

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Dijana S. Drača

**MOLEKULSKI MEHANIZMI DELOVANJA
ANTITUMORSKOG AGENSA IZ GRUPE SINTETSKIH
TUBULIZINA, TUBUGI 1, NA ODABRANIM MODEL
SYSTEMIMA MELANOMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Dijana S. Drača

**MOLECULAR MECHANISMS OF THE ACTION OF
ANTITUMOR AGENT FROM THE SYNTHETIC
TUBULYSINS' GROUP, TUBUGI 1, ON SELECTED
MELANOMA MODEL SYSTEMS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

MENTOR:

dr Danijela Maksimović-Ivanić,

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

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Danijela Maksimović-Ivanić,

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

dr Milica Markelić,

docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Sanja Mijatović,

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

dr Igor Golić,

naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

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

Izjava zahvalnosti

Veliku zahvalnost dugujem dr Danijeli Maksimović-Ivanić, mojoj zvaničnoj mentorki, naučnici i ženi sa čeličnom snagom, kakvu do sad u životu nisam srela, ženi koja može apsolutno sve. Hvala joj na svemu što je učinila za mene, i što i dalje čini. Hvala joj na vremenu koje mi je posvetila i na svim mudrim savetima koje mi je uvek nesebično pružala. Najiskrenije se zahvaljujem dr Sanji Mijatović, mojoj nezvaničnoj mentorki, naučnici i ženi sa dušom širokom i dubokom poput mora, na podjednako savesnom upravljanju ovom disertacijom. Hvala joj na svakoj toploj reči i svakom toplom pogledu koji su smirivali nemire u meni i davali mi snagu za buduće dane. Sreća je moja što sam srela osobe koje svemu u životu daju krila. Hvala im na bezgraničnom razumevanju i posvećenosti u svakom momentu mog učenja. Hvala im na dopuštenju da uđem u njihov čaroban svet i da budem deo njega. Hvala im što su izuzetni, vanserijski ljudi. Izuzetna je čast i privilegija bila upoznati ih.

Zahvaljujem dr Milici Markelić, na uloženom vremenu i trudu, velikoj pomoći i strpljenju, pokazanoj susretljivosti i obzirnosti, a pre svega na vrlo konstruktivnim savetima i dragocenim predlozima tokom izrade finalne verzije ove doktorske disertacije. Hvala joj na vedrini i optimističnom duhu. Hvala i dr Golić Igoru, na odvojenom vremenu, trudu i korisnim sugestijama i predlozima usled čega je ova teza primila svoj finalni oblik.

Hvala prof dr Ludgeru Wessjohann, velikom naučniku, koji je omogućio sintezu jedinjenja koje je ispitivano u ovoj studiji, ali i omogućio meni da steknem nova znanja. Prof dr Kaluđerović Goranu, izvanrednom hemičaru, zahvaljujem na posvećenom vremenu, korisnim savetima i istinskoj podršci.

dr Jeleni Bogdanović-Pristov, dr Spasojević Ivanu, Opačić Milošu i kolegama sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja, i dr Tatjani Đukić hvala na velikoj i nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja određenih eksperimenata.

Zahvaljujem svim svojim dragim kolegama sa odeljenja za Imunologiju na svakoj pomoći koju su mi rado pružili, i što su učinili da svaki rad sa njima bude lep i prijatan. Pre svega, veliko hvala dr Đorđu Miljkoviću na pruženoj prilici da budem deo ovog divnog odeljenja.

Tamari, mom istinskom drugu, savezniku i saputniku, dugujem zahvalnost na nesebičnoj pomoći i podršci koju mi je uvek rado pružala, na brizi i požrtvovanosti, i što mi je jako olakšala početne korake. Hvala joj što me je uvek pomno pratila. Hvala i milom Blagoju, na neiscrpoj motivaciji, podstrecima i mudrim savetima, što je bio uz mene u svakoj situaciji i svojim humorom uveseljavao radne dane. Oni su prijatelji kakvi se danas retko sreću. Nadam se da ćemo se jednog dana sresti na istom mestu, jer mi smo tim koji svugde i uvek pobeđuje.

Najveću zahvalnost dugujem mojim najmilijima, mojoj porodici, tati Slobodanu, mami Ljiljani i bratu Draganu. Oni su najsigurnija i najtoplija ruka koja je uvek tu, zaleđe u svemu što radim. Hvala im što bdiju nad svim mojim putovanjima i čine da koračam spokojno i sigurno. Mojoj ljubavi, Marku, hvala na predivnim trenucima i osećajima i što me čini istinski srećnom. Hvala im što čine da verujem da život može biti pesma.

Molekulski mehanizmi delovanja antitumorskog agensa iz grupe sintetskih tubulizina, tubugi 1, na odabranim model sistemima melanoma

Sažetak

Tubulizini su sekundarni metaboliti miksobakterija koji svoju antitumorsku aktivnost ostvaruju narušavanjem organizacije deobnog vretena. U ovoj studiji ispitivan je antitumorski potencijal sintetskog analoga tubulizina, tubugi 1, *in vitro* i *in vivo* na modelu mišjeg i humanog melanoma. Tubugi 1 je pokazao selektivnost prema malignom fenotipu. U mišjim B16 ćelijama, tubugi 1 je indukovao atipičnu apoptozu bez eksternalizacije fosfatidilserina (PS), što je pripisano očuvanosti lipida membrane u uslovima intenzivnog oksidativnog stresa. Iako PS ima ključnu ulogu u uklanjanju apoptotskih ćelija, ovo se nije odrazilo na fagocitnu aktivnost makrofaga *in vitro*. Delotvornost eksperimentalnog agensa potvrđena je *in vivo*. Smanjeni volumen tumora je, pored direktnog uticaja na maligne ćelije, rezultat i indukcije citotoksičnog fenotipa, kao i očuvane fagocitne sposobnosti makrofaga. Sa druge strane, kod A-375 ćelija tubugi 1 je indukovao mitotsku katastrofu, morfološki manifestovanu mikronukleacijama, a biohemijski – aktivacijom kaspaze 2 i nukleusnog faktora κ B (NF- κ B). Opisani fenomen bio je praćen intenziviranom, ali prolaznom autofagijom citoprotektivnog karaktera. Sa jenjavanjem autofagnog procesa, jačala je apoptoza praćena porastom proapoptotskog indeksa i aktivnosti kaspaze 3. Svi opisani događaji u potpunosti su korelirali sa dinamičnim promenama u signalnim putevima uključenim u ćelijsku deobu i smrt – mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK) i fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K/Akt). U celini, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na značajan antitumorski potencijal sintetskog derivata prirodnih tubulizina, tubugi 1, pokazan na modelu mišjeg i humanog melanoma.

Ključne reči: melanom, tubulizin, apoptoza, mitotska katastrofa, autofagija, fosfatidilserin, polarizacija makrofaga

Naučna oblast: Biologija tumora

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

UDK broj:

Molecular mechanisms of the action of antitumor agent from the synthetic tubulysins' group, tubugi 1, on selected melanoma model systems

Abstract

Tubulysins are secondary metabolites of myxobacteria that exert their antitumor activity by disrupting the organization of the mitotic spindle. In this study, the antitumor potential of synthetic analog of tubulysins, tubugi 1, was tested in mouse and human melanoma model *in vitro* and *in vivo*. Tubugi 1 showed selectivity for the malignant phenotype. In murine B16 cells, tubugi 1 induced atypical apoptosis without phosphatidylserine (PS) externalization, which was attributed to membrane lipid preservation under conditions of intense oxidative stress. Although PS plays a key role in apoptotic cell removal, this did not affect macrophage phagocytic activity *in vitro*. The efficacy of the experimental agent was confirmed *in vivo*. In addition to its direct effect on malignant cells, reduced tumor volume is ascribed to established cytotoxic phenotype, as well as the preserved phagocytic ability of macrophages. On the other hand, in A-375 cells, tubugi 1 induced a mitotic catastrophe, manifested morphologically by micronuclei formation, and biochemically by activation of caspase 2 and the nuclear factor κ B (NF- κ B). The described phenomenon was accompanied by intense, but transient autophagy showing cytoprotective features. With the depletion of the autophagic process, apoptosis increased, followed by an increase in proapoptotic index and caspase 3 activity. All of the events described correlated completely with the dynamic changes in signaling pathways involved in cell division and death – mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt). Finally, the results of this doctoral dissertation pointed to the important antitumor potential of the synthetic derivative of natural tubulysins, tubugi 1, in the mouse and human melanoma model.

