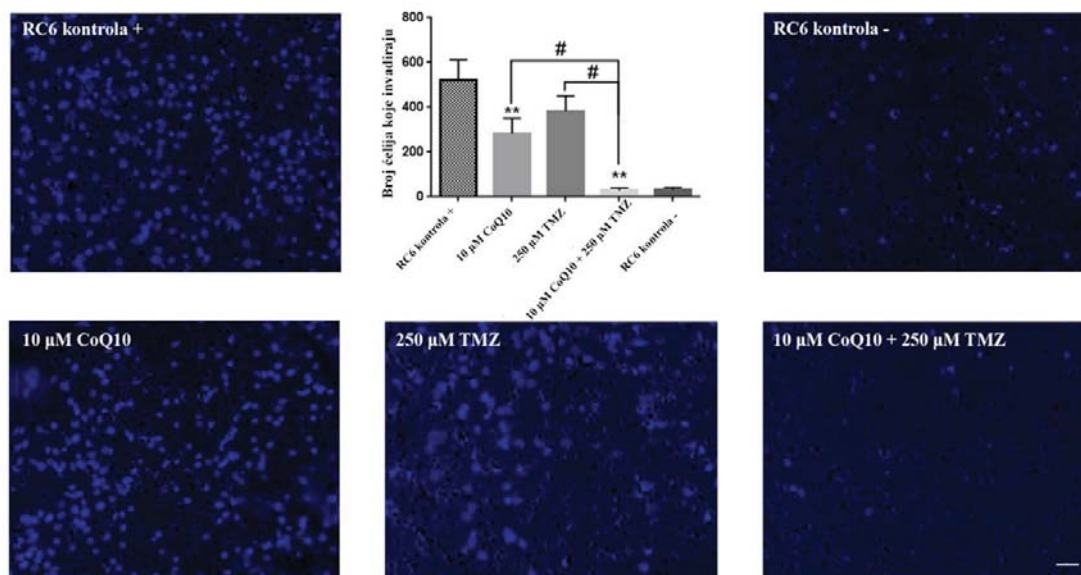
Za ispitivanje uticaja na invazivni potencijal RC6 ćelija, korišćeni su različiti testovi: degradacija ili razlaganje želatina, invazija ćelija kroz matrigel i 3D invazija sferoida. U svim testovima ispitivana koncentracija CoQ10 je bila 10 µM, TMZ-a 250 µM, pojedinačno i u kombinaciji, dok je tretman trajao 24 h.

Degradacija želatina, ilustrovana na Slici 39A, je značajno smanjena ( $p \leq 0,001$ ) nakon tretmana sa CoQ10 i TMZ (4 i 2 puta, redom, Slika 39B), dok je najbolji efekat dobijen nakon kombinovanog tretmana, koji dovodi do značajnog smanjenja degradacije želatina i do 8 puta ( $p \leq 0,001$ , Slika 39B).



**Slika 39. Efekat CoQ10, TMZ i njihove kombinacije na degradaciju želatina od strane RC6 ćelija.** (A) Prikazane su reprezentativne slike RC6 ćelija zasejanih na želatinu u kontroli, pod tretmanom sa CoQ10, TMZ i njihovom kombinacijom. Ćelije emituju crvenu fluorescencu usled bojenja sa F-aktinom. Jedra su obojena sa Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Želatin fluorescira zelenom bojom. Degradovani želatin se uočava kao smanjenje ili nedostatak fluorescentnog signala u području ispod ćelije ili na mestu gde se nalazila ćelija. Skala = 200 μm. (B) Na histogramu je kvantifikovana razlika u sposobnosti RC6 ćelija da degradiraju želatin nakon pojedinačnih i kombinovanog tretmana sa CoQ10 i TMZ. Stepen degradacije je izražen kao odnos površine degradovanog želatina i površine citoplazme ćelije. Srednje vrednosti su dobijene iz tri nezavisna eksperimenta (n=3). Statistički značajna razlika između netretirane kontrole i tretmana je predstavljena kao  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

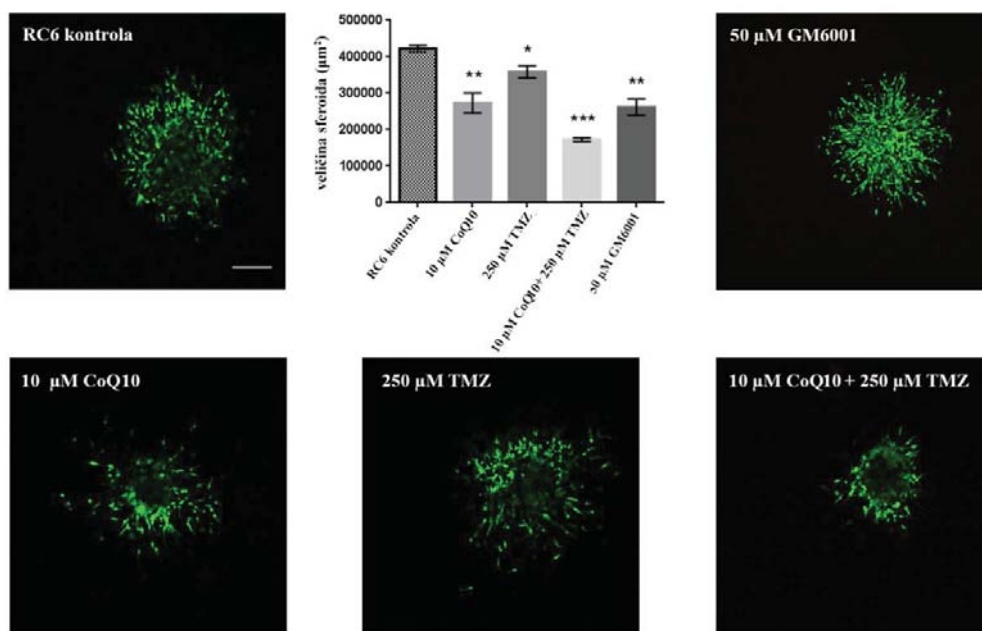
U testu invazije ćelija kroz matrigel, korišćene su pozitivna i negativna kontrola (detaljno opisano u Materijalu i metodama) kao što je prikazano na Slici 40. Procenat ćelija koje su prošle kroz matrigel u negativnoj kontroli mora biti manji od 15% u odnosu na pozitivnu kontrolu. Pri tretmanu sa CoQ10 skoro 50% ćelija ne prolazi kroz matrigel ( $p \leq 0,01$ ), TMZ smanjuje invaziju RC6 ćelija za 30%, ali ne značajno, dok je efekat kombinovanog tretmana na nivou negativne kontrole. Kombinovani tretman dovodi do statistički značajnog smanjenja invazije u odnosu na pojedinačne tretmane i CoQ10 i TMZ ( $p \leq 0,05$ , Slika 40).



**Slika 40. Efekat CoQ10, TMZ i njihove kombinacije na invaziju RC6 ćelija.** Prikazane su reprezentativne slike RC6 ćelija u pozitivnoj i negativnoj kontroli, pri tretmanu sa CoQ10, TMZ i njihovom kombinacijom. Jedra su obojena Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Skala = 50  $\mu\text{m}$ . Statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu:  $p \leq 0,01$  (\*\*); Statistički značajna razlika u odnosu na pojedinačne tretmane:  $p \leq 0,05$  (#).



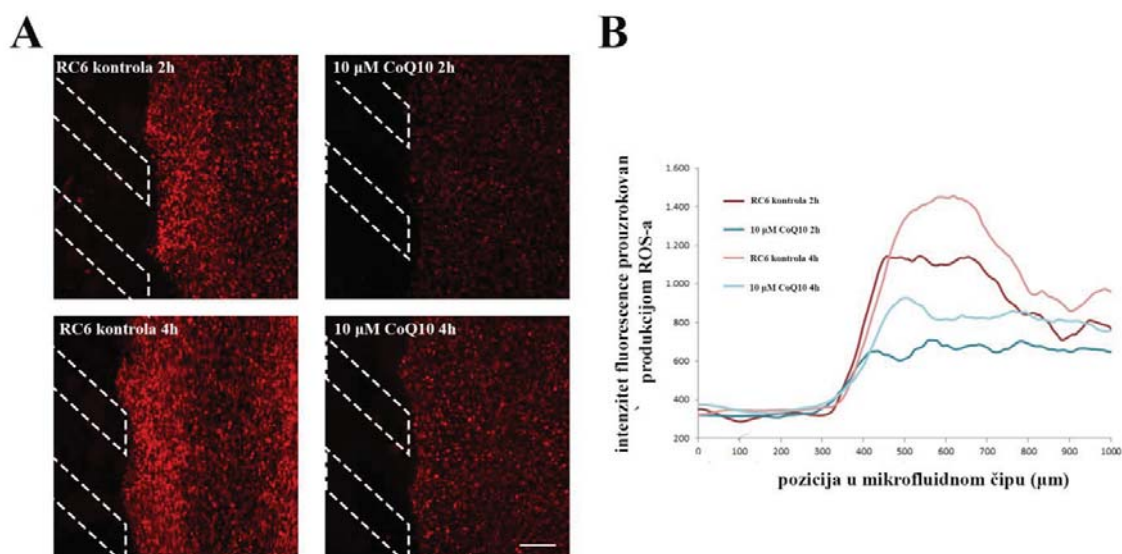
U 3D testu invazije sferoida prikazanom na Slici 41, CoQ10 dovodi do značajnog smanjenja invazivne sposobnosti RC6 sferoida za 33% u odnosu na netretiranu kontrolu ( $p \leq 0,01$ ), dok je efekat TMZ nešto slabiji i dovodi do smanjenja od 20% ( $p \leq 0,05$ ). Kombinacija pokazuje najbolji efekat smanjujući invazivnu sposobnost RC6 sferoida i do 60% ( $p \leq 0,001$ ). Efekat CoQ10, TMZ i njihove kombinacije, upoređen je sa efektom nespecifičnog inhibitora matriksnih metaloproteinaza – galardina (GM6001). Tretman sa 50  $\mu\text{M}$  GM6001 smanjuje invazivnu sposobnost RC6 sferoida za 38%, što je na nivou tretmana sa CoQ10 ( $p \leq 0,01$ , Slika 41).



**Slika 41. Efekat CoQ10, TMZ i njihove kombinacije na invaziju RC6 sferoida.** Prikazane su reprezentativne slike RC6 sferoida u kontroli, pri tretmanu sa CoQ10, TMZ i njihovom kombinacijom, kao i pri tretmanu sa GM6001 u hidrogelu. CAM emituje zelenu fluorescencu i služi za detekciju živih ćelija, dok PI emituje crvenu fluorescencu i služi za detekciju mrtvih ćelija. Skala = 200  $\mu\text{m}$ . Kvantifikacija rezultata je dobijena analizom broja ćelija koje invadiraju hidrogel. Statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolu:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*) i  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

#### 4.9. MEHANIZAM CoQ10

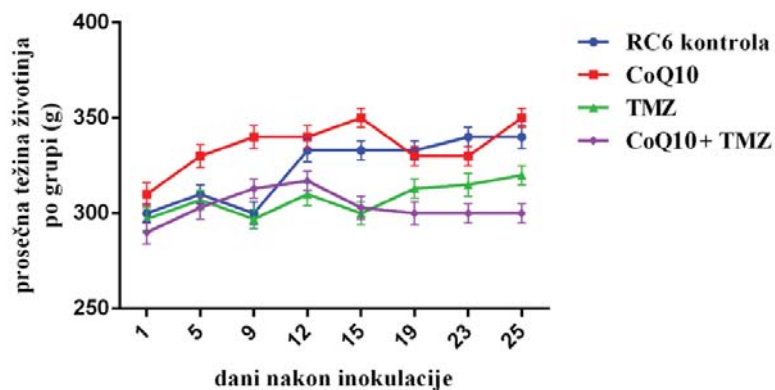
Uticaj CoQ10 na produkciju ROS-a kod RC6 ćelija je ispitivan i u mikrofluidnim čipovima. RC6 ćelije su za potrebe ovog eksperimenta zasejane u gustini od  $40 \times 10^6$  ćelija/ml u centralnu komoru mikrofluidnog čipa, dok je kroz lateralnu komoru perfundovan čist medijum i medijum sa  $10 \mu\text{M}$  CoQ10. Nakon 2 h i 4 h, ćelije su obojene sa CellROX® Orange i mikrofluidni čipovi su slikani na konfokalnom mikroskopu (Slika 42A). Kvantifikacija rezultata je izvršena prema intenzitetu fluorescence koja predstavlja meru produkcije ROS-a i poziciji RC6 ćelija u odnosu na lateralnu komoru kroz koju se vrši dotok medijuma. Značajno smanjenje produkcije ROS-a i ravnomernija distribucija u ćelijama je uočena pri tretmanu sa CoQ10 u obe vremenske tačke (Slika 42B).



**Slika 42. Efekat CoQ10 na produkciju ROS-a kod RC6 ćelija u mikrofluidnom čipu.** (A) Reprezentativne slike mikrofluidnih čipova. RC6 ćelije se nalaze u centralnoj komori, dok je kroz lateralne komore perfundovan čist medijum u kontroli ili medijum sa  $10 \mu\text{M}$  CoQ10. Produkcija ROS-a je praćena nakon tretmana sa CoQ10 u trajanju 2 h i 4 h. CellROX® Orange emituje crvenu fluorescencu u oksidovanom stanju. Skala =  $200 \mu\text{m}$ . (B) Na histogramu je prikazan intezitet CellROX® Orange fluorescence kroz region mikrofluidnog čipa u kontroli i tretmanu sa CoQ10, nakon 2 h i 4 h. Intenzitet fluorescence je srazmeran količini ROS-a.

#### 4.10. EFEKAT CoQ10 NA EFIKASNOST TMZ TRETMANA U RC6 ANIMALNOM MODELU

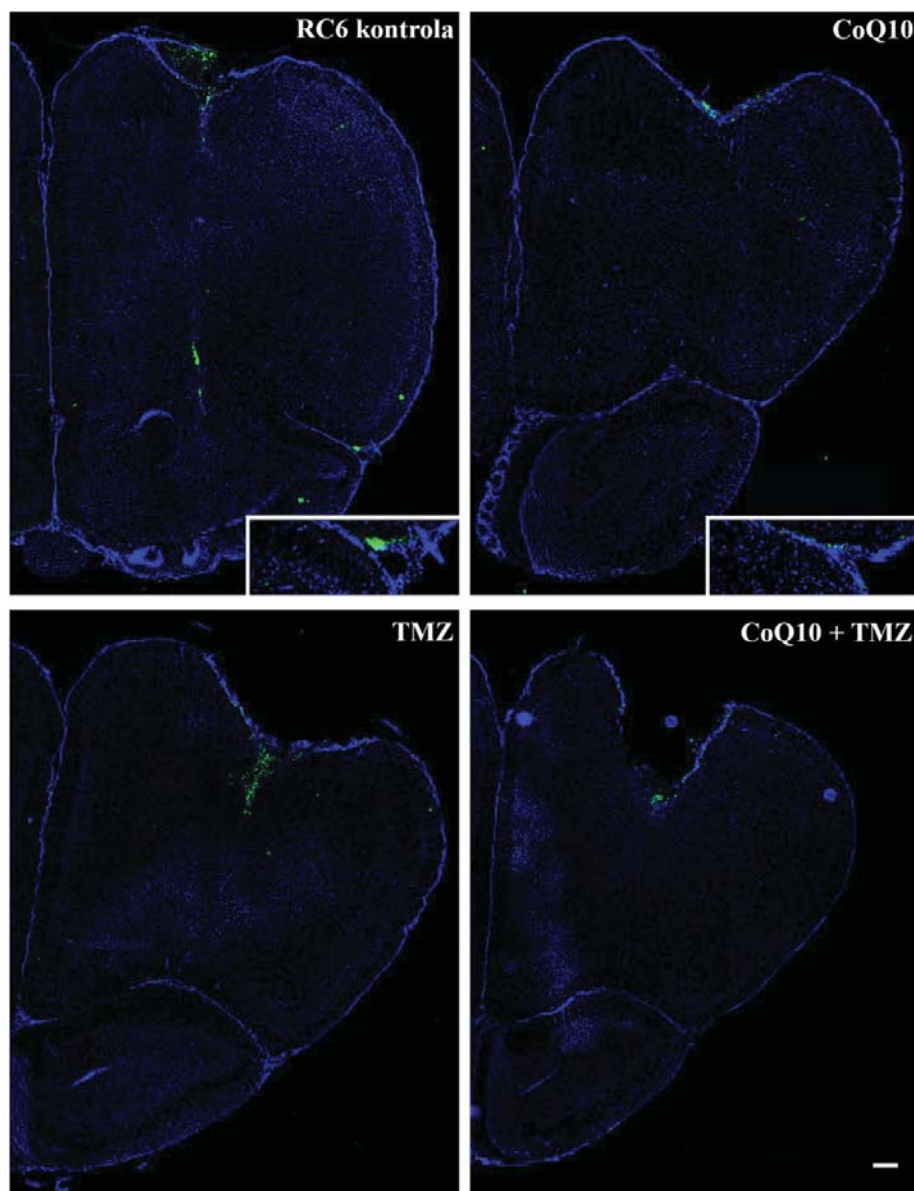
Za *in vivo* praćenje efikasnosti tretmana sa CoQ10 i TMZ, pojedinačno i u kombinaciji, u mozak Wistar pacova su inokulirane RC6 ćelije obeležene CFSE fluorescentnom bojom. Životinje su podeljene u 4 grupe sa po 5 životinja (kontrolna grupa i grupe tretirane sa CoQ10, TMZ i njihovom kombinacijom). Eksperiment je trajao 25 dana. CoQ10 i TMZ su ubrizgavani intraperitonealno, 10 mg/kg CoQ10 dva puta nedeljno u toku 25 dana, a 4 mg/kg TMZ jednom dnevno, pet uzastopnih dana u toku druge nedelje nakon inokulacije ćelija. Praćenjem težine tretiranih i netretiranih životinja je ustanovljeno da ne dolazi do značajnih promena među različitim grupama, što ukazuje na to da tretmani nisu imali negativan uticaj na njihovo fiziološko stanje (Slika 43).



Slika 43. Prosečna težina životinja po grupama tokom 25 dana od inokulacije ćelija.

Poprečni moždani preseci su slikani na fluorescentnom mikroskopu (Slika 44). Na moždanim presecima u kontrolnoj grupi, RC6 ćelije migriraju u dublje ipsilateralne moždane strukture i ipsilateralni olfaktorni bulbus. Ćelije se mogu videti u diskretnim grupacijama i kao rasute, što ukazuje na njihov infiltrativni rast. Na moždanim presecima životinja tretiranih samo sa CoQ10 uočava se kako antiproliferativni, tako i anti-invazivni efekat (Slika 44). Većina ćelija je lokalizovana u predelu uboda i manje ćelija je moguće detektovati u moždanom tkivu u poređenju sa moždanim presecima kontrolne grupe. Ćelije se mogu uočiti u manjoj grupaciji na prelazu ka olfaktornom bulbusu. Na moždanim presecima životinja tretiranih sa TMZ, jasno se uočava CFSE fluorescenca, što ukazuje na nižu stopu proliferacije zbog zadržavanja boje u RC6 ćelijama (Slika 44). Iako je invaziona sposobnost smanjena u

poređenju sa kontrolom, ćelije se takođe kreću ka ipsilateralnom olfaktornom bulbusu. Na preseku mozga životinja tretiranih sa kombinacijom CoQ10 i TMZ, većina RC6 ćelija se nalazi u predelu uboda. Izraženo je smanjena proliferacija i migracija inokuliranih ćelija u poređenju sa kontrolom, kao i samostalnim TMZ tretmanom (Slika 44).



**Slika 44. Efekat pojedinačnih i kombinovanog tretmana sa CoQ10 i TMZ u RC6 animalnom modelu.** Prikazane su reprezentativne slike poprečnih moždanih preseka životinja iz kontrolne netretirane grupe, CoQ10, TMZ i CoQ10 + TMZ grupe. Inokulisane RC6 ćelije su obeležene CFSE bojom koja emituje zelenu fluorescencu. Ćelijska jedra mozga su obeležena Hoechst 33342 bojom koja emituje plavu fluorescencu. Skala = 200  $\mu$ m.

## 5. DISKUSIJA

Gliomi predstavljaju najbrojniju grupu malignih tumora centralnog nervnog sistema, dok se glioblastomi izdvajaju kao najčešća i najagresivnija podgrupa. Standardna terapija za ovaj tip malignog tumora se sastoji iz maksimalnog hiruškog odstranjivanja praćenog radio- i hemioterapijom. Uprkos ovako agresivnom terapijskom pristupu petogodišnje preživljavanje pacijenata je manje od 9,8% što predstavlja poražavajući statistički podatak (Stupp i saradnici, 2009). Značajne prepreke za uspešno lečenje ovog maligniteta su pojava rezistencije na hemioterapiju i rasejavanje ćelija iz tumorske mase. Rasejane tumorske ćelije ne mogu biti hiruški ukonjene, te tako dovode do ponovnog razvoja bolesti.

### 5.1. REZISTENTAN FENOTIP RC6 ĆELIJA

Rezistentne ćelijske linije nastale od prvobitno senzitivnih ćelija primenom određenog hemioterapeutika, kroz procese indukcije i selekcije, već dugi niz godina se koriste kao *in vitro* modeli za ispitivanje kako mehanizama rezistencije, tako i novih terapijskih strategija. Poznato je da mehanizmi rezistencije, koji će se razviti u određenom modelu, zavise i od tipa tumorskih ćelija koje se koriste kao početni materijal, i od vrste hemioterapeutika kojim se indukuje rezistencija (McDermott i saradnici, 2014). Za dobijanje rezistentnog modela koji bi se mogao koristiti za ispitivanje novih pristupa lečenju glioblastoma, kao polazni materijal izabrali smo pacovsku C6 gliomsku ćelijsku liniju, a antigliomski agens karmustin (BCNU) smo upotrebili za stvaranje rezistencije. Na osnovu velikog broja literaturnih podataka koji upoređuju komercijalno dostupne pacovske ćelijske linije moždanih tumora, C6 linija pokazuje genetički profil i invazivne karakteristike najbližnje onima kod humanih glioblastoma (Barth i Kaur, 2009). BCNU se kao alkilirajući hemioterapeutski agens koristi u terapiji različitih tipova tumora, ali za našu studiju je najznačajnije bilo to što je BCNU prvi hemioterapeutik odobren od strane Administracije za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration – FDA) za lečenje primarnih i rekurentnih glioma (Panigrahi i saradnici, 2011).

Nakon devetomesečne primene BCNU, kao rezultat smo dobili novu RC6 ćelijsku liniju višestruko rezistentnu na BCNU u odnosu na polazne C6 ćelije. Naknadnim ispitivanjima smo utvrdili postojanje ukrštene rezistencije na druga dva DNK oštećujuća agensa, cisplatin (Cpt) koji unakrsno povezuje lance DNK i posledično dovodi do njihovog prekida i temozolomid (TMZ), alkilirajući agens koji se trenutno koristi kao standard u hemioterapiji visokogradusnih glioma po tzv. Stupovom protokolu lečenja. Stepenn rezistencije

na CPT i TMZ je na istom nivou kao u slučaju BCNU. Suprotno ovome, primetili smo pojavu kolateralne senzitivnosti na doksorubicin (DOX), inhibitor aktivnosti enzima topoizomeraze II koji pravi oštećenja u vidu dvolančanih prekida na DNK. Naš dalji rad je bio usmeren na ispitivanje mehanizama u osnovi razvoja rezistencije i kolateralne senzitivnosti.