Key words: melanoma, tubulysin, apoptosis, mitotic catastrophe, autophagy, phosphatidylserine, macrophage polarization

Scientific field: Tumor biology

Scientific subfield: Experimental oncology

UDC number:

Lista skraćenica:

3-MA – 3-metiladenin
AO – akridin-oranž
ANOVA – analiza varijanse
APC – anafaza-promovišući kompleks (engl. *Anaphase-Promoting Complex*)
APS – amonijum-persulfat
ATCC – Američka kolekcija kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*)
Bax – engl. *Bcl-2-associated X*
Bcl-2 – engl. *B-cell lymphoma 2*
BSA – albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumine*)
BRAF – engl. *B-type Raf kinase*
Cdk – ciklin-zavisna kinaza (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*)
CFSE – 5(6)-karboksifluorescein diacetat N-sukcinimidil estar
CTLA-4 – engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*
DAF-FM – 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat
DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DHR – dihidrorodamin 123
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DMSO – dimetil sulfoksid
DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina
DTT – ditioneitol
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
ER – endoplazmatični retikulum
ERK – engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
FBS – serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*)
FITC – fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)
G1 – engl. *Gap 1 phase*
G2 – engl. *Gap 2 phase*
GSH – glutation
GSSG – oksidovani glutation
HIF-1 α – hipoksijom indukovani faktor-1 α (engl. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*)
hY1R – humani Y1 receptor
IL – interleukin
I κ B – inhibitor NF- κ B
iNOS – inducibilna azot-monoksid sintaza (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*)
LC3B – engl. *microtubule-associated protein light chain 3B*
M – mitoza
MAPs – proteini pridruženi mikrotubulama (engl. *Microtubule-Associated Proteins*)
MAPK – mitogenom-aktivirana protein kinaza (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MEK – engl. *mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase kinase*
MC1R – melanokortinski receptor 1 (engl. *Melanocortin-1 Receptor*)
MDA – malondialdehid
MTOC – centar organizacije mikrotubula (engl. *Microtubule Organization Center*)
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NO – azot-monoksid
NF- κ B – nukleusni faktor κ B
NPY – neuropeptid Y
PI – propidijum-jodid

PI3K – fosfatidilinozitol 3-kinaza (engl. *Phosphatidylinositol 3-kinase*)
PE – engl. *phycoerythrin*
PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffer Saline*)
PCT – paklitaksel
PD-1 – engl. *Programmed Death 1*
PDC – konjugati sa peptidima (engl. *peptide-drug conjugates*)
PFA – paraformaldehid
PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid
PS – fosfatidilserin
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS/RNS – reaktivne vrste kiseonika i azota (engl. *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)
RPMI – medijum za gajenje ćelija (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*)
S – engl. *Synthesis phase*
SAC – kontrolna tačka formiranja mitotskog vretena (engl. *Spindle Assembly Checkpoint*)
SD – standardna devijacija
SDS – natrijum dodecil sulfat
SV – srednja vrednost
TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletilen-1,2-diamin
TBA – tiobarbiturna kiselina
TGF- β – faktor rasta transformacije- β (engl. *Transforming Growth Factor- β*)
TNF- α – faktor nekroze tumora- α (engl. *Tumor necrosis factor- α*)
UV – engl. *Ultra Violet*
VEGF – vaskularni endotelni faktor rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
 α -MSH – α -stimulišući hormon melanocita (engl. *α -Melanocyte-Stimulating Hormone*)
 γ -TuRC – γ -tubulinski prstenasti kompleks (engl. *γ -tubulin ring complex*)

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Melanociti..... | 3 |
| 1.1.1. Regulacija funkcije melanocita..... | 3 |
| 1.1.2. Melanin i melanozomi | 4 |
| 1.2. Melanom..... | 5 |
| 1.2.1. Epidemiologija melanoma | 5 |
| 1.2.2. Etiologija melanoma | 5 |
| 1.2.3. Terapija melanoma..... | 6 |
| 1.3. Mikrotubule | 6 |
| 1.4. Terapijski agensi usmereni ka mikrotubulama..... | 8 |
| 1.4.1. Agensi koji promovišu polimerizaciju mikrotubula | 10 |
| 1.4.2. Agensi koji inhibiraju polimerizaciju mikrotubula..... | 11 |
| 2. Ciljevi istraživanja | 15 |
| 3. Materijal i metode | 17 |
| 3.1. Reagensi | 18 |
| 3.2. Rastvori..... | 19 |
| 3.3. Kulture ćelija | 20 |
| 3.3.1. Ćelijske linije | 20 |
| 3.3.2. Primarne ćelije | 20 |
| 3.3.3. Uslovi kultivacije..... | 21 |
| 3.4. Eksperimentalne životinje | 21 |
| 3.5. Primenjene metode | 21 |
| 3.5.1. Tripsinizacija ćelija..... | 21 |
| 3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija | 22 |
| 3.5.3. Priprema ćelijskih kultura | 22 |
| 3.5.4. Testovi vijabiliteta | 22 |
| 3.5.5. Bojenje ćelija DAPI bojom..... | 23 |
| 3.5.6. Fluorimetrija i protočna citofluorimetrija | 23 |
| 3.5.7. Analiza parametara oksidativnog stresa | 26 |
| 3.5.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju | 27 |
| 3.5.9. Imunoblot analiza proteina | 27 |
| 3.5.10. Analiza fagocitoze <i>in vitro</i> | 28 |
| 3.5.11. Indukcija melanoma i tretman životinja | 28 |
| 3.5.12. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom | 28 |
| 3.5.13. Analiza fenotipa i fagocitnog kapaciteta makrofaga životinja tretiranih sintetskim analogom tubulizina..... | 29 |
| 3.5.13. Statistička obrada podataka | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Rezultati | 31 |
| 4.1. Tubugi 1 inhibira rast ćelija melanoma <i>in vitro</i> , ali ne i rast primarnih ćelija | 32 |
| 4.2. Tubugi 1 utiče na proliferaciju i remeti distribuciju ćelija melanoma po fazama ćelijskog ciklusa..... | 34 |
| 4.3. Tubugi 1 indukuje atipičnu apoptozu B16 ćelija zavisnu od aktivacije kaspaza | 36 |
| 4.4. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za proces apoptoze kod B16 ćelijske linije | 39 |
| 4.5. Tubugi 1 indukuje oksidativni stres kod B16 ćelijske linije | 40 |
| 4.6. Tubugi 1 sprečava eksternalizaciju PS kroz prevenciju peroksidacije lipida..... | 42 |
| 4.7. Tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu apoptotskih ćelija | 43 |
| 4.8. Tubugi 1 smanjuje rast melanoma <i>in vivo</i> | 44 |
| 4.9. Tubugi 1 ne pokazuje toksične efekte <i>in vivo</i> | 45 |
| 4.10. Tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu, promovise citotoksični potencijal makrofaga i njihovu polarizaciju ka M1 fenotipu <i>ex vivo</i> | 45 |
| 4.10.1. Tubugi 1 ne inhibira fagocitnu aktivnost makrofaga..... | 46 |
| 4.10.2. Tubugi 1 promovise citotoksični potencijal makrofaga | 46 |
| 4.10.3. Tubugi 1 stimuliše polarizaciju makrofaga ka M1 fenotipu..... | 47 |
| 4.10.4. Polarizacija makrofaga ka M1 fenotipu, uzrokovana je indirektno, promenom fenotipa apoptotskih ćelija | 48 |
| 4.11. Tubugi 1 indukuje mitotsku katastrofu sinhronizovanu sa autofagijom na A-375 ćelijama..... | 49 |
| 4.12. Tubugi 1 menja ekspresiju medijatora mitotske katastrofe kod A-375 ćelijske linije | 50 |
| 4.13. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za autofagiju kod A-375 ćelijske linije . | 53 |
| 4.14. Tubugi 1 indukuje citoprotektivnu autofagiju kod A-375 ćelijske linije | 54 |
| 4.15. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina signalnih puteva uključenih u realizaciju ćelijske smrti i deobe kod A-375 ćelijske linije..... | 56 |
| 5. Diskusija | 57 |
| 6. Zaključci | 67 |
| 7. Literatura | 69 |

1. Uvod

Ogroman antropogeni uticaj na biosferu i oštećenje ozonskog omotača doveli su do toga da sunčevo zračenje sve više ugrožava život na Zemlji. Negativan efekat ultraljubičastih (UV) zraka na nasledni materijal ogleda se u direktnom formiranju timidinskih foto-dimera u molekulu DNK, ali i u produkciji slobodnih radikala na koje su komponente DNK posebno osetljive [1]. Pored toga što predstavlja glavni pigment koji determiniše obojenost kože, dlake i očiju u životinjskom svetu, melanin je prva linija odbrane kože od štetnih efekata UV zračenja, sprečavajući na taj način pojavu brojnih mutacija u genomu epidermalnih ćelija kože [2]. Visoko specijalizovane ćelije predominantno odgovorne za sintezu melanina su melanociti.

1.1. Melanociti

Melanociti potiču od prekursora poreklom od ćelija nervne kreste. Tokom fetalnog i postnatalnog perioda, razlikujemo sledeće faze u nastanku melanocita: diferencijaciju melanocitne loze od ćelija nervne kreste, migraciju i proliferaciju melanoblasta, diferencijaciju melanoblasta u melanocite, sazrevanje melanocita u pravcu sticanja dendritične morfologije i produkcije melanina i transport zrelih melanozoma iz melanocita u keratinocite [3]. Kod ljudi melanociti se uglavnom nalaze u epidermisu kože, folikulima dlake i zenici oka. Takođe, mogu biti prisutni i u unutrašnjem uhu, nervnom sistemu i srcu [4,5]. Prisustvo melanocita u drugim tkivima u ljudskom organizmu ukazuje na niz drugih funkcija ovih ćelija, koje nisu vezane isključivo za produkciju melanina i proces pigmentacije [6].

U epidermisu kože, melanociti se nalaze u bazalnom sloju gde naležu na bazalnu laminu. Čine 1–2% ukupne populacije ćelija u epidermisu [7].