Rezistencija na BCNU, CPT i TMZ kod RC6 ćelija, potvrđena je na nivou indukcije ćelijske smrti, kao i na nivou DNK oštećenja. Primena istih koncentracija ovih hemioterapeutika dovodi do pojave mrtvih ćelija i DNK oštećenja kod C6 linije, dok RC6 linija ne pokazuje osetljivost. Unutrašnji mitohondrijalni put apoptoze je vrlo često izmenjen kod tumorskih ćelija rezistentnih na radioterapiju, kao i na širok spektar hemioterapeutika (Wong, 2011). Naši rezultati su pokazali značajno smanjenje ekspresije antiapoptotskog faktora Bcl-2, proapoptotskog faktora Bad i efektorske kaspaze 3 na nivou iRNK i proteina. Takođe je pokazano smanjenje ekspresije iRNK antiapoptotskog Bcl-Xl i proapoptotskog Bax-a. Promene u ekspresiji članova unutrašnjeg mitohondrijalnog puta nastale usled kontinuiranog tretmana sa BCNU su najverovatnije posledica uspostavljanja nove ravnoteže između pro- i antiapoptotskih faktora. Smanjena ekspresija Bax proteina kod pacijenata sa adenokarcinomom dojke koreliše sa lošijim odgovorom na terapiju i smanjenim preživljavanjem. Pored toga, smanjena ekspresija Bax proteina je povezana sa smanjenjem ekspresije Bcl-2 proteina, *p53* mutacijama i gubitkom estrogenskih receptora što sve zajedno dovodi do formiranja agresivnijeg fenotipa (Reed, 1995). Preovladava mišljenje da je odnos u zastupljenosti proapoptotskih i antiapoptotskih članova Bcl-2 familije bitan za pokretanje procesa apoptoze. Aktivnost članova apoptotske mašinerije zavisi i od njihovog fosforilacionog statusa (Datta i saradnici, 2002; Ito i saradnici, 1997). U našem modelu, najznačajniju promenu predstavlja smanjenje ekspresije efektorske kaspaze 3 što ukazuje na nemogućnost pokretanja egzekutorske faze apoptoze kod RC6 ćelija. Literaturni podaci pokazuju da pacijenti oboleli od karcinoma dojke i prostate imaju smanjenu gensku i proteinsku ekspresiju kaspaze 3 (Devarajan i saradnici, 2002; Winter i saradnici, 2001). Kod MCF-7 ćelijske linije sa delecijom u *CASP3* dolazi do gubitka ekspresije ovog proteina i razvoja rezistencije na CPT i DOX (Yang i saradnici, 2001).

Naši rezultati pokazuju da jednokratni tretmani sa BCNU, CPT i TMZ prouzrokuju povećanu fosforilaciju H2A.X histona kod C6 u odnosu na RC6 ćelije, što ukazuje na smanjenu osetljivost RC6 ćelija na DNK oštećujuće agense. Naime, histon H2A.X pripada sistemu za detekciju i popravku oštećenja DNK molekula (eng. DNA Damage Response, DDR). Oštećenje DNK dovodi do fosforilacije serina na poziciji 139 u karboksiterminalnom

domenu ovog proteina ( $\gamma$ H2A.X) i njegove translokacije na mesto dvolančanog prekida DNK. Različiti proteini uključeni u popravku DNK takođe bivaju regrutovani unutar nukleusa stvarajući diskretne nakupine koje mogu biti detektovane korišćenjem fosfo-histon H2A.X antitela (Yuan i saradnici, 2010). Zapaženo je da se  $\gamma$ H2A.X smanjeno eksprimira kod K562 ćelijske linije leukemije rezistentne na DOX u odnosu na parentalnu liniju pod tretmanom sa istim koncentracijama tog agensa (Zhou i saradnici, 2011). Aktivacija H2A.X je povezana sa aktivacijom kaspaze 3 što ukazuje da ovaj protein ima jednu od glavnih uloga u pokretanju procesa apoptoze (Rebbaa i saradnici, 2006). Smanjeno prisustvo fosforilisane forme  $\gamma$ H2A.X kod RC6 ćelija nakon tretmana DNK oštećujućim agensima, u sprezi sa smanjenom ekspresijom kaspaze 3 i uspostavljanjem nove ravnoteže između pro- i anti- apoptotskih faktora, ukazuje da je kod RC6 ćelija razvijen specifičan mehanizam rezistencije – izbegavanje apoptoze.

Pored toga, naši rezultati pokazuju povišen bazalni nivo ROS-a kod rezistentne u odnosu na senzitivnu ćelijsku liniju. Tretmani sa BCNU i CPT nisu imali potencijal da značajno pomene nivo ROS-a kod RC6 ćelija, dok su C6 ćelije kao odgovor na tretman značajno povećale sadržaj ROS-a. Smanjena osetljivost RC6 ćelija na tretman vodonik peroksidom u poređenju sa C6 ćelijama ukazuje na povećanje antioksidativnog kapaciteta rezistentnih ćelija. Adaptacija na oksidativni stres praćena visokim unutarćelijskim sadržajem ROS-a se često javlja kod rezistentnih ćelija podvrgnutih dejstvu BCNU, CPT ili DOX. Naime, ovi agensi pored toga što deluju na nivou DNK lanaca stvarajući jedno- ili dvolančane prekide, takođe dovode i do povećanja ROS-a u ćeliji. Kod tumorskih ćelija, ROS doprinosi povećanju genomske nestabilnosti što izaziva progresiju ka rezistentnijem i agresivnijem fenotipu (Trachootham i saradnici, 2009). Kod RC6 ćelija je uočeno smanjenje odnosa oksidovanog prema redukovanom glutationu (GSSG/GSH) zbog povećanja količine GSH. Upravo, rezistencija gliomskih ćelija na veći broj hemioterapeutika, uključujući i BCNU, se javlja usled povećanja nivoa GSH (Backos i saradnici, 2012). RC6 ćelije takođe odlikuje povećanje ekspresije iRNK za *MnSOD*, *iNOS* i *GPx*, dok je ekspresija iRNK za *HIF-1 $\alpha$*  niža u odnosu na senzitivne ćelije. Na doprinos ovih enzima tumorskoj progresiji ukazali su i drugi autori. Tako je povišen nivo MnSOD uočen u serumu pacijenata obolelih od karcinoma ovarijuma i neuroblastoma (Ishikawa i saradnici, 1990; Kawamura i saradnici, 1992), dok kod pacijenata obolelih od glioblastoma nivo MnSOD koreliše sa gradusom i predstavlja negativni prognostički faktor (Ria i saradnici, 2001). Povećana ekspresija iNOS-a je karakteristična za humane karcinome dojke i melanom (Ekmekcioglu i saradnici, 2006;

Loibl i saradnici, 2005) i rezultuje u pojavi vaskularizovanijih i agresivnijih tumora (Kostourou i saradnici, 2011), dok inhibicija GPx uzrokuje senzitivizaciju rezistentnog fenotipa kod ćelijske linije cervikalnog adenokarcinoma (Hall i saradnici, 2014). Literaturni podaci ukazuju da povišen nivo ROS-a dovodi do oksidacije katalitičkog centra prolil hidroksilaze što inaktivira ovaj enzim i sprečava degradaciju HIF-1 $\alpha$  (Calvani i saradnici, 2012; Schroedl i saradnici, 2002). Stabilizacija HIF-1 $\alpha$  može biti u vezi sa smanjenom ekspresijom odgovarajuće iRNK uočenoj kod RC6 ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju na kompleksnost i međupovezanost mehanizama uključenih u razvoj rezistencije kod RC6 ćelija. Izbegavanje apoptoze i adaptacija na oksidativni stres, inače karakteristične odlike agresivnih humanih glioblastoma (Salazar-Ramiro i saradnici, 2016; Ziegler i saradnici, 2008), su u ovoj studiji identifikovane kao glavni mehanizmi rezistencije RC6 ćelija.

## 5.2. KOLATERALNA SENZITIVNOST NA DOX

Rezistentne tumorske ćelije, u nekim slučajevima, postaju osetljivije na određene hemioterapeutike od njihovih odgovarajućih senzitivnih ćelija. Ovaj fenomen je poznat i opisan kao kolateralna senzitivnost u postojećoj literaturi (Pluchino i saradnici, 2012). RC6 ćelije, pored rezistencije na BCNU, Cpt i TMZ, odlikuju se i povećanom osetljivošću na DOX u odnosu na C6 ćelije, što je potvrđeno na nivou indukcije ćelijske smrti i DNK oštećenja. Slično, Belvedere i saradnici su pokazali da je indukcija rezistencije na cisplatin kod ćelijske linije karcinoma ovarijuma dovela do kolateralne senzitivnosti na DOX kao rezultat povećanog nivoa topoizomeraze II u ovim ćelijama (Belvedere i saradnici, 1996). S druge strane, kontinuirani tretman DOX-om prouzrokuje kod ćelijske linije trostruko negativnog karcinoma dojke rezistenciju na ovaj hemioterapeutik, kao i na etoposid i mitoksantron, zbog smanjene ekspresije topoizomeraze II. Utvrđeno je da je ova ćelijska linija kolateralno senzitivna na BCNU usled hipermetilacije promotora *MGMT* gena i njegove smanjenje ekspresije (Raguz i saradnici, 2013). Pretpostavljajući da je dugotrajno izlaganje C6 ćelija dejstvu BCNU moglo uticati na nivo ekspresije topoizomeraze II i na taj način promeniti osetljivost ishodnih RC6 ćelija na DOX, odlučili smo da prvo ispitamo da li postoji razlika u ekspresiji iRNK za topoizomerazu II $\alpha$  između C6 i RC6 ćelija. Međutim, utvrdili smo da RC6 ćelije nemaju promenjen nivo ekspresije *TopoII $\alpha$*  iRNK.

Analiza akumulacije DOX-a pokazala je da RC6 ćelije znatno više akumuliraju DOX u odnosu na C6 ćelije. Zato smo ispitali da li ATP-vezujuće transportne pumpe imaju ulogu u kolateralnoj senzitivnosti na DOX. Studije pokazuju da je povećana ekspresija P-gp (ABCB1)



proteina karakteristika glioma nižih gradusa (I i II), dok je povećana ekspresija MRP1 proteina odlika visokogradusnih glioma (III i IV) i predstavlja negativni prognostički faktor kod pacijenata obolelih od neuroblastoma (de Faria i saradnici, 2008). Pošto je DOX supstrat i za ABCB1, i za MRP1 transporter, analizirali smo promene u nivou ekspresije iRNK za oba transportera. Ekspresija iRNK za *Abcb1* je 3 puta smanjena kod RC6 ćelija u odnosu na C6 ćelije, dok je ekspresija iRNK za *Mrp1* 17 puta povišena. Iako uočene promene mogu uticati na akumulaciju DOX-a u RC6 ćelijama, dobijeni rezultati nisu mogli u potpunosti objasniti fenomen kolateralne senzitivnosti. Naime, pokazano je da ROS može biti negativni regulator ekspresije P-gp (ABCB1) na primeru primene visoke koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koja je dovela do smanjenja ekspresije P-gp proteina u ćelijama karcinoma debelog creva (Terada i saradnici, 2014). MRP1 pumpa vrši izbacivanje supstrata konjugovanih sa redukovanim glutationom (GSH). Procesu GSH konjugacije podleže širok spektar hlороetilnitrozourea, jedinjenja koja u svom sastavu sadrže platinu, zatim melfalan, ciklofosamid, hlорambucil, doksorubicin i BCNU čime ovi agensi postaju polarni i manje aktivni i samim tim pogodni za transport MRP1 pumpom. Pored toga, oksidovana forma glutationa (GSSG) je supstrat MRP1 pumpe što u normalnim ćelijama služi kao mehanizam održavanja redoks homeostaze sprečavajući oksidativni stres usled nakupljanja GSSG-a (Kruh i Belinsky, 2003). Shodno tome, povišen nivo ROS-a u RC6 ćelijama može uticati na smanjenje ekspresije ABCB1 i posledično povećanje akumulacije DOX-a, dok MRP1 verovatno dodatno doprinosi povećanju antioksidativnog kapaciteta RC6 ćelija.