1.1.1. Regulacija funkcije melanocita

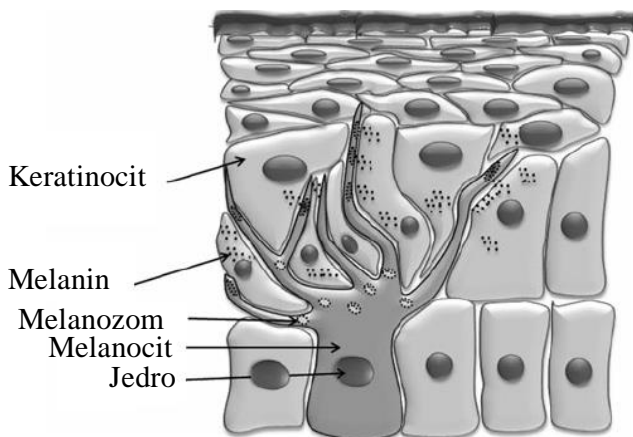
Održanje homeostaze kože i regulacija produkcije melanina na nivou epidermisa počiva na međusobnoj komunikaciji melanocita, keratinocita i dermalnih fibroblasta. Keratinociti imaju dominantnu ulogu u kontroli osnovnih bioloških procesa melanocita poput proliferacije, produkcije melanina i formiranja dendritičnih nastavaka [3]. Izlaganje UV zračenju *in vitro* stimuliše keratinocite u njihovoj produkciji određenih parakrinih faktora koji mogu stimulisati ili inhibirati proces melanogeneze u melanocitima [8,9]. Dermalni fibroblasti takođe mogu biti regulatori rasta melanocita i melanogeneze, kao i diferencijacije samog melanocita [10]. Melanokortinski receptor 1 (engl. *Melanocortin 1 Receptor*, MC1R) je ključni protein na membrani melanocita koji je uključen u regulaciju sinteze melanina i odgovor kože na UV zračenje. Aktivacijom MC1R od strane α -stimulišućeg hormona melanocita (engl. *α -Melanocyte Stimulating Hormone*, α -MSH) biva pokrenuta sinteza melanina. Pored toga što reaguje na promene u epidermalnoj mikrosredini, melanocit je i aktivni regulator procesa u koži, pošto produkuje i oslobađa brojne signalne molekule koji povratno deluju na keratinocite, ali i na ćelije imunskog sistema kože [11]. Među molekulima koje sekretuje stimulisani melanocit mogu se naći proinflamatorni citokini, hemokini, TGF- β (engl. *Transforming Growth Factor- β*), kateholamini, eikozanoidi, serotonin, α -MSH i azot-monoksid (engl. *Nitric Oxide*, NO). Oni pored parakrinog načina delovanja, mogu delovati i autokrino [11]. Regulacija procesa melanogeneze odvija se i putem melanokortina koji su bazalno produkovani od strane hipofize.

1.1.2. Melanin i melanozomi

Postoje dve velike grupe melanina u koži: eumelanin – braon i crni pigment i feomelanin – žuto-crveni pigment [2]. Prekursor sinteze melanina je L-tirozin, a tirozinaza je ključni enzim procesa melanogeneze [12]. U koži ljudi prisutne su sve forme melanina i zastupljenost eumelanina prema ukupnom melaninu determiniše boju kože [13]. Feomelanin ne predstavlja faktor značajan za pigmentaciju kože. Sa aspekta fotoprotekcije, eumelanin je bolji čuvar genoma ćelije – sporije se degraduje u poređenju sa feomelaninom i ima sposobnost neutralizacije reaktivnih kiseoničnih vrsta [14].

U epidermalnim i okularnim melanocitima, kao i pigmentnim epitelnim ćelijama mrežnjače, zenici i cilijarnom telu oka, melanini se sintetišu unutar specifičnih membranskih organela – melanozoma [15,16]. Biogeneza i sazrevanje melanozoma u melanocitima i ćelijama pigmentnog epitela mrežnjače odvija se kroz četiri morfološki različita stadijuma [15]. Melanozomi na stadijumu I su malih dimenzija nalik endozomima. Na stadijumu II, proteinska vlakna matriksa se organizuju i formiraju karakteristične vlaknaste strukture kada melanozom zadobija izdužen oblik. Prisustvo tirozinaze i drugih proteina esencijalnih za sintezu melanina odlikuje ovaj stadijum, iako proces melanogeneze *per se* nije prisutan. Na stadijumu III, počinje produkcija melanina i deponovanje istog na vlaknima što vodi zadebljanju i tamnjenju melanozoma. Melanozom na IV stadijumu je u potpunosti ispunjen melaninom i lišen aktivnosti enzima.

Transport melanozoma iz melanocita u populaciju keratinocita i gornje slojeve epidermisa preduslov je za ostvarenje fotoprotektivne funkcije melanina. U kontekstu funkcionalne povezanosti melanocita i keratinocita neophodno je definisati dermalno-melaninsku jedinicu koja predstavlja vezu jednog dendritičnog melanocita sa otprilike 30–40 epidermalnih keratinocita [17] (Slika 1). U citoplazmi keratinocita granule pigmenta formiraju supranukleusne melaninske kape [16] koje štite molekule DNK od UV zračenja.



Slika 1. **Dermalno-melaninska jedinica.** Slika preuzeta i modifikovana iz Gupta i saradnici, 2013 [18]

1.2. Melanom

1.2.1. Epidemiologija melanoma

Maligna transformacija melanocita vodi nastanku melanoma – najopasnije forme kancera kože. Danas, melanom predstavlja neoplaziju čija učestalost širom sveta raste zabrinjavajućom stopom i mnogo brže u odnosu na druge tipove maligniteta [19,20]. U Sjedinjenim Američkim Državama sedamdesetih godina prošlog veka melanom je bio zastupljen sa 6 slučajeva na 100 000 stanovnika, a početkom 2000. godine ta brojnost je porasla na 18 slučajeva na 100 000 stanovnika. U istom periodu, u Evropi, incidenca melanoma je porasla sa 4 na 10–15 slučajeva na 100 000 stanovnika [21]. Pored melanoma, postoje još dve velike grupe malignih tumora kože koji se zajedno označavaju kao nemelanomski: bazocelularni i skvamocelularni karcinom. Među njima, melanom je najagresivnija forma kancera kože. Iako čini manje od 5% kožnih maligniteta, uzročnik je čak 50% smrtnosti od kancera kože [22,23].

1.2.2. Etiologija melanoma

UV zračenje je najznačajniji faktor rizika za nastanak melanoma [24]. Pokazano je da je u 60–70% slučajeva maligni melanom izazvan UV zračenjem [25]. Na Zemljinu površinu dolazi 95% UV-A (320–340 nm) i 5% UV-B (290–320 nm) zračenja, a UV-C u potpunosti biva apsorbovan od strane ozonskog omotača. UV-A prodire u dublje slojeve kože u poređenju sa UV-B, pa tako oko 50% UV-A i svega 9–15% UV-B zraka stiže do melanocita [26]. UV-B direktno oštećuje molekul DNK, produkuje lezije u formi ciklobutanskih pirimidinskih dimera i pirimidinskih 6,4-pirimidonskih fotoprodukata [27]. Genotoksični efekat UV-A je slabiji u poređenju sa UV-B, ali sa druge strane indukuje snažan oksidativni stres na taj način indirektno oštećujući DNK molekul [1].

Pored UV zračenja, etnička pripadnost i geografska pozicija važni su činioci koje je neophodno definisati u etiologiji melanoma. Incidenca melanoma značajno varira među različitim etničkim grupama [28]. S obzirom na fotoprotektivne osobine eumelanina i feomelanina, rizik od razvijanja raka kože je 30–40 puta veći kod populacija sa svetlijom pigmentacijom u poređenju sa populacijama koje imaju tamniju boju kože [29]. Melanom ima izuzetno nisku incidencu kod populacija crne boje kože u Africi, dok kod kavkaskih populacija širom sveta njegova učestalost nesrazmerno raste [23]. Kod osoba sa tamnijom pigmentacijom, melanin na nivou epidermisa apsorbuje oko 50% više UV-B zračenja u poređenju sa osobama koje imaju svetliju kožu [30]. Geografska pozicija značajno utiče na incidencu melanoma unutar jedne etničke grupe [31]. Učestalost i stopa mortaliteta od melanoma menja se sa nadmorskom visinom i geografskom širinom, sa trendom porasta incidence u geografskim oblastima bližim ekvatoru i na većoj nadmorskoj visini [31,32]. Takođe, atmosferska apsorpcija, oblačnost i godišnje doba parametri su koji definišu intenzitet UV zračenja.

Za razliku od ostalih tipova solidnih tumora koji se javljaju prvenstveno kod starijih osoba, melanom se razvija i kod mladih i osoba srednjih godina, i predstavlja jedan od najčešćih uzroka smrti povezanih sa kancerom u starosnom dobu od 20. do 35. godine života [33]. Učestalost melanoma je različita kod osoba muškog i ženskog pola, pri čemu su muškarci podložniji oboljevanju. Prisustvo androgenih hormona delimično može opravdati veću prevalencu melanoma kod osoba muškog pola [34]. Nevusi kao potencijalne prekursorske lezije, njihov ukupan broj na koži, veličina i tip, predstavljaju faktor rizika za oboljevanje od melanoma [35,36], budući da 25% slučajeva melanoma vodi poreklo od postojećih nevusa [37]. Nasledni faktori objašnjavaju 7–15%

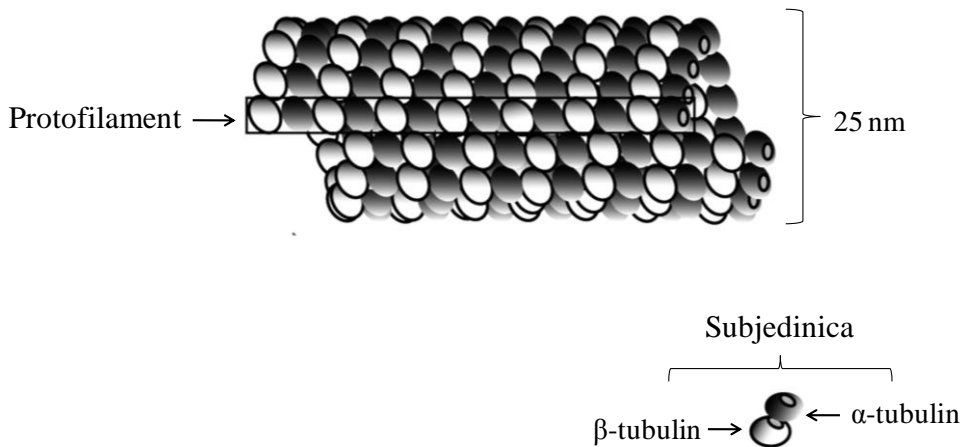
svih slučajeva melanoma [38]. Nasledne forme melanoma prepoznaju se usled ranije pojave bolesti, odnosno mlađe starosne dobi kada se razvija bolest, kao i prisustva mnogobrojnih primarnih lezija. Rizik oboljevanja od melanoma veći je 2,2 puta ukoliko je u porodici prisutan najmanje jedan oboleli.

1.2.3. Terapija melanoma

Kod obolelih od melanoma u ranoj fazi bolesti, hirurška ekscizija dovodi do izlečenja u 90% slučajeva [39]. Međutim, melanom je jedan od maligniteta sa najvećim potencijalom za diseminaciju malignih klonova [40] i u tom slučaju hirurški zahvat više nije efikasan. Uprkos hemorezistentnoj prirodi melanoma, citotoksična hemoterapija je dugi niz godina predstavljala okosnicu sistemske terapije uznapređovalog melanoma, sa dakarbazinom kao zlatnim standardom u lečenju obolelih [41]. Iako je ostao jedini zvanično odobren hemoterapeutik za terapiju melanoma uznapređovalog stupnja [41], primena dakarbazina danas ima isključivo palijativan karakter. Tokom poslednje decenije, ciljana i imunoterapija značajno su promenile dosadašnje tokove lečenja obolelih od agresivne forme melanoma. Medijana preživljavanja sa 9 meseci nakon palijativne hemoterapije [42] porasla je na 20–30 meseci primenom novih, pomenutih vidova terapije [43]. Primena BRAF (engl. *B-type Raf kinase*) i MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase*) kinaznih inhibitora, pojedinačno ili u njihovoj kombinaciji, kao i anti-CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4*) i anti-PD-1 (engl. *Programmed Death 1*) antitela dala je obećavajuće rezultate u kliničkim ispitivanjima kod obolelih od melanoma u terminalnoj fazi bolesti [44–50]. Iako značajan napredak na polju razumevanja biologije i genetike melanoma jeste popločao put delotvornim pristupima u terapiji ovog maligniteta, melanom i dalje ostaje udružen sa visokom stopom smrtnosti, posebno kada se radi o metastatskim malignitetima, ukazujući na urgentnu potrebu za inovativnim terapijskim modalitetima. U paleti novootkrivenih molekula, mahom prirodnog porekla, veliki značaj se pridaje onima koji remete strukturu i funkciju mikrotubula.

1.3. Mikrotubule

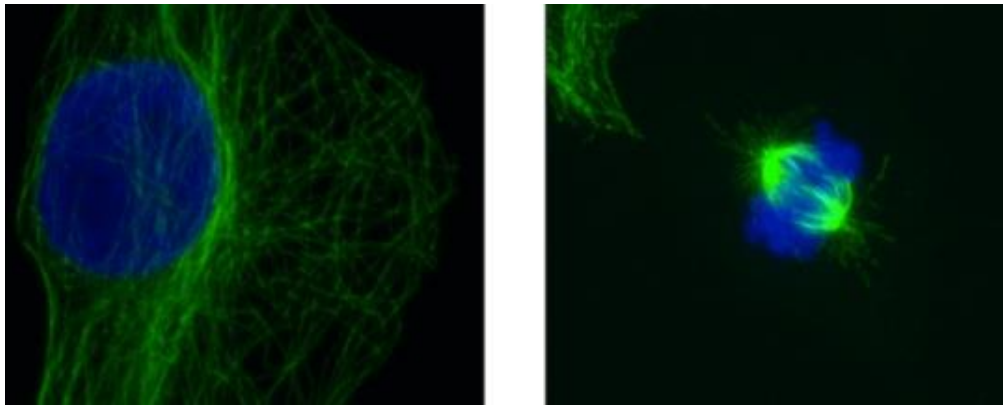
Mikrotubule imaju esencijalnu ulogu u mitozu, jer izgrađuju deobno vreteno i učestvuju u segregaciji hromozoma. Takođe, mikrotubule održavaju morfologiju i pokretljivost ćelije i posreduju u unutarćelijskom transportu [51]. Mikrotubule su cilindrični polimeri tubulina [52]. Osnovna strukturna jedinica mikrotubula, poznata pod nazivom tubulinska subjedinica, je heterodimer sačinjen od α - i β -tubulina [52]. Kod ljudi postoji osam izoformi α -tubulina, kao i sedam izoformi β -tubulina i tkivno su specifične [53]. Mikrotubule imaju izgled šupljeg cilindra dijametra 25 nm čiji zid, kod ljudi i drugih sisara, gradi 13 linearnih protofilamenata [54] (Slika 2).



Slika 2. **Struktura mikrotubula.** Slika preuzeta i modifikovana iz Wiese i Zheng, 2006 [55]

Mikrotubule su polarne strukture; svi njihovi protofilamenti imaju istu orijentaciju – na jednom završetku mikrotubule nalazi se prsten od α -tubulina i taj kraj se označava kao negativan kraj, a na suprotnom završetku nalazi se prsten od β -tubulina označen kao pozitivan kraj. Negativni kraj mikrotubule najčešće je ukotvljen u centrozom predstavljen parom centriola, koji se još naziva centar organizacije mikrotubula (engl. *Microtubule Organization Center*, MTOC), s obzirom na glavnu funkciju ove organele u formiranju jezgra budućeg tubulinskog polimera. U delu centrozoma, pod imenom pericentriolarni matriks, prisutni su prekursori mikrotubula (monomeri i dimeri tubulina), pericentrin i posebne strukture prstenastog oblika koje služe kao baza za nukleaciju i dalje, elongaciju mikrotubula, izgrađene od proteinskih kompleksa označenih kao γ -tubulinski prstenasti kompleks (engl. *γ -tubulin ring complex*, γ -TuRC) [56,57]. Na γ -TuRC kao centar nukleacije se zatim spiralno dodaju heterodimeri čime mikrotubula raste ka svom pozitivnom kraju. Elongacija mikrotubula podržana je nizom pratećih proteina, takozvanih proteina pridruženih mikrotubulama (engl. *Microtubule-Associated Proteins*, MAPs) [58] koji se s obzirom na dodeljene funkcije, mogu smatrati strukturnim komponentama mikrotubula.

Pozitivni kraj je mesto polimerizacije (rasta) i depolimerizacije (skraćivanja) mikrotubula; njihova dužina se može menjati usled dodavanja ili uklanjanja solubilnih tubulinskih dimera. Otuda, mikrotubule se definišu kao visoko dinamične strukture [59]. Za vreme mitoze, mikrotubule formiraju deobno vreteno sa ciljem pravilne segregacije hromozoma [60]. Mikrotubule koje učestvuju u deobi ćelija pripadaju grupi kratko-živećih struktura, naspram interfaznih mikrotubula koje su okarakterisane kao stabilne i dugo-živeće strukture. Jasna podela između ove dve populacije mikrotubula je bitna u kontekstu neophodnosti brze reorganizacije interfaznih mikrotubula u mikrotubule deobnog vretena prilikom započinjanja mitoze, i nakon završetka deobe, dezintegracije vretena u citoskeletnu mrežu [61] (Slika 3). U tom smislu, dinamička nestabilnost se definiše kao proces u kom mikrotubule mogu prelaziti iz faze rasta u fazu skraćivanja [59,62,63].



Slika 3. **Dinamičnost mikrotubula.** U interfazi, mikrotubule se iz centrozoma radijalno pružaju ka periferiji ćelije. Tokom mitoze, mreža mikrotubula podleže dinamičnoj reorganizaciji u cilju formiranja mitotskog vretena. Slika preuzeta i modifikovana iz Parker i saradnici, 2014 [52]