Imajući u vidu da je DOX slaba baza i da protonacija, odnosno povišena kiselost sredine, utiče na jonizaciju i akumulaciju DOX-a (Simon i saradnici, 1994), ispitali smo da li postoje razlike u unutarćelijskom pH između C6 i RC6 ćelija. Koristili smo fluorescentni BCECF reagens, koji detektuje promene unutarćelijskog pH pri ekscitaciji na 488 nm. Njegova konstanta disocijacije (pKa) je 6,97 što ovaj molekul čini idelanim za određivanje unutarćelijskog pH u fiziološkim uslovima (Grant i Acosta, 1997). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji značajno povećanje broja RC6 ćelija sa niskim pH u odnosu na C6 ćelije. Pretpostavili smo da je unutarćelijska kiselost rezistentnih ćelija posledica povišenog nivoa ROS-a. U prilog tome idu i rezultati drugih autora koji su pokazali da povišen ROS, kao i povišena kiselost unutar ćelije utiču na ekspresiju P-gp (ABCB1). Naime, inhibitor Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> izmenjivača (NHE1) dovodi do unutarćelijske protonacije K562 ćelija rezistentnih na DOX smanjujući ekspresiju P-gp na genskom i proteinskom nivou što uzrokuje akumulaciju DOX-a u ovim ćelijama (Lu i saradnici, 2008). Stoga, kolateralna senzitivnost RC6 ćelija na DOX se

javlja kao posledica modifikacija u antioksidativnom kapacitetu i adaptacije na oksidativni stres. Ove promene su dovele do povišene kiselosti unutar RC6 ćelija i omogućile povećanu akumulaciju DOX-a kao slabe baze. DOX dalje izaziva oštećenja na DNK što je potvrđeno povišenom fosforilacijom H2A.X i pojavom nekroze, jer RC6 ćelije nisu u mogućnosti da pokrenu egzekutorsku fazu apoptoze usled smanjene ekspresije kaspaze 3.

### 5.3. INVAZIVNOST RC6 ĆELIJA

Nakon delovanja hemioterapije koja prvenstveno deluje na brzodeleće tumorske ćelije, obično se događa da populacija sporo proliferišućih ćelija preživi. Odlike ovih ćelija su rezistencija na terapiju i prisustvo matičnog fenotipa. Takođe, sporiji prelaz iz G2 u M fazu ćelijskog ciklusa, takvim ćelijama daje više vremena da izvrše popravke oštećenja nastalih usled delovanja hemioterapije. Upravo ove ćelije prouzrokuju pojavu rezistentnih tumora nakon primene hemioterapije, koji se mogu razviti kako u blizini primarnog tumora, tako i na udaljenim lokacijama u organizmu (Moore i saradnici, 2012).

Istraživanja pokazuju da ćelije glioma koje se nalaze na invazionom frontu imaju smanjenu stopu proliferacije u odnosu na centralni deo tumora gde je stopa proliferacije znatno veća. Ovaj fenomen se objašnjava učešćem istih signalnih puteva u procesu migracije i formiranja lamelipodija (citoplazmatskih produžetaka koji omogućavaju kretanje ćelija) i procesu proliferacije i formiranja mitotičkog vretena (Giese i saradnici, 2003). Tako, ćelije opredeljene za deobu ne mogu istovremeno migrirati, a ćelije koje se kreću se ne mogu istovremeno i deliti.

Naša studija je pokazala da RC6 ćelije proliferišu značajno sporije u odnosu na C6 ćelije. Dalje smo ispitali invazivne karakteristike senzitivne i rezistentne ćelijske linije. U početnoj fazi invazije, tumorske ćelije se pričvršćuju za proteine vanćelijskog matriksa, što je posredovano receptorima na površini tumorskih ćelija i praćeno degradacijom matriksa pomoću različitih klasa proteaza. Sposobnost C6 i RC6 ćelija da degradiraju želatin u *in vitro* uslovima se razlikuje. Utvrdili smo da rezistentne ćelije znatno više degradiraju želatin u odnosu na senzitivne ćelije. Degradacija želatina je posledica aktivnosti članova klase proteinaza (želatinaza), MMP-2 i MMP-9 (Toth i saradnici, 2012). Veći broj studija pokazuje da MMP-2 i MMP-9, pored ćelija glioma, sekretuju i endotelijalne ćelije u njihovoj blizini, pa tako saradnja tumorskih ćelija i mikrosredine pospešuje invaziju. Pored endotelijalnih ćelija i druge komponentne tumorske mikrosredine, infiltrirajući makrofagi, leukociti i mikroglia ekspimiraju MMP-9 (Vos i saradnici, 2000). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da

rezistentne ćelije imaju značajno manju ekspresiju iRNK za *Mmp2*, za razliku od *Mmp9* čiji nivo iRNK je višestruko povišen u odnosu na senzitivne ćelije. Očigledno, dominantna forma proteaze odgovorne za razlaganje želatina od strane RC6 ćelija je MMP-9. Iako ekspresija obe želatinaze utiče na progresiju glioma, MMP-2 je značajnija u ranim fazama invazije, dok MMP-9 ima veći uticaj u kasnijim faza i pomaže proces angiogeneze (Forsyth i saradnici, 1999). Konstitutivno aktivni EGFR vIII i MAPK/ERK signalni put dovode do povećanja ekspresije MMP-9 kod IDH-wildtype glioblastoma (Choe i saradnici, 2002). ROS takođe dovodi do aktivacije članova MAPK/ERK signalnog puta i ima veliki uticaj na migraciju i invaziju tumorskih ćelija. ROS reguliše ekspresiju i aktivnost velikog broja matriksnih metaloproteinaza, kao i blokadu njihovih inhibitora (Tochhawng i saradnici, 2013). Osim migracije, regulacija ekspresije MMP-a ima uticaj i na proces angiogeneze, dok produkcija NO podstiče vazodilataciju novostvorenih krvnih sudova i na taj način povećava dotok krvi, a time kiseonika i hranjivih materija do tumora (Reuter i saradnici, 2010). ROS pozitivno reguliše aktivaciju transkripcionog regulatora NF- $\kappa$ B koji stimuliše ekspresiju matriksnih metaloproteinaza i urokinaznog aktivatora plazminogena (uPA) (Tochhawng i saradnici, 2013). Osim transkripcione, ROS reguliše i enzimatsku aktivnost matriksnih metaloproteinaza. Oksidativna modifikacija specifičnih cisteinskih ostataka proteina dovodi do autokatalitičkog sećenja i aktivacije proteinaza (Nelson i Melendez, 2004).

Tako, povećana produkcija ROS-a u RC6 ćelijama dovodi do uspostavljanja sporo proliferišućeg, invazivnog fenotipa. U cilju dopune i potvrde dobijenih rezultata, ispitana je invazija senzitivnih i rezistentnih sferoida uronjenih u hidrogel. Multicelularni sferoidi predstavljaju simetrične agregate ćelija za koje se ne koriste veštački supstrati u cilju postizanja ćelijske adhezije. U poređenju sa klasičnim 2D kulturama, ćelije u 3D agregatima vernije oslikavaju uslove *in vivo* u pogledu ćelijskog oblika i mikrosredine, što dalje utiče na gensku ekspresiju i biološko ponašanje ćelija u sferoidima (Hamilton, 1998). RC6 sferoidi nakon 24 h u hidrogelu zauzimaju veću površinu u odnosu na C6 sferoide, što ukazuje na veću i bržu diseminaciju RC6 ćelija od tela sferoida i potvrđuje njihov povećani invazivni potencijal.

#### **5.4. C6 I RC6 ĆELIJE U ANIMALNOM MODELU**

Visokogradusni gliomi se odlikuju specifičnim obrascem invazije i infiltracije u moždani parenhim. Na ovaj proces, pored genetičkih i metaboličkih svojstava samih tumorskih ćelija, utiču i mikrosredinski uslovi, kao što su prokrvljenost, hipoksija i

inflamacija. Glavna patološka karakteristika glioblastoma je pojava atipično velikog broja ćelija oko regiona nekroze (pseudopalisadni obrazac) koje odlikuje smanjena proliferacija, hipoksija, sekrecija proangiogenih faktora i povećana aktivnost želatinaza (Brat i Van Meir, 2004).

Slično ponašanje smo očekivali da ispolje C6 i RC6 ćelije u *in vivo* modelu ortotopnog alografta imuno kompetentnih Wistar pacova. Kako čeonu režanj velikog mozga predstavlja region gde se sa najvećom učestalošću javljaju maligni tumori CNS-a (Ostrom i saradnici, 2015), shodno tome smo odlučili da mesto inokulacije bude motorni korteks. Prvi eksperimenti su se odnosili na utvrđivanje da li postoji imunski odgovor kod životinja sa inokulisanim ćelijama. Rezultati su pokazali da prisustvo C6 i RC6 ćelija ne dovodi do pokretanja imunskog odgovora kod Wistar pacova što predstavlja značajnu prednost prilikom budućeg ispitivanja terapijskog odgovora.

Poznato ograničenje C6 animalnog modela je nemogućnost merenja tumorske mase zbog infiltrativnog rasta C6 ćelija (Grobben i saradnici, 2002). Zato je bilo neophodno adekvatno obeležiti C6 i RC6 ćelije. Praćenje kretanja C6 i RC6 ćelija kroz moždani parenhim omogućeno je fluorescentnim obeležavanjem ćelija (Fast blue ili CFSE) neposredno pre inokulacije u mozak Wistar pacova. Zapažene su značajne razlike u invazivnom obrascu ponašanja između senzitivnih i rezistentnih ćelija. C6 ćelije su pronađene oko i u blizini mesta inokulacije u obe ispitane vremenske tačke (10. i 25. dan nakon inokulacije), dok RC6 ćelije migriraju u region olfaktornog bulbosa i udaljenih moždanih struktura.

Pored toga, preseći moždanog tkiva su dodatno obeleženi antitelom za marker proliferacije - Ki67. Dobijena kolokalizacija Ki67 sa CFSE fluorescencijom predstavlja potvrdu da se proliferišuće gliomske ćelije zaista nalaze u pomenutim moždanim strukturama.

Multipotentne prekursorske ćelije u mozgu odraslih sisara se većinom nalaze u dva regiona ili tzv. neurogene niše, subventrikularnoj zoni (SVZ) u prednjem mozgu i subgranularnoj zoni (SGZ) dentatnog girusa u hipokampusu. Kod glodara prekursorske ćelije sa matičnim karakteristikama su izolovane i iz regiona rostralne ekstenzije SVZ i olfaktornih bulbosa (Gritti i saradnici, 2002). Specijalni uslovi mikrosredine u pogledu ćelijske organizacije i vaskularizacije, omogućavaju održavanje matičnog fenotipa ćelija u SVZ niši. Kroonen i saradnici su pokazali da ćelije humanih glioma inokulisane u strijatum imunokompromitovanih miševa migriraju ka SVZ i olfaktornim bulbusima (Kroonen i saradnici, 2011). Migracija je posredovana CXCL12/CXCR4 signalizacijom, a otpuštanje

hemokinskog liganda CXCL12 od strane ćelija SVZ posreduje u rezistenciji gliomskih ćelija na radioterapiju u ovom animalnom modelu (Goffart i saradnici, 2014; Goffart i saradnici, 2016).

Migratorno kretanje RC6 ćelija ka olfaktornim bulbusima se poklapa sa pomenutim literaturnim podacima, ali ostaje otvoreno pitanje uticaja hemoatraktanata koji učestvuju u ovom procesu. Dodatna ispitivanja i upotreba magnetne rezonance bi pomogla u utvrđivanju razlika u postojanju i profilu nekrotskih regiona i pseudopalisada u C6 i RC6 animalnom modelu glioma.