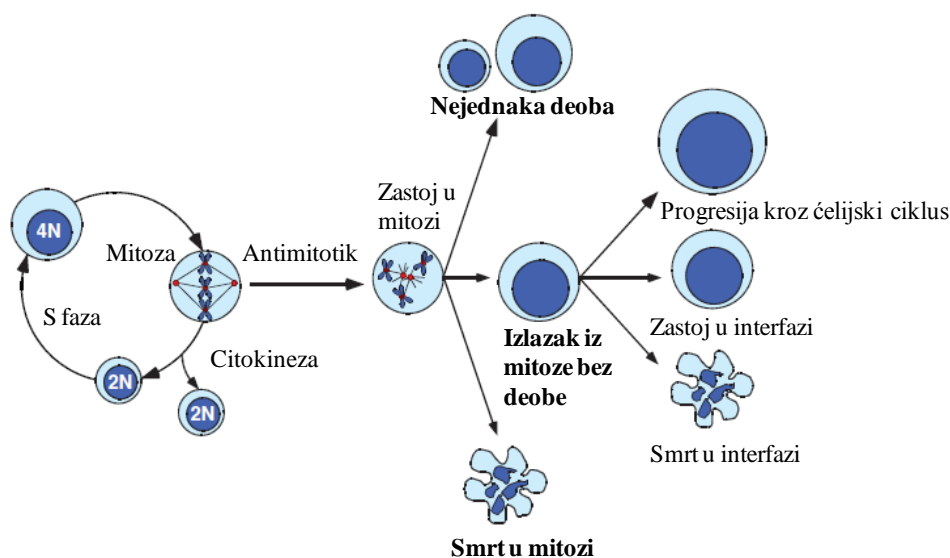
Dodavanje ili uklanjanje slobodnih subjedinica na kraj mikrotubule je visoko regulisan proces i zavisi od dva faktora. Količina slobodnog α - i β -tubulina u ćeliji je bitna u kontekstu kritične koncentracije koja je u ravnoteži sa mikrotubulama. Ukoliko je količina tubulina u ćeliji veća od kritične koncentracije, polimerizacija mikrotubula će biti favorizovana. Ukoliko je ispod kritične vrednosti, mikrotubula će depolimerizovati. Količina kompleksa GTP- β -tubulin je drugi faktor koji utiče na dinamičku nestabilnost mikrotubula. Svaka tubulinska subjedinica vezuje dva molekula GTP [64]. Jedan GTP vezan je ireverzibilno za α -tubulin i ovaj molekul ne podleže hidrolizi. Nalazi se na mestu kontakta dva tubulinska monomera i ima strukturnu funkciju. Drugo GTP-vezujuće mesto nalazi se na β -tubulinu. GTP vezan za β -tubulin podleže hidrolizi do GDP. U trenutku polimerizacije mikrotubula i njenog rasta, dimeri tubulina su vezani za GTP. Ubrzo nakon dodavanja dimera na mikrotubulu, β -tubulin hidrolizuje GTP u GDP [64]. Tubulinska subjedinica povezana sa GDP na kraju mikrotubule doprinosi nestabilnosti strukture i pokazuje tendenciju da se od nje odvoji. Ovaj proces naziva se mikrotubularna katastrofa. Suprotno, u procesu spašavanja, usled smanjenja GTP hidrolize dešava se elongacija polimera [65]. Dinamika mikrotubula je, stoga, kontrolisana preciznim balansom između dodavanja GTP-tubulina i brzine hidrolize GTP [64]. S obzirom da se tubulinska subjedinica vezuje za kraj mikrotubula isključivo kada za sebe ima vezan GTP, GTP-tubulin je struktura koja ima zaštitnu ulogu jer sprečava depolimerizaciju kraja mikrotubula, a GTP ključni regulator njihove stabilnosti. Produženje ili skraćenje mikrotubule može se odvijati i na njenom negativnom kraju, ali je značajno brže na pozitivnom kraju [66].

Dinamičnost mikrotubula ogleda se i kroz proces jednosmernog toka tubulina sa jednog kraja mikrotubule na drugi [67], kada ova struktura izgleda kao da se „kreće“ kroz citoplazmu ćelije. Stanje mikrotubule u kom ona na jednom kraju polimerizuje, a na drugom depolimerizuje, važno je za neke njene funkcije, kao što je translokacija hromozoma za vreme mitoze [67].

1.4. Terapijski agensi usmereni ka mikrotubulama

Budući da čine osnovne komponente mitotskog vretena, mikrotubule predstavljaju privlačnu metu u malignoj ćeliji prilikom dizajniranja novih terapijskih agenasa. Visoko dinamična priroda tumorskih ćelija i njihova velika stopa proliferacije osnov je relativne selektivnosti supstanci koje su usmerene ka deobnom vretenu. Agensi koji interferiraju sa strukturom i funkcijom mitotskog vretena se dele u dve osnovne grupe: agensi koji promovišu polimerizaciju mikrotubula i agensi koji inhibiraju polimerizaciju mikrotubula [68]. Pokazuju efekat zavisian od koncentracije; visoke

koncentracije ovih agenasa utiču na masu polimera, bilo da je smanjuju ili povećavaju, dok niske koncentracije utiču na dinamiku mikrotubula [68]. Ipak, finalni učinak ostaje isti. Princip delovanja ovih supstanci, takozvanih antimitotika, je narušavanje strukture i funkcije deobnog vretena i aktivacija kontrolne tačke formiranja vretena (engl. *Spindle Assembly Checkpoint*, SAC), što dalje vodi zastoju u mitozu i konačno smrti tumorske ćelije [69]. Zastoj u mitozu indukovano ovim agensima pripisuje se neuspehu jednog ili više kinetohora u formiranju stabilnih veza sa vretenom [70]. U slučaju animalnih somatskih ćelija, mitozu je značajno produžena u odsustvu funkcionalnog vretena [70]. Iako su mehanizmi putem kojih antimitotoksi lekovi izazivaju blokadu progresije kroz ćelijski ciklus rasvetljeni, malo se zna o ponašanju ćelije nakon njenog zaustavljanja u metafazi mitoze u prisustvu ovih agenasa. Trenutak kada ćelija zaista umire posle blokade u mitozu, i da li uopšte umire, predmet su istraživanja mnogobrojnih studija, i u tom smislu izvor izvesnih protivurečnosti. Panvichian i saradnici su ukazali da ćelija umire direktno u mitozu [71]. Druge studije su ukazale na izlazak ćelije iz mitoze u procesu označenom kao mitotsko „proklizavanje“ (engl. *Mitotic Slippage*) što implicira njeno tetraploidno stanje [72,73]. Većina somatskih ćelija ne mora da prođe SAC da bi izašla iz mitoze. Tetraploidna ćelija zatim može umreti u G₁ fazi putem apoptoze, ući u naredni ćelijski ciklus ili pak zastati u interfazi što dalje implicira njen ulazak u senescenciju [72]. Međutim, određene studije su pokazale da nejednaka deoba ćelije takođe može biti jedan od ishoda zaustavljanja ćelije u mitozu, nakon čega nastaju progenitorske ćelije sa aneuploidijom [74] (Slika 4), što je predominantno opisano u kontekstu delovanja agenasa koji oštećuju DNK molekul [70].



Slika 4. **Moguća sudbina ćelije koja ne prolazi SAC u prisustvu antimitotika.** Slika preuzeta i modifikovana iz Gascoigne i Taylor, 2009 [75]

Dužina trajanja mitotskog zastoja nije faktor relevantan za dalju sudbinu ćelije, već odabrani antimitotoksi agens i njegova koncentracija [76], što dovodi u pitanje dugo postojanu teoriju da je verovatnoća umiranja ćelije veća ukoliko se duže nalazi u mitozu [70,77]. U odgovoru na niske koncentracije paklitaksela (PCT), većina humanih ćelija izlazi iz mitoze i ostaje vijabilna u G₁ fazi duži vremenski period, dok visoke koncentracije istog hemoterapeutika indukuju smrt ćelije direktno u mitozu ili odmah nakon izlaska iz mitoze [78,79].

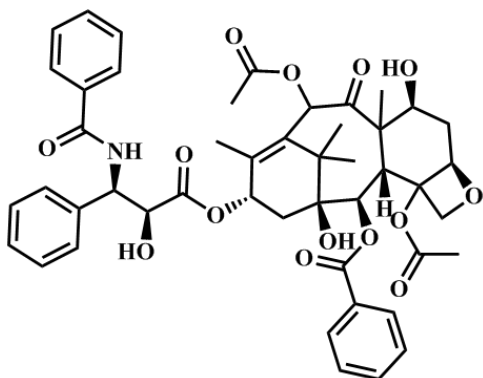
U osnovi rezistencije tumorskih ćelija na agense koji interaguju sa mikrotubulama nalazi se izmenjena ekspresija izoformi tubulina, promene u posttranslacionim modifikacijama ovih izoformi, kao i u ekspresiji MAPs [52]. Aberantna ekspresija izotipova tubulina je najčešće pronađena alteracija mikrotubula i predominantno zastupljena kod solidnih i hematoloških maligniteta [52]. S obzirom da ovi agensi svoju citotoksičnu aktivnost ostvaruju vezivanjem za β -tubulin heterodimerne subjedinice, izoforme β -tubulina su u fokusu istraživanja vezanih za fenomen rezistencije. Mutacije u genima koji kodiraju za tubulin klinički nisu značajno zastupljene, te njihov doprinos hemorezistenciji ostaje diskutabilan [80], uprkos brojnim *in vitro* studijama koje povezuju mutacije ovog proteina sa rezistencijom tumora na agense koji interaguju sa mikrotubulama [81,82].

Veliki potencijal ove klase terapeutika do sad je potvrđen uspešnom kliničkom upotrebom vinka alkaloida i taksana u tretmanu velikog broja različitih tipova kancera. Veliki broj jedinjenja, predominantno prirodnog porekla, sa delovanjem usmerenim ka mikrotubulama u osnovi antikancerske aktivnosti nalazi se u pretkliničkim ispitivanjima ili u nekoj fazi kliničkih studija.

1.4.1. Agensi koji promovišu polimerizaciju mikrotubula

U klasi lekova koji promovišu polimerizaciju mikrotubula izdvajaju se taksani i epotiloni.

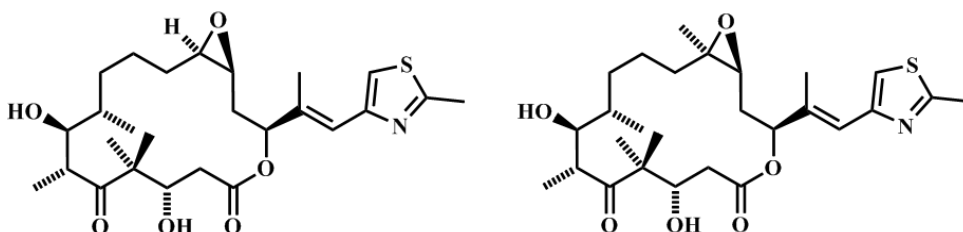
Familiji taksana pripadaju jedinjenja izolovana iz ekstrakta kore biljke iz roda *Taxus*, kao i njihovi polusintetski derivati. Ova jedinjenja predstavljaju vodeću klasu hemoterapeutika u lečenju solidnih tumora, kao što su karcinom dojke, pluća i pankreasa. PCT je prvi opisan primer agensa koji svoju antiproliferativnu aktivnost ostvaruje putem stabilizacije mikrotubula [83]. Koristi se u lečenju karcinoma dojke i jajnika, Kapoši sarkoma i nesitnoćelijskog karcinoma pluća [69].



Slika 5. Hemijska struktura PCT

Pored PCT, i docetaksel, polusintetski taksan, je istaknuti predstavnik ove familije, odobren u terapiji karcinoma dojke, glave i vrata, prostate, jajnika i nesitnoćelijskog karcinoma pluća [84]. Sa idejom premošćavanja rezistencije tumora na taksane, razvijen je kabazitaksel [85] koji je odobren u terapiji hormon-refraktarnog kancera prostate. PCT vezan za albumin takođe je danas u kliničkoj praksi u lečenju karcinoma dojke i pluća [86]. Taksani se vezuju za β -tubulin, ali samo ukoliko se on nalazi u okviru mikrotubule [75]. Konformacione promene indukovane ovim vezivanjem povećavaju afinitet vezivanja između tubulinskih molekula [87]. Pri niskim koncentracijama, PCT stabilizuje dinamiku mikrotubula vodeći njenoj supresiji i zaustavljanju mitoze, dok visoke koncentracije povećavaju polimerizaciju tubulina [88].

Epotiloni, predvođeni epotilonom A i epotilonom B, su prirodna jedinjenja sa snažnim antitumorskim svojstvom, izolovana iz miksobakterija početkom devedesetih godina [89].



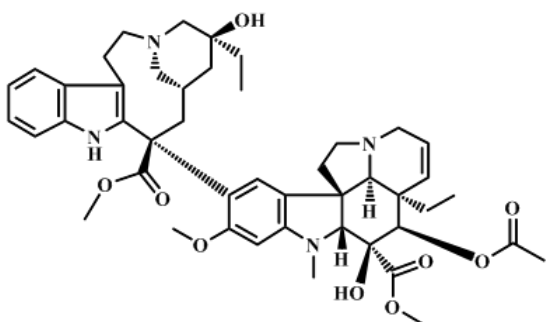
Slika 6. Hemijska struktura epotilona A i epotilona B

U poređenju sa taksanima pokazuju veću citotoksičnu aktivnost *in vitro* [90]. S obzirom da se različiti mehanizmi nalaze u osnovi rezistencije tumorskih klonova na taksane i epotilone [91], epotiloni su svoju primenu u kliničkoj praksi pronašli u lečenju maligniteta koji su rezistentni na taksane. Polusintetski derivat epotilona B, iksabepilon, primenjuje se u terapiji metastatskog karcinoma dojke rezistetnog na PCT i antracikline [92]. Epotiloni promovišu polimerizaciju mikrotubula.

1.4.2. Agensi koji inhibiraju polimerizaciju mikrotubula

U grupi lekova koji sprečavaju polimerizaciju mikrotubula ili indukuju njihovu depolimerizaciju izdvajaju se vinka alkaloidi, zatim klasa agenasa predvođena kolhicinom, dolastatini, disorazoli i tubulizini.

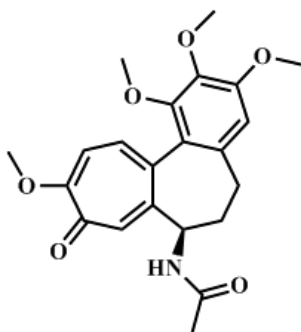
Posle taksana, vinka alkaloidi su najčešće primenjivani agensi u terapiji kancera. Vinblastin je izolovan šezdesetih godina prošlog veka iz biljke *Catharanthus roseus*, (prvobitno *Vinca rosea*), ružičaste, zimzelene, tropske biljke koja raste u madagaskarskim šumama [93]. Ostali članovi ove familije terapeutika su uspešno sintetisani i objedinjeni pod imenom derivati vinka alkaloida.



Slika 7. Hemijska struktura vinblastina

Danas je u kliničkoj upotrebi pet članova vinka alkaloida (vinkristin, vinblastin, vinorelbin, vindezin i vinflunin) u terapiji hematoloških maligniteta [94]. Mehanizam delovanja vinka alkaloida uključuje inhibiciju polimerizacije mikrotubula kroz njihovo vezivanje za β -tubulin, ali i depolimerizaciju funkcionalnih mikrotubula. Interakcija ovih agenasa sa β -tubulinom događa se u regionu koji je u neposrednoj blizini GTP-vezujućeg mesta označenog kao vinka domen [95].

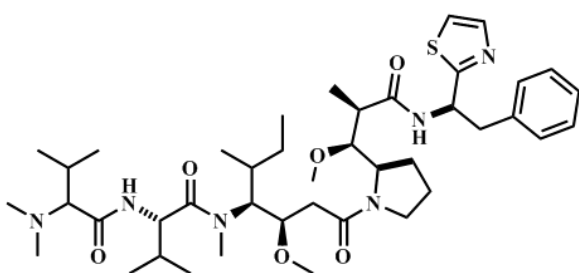
Druga najpoznatija grupa inhibitora polimerizacije mikrotubula obuhvata kolhicin, porekom iz otrovnog livadskog šafrana (*Colchicum autumnale*).



Slika 8. Hemijska struktura kolhicina

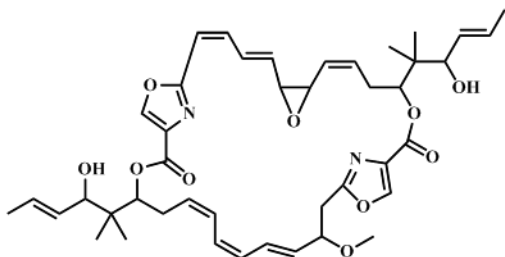
Kolhicin se vezuje za slobodni tubulin pri čemu izaziva njegovu konformacionu promenu, što dalje utiče na proces polimerizacije mikrotubula [93]. Kolhicin je visoko toksičan molekul, usled čega je njegova primena u kliničkoj praksi ograničena. Niske koncentracije kolhicina su odobrene u palijativnom režimu kod hepatocelularnog karcinoma [96] i holangiokarcinoma [97].

Dolastatini takođe pripadaju grupi inhibitora polimerizacije tubulina. Dolastatin 10, istaknuti predstavnik grupe, vodi poreklo iz morskog puža *Dolabella auricularia* i poseduje veoma izražen antiproliferativni potencijal koji ga je, u vreme njegovog otkrića, učinio najsnažnijim antineoplastičnim agensom [98]. Dolastatin 10, interagujući sa tubulinom, sprečava polimerizaciju mikrotubula [99].



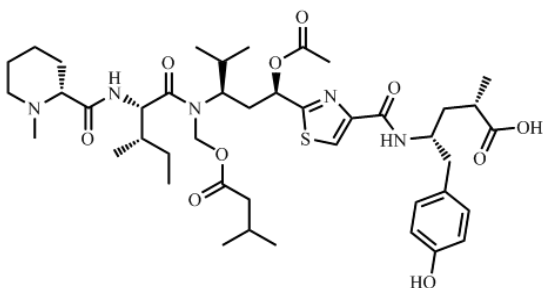
Slika 9. Hemijska struktura dolastatina 10

Disorazoli čine još jednu klasu inhibitora funkcije mikrotubula, koja je izolovana iz miksobakterije *Sorangium cellulosum*. Elnakady i saradnici su ukazali na izuzetnu citotoksičnu aktivnost disorazola A₁ u pikomolarnim koncentracijama kod nekoliko humanih i animalnih tumorskih ćelijskih linija, kao i klonova rezistentnih na terapiju [100]. Disorazoli deluju na subjednice tubulina sprečavajući njihovu polimerizaciju, kao i na intaktne mikrotubule promovišući njihovu degradaciju [100].



Slika 10. Hemijska struktura disorazola A₁

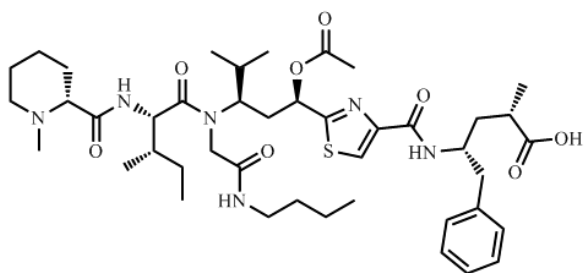
Familija tubulizina predstavlja treću grupu produkata bogatog sekundarnog metabolizma miksobakterija koji interferiraju sa organizacijom mikrotubula. Sasse i saradnici su 2000. godine izolovali ova jedinjenja iz dva različita soja miksobakterija – *Archangium gephyra* i *Angiococcus disciformis* [101]. Tubulizini su peptidi sačinjeni od četiri aminokiseline: N-metil pipekolinska kiselina, L-izoleucin, tubuvalin, tubutirozin ili tubufenilalanin. Strukturno, ova jedinjenja pokazuju sličnost sa dolastatinom 10 [98]. Ova familija agenasa broji osam članova označenih kao tubulizin A, B, D–F, U, V i Z, sa tubulizinom A i tubulizinom D kao dominantnim predstavnicima grupe.