Bihevioralna eksperimentalna istraživanja se uglavnom baziraju na motoričkom odgovoru životinje na određenu senzornu stimulaciju, zbog čega je važno definisati funkcionalnu očuvanost motoričkih i senzornih funkcija eksperimentalnog modela. Mi smo se odlučili za opciju insertovanja tumorskih ćelijskih linija u motorni korteks i ispitivali posledične motoričke disfunkcije u uslovima primarno očuvanih senzornih funkcija. Studije ponašanja pacova 25. dana nakon inokulacije C6 i RC6 ćelija su pokazale razlike u motoričkoj aktivnosti životinja u ove dve grupe. Kontrolna grupa pacova je prošla kroz istu proceduru operacije s tom razlikom što joj je inokuliran samo fosfatni pufer koji služi kao nosač C6 i RC6 ćelija, čime je otkonjena mogućnost da sam eksperimentalni postupak utiče na promene u ponašanju. Vertikalna aktivnost u C6 i RC6 grupi životinja nije promenjena. U poređenju sa kontrolnom grupom, C6 grupa je pokazala povećanje lokomotorne aktivnosti tokom prvog dana testiranja. Iako je RC6 grupa pokazala povećanje lokomotorne aktivnosti prvog dana testiranja tokom prvih 10 minuta, ovo povećanje nije pokazalo značajnost u ukupnom merenju. Kako je region u koji smo inokulirali ćelije primarni motorni korteks, pretpostavljamo da promene u njegovom funkcionisanju u pogledu senzorne i motorne intergracije, kao i kontrole pokreta, doprinose primećenim promenama u ponašanju životinja. U literaturi je poznata veza između eksploratornog ponašanja i aktivnosti primarnog somatosenzornog i motornog korteksa, zajedno sa selektivnim povećanjem aktivnosti hipokampusa (VanElzakker i saradnici, 2008). U C6 grupi životinja primećeni su manji poremećaji habituacije u drugom danu testiranja, dok su u RC6 grupi životinja poremećaji habituacije veći i prisutni u drugom i trećem danu testiranja. Ovi rezultati pokazuju da je u C6 grupi sposobnost životinja da prepoznaju prostor u kom su već bile blago poremećena, dok životinje u RC6 grupi ispoljavaju jako izražene poremećaje u prepoznavanju i adaptaciji na sredinu u kojoj se nalaze. Ovi rezultati podržavaju ulogu motornog korteksa u učenju (Wolpert i saradnici, 2011). Obzirom na to da hipokampus ima važnu ulogu u habituacionom

učenju (Thiel i saradnici, 1998), moguće je da kod životinja u RC6 grupi dolazi do disfunkcije hipokampalnih projekcija u korteks, ali za potvrdu ove pretpostavke su neophodna dodatna istraživanja. Bihevioralni eksperimenti nedvosmisleno pokazuju da RC6 ćelije u poređenju sa C6 ćelijama dovode do intenzivnijih poremećaja u procesima učenja i pamćenja, kao i u neuralnim supstratima odgovornim za integrisanje dobijenih informacija i adaptaciju na novo.

## **5.5. ISPITIVANJE NOVE KOMBINOVANE TERAPEUTSKE STRATEGIJE U RC6 MODELU**

Rezistencija na TMZ, kao glavni hemioterapeutik u lečenju humanih glioblastoma, predstavlja prepreku efikasnom tretmanu ove bolesti. Postoji konstantna potreba za pronalaženjem novih i ispitivanjem već postojećih supstanci koje bi u kombinaciji sa TMZ-om delovale sinergistički i dovele do senzitivizacije glioblastoma na ovaj agens. Kod pacijenata sa povećanom aktivnošću MGMT ispitivani su različiti agensi koji vrše modulaciju ekspresije i aktivnosti ovog molekula, O6-benzilguanin, interferon- $\beta$  i levetiracetam, a od onih sa nepoznatim sinergističkim mehanizmom delovanja, valproična kiselina i inhibitori ribonukleotid reduktaze (Nakada i saradnici, 2012). Nažalost, većina obećavajućih kandidata je odbačena nakon II ili III faze kliničkih ispitivanja, uključujući inhibitor EGFR tirozin kinaze – erlotinib i selektivni inhibitor  $\alpha\beta3$  i  $\alpha\beta5$  integrina – cilengitid (Peereboom i saradnici, 2010; Stupp i saradnici, 2014).

Dva prirodna antioksidanta, resveratrol i kvercetin, u kombinaciji sa TMZ-om pokazala su pozitivan uticaj na efikasnost TMZ-a i *in vitro*, i *in vivo* (Jakubowicz-Gil i saradnici, 2010; Lin i saradnici, 2012). U našoj studiji opredelili smo se da ispitamo efekat takođe prirodnog antioksidanta CoQ10 u kombinaciji sa TMZ u RC6 modelu. Jedini do sada ispitivani antitumorski agens u kombinaciji sa CoQ10 je tamoksifen koji se koristi u lečenju karcinoma dojke. Njihova kombinacija dovodi do smanjenja proliferacije tumorskih ćelija i veličine tumora u mišjem modelu karcinoma dojke (Perumal i saradnici, 2005). Izvestan broj studija pokazuje da korišćenje CoQ10 kao suplementa u terapiji ima pozitivan efekat na preživljavanje pacijenata obolelih od karcinoma dojke (Bjorklund, 2015; Hertz i Lister, 2009).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da CoQ10 povećava osetljivost RC6 ćelija na tretman TMZ-om. Zadovoljavajući stepen reverzije rezistencije na TMZ postignut je pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  CoQ10 što odgovara koncentraciji CoQ10 u plazmi nakon oralne primene kod ljudi (Shults i saradnici, 2004). Dvokratni tretman CoQ10 sa TMZ-om je

pokazao bolji efekat u odnosu na jednokratni tretman, te smo u skladu sa tim osmislili terapijsku strategiju aplikacije CoQ10 kod životinja.

Naime, CoQ10 je primenjen dvokratno u ciklusima u nedelji pre aplikacije TMZ, u nedelji u toku aplikacije TMZ, koji su životinje dobile pet dana za redom, kao i u nedelji posle primene TMZ. Efekat kombinovanog tretmana je upoređen sa efektom pojedinačnih tretmana i CoQ10, i TMZ, koji su pratili isti vremenski raspored aplikacije. Poređenje pojedinačnih sa kombinovanim tretmanom pokazuje razlike na nivou invazivnog i proliferativnog potencijala. TMZ smanjuje proliferaciju i invaziju RC6 ćelija, ali se ne menja obrazac invazije ka olfaktornom bulbusu koji je karakterističan za RC6 ćelije. Na presecima mozgovca pacova tretiranih sa CoQ10 se primećuje efekat na proliferaciju i invaziju, ali je obrazac invazije izmenjen. Kombinovani tretman ne dozvoljava migraciju ćelija dalje od ubodne lezije i vrši grupisanje ćelija u tom regionu.

Ispitivanje indukcije ćelijske smrti pokazuje značajniji efekat kombinacije CoQ10 i TMZ u 3D modelu mikrofluidnog čipa u odnosu na 2D kulturu. Mikrofluidni čipovi korišćeni u našim eksperimentima se već primenjuju u proučavanju migracije i invazije gliomskih ćelija i sferoida pod dejstvom različitih faktora i hemoatraktanata (Ayuso i saradnici, 2015). Mikrofluidni čip je pogodan za modulaciju sredinskih uslova, ispitivanje formiranja pseudopalisada i nekrotskih regiona, kao i efekta različitih hemioterapeutika (Ayuso i saradnici, 2016). RC6 ćelije uronjene u hidrogel sa kolagenom koji imitira vanćelijski matriks se ubrizgavaju u centralnu komoru mikročipa, dok se medijum propušta kroz lateralne komore koje imaju ulogu krvnih sudova za dopremanje kiseonika, hranjivih materija i različitih agenasa po potrebi. Stoga, mikrofluidni čip predstavlja svojevrsni „presek kroz tumorsko tkivo“ koji omogućava lako praćenje ponašanja ćelija u različitim regionima koje karakterišu drugačiji uslovi mikrosredine. Moguće je ispitati i sposobnosti prolaska agenasa kroz više slojeva ćelija, što može uticati na efikasnost tretmana.

Izgleda da specifični uslovi sredine prisutni u mikrofluidnim čipovima pogoduju većoj efikasnosti kombinovanog tretmana CoQ10 i TMZ u indukciji smrti RC6 ćelija. Imajući u vidu da 3D uslovi imitiraju *in vivo* uslove i da brojne supstance koje ispoljavaju veliku efikasnost u 2D kulturi, gube svoju efikasnost *in vivo*, rezultati dobijeni u našoj studiji su tim značajniji jer ukazuju da CoQ10 postiže svoj najveći učinak kada se kombinuje sa TMZ-om upravo u sredinskim uslovima sličnim onim prisutnim *in vivo*. Takođe, CoQ10 značajno smanjuje produkciju ROS-a kod RC6 ćelija u mikrofluidnim čipovima.

Kombinacija TMZ sa antioksidantima indukuje ćelijsku smrt po tipu apoptoze i nekroze kao posledicu blokade autofagije (Jakubowicz-Gil i saradnici, 2010; Lin i saradnici, 2012). TMZ je poznati induktor autofagije, koja može imati protektivno dejstvo na ćelije glioma i doprineti razvoju rezistencije na ovaj agens (Kanzawa i saradnici, 2004). Tretman TMZ-om povećava produkciju ROS-a što aktivira MAPK/ERK signalni put i pokreće proces autofagije, dok resveratol uklanjajući ROS sprečava autofagiju i povećava terapijski kapacitet TMZ-a *in vitro* i *in vivo* (Lin i saradnici, 2012). Postoji mogućnost da CoQ10 ispoljava sličan mehanizam indukcije ćelijske smrti preko smanjenja ROS-a i blokade autofagije. U tom pravcu su neophodna dalja istraživanja.

Naši rezultati pokazuju da kombinacija CoQ10 i TMZ dovodi do značajnog smanjenja degradacije želatina od strane RC6 ćelija sa većom efikasnošću u odnosu na pojedinačne tretmane. Time smo pokazali da kombinovani tretman CoQ10 i TMZ značajno smanjuje invazivni potencijal kako RC6 ćelija, tako i RC6 sferoida.

*In vitro* studije na MCF-7 ćelijama pokazuju da je aktivnost MMP-2 direktno proporcionalna količini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ovim ćelijama i da dodavanje CoQ10 dovodi do smanjenja nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i blokade aktivacije MMP-2 (Bahar i saradnici, 2010). Tretman sa CoQ10 dovodi do smanjenja produkcije superoksidnog anjona i azot monoksida, kao i aktivnosti MMP-2 i MMP-9 *in vivo* u mišjem modelu karcinoma pluća (Burlaka i saradnici, 2016). CoQ10 u kombinaciji sa tamoksifenom smanjuje nivo MMP-2 i MMP-9 i povećava nivo proteaznih inhibitora kod pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke (Sachdanandam, 2008).

Efikasnost inhibicije invazije RC6 sferoida od strane CoQ10 u kombinaciji sa TMZ, uporedili smo u odnosu na galardin, poznati nespecifični inhibitor velikog broja matriksnih metaloproteinaza (MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-14, MMP-26), uključujući i kolagenzu fibroblasta (MMP-1) (Almholt i saradnici, 2008). Budući da kombinovani tretman CoQ10 sa TMZ-om ostvaruje jači inhibicioni efekat od galardina, kao i to da smo prethodno utvrdili povišenu ekspresiju iRNK za *Mmp-9* kod RC6 ćelija, moguće je da CoQ10 ima efekat na inhibiciju matriksnih metaloproteinaza. Literaturni podaci pokazuju da CoQ10 smanjuje otpuštanje citokina TNF $\alpha$  i IL-2 regulacijom aktivnosti NF $\kappa$ B, čime utiče na proces inflamacije (Bessler i saradnici, 2010; Tsai i saradnici, 2012). Osim toga, CoQ10 blokira angiogenezu prouzrokovanu bFGF-om i smanjuje ekspresiju VEGF-a preko regulacije fosforilacionog statusa ERK kinaze (Choi i saradnici, 2011). Svi do sada otkriveni



kompleksni mehanizmi delovanja CoQ10 kako na tumorske ćelije, tako i na različite tipove ćelija u tumorskoj mikrosredini, mogu imati uticaj na rast i invaziju tumora *in vivo*.