Slika 11. Hemijska struktura tubulizina A

Po svom antiproliferativnom kapacitetu, tubulizini nadmašuju sve hemoterapijske agense koji interaguju sa tubulinom. Nekoliko istraživačkih grupa ukazalo je na impresivan potencijal tubulizina u supresiji rasta kancera: dojke [102], grlića materice [101,103], debelog creva [104], pluća [105], jajnika [102], prostate i melanoma [104] *in vitro*. Koncentracije tubulizina koje inhibiraju rast tumorskih ćelija za 50% nalaze se u nano- do pikomolarnom opsegu [101]. Tubulizin A je efikasan i u smanjenju rasta višestruko rezistentnog malignog fenotipa, što je pokazano u slučaju KB-V1 ćelijske linije [101,103]. Kao dolastatini, tubulizini se vezuju za vinka domen β -tubulina [106]. Khalil i saradnici su pokazali da tubulizini sprečavaju polimerizaciju tubulina u mikrotubule, kao i da deluju na funkcionalne mikrotubule u pravcu njihove depolimerizacije [106], posledično izazivajući apoptozu tumorskih ćelija [104]. Tubulizin A nije supstrat za p-glikoprotein [104] što implicira da ovaj molekul neće biti eliminisan od strane agresivnih fenotipova čiju

membranu odlikuje prisustvo ovih transportera odgovornih za razvijanje otpornosti na terapeutike. Pored antiproliferativnog dejstva na kancerske ćelije, Kaur i saradnici su ukazali i na antiangiogeno svojstvo tubulizina A [104]. S obzirom na veoma ograničenu dostupnost tubulizina u formi prirodnih metabolita, u cilju daljeg razvoja na polju eksperimentalne onkologije, bilo je neophodno obezbediti dodatne izvore ovih jedinjenja. Tubulizin U i V su prvi članovi tubulizinske porodice koji su uspešno sintetisani [107]. Ubrzo zatim Peltier i saradnici izvršili su prvu sintezu tubulizina D [108]. Potreba za derivatima koje karakteriše veća stabilnost i dostupnost, ali i očuvan citotoksični potencijal, dovela je do sinteze prvog sintetskog analoga tubulizina pod nazivom tubugi 1 [109].



Slika 12. Hemijska struktura sintetskog analoga tubulizina, tubugi 1

Preliminarni rezultati studija citotoksičnosti pokazali su da je tubugi 1, sintetski analog tubulizina, zadržao citotoksičnu aktivnost parentalnih jedinjenja. Koncentracije jedinjenja tubugi 1 u kojima je efikasno suprimirao rast tumorskih ćelijskih linija kolona i prostate (HT-29 i PC-3) su slične koncentracijama tubulizina A na istim ćelijskim linijama i nalaze se u nanomolarnom opsegu [109]. Aktivnost supstance tubugi 1 višestruko prevazilazi aktivnost PCT, konvencionalno korišćenog citostatika, na obe ćelijske linije [109]. Dalje, Denkert i saradnici su pokazali da se u osnovi delovanja jedinjenja tubugi 1 na ćelijskoj liniji kolona Colo320 nalazi zastoj u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, a zatim apoptoza realizovana kroz unutrašnji mitohondrijski put, kao i da se direktan efekat ovog analoga na mikrotubule ogleda kroz sprečavanje njihove polimerizacije [110]. Kufka i saradnici su po prvi put sintetisali konjugat tubugi 1 sa neuropeptidom Y (NPY) koji se vezuje za humani Y1 receptor (hY1R) koji je prekomerno ekspimiran u većini tipova kancera dojke [111]. Terapeutski pristup konjugacije sa peptidima (engl. *peptide-drug conjugates*, PDC) umanjio bi potencijalnu toksičnost jedinjenja tubugi 1 na zdrava tkiva. NPY-konjugovan tubugi 1 selektivan za hY1R je pokazao gubitak citotoksičnosti usmerene ka ćelijskim linijama karcinoma kolona i prostate (HT-29, Colo320 i PC-3), ali i visoku selektivnost ka tumorskim ćelijskim linijama sarkoma (SK-N-MC) i dojke (MDA-MB-468 i MDA-231) i normalnoj, ali hemijski transformisanoj liniji poreklom od epitela mlečne žlezde (184B5) koje ekspimiraju hY1R [111]. Značajno, antitumorska aktivnost sintetisanog jedinjenja je bila u korelaciji sa stepenom ekspresije hY1R, što ukazuje na visoku specifičnost novodizajniranog agensa.

U ovoj studiji će biti ispitan antitumorski efekat sintetskog derivata tubulizina, tubugi 1, na modelu mišjeg i humanog metastatskog melanoma *in vitro*, kao i u singenom modelu solidnog melanoma. S obzirom na specifičnost dveju ćelijskih linija melanoma usled različitog porekla i stepena agresivnosti, detaljan uvid u mehanizme delovanja sintetskog analoga tubulizina predočio bi moguće razlike u senzitivnosti ćelija na primenjeni agens. Imajući u vidu da linija humanog melanoma vodi poreklo od visoko invazivne forme melanoma koja konstitutivno ekspimirira inducibilnu izoformu sintaze NO (engl. *Inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS), a s obzirom da je endogena produkcija NO odgovorna za otpornost melanoma na hemoterapeutike, kao što je cisplatin, analiza delovanja ovog molekula na pomenutoj liniji bi mogla ukazati na mehanizme prevazilaženja hemorezistencije.

2. Ciljevi istraživanja

Mnoge studije ukazale su na snažnu antitumorsku aktivnost tubulizina *in vitro* i *in vivo*. U uslovima veoma ograničene dostupnosti ovih metabolita omogućena je sinteza prvog sintetskog analoga tubulizina, tubugi 1. Nedostatak podataka u literaturi o antitumorskoj aktivnosti novosintetisanog derivata, a u svetlu poznatih svojstava parentalnih jedinjenja u terapiji kancera, nameće potrebu za njegovom daljom karakterizacijom.

U skladu sa navedenim, postavljeni su sledeći ciljevi u ovoj tezi:

1. Utvrđivanje antitumorskog delovanja jedinjenja tubugi 1 na ćelijskim linijama melanoma B16 poreklom iz miša i A-375 poreklom od čoveka *in vitro*.
2. Definisane mehanizama direktnog delovanja jedinjenja tubugi 1 na ćelije melanoma.
3. Ispitivanje antitumorskog potencijala jedinjenja tubugi 1 *in vivo* na modelu mišjeg solidnog melanoma.
4. Ispitivanje uticaja jedinjenja tubugi 1 na citotoksičnost i fenotipske karakteristike makrofaga *in vitro* i *ex vivo*.

3. Materijal i metode

3.1. Reagensi

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći reagensi:

Medijum za gajenje ćelija RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Biowest, Riversajd, SAD); nistatin, PCT za *in vivo* eksperimente (Galenika, Beograd, Srbija); rastvor antibiotika – penicilin/streptomycin, HEPES (Biological Industries, Kromvel, SAD); serum fetusa govečeta (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS), tripsin, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), RNaza, propidijum-jodid (PI), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT), dimetil sulfoksid (DMSO), ditiotreitol (DTT), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF), Tween-20, bromfenol plavo, aprotinin, 5(6)-karboksifluorescein-diacetat-*N*-sukcinimidil estar (CFSE), 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), 3-metiladenin (3-MA), hlorokin, natrijum-azid (NaN_3), sulfanilamid, *N*-(1-naftil) etilendiamin dihidrohlorid, natrijum-acetat (CH_3COONa), natrijum-nitrit (NaNO_2), *p*-nitro-fenil-fosfat, glutation reduktaza, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), 2-vinilpiridin, fluorescentne polistirenske kuglice, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina (DTNB), tiobarbiturna kiselina (TBA), trisaminometan hidrohlorid (TRIS HCl), DPX medijum za montiranje mikroskopskih preparata (svi iz Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD); PCT za *in vitro* eksperimente (Cell Signaling Technology, Denver, SAD); medijum za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata sa DAPI bojom (DAPI Fluoromount-G) (Southern Biotech, Birningen, SAD); medijum za montiranje fluorescentno obojenih mikroskopskih preparata (Fluoromount-G) (eBioscience, San Dijego, SAD); dinatrijum-hidrogenfosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Folin-Ciocalteu reagens (Merck, Darmštad, Nemačka); natrijum-karbonat (Na_2CO_3) (Carlo Erba, Milano, Italija); trinatrijum-fosfat (Na_3PO_4) (ICN Biomedicals, Irvin, SAD), kalijum-natrijum-tartarat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum-dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Analytika, Prag, Češka Republika); natrijum-hlorid (NaCl) (ICN, Aurora, SAD); glicerol, natrijum-hidroksid (NaOH), kalijum-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), kalijum-hlorid (KCl) (Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika); bakar-sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$), kalcijum-hlorid (CaCl_2), sirćetna kiselina (CH_3COOH), metanol (CH_3OH), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), vodonik peroksid (H_2O_2) (Zorka, Šabac, Srbija); fosforna kiselina (H_3PO_4) (Centrohema, Stara Pazova, Srbija); tripan plavo, TRIS, albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA), Triton X-100 (Fluka, Selze, Nemačka); kristal violet (CV) (Mol, Beograd, Srbija); akridin-oranž (Labo-Moderna, Pariz, Francuska); *blotto* nemasno mleko u prahu (engl. *blotto non-fat dry milk*) (ChemCruz Biochemicals, Santa Cruz, SAD); 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein diacetat (DAF-FM diacetat), dihidrorodamin 123 (DHR) (Molecular Probes, Judžin, SAD); amonijum-persulfat (APS), natrijum-dodecilsulfat (SDS), β -merkptoetanol, Tween 20 (AppliChem, Darmštad, Nemačka); *N,N,N',N'*-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED), paraformaldehid (PFA), glicin, akrilamid/bisakrilamid rastvor 29:1 (Serva, Hajdelberg, Nemačka); ECL reagens za detekciju (GE Healthcare, Bakinghemšir, Velika Britanija); FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*)-konjugovani pan-kaspazni inhibitor ApoStat (R&D Systems, Mineapolis, SAD); FITC-konjugovani aneksin V (FITC-Ann V) (BD Pharmingen, San Dijego, SAD).