Prema našim rezultatima, kombinacija CoQ10 i TMZ dovodi do indukcije ćelijske smrti i inhibicije invazije u 3D sistemima, što potvrđuju i rezultati dobijeni *in vivo*. Ova studija predstavlja osnovu za dalja preklinička ispitivanja kombinacije antioksidanta CoQ10 sa anti gliomskim agensom TMZ. Vremenski okvir od 25 dana nakon inokulacije RC6 ćelija u mozak Wistar pacova se pokazao kao adekvatan za uočavanje terapijskog potencijala pojedinačnih i kombinovanog tretmana, što opravdava upotrebu RC6 animalnog modela u proceni efikasnosti novih terapijskih strategija.

## 6. ZAKLJUČCI

Nakon ostvarenih ciljeva postavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji, a na osnovu prikazanih rezultata, mogu se izvući sledeći zaključci:

### **I Karakterizacija novouspostavljenog rezistentnog fenotipa pacovskog glioma**

1. Kontinuirani tretman C6 ćelija pacovskog glioma sa BCNU dovodi do razvoja rezistencije ne samo na ovaj hemioterapeutik, već i na druge DNK oštećujuće agense (TMZ i CPt).
2. Razvoj rezistencije je praćen promenama u osetljivosti na apoptozu usled uspostavljanja nove ravnoteže između pro- i antiapoptotskih faktora kod novouspostavljenih RC6 ćelija.
3. Antioksidativni kapacitet rezistentnih RC6 ćelija je znatno veći u odnosu na parentalne C6 ćelije, što dovodi do veće adaptiranosti RC6 ćelija na oksidativni stres.
4. RC6 ćelije su osetljivije na dejstvo DOX-a u odnosu na C6 ćelije (fenomen kolateralne senzitivnosti) usled povećanog sadržaja ROS-a i acidifikacije citoplazme.
5. Razvoj rezistencije kod RC6 ćelija, praćen povećanom produkcijom ROS-a, dovodi do stvaranja fenotipa sa većim invazivnim potencijalom.
6. Novi ortotopni animalni model rezistentnog RC6 glioma, uspostavljen u mozgu Wistar pacova, razlikuje se od C6 modela po većoj sposobnosti invazije u moždani parenhim.
7. Testovi ponašanja pokazuju izraženije poremećaje u habituaciji, prepoznavanju i adaptaciji na sredinu kod životinja sa inokulisanim RC6 ćelijama.

### **II Procena efikasnosti nove kombinovane antigliomske terapijske strategije**

1. Kombinacija antioksidanta CoQ10 i antigliomskog hemioterapeutika TMZ dovodi do sinergističke inhibicije proliferacije RC6 ćelija.
2. U RC6 modelu, kombinacija CoQ10 i TMZ dovodi do pojave širih regiona nekroze u odnosu na pojedinačne tretmane ovim agensima u 3D sistemu mikrofluidnih čipova.
3. Kombinacija CoQ10 i TMZ je efikasnija u odnosu na pojedinačne tretmane u pogledu inhibicije migracije i invazije RC6 ćelija i RC6 sferoida.
4. U RC6 animalnom modelu, TMZ značajno smanjuje proliferaciju gliomskih ćelija, dok CoQ10 utiče na zaustavljanje invazije.

5. Kombinovani tretman sa CoQ10 i TMZ u RC6 animalnom modelu smanjuje i proliferaciju, i invaziju gliomskih ćelija što predstavlja potvrdu rezultata dobijenih u 3D *in vitro* sistemu.

**Opšti zaključak:**

RC6 pacovska ćelijska linija glioma predstavlja koristan model za proučavanje mehanizama rezistencije na antigliomske agense, kao i načina na koji bi se fenomen rezistencije prevazišao. Pojava kolateralne senzitivnosti bi mogla biti upotrebljena za osmišljavanje novih terapijskih strategija u lečenju glioma. RC6 model *in vitro* i *in vivo* se može koristiti u ispitivanju terapijskog potencijala različitih agenasa praćenjem odnosa proliferacije i invazije gliomskih ćelija. Prirodni antioksidant CoQ10 se pokazao efikasnim u senzitivizaciji RC6 ćelija na TMZ, dok kombinacija ova dva agensa efikasno inhibira invaziju RC6 ćelija *in vitro* i *in vivo*. Prikazani rezultati ukazuju na korisnost primene CoQ10 kao suplementa u terapiji glioma.

## 7. LITERATURA

- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., and von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta neuropathologica* 129, 829-848.
- Almholt, K., Juncker-Jensen, A., Laerum, O.D., Dano, K., Johnsen, M., Lund, L.R., and Romer, J. (2008). Metastasis is strongly reduced by the matrix metalloproteinase inhibitor Galardin in the MMTV-PymT transgenic breast cancer model. *Molecular cancer therapeutics* 7, 2758-2767.
- Angelastro, J.M., and Lamé, M.W. (2010). Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Molecular Cancer Research* 8, 1105-1115.
- Arceci, R.J. (1993). Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood* 81, 2215-2222.
- Arts, H.J., Katsaros, D., de Vries, E.G., Massobrio, M., Genta, F., Danese, S., Arisio, R., Scheper, R.J., Kool, M., Scheffer, G.L., *et al.* (1999). Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 5, 2798-2805.
- Ashby, L.S., Smith, K.A., and Stea, B. (2016). Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World journal of surgical oncology* 14, 225.
- Ayuso, J.M., Basheer, H.A., Monge, R., Sánchez-Álvarez, P., Doblare, M., Shnyder, S.D., Vinader, V., Afarinkia, K., Fernández, L.J., and Ochoa, I. (2015). Study of the Chemotactic Response of Multicellular Spheroids in a Microfluidic Device. *PloS one* 10, e0139515.
- Ayuso, J.M., Virumbrales-Munoz, M., Lacueva, A., Lanuza, P.M., Checa-Chavarria, E., Botella, P., Fernandez, E., Doblare, M., Allison, S.J., Phillips, R.M., *et al.* (2016). Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment. *Scientific reports* 6, 36086.
- Backos, D.S., Franklin, C.C., and Reigan, P. (2012). The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochemical pharmacology* 83, 1005-1012.
- Bahar, M., Khaghani, S., Pasalar, P., Paknejad, M., Khorramizadeh, M.R., Mirmiranpour, H., and Nejad, S.G. (2010). Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. *Nutrition Journal* 9, 62-62.
- Bar-Am, O., Weinreb, O., Amit, T., and Youdim, M.B. (2005). Regulation of Bcl-2 family proteins, neurotrophic factors, and APP processing in the neurorescue activity of propargylamine. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1899-1901.

Barth, R.F., and Kaur, B. (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of neuro-oncology* 94, 299-312.

Belvedere, G., Imperatori, L., Damia, G., Tagliabue, G., Meijer, G., de Vries, E.G.E., and D'Incalci, M. (1996). In vitro and in vivo characterisation of low-resistant mouse reticulosarcoma (M5076) sublines obtained after pulse and continuous exposure to cisplatin. *European journal of cancer* 32, 2011-2018.

Bernstein, J.J., and Woodard, C.A. (1995). Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. *Neurosurgery* 36, 124-132; discussion 132.

Bessler, H., Bergman, M., Blumberger, N., Djaldetti, M., and Salman, H. (2010). Coenzyme Q10 decreases TNF-alpha and IL-2 secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of nutritional science and vitaminology* 56, 77-81.

Bethel, C.R., Chaudhary, J., Anway, M.D., and Brown, T.R. (2009). Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *The Prostate* 69, 838-850.

Bjorklund, G. (2015). The Adjuvant Nutritional Intervention in Cancer (ANICA) Trial. *Nutrition and cancer* 67, 1355-1358.

Bonanno, L., Favaretto, A., and Rosell, R. (2014). Platinum drugs and DNA repair mechanisms in lung cancer. *Anticancer research* 34, 493-501.

Boonstra, J., and Post, J.A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337, 1-13.

Borst, P., and Elferink, R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* 71, 537-592.

Bota, D.A., Desjardins, A., Quinn, J.A., Affronti, M.L., and Friedman, H.S. (2007). Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel®) wafers in the treatment of malignant gliomas. *Therapeutics and clinical risk management* 3, 707.

Brandon, M., Baldi, P., and Wallace, D. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25, 4647-4662.

Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2004). Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84, 397-405.

Burlaka, A.P., Ganusevich, II, Golotiuk, V.V., Vovk, A.V., and Lukin Scapital Em, C. (2016). Superoxide- and NO-dependent mechanisms of antitumor and antimetastatic effect of L-arginine hydrochloride and coenzyme Q10. *Experimental oncology* 38, 31-35.

Cairns, R.A., Kalliomaki, T., and Hill, R.P. (2001). Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer research* 61, 8903-8908.

Calvani, M., Comito, G., Giannoni, E., and Chiarugi, P. (2012). Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1alpha by different intracellular sources of reactive oxygen species. *PloS one* 7, e38388.

Chan, H.S., Thorner, P.S., Haddad, G., and Ling, V. (1990). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 8, 689-704.

Chen, E.I., Hewel, J., Krueger, J.S., Tiraby, C., Weber, M.R., Kralli, A., Becker, K., Yates, J.R., 3rd, and Felding-Habermann, B. (2007). Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer research* 67, 1472-1486.

Chicoine, M.R., and Silbergeld, D.L. (1995). Assessment of brain tumor cell motility in vivo and in vitro. *Journal of neurosurgery* 82, 615-622.

Choe, G., Park, J.K., Jouben-Steele, L., Kremen, T.J., Liao, L.M., Vinters, H.V., Cloughesy, T.F., and Mischel, P.S. (2002). Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 2894-2901.

Choi, J.S., Park, S.Y., Yi, E.Y., Kim, Y.J., and Jeong, J.W. (2011). Coenzyme Q10 decreases basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced angiogenesis by blocking ERK activation. *Oncology research* 19, 455-461.

Chou, T.C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 22, 27-55.

Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition* 20, 591-598.

Datta, S.R., Ranger, A.M., Lin, M.Z., Sturgill, J.F., Ma, Y.C., Cowan, C.W., Dikkes, P., Korsmeyer, S.J., and Greenberg, M.E. (2002). Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Developmental cell* 3, 631-643.

de Faria, G.P., de Oliveira, J.A., de Oliveira, J.G., Romano Sde, O., Neto, V.M., and Maia, R.C. (2008). Differences in the expression pattern of P-glycoprotein and MRP1 in low-grade and high-grade gliomas. *Cancer investigation* 26, 883-889.

Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A.M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X.H., *et al.* (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene* 21, 8843-8851.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., and Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer* 8, 425-437.

Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J.A., Prieto, V.G., Johnson, M.M., Broemeling, L.D., and Grimm, E.A. (2006). Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. *International journal of cancer Journal international du cancer* 119, 861-866.

Finkel, T. (2012). Signal transduction by mitochondrial oxidants. *Journal of Biological Chemistry* 287, 4434-4440.

Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 265-269.

Forsyth, P.A., Wong, H., Laing, T.D., Rewcastle, N.B., Morris, D.G., Muzik, H., Leco, K.J., Johnston, R.N., Brasher, P.M., Sutherland, G., *et al.* (1999). Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *British journal of cancer* 79, 1828-1835.

Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G., and James, C.D. (2000). Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer research* 60, 1383-1387.

Friedman, H.S., Dolan, M.E., Kaufmann, S.H., Colvin, O.M., Griffith, O.W., Moschel, R.C., Schold, S.C., Bigner, D.D., and Ali-Osman, F. (1994). Elevated DNA polymerase alpha, DNA polymerase beta, and DNA topoisomerase II in a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma xenograft that is cross-resistant to nitrosoureas and topotecan. *Cancer research* 54, 3487-3493.

Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K.M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21, 2283-2294.

Ge, Y., Belcher, S.M., Pierce, D.R., and Light, K.E. (2004). Altered expression of Bcl2, Bad and Bax mRNA occurs in the rat cerebellum within hours after ethanol exposure on postnatal day 4 but not on postnatal day 9. *Brain research Molecular brain research* 129, 124-134.

Giese, A., Bjerkvig, R., Berens, M.E., and Westphal, M. (2003). Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21, 1624-1636.

Giordano, F.J., and Johnson, R.S. (2001). Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Current opinion in genetics & development* 11, 35-40.

Goffart, N., Kroonen, J., Di Valentin, E., Dedobbeleer, M., Denne, A., Martinive, P., and Rogister, B. (2014). Adult mouse subventricular zones stimulate glioblastoma stem cells specific invasion through CXCL12/CXCR4 signaling. *Neuro-oncology*.

Goffart, N., Lombard, A., Lallemand, F., Kroonen, J., Nassen, J., Di Valentin, E., Berendsen, S., Dedobbeleer, M., Willems, E., Robe, P., *et al.* (2016). CXCL12 mediates glioblastoma resistance to radiotherapy in the subventricular zone. *Neuro-oncology*.

Goolsby, C., Paniagua, M., Tallman, M., and Gartenhaus, R.B. (2005). Bcl-2 regulatory pathway is functional in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry* 63, 36-46.

Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine* 53, 615-627.

Grant, R.L., and Acosta, D. (1997). Ratiometric measurement of intracellular pH of cultured cells with BCECF in a fluorescence multi-well plate reader. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 33, 256-260.

Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, I., Alvarez-Buylla, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., and Vescovi, A.L. (2002). Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 437-445.

Grobben, B., De Deyn, P.P., and Slegers, H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and tissue research* 310, 257-270.

Haber, M., Smith, J., Bordow, S.B., Flemming, C., Cohn, S.L., London, W.B., Marshall, G.M., and Norris, M.D. (2006). Association of high-level MRP1 expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 1546-1553.

Hall, M.D., Marshall, T.S., Kwit, A.D., Miller Jenkins, L.M., Dulcey, A.E., Madigan, J.P., Pluchino, K.M., Goldsborough, A.S., Brimacombe, K.R., Griffiths, G.L., *et al.* (2014). Inhibition of glutathione peroxidase mediates the collateral sensitivity of multidrug-resistant cells to tiopronin. *The Journal of biological chemistry* 289, 21473-21489.

Hamilton, G. (1998). Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer letters* 131, 29-34.

Hamilton, J.D., Rapp, M., Schneiderhan, T., Sabel, M., Hayman, A., Scherer, A., Kropil, P., Budach, W., Gerber, P., Kretschmar, U., *et al.* (2014). Glioblastoma multiforme metastasis outside the CNS: three case reports and possible mechanisms of escape. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, e80-84.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Handy, D.E., and Loscalzo, J. (2012). Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxidants & redox signaling* 16, 1323-1367.

Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., and Weller, M. (2006). O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *Journal of neurochemistry* 96, 766-776.

Hertz, N., and Lister, R.E. (2009). Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q(10) and other antioxidants: a pilot study. *The Journal of international medical research* 37, 1961-1971.



- Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306-1316.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* 6, 1769-1792.
- Huse, J.T., and Holland, E.C. (2010). Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer* 10, 319-331.
- Institute, N.C. (2015). What Is Cancer?
- Ishikawa, M., Yaginuma, Y., Hayashi, H., Shimizu, T., Endo, Y., and Taniguchi, N. (1990). Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer research* 50, 2538-2542.
- Ito, T., Deng, X., Carr, B., and May, W.S. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *The Journal of biological chemistry* 272, 11671-11673.
- Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Wertel, I., Piersiak, T., and Rzeski, W. (2010). Temozolomide, quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. *Chemico-biological interactions* 188, 190-203.
- Jolliet, P., Simon, N., Barre, J., Pons, J.Y., Boukef, M., Paniel, B.J., and Tillement, J.P. (1998). Plasma coenzyme Q10 concentrations in breast cancer: prognosis and therapeutic consequences. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 36, 506-509.
- Kalen, A., Appelkvist, E.L., and Dallner, G. (1989). Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 24, 579-584.
- Kang, W., Nielsen, O., Fenger, C., Leslie, G., Holmskov, U., and Reid, K.B. (2005). Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* 26, 1129-1137.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell death and differentiation* 11, 448-457.
- Karran, P. (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22, 1931-1937.
- Karwatsky, J., Lincoln, M.C., and Georges, E. (2003). A mechanism for P-glycoprotein-mediated apoptosis as revealed by verapamil hypersensitivity. *Biochemistry* 42, 12163-12173.
- Kawamura, N., Suzuki, K., Ishikawa, M., Iizuka, S., Miyake, M., Mino, M., and Taniguchi, N. (1992). High levels of Mn-superoxide dismutase in serum of patients with neuroblastoma and in human neuroblastoma cell lines. *Free radical biology & medicine* 12, 281-286.

- Kon, M., Kimura, F., Akimoto, T., Tanabe, K., Murase, Y., Ikemune, S., and Kono, I. (2007). Effect of Coenzyme Q10 supplementation on exercise-induced muscular injury of rats. *Exercise immunology review* *13*, 76-88.
- Kostourou, V., Cartwright, J.E., Johnstone, A.P., Boulton, J.K., Cullis, E.R., Whitley, G., and Robinson, S.P. (2011). The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *British journal of cancer* *104*, 83-90.
- Kroonen, J., Nassen, J., Boulanger, Y.G., Provenzano, F., Capraro, V., Bours, V., Martin, D., Deprez, M., Robe, P., and Rogister, B. (2011). Human glioblastoma-initiating cells invade specifically the subventricular zones and olfactory bulbs of mice after striatal injection. *International journal of cancer Journal international du cancer* *129*, 574-585.
- Kruh, G.D., and Belinsky, M.G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* *22*, 7537-7552.
- Kundu, N., Zhang, S., and Fulton, A.M. (1995). Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis* *13*, 16-22.
- Lage, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *65*, 3145-3167.
- Laib, A.M., Bartol, A., Alajati, A., Korff, T., Weber, H., and Augustin, H.G. (2009). Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nature protocols* *4*, 1202-1215.
- Lal, A., Glazer, C.A., Martinson, H.M., Friedman, H.S., Archer, G.E., Sampson, J.H., and Riggins, G.J. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer research* *62*, 3335-3339.
- Lin, C.J., Lee, C.C., Shih, Y.L., Lin, T.Y., Wang, S.H., Lin, Y.F., and Shih, C.M. (2012). Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free radical biology & medicine* *52*, 377-391.
- Lin, S.H., and Kleinberg, L.R. (2008). Carmustine wafers: localized delivery of chemotherapeutic agents in CNS malignancies. *Expert review of anticancer therapy* *8*, 343-359.
- Liu, W., Wang, G., and Yakovlev, A.G. (2002). Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. *The Journal of biological chemistry* *277*, 8273-8278.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Loibl, S., Buck, A., Strank, C., von Minckwitz, G., Roller, M., Sinn, H.P., Schini-Kerth, V., Solbach, C., Strebhardt, K., and Kaufmann, M. (2005). The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer. *European journal of cancer* *41*, 265-271.

Louis, D.N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annual review of pathology* 1, 97-117.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* 131, 803-820.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193, 265-275.

Lu, Y., Pang, T., Wang, J., Xiong, D., Ma, L., Li, B., Li, Q., and Wakabayashi, S. (2008). Down-regulation of P-glycoprotein expression by sustained intracellular acidification in K562/Dox cells. *Biochemical and biophysical research communications* 377, 441-446.

Lushchak, V.I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids* 2012, 26.

Marlier, L.N., Patacchioli, F.R., Porzio, O., Bottone, A., Di Grezia, R., Borboni, P., Lauro, R., and Angelucci, L. (1996). Differential regulation of adrenocorticoid receptors in the hippocampus and spinal cord of adrenalectomized rats. *Journal of neuroscience research* 43, 526-534.

Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32, 157-170.

Matsui, A., Ikeda, T., Enomoto, K., Hosoda, K., Nakashima, H., Omae, K., Watanabe, M., Hibi, T., and Kitajima, M. (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer letters* 151, 87-95.

Mattson, D.L., and Wu, F. (2000). Nitric oxide synthase activity and isoforms in rat renal vasculature. *Hypertension* 35, 337-341.

McBride, S.M., Perez, D.A., Polley, M.Y., Vandenberg, S.R., Smith, J.S., Zheng, S., Lamborn, K.R., Wiencke, J.K., Chang, S.M., Prados, M.D., *et al.* (2010). Activation of PI3K/mTOR pathway occurs in most adult low-grade gliomas and predicts patient survival. *Journal of neuro-oncology* 97, 33-40.

McDermott, M., Eustace, A.J., Busschots, S., Breen, L., Crown, J., Clynes, M., O'Donovan, N., and Stordal, B. (2014). *In vitro* Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Frontiers in Oncology* 4, 40.

Megyesi, J.F., Kachur, E., Lee, D.H., Zlatescu, M.C., Betensky, R.A., Forsyth, P.A., Okada, Y., Sasaki, H., Mizoguchi, M., Louis, D.N., *et al.* (2004). Imaging correlates of molecular signatures in oligodendrogliomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 4303-4306.

- Miyake, Y., Shouzu, A., Nishikawa, M., Yonemoto, T., Shimizu, H., Omoto, S., Hayakawa, T., and Inada, M. (1999). Effect of treatment with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on serum coenzyme Q10 in diabetic patients. *Arzneimittel-Forschung* 49, 324-329.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine* 329, 2002-2012.
- Moore, N., Houghton, J., and Lyle, S. (2012). Slow-cycling therapy-resistant cancer cells. *Stem cells and development* 21, 1822-1830.
- Moritaka, T., Kiura, K., Ueoka, H., Tabata, M., Segawa, Y., Shibayama, T., Takigawa, N., Ohnoshi, T., and Harada, M. (1998). Cisplatin-resistant human small cell lung cancer cell line shows collateral sensitivity to vinca alkaloids. *Anticancer research* 18, 927-933.
- Nakada, M., Furuta, T., Hayashi, Y., Minamoto, T., and Hamada, J.-i. (2012). The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Frontiers in Oncology* 2, 98.
- Natarajan, M., Hecker, T.P., and Gladson, C.L. (2003). FAK signaling in anaplastic astrocytoma and glioblastoma tumors. *Cancer journal (Sudbury, Mass)* 9, 126-133.
- Nathan, C., and Xie, Q.W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *The Journal of biological chemistry* 269, 13725-13728.
- Navas, P., Villalba, J.M., and de Cabo, R. (2007). The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion* 7 Suppl, S34-40.
- Nelson, K.K., and Melendez, J.A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free radical biology & medicine* 37, 768-784.
- Network, C.G.A.R. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- NicAmhlaoibh, R., Heenan, M., Cleary, I., Touhey, S., O'Loughlin, C., Daly, C., Nunez, G., Scanlon, K.J., and Clynes, M. (1999). Altered expression of mRNAs for apoptosis-modulating proteins in a low level multidrug resistant variant of a human lung carcinoma cell line that also expresses *mdr1* mRNA. *International journal of cancer Journal international du cancer* 82, 368-376.
- Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G., Stoter, G., and Foekens, J.A. (1997). The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British journal of cancer* 76, 486-493.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P.L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N.M., Maiorka, P.C., *et al.* (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research* 64, 6892-6899.
- Okonko, D.O., and Shah, A.M. (2015). Heart failure: mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. *Nature Reviews Cardiology* 12, 6-8.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2015). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology 17 Suppl 4*, iv1-iv62.

Palan, P.R., Mikhail, M.S., Shaban, D.W., and Romney, S.L. (2003). Plasma concentrations of coenzyme Q10 and tocopherols in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP) 12*, 321-326.

Palladino, M.A., Pirlamarla, P.R., McNamara, J., Sottas, C.M., Korah, N., Hardy, M.P., Hales, D.B., and Hermo, L. (2011). Normoxic expression of hypoxia-inducible factor 1 in rat Leydig cells in vivo and in vitro. *Journal of andrology 32*, 307-323.

Panigrahi, M., Das, P.K., and Parikh, P.M. (2011). Brain tumor and Gliadel wafer treatment. *Indian journal of cancer 48*, 11-17.

Paxinos, G., and Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego, CA,USA, 1–456.

Peereboom, D.M., Shepard, D.R., Ahluwalia, M.S., Brewer, C.J., Agarwal, N., Stevens, G.H., Suh, J.H., Toms, S.A., Vogelbaum, M.A., Weil, R.J., *et al.* (2010). Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology 98*, 93-99.

Pelicano, H., Lu, W., Zhou, Y., Zhang, W., Chen, Z., Hu, Y., and Huang, P. (2009). Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism. *Cancer research 69*, 2375-2383.

Perry, G., Raina, A.K., Nunomura, A., Wataya, T., Sayre, L.M., and Smith, M.A. (2000). How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine 28*, 831-834.

Perumal, S.S., Shanthi, P., and Sachdanandam, P. (2005). Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q10 on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer. *Molecular and cellular biochemistry 273*, 151-160.

Pesic, V., Marinkovic, P., Janac, B., Ignjatovic, S., Popic, J., Kanazir, S., and Ruzdijic, S. (2010). Changes of behavioral parameters during long-term food restriction in middle-aged Wistar rats. *Physiology & behavior 101*, 672-678.

Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Moorsel, C.J., Kroep, J.R., Bergman, A.M., and Ackland, S.P. (2000). Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacology & therapeutics 87*, 227-253.

Petkovic, F., Zivanovic, J., Blazevski, J., Timotijevic, G., Momcilovic, M., Stanojevic, Z., Stamenkovic, V., Milosevic, V., Mostarica Stojkovic, M., and Miljkovic, D. (2015). Activity, but not mRNA expression of gelatinases correlates with susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience 292*, 1-12.

- Pitot, H.C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72, 962-970.
- Pluchino, K.M., Hall, M.D., Goldsborough, A.S., Callaghan, R., and Gottesman, M.M. (2012). Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 15, 98-105.
- Raffo, A.J., Perlman, H., Chen, M.W., Day, M.L., Streitman, J.S., and Buttyan, R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer research* 55, 4438-4445.
- Raguz, S., Adams, C., Masrour, N., Rasul, S., Papoutsoglou, P., Hu, Y., Cazzanelli, G., Zhou, Y., Patel, N., Coombes, C., *et al.* (2013). Loss of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase confers collateral sensitivity to carmustine in topoisomerase II-mediated doxorubicin resistant triple negative breast cancer cells. *Biochemical pharmacology* 85, 186-196.
- Ramirez, Y.P., Weatherbee, J.L., Wheelhouse, R.T., and Ross, A.H. (2013). Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals* 6, 1475-1506.
- Rao, J.S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3, 489-501.
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chu, F., and Mirkin, B.L. (2006). The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. *Cell death and differentiation* 13, 1960-1967.
- Reed, J.C. (1995). Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current opinion in oncology* 7, 541-546.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine* 49, 1603-1616.
- Ria, F., Landriscina, M., Remiddi, F., Rosselli, R., Iacoangeli, M., Scerrati, M., Pani, G., Borrello, S., and Galeotti, T. (2001). The level of manganese superoxide dismutase content is an independent prognostic factor for glioblastoma. *Biological mechanisms and clinical implications. British journal of cancer* 84, 529-534.
- Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., and Sattler, M. (2008). Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling* 10, 1813-1848.
- Roffe, L., Schmidt, K., and Ernst, E. (2004). Efficacy of coenzyme Q10 for improved tolerability of cancer treatments: a systematic review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 4418-4424.
- Sachdanandam, P. (2008). Antiangiogenic and hypolipidemic activity of coenzyme Q10 supplementation to breast cancer patients undergoing Tamoxifen therapy. *BioFactors (Oxford, England)* 32, 151-159.

Salazar-Ramiro, A., Ramírez-Ortega, D., Pérez de la Cruz, V., Hernández-Pedro, N.Y., González-Esquivel, D.F., Sotelo, J., and Pineda, B. (2016). Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Frontiers in Immunology* 7.

Sarter, B. (2002). Coenzyme Q10 and cardiovascular disease: a review. *The Journal of cardiovascular nursing* 16, 9-20.

Sauna, Z.E., and Ambudkar, S.V. (2001). Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *The Journal of biological chemistry* 276, 11653-11661.

Schafer, F.Q., and Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine* 30, 1191-1212.

Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., *et al.* (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.

Schmidek, H.H., Nielsen, S.L., Schiller, A.L., and Messer, J. (1971). Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea. *Journal of neurosurgery* 34, 335-340.

Schroedl, C., McClintock, D.S., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2002). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 283, L922-931.

Semenza, G.L. (2000). Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35, 71-103.

Shen, G., Shen, F., Shi, Z., Liu, W., Hu, W., Zheng, X., Wen, L., and Yang, X. (2008). Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 44, 280-289.

Shults, C.W., Flint Beal, M., Song, D., and Fontaine, D. (2004). Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Experimental neurology* 188, 491-494.

Sibenaller, Z.A., Etame, A.B., Ali, M.M., Barua, M., Braun, T.A., Casavant, T.L., and Ryken, T.C. (2005). Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurgical focus* 19, E1.

Simon, S., Roy, D., and Schindler, M. (1994). Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 1128-1132.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82, 1107-1112.

Sohet, F.M., Neyrinck, A.M., Pachikian, B.D., de Backer, F.C., Bindels, L.B., Niklowitz, P., Menke, T., Cani, P.D., and Delzenne, N.M. (2009). Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochemical pharmacology* 78, 1391-1400.

Sosinski, J., Thakar, J.H., Germain, G.S., Dias, P., Harwood, F.C., Kuttesch, J.F., and Houghton, P.J. (1994). Cross-resistance to antitumor diarylsulfonylureas and collateral sensitivity to mitochondrial toxins in a human cell line selected for resistance to the antitumor agent N-(5-indanylsulfonyl)-N'-(4-chlorophenyl)urea. *Molecular pharmacology* 45, 962-970.

Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirolo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348, 747-749.

Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujcic, D., *et al.* (2014). Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 15, 1100-1108.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., *et al.* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10, 459-466.

Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 51, 794-798.

Szybalski, W., and Bryson, V. (1952). Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *Journal of bacteriology* 64, 489-499.

Terada, Y., Ogura, J., Tsujimoto, T., Kuwayama, K., Koizumi, T., Sasaki, S., Maruyama, H., Kobayashi, M., Yamaguchi, H., and Iseki, K. (2014). Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia-reperfusion. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 17, 266-276.

Thiel, C.M., Huston, J.P., and Schwarting, R.K. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85, 1253-1262.

Tochhawng, L., Deng, S., Pervaiz, S., and Yap, C.T. (2013). Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion* 13, 246-253.

Tomlinson, F.H., Scheithauer, B.W., Hayostek, C.J., Parisi, J.E., Meyer, F.B., Shaw, E.G., Weiland, T.L., Katzmann, J.A., and Jack, C.R., Jr. (1994). The significance of atypia and histologic malignancy in pilocytic astrocytoma of the cerebellum: a clinicopathologic and flow cytometric study. *Journal of child neurology* 9, 301-310.



Toth, M., Sohail, A., and Fridman, R. (2012). Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *Methods in molecular biology* 878, 121-135.

Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews Drug discovery* 8, 579-591.

Tsai, K.L., Huang, Y.H., Kao, C.L., Yang, D.M., Lee, H.C., Chou, H.Y., Chen, Y.C., Chiou, G.Y., Chen, L.H., Yang, Y.P., *et al.* (2012). A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 458-468.

Turunen, M., Olsson, J., and Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et biophysica acta* 1660, 171-199.

Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efrid, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer research* 56, 150-153.

Uhm, J.H., Gladson, C.L., and Rao, J.S. (1999). The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 4, D188-199.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry* 266, 37-56.

VanElzakker, M., Fevurly, R.D., Breindel, T., and Spencer, R.L. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learning & Memory* 15, 899-908.

Vos, C.M., Gartner, S., Ransohoff, R.M., McArthur, J.C., Wahl, L., Sjulson, L., Hunter, E., and Conant, K. (2000). Matrix metalloproteinase-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. *Journal of neuroimmunology* 109, 221-227.

Wang, M., Wang, T., Liu, S., Yoshida, D., and Teramoto, A. (2003). The expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathology* 20, 65-72.

Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American journal of pathology* 174, 1149-1153.

Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* 359, 492-507.

Wiencke, J.K., Zheng, S., Jelluma, N., Tihan, T., Vandenberg, S., Tamguney, T., Baumber, R., Parsons, R., Lamborn, K.R., Berger, M.S., *et al.* (2007). Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. *Neuro-oncology* 9, 271-279.

- Winter, R.N., Kramer, A., Borkowski, A., and Kyprianou, N. (2001). Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer research* 61, 1227-1232.
- Wolpert, D.M., Diedrichsen, J., and Flanagan, J.R. (2011). Principles of sensorimotor learning. *Nat Rev Neurosci* 12, 739-751.
- Wong, H., Anderson, W.D., Cheng, T., and Riabowol, K.T. (1994). Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: the "primer-dropping" method. *Analytical biochemistry* 223, 251-258.
- Wong, R.S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30, 87.
- Wu, Y., Yu, H., Zhu, X., Yuan, H., Kang, Y., Jiao, J., Gao, W., Liu, Y., and Lou, J. (2011). Noninvasive Delayed Limb Ischemic Preconditioning Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats by a Mitochondrial K<sup>+</sup> sub ATP<sup>+</sup> Channel-Dependent Mechanism. *Physiological Research* 60, 271.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L.Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.R., and Jiang, B.H. (2007). Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* 67, 10823-10830.
- Yadav, S., Zajac, E., Singhal, S.S., and Awasthi, S. (2007). Linking stress-signaling, glutathione metabolism, signaling pathways and xenobiotic transporters. *Cancer metastasis reviews* 26, 59-69.
- Yang, X.H., Sladek, T.L., Liu, X., Butler, B.R., Froelich, C.J., and Thor, A.D. (2001). Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer research* 61, 348-354.
- Yeh, C.T., and Yen, G.C. (2006). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *The Journal of nutrition* 136, 11-15.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Yuan, J., Adamski, R., and Chen, J. (2010). Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS letters* 584, 3717-3724.
- Zhang, J., Stevens, M.F., and Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology* 5, 102-114.
- Zheng, L.S., Wang, F., Li, Y.H., Zhang, X., Chen, L.M., Liang, Y.J., Dai, C.L., Yan, Y.Y., Tao, L.Y., Mi, Y.J., *et al.* (2009). Vandetanib (Zactima, ZD6474) antagonizes ABCC1- and ABCG2-mediated multidrug resistance by inhibition of their transport function. *PloS one* 4, e5172.
- Zhou, F., Mei, H., Wu, Q., and Jin, R. (2011). Expression of histone H2AX phosphorylation and its potential to modulate adriamycin resistance in K562/A02 cell line. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue*

xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban 31, 154-158.

Zhu, Y., and Parada, L.F. (2002). The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2, 616-626.

Ziegler, D.S., Kung, A.L., and Kieran, M.W. (2008). Anti-Apoptosis Mechanisms in Malignant Gliomas. *Journal of Clinical Oncology* 26, 493-500.

Zwelling, L.A., Hinds, M., Chan, D., Mayes, J., Sie, K.L., Parker, E., Silberman, L., Radcliffe, A., Beran, M., and Blick, M. (1989). Characterization of an amsacrine-resistant line of human leukemia cells. Evidence for a drug-resistant form of topoisomerase II. *The Journal of biological chemistry* 264, 16411-16420.

## BIOGRAFIJA

Sonja Stojković Burić je rođena 06.11.1985. godine u Jagodini. Osnovnu i srednju školu završila je u Jagodini. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2004. godine, a diplomirala je 01.07.2011. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija sa srednjom ocenom 8,44.

Doktorske studije je upisala 2012. godine na smeru Molekularna biologija (Modul Molekularna biologija eukariota) na Biološkom fakultetu. Na Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” zaposlena je od 01.01.2012. godine. Eksperimentalni deo doktorske disertacije Sonje Stojković Burić urađen je u Laboratoriji za molekularnu neurobiologiju, u okviru naučno-istraživačkog projekta III41031 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj.

U svom dosadašnjem radu Sonja Stojković Burić je učestvovala sa 26 kongresnih saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja i sa 4 kongresna saopštenja na skupovima domaćeg značaja. Sonja Stojković Burić je autor 2 naučna rada objavljena u časopisima međunarodnog značaja i koautor još 8 radova objavljenih u časopisima međunarodnog značaja.