Za imunoblot analizu korišćena su antitela na: inhibitor nukleusnog faktora κB ($\text{I}\kappa\text{B}$)- α fosforilisan na poziciji Ser32, $\text{I}\kappa\text{B}$ - α , kinazu regulisanu ekstracelijskim signalom (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*, ERK1/2) fosforilisanu na poziciji Thr202/Tyr204, ERK1/2, fosforilisani Akt, Akt, ribozomski protein S6 fosforilisan na poziciji Ser240/244, S6, p70S6 kinazu fosforilisanu na poziciji Thr389, p70S6K, Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), Bax (engl. *Bcl-2-associated X*), kaspazu 3, kaspazu 7, kaspazu 9, beclin-1 i α -tubulin (svi iz Cell Signaling Technology, Denver, SAD); p53, kaspazu 2 i β -aktin (svi iz Abcam, Kembridž, Velika Britanija); Notch 1, kozje anti-kunić IgG-HRP (engl. *horseradish peroxidase*) (svi iz Santa Cruz Biotechnology, Dalas, SAD); p62/SQSTM1 (engl. *p62/sequestosome 1*) (Novus Biologicals,

Litlton, SAD); LC3B (engl. *microtubule-associated protein light chain 3B*) (Sigma-Aldrich, Sent Luis, SAD). Za protočnu citofluorimetriju korišćena su antitela: FITC-konjugovano mišje anti-CD40, PE (engl. *phycoerythrin*)-konjugovano mišje anti-F4/80 (svi iz eBioscience, San Dijego, SAD). Antitelo na p62 i sekundarno anti-kunić IgG-HRP antitelo su korišćeni u koncentraciji 1:3000, dok su ostala antitela za imunoblot analizu upotrebljavana u razblaženju 1:1000. Za potrebe protočne citofluorimetrije antitela su korišćena u razblaženju 1:100.

3.2. Rastvori

Ćelijske linije melanoma i linija mišjih fibroblasta su gajene u RPMI-1640 medijumu u koji su dodavani: 10% FBS, antimikotik nistatin (100 IJ/ml) i rastvor antibiotika penicilin (100 IJ/ml)/streptomycin (100 µg/ml), što je u daljem tekstu označeno kao medijum za gajenje. Medijum za gajenje makrofaga obogaćivan je sa 5% FBS. FBS je pre dodavanja u medijum inkubiran na 56°C 30 minuta kako bi se inaktivirale komponente komplementa. PBS pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*), korišćen za ispiranje ćelija, pH 7,4 na sobnoj temperaturi, pravljen je od: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O i 1,76 KH₂PO₄.

Za tripsinizaciju ćelija korišćen je rastvor tripsina (0,25%) i EDTA (0,02%) u PBS.

Za merenje vijabiliteta ćelija testom kisele fosfataze korišćen je supstrat za kiselu fosfatazu napravljen od: *p*-nitro-fenil-fosfata, Triton X-100 i 0,3% CH₃COONa.

Za bojenje ćelija FITC-Ann V korišćen je pufer za vezivanje aneksina sačinjen od 10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl i 2,5 mM CaCl₂.

Za merenje koncentracije proteina metodom po Loriju pravljeni su sledeći rastvori: 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH, 1% CuSO₄ × 5 H₂O i 2% kalijum-natrijum-tartarat u destilovanoj vodi (dH₂O), mešani u razmeri 98:1:1.

Za merenje produkcije NO u supernatantu kulture metodom po Griess-u korišćen je 0,1% rastvor *N*-(1-naftil) etilendiamin dihidrohlorida i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H₃PO₄.

Za imunoblot analizu proteina pravljeni su sledeći rastvori: 5 × PBS bez kalijuma (400 mM Na₂HPO₄ × 2 H₂O, 500 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄ × 2 H₂O u dH₂O); rastvor za liziranje ćelija (62,5 mM TRIS HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol i 50 mM DTT u dH₂O) u koji su neposredno pre korišćenja dodavani inhibitori proteaza (10 µg/ml aprotinin, 2 mM EDTA i 1 mM PMSF); pufer za nalivanje uzoraka na gel za elektroforezu – 4 × Laemmli pufer (1 M TRIS HCl pH 6,8, 20% SDS, 20% glicerol, 0,2 M β-merkaptotanol, 0,004% bromfenol plavo); 5 × pufer za elektroforezu (125 mM TRIS, 0,5% SDS, 1,25 M glicin u dH₂O); pufer za transfer na membranu (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 10% CH₃OH, 0,1% SDS u dH₂O); za ispiranje membrana korišćen je rastvor 0,1% Tween 20-PBS (PBSTw); rastvor za nespecifično vezivanje antitela 5% BSA ili mleko u prahu u PBSTw; rastvori antitela određenog razblaženja pravljeni su u PBSTw sa 1% BSA ili 3% mleka u prahu.

Tubugi 1 (MW = 827,08 g/mol) je sintetisan na Lajbnic Institutu za biljnu biohemiju, Hale, Nemačka, prema protokolu grupe profesora Wessjohann-a [109]. Rastvor štoka (20 mM) jedinjenja tubugi 1 je pripreman u DMSO i čuvan na –20°C. Pre upotrebe radni rastvori (0,08–5 nM) su pravljeni u medijumu za gajenje. Procenat DMSO u najvećoj koncentraciji eksperimentalnog agensa je iznosio 0,000025%. PCT je rastvoren u DMSO i 1 mM štok čuvan na –20°C, a radni rastvori

(0,75–50 nM) napravljeni u medijumu za gajenje ćelija. Procenat DMSO iznosio je 0,005% u najvećoj koncentraciji PCT.

3.3. Kulture ćelija

3.3.1. Ćelijske linije

Sve korišćene ćelijske linije formiraju adherentnu kulturu i gajene su u monosloju. Potiču iz Američke kolekcije kultura sojeva (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC) (Rokvil, SAD).

3.3.1.1. B16 linija mišjeg melanoma

B16 ćelijska linija mišjeg melanoma je uspostavljena iz hemijski indukovano tumora u C57BL/6 miševima. U pitanju su maligno izmenjene ćelije epidermisa koje proizvode melanin. Ova linija je slabo invazivna i ne poseduje svojstvo metastaziranja.

3.3.1.2. A-375 linija humanog melanoma

A-375 ćelijska linija potiče od malignih melanoma ćelija čoveka [112]. Ove ćelije poseduju epitelijalnu morfologiju. Za razliku od linije mišjeg melanoma, A-375 linija je amelanotična. Radi se o anaplastičnoj, visoko agresivnoj malignoj ćelijskoj liniji, sa velikim potencijalom da invadira okolna tkiva i formira metastaze. Ćelije humanog melanoma konstitutivno ekspimiraju iNOS koja je odgovorna za produkciju NO kao njihovog endogenog faktora rasta. S obzirom na mnogobrojne efekte iNOS u progresiji tumora, kao što je između ostalog i neovaskularizacija, ovakav ćelijski fenotip je izuzetno koristan model za proučavanje fenomena metastaziranja [113].

3.3.1.3. NIH 3T3 linija mišjih fibroblasta

NIH 3T3 je jedna od najčešće korišćenih fibroblastnih ćelijskih linija. Ustanovljena je od primarnih fibroblasta embriona miševa koji su kultivisani po jasno definisanom protokolu [114]. Nakon 20–30 generacija propagacije *in vitro* nastaju spontano imortalizovane ćelije koje više nisu, u svom rastu, inhibirane kontaktom sa susednim ćelijama, već počinju neograničeno da se dele u kulturi.

3.3.2. Primarne ćelije

3.3.2.1. Ćelije peritonealnog eksudata miša

Ćelije peritonealnog eksudata miša su sakupljane ispiranjem trbušne šupljine hladnim rastvorom PBS. Pod aseptičnim uslovima u peritoneum životinja je ubrizgavan sterilan PBS, a zatim su

sakupljane ćelije peritonealnog ispirka. Eventualno prisustvo eritrocita eliminisano je primenom pufera za liziranje istih u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon zaustavljanja procesa hemolize i centrifugiranja tokom 5 minuta na 500 g, ćelijski talog je resuspendovan u medijumu za gajenje. Po sađenju u laboratorijski sud, ćelije peritonealnog ispirka su ostavljane da adheriraju tokom 4 h, i nakon uklanjanja neadheriranih limfocita ispiranjem u PBS, dobijena je populacija makrofaga.

3.3.2.2. Keratinociti iz uha miša

Ćelijska suspenzija epidermisa je dobijena iz kože uha miševa. Nakon ispiranja u rastvoru PBS/antibiotici (penicilin 100 IJ/ml i streptomycin 100 µg/ml), uši su rascepljene i potopljene u rastvor dispaze (2,5 mg/ml) u medijumu za gajenje obogaćenom 50 µM β-merkaptetanolom. Nakon 1,5 h inkubacije na 37°C, epidermis je odvojen od dermisa, isečen u male komade, a zatim izložen delovanju rastvora 0,1% tripsin-0,1% glukoza u PBS tokom 35 minuta na 37 °C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 10% FBS. Nastala ćelijska suspenzija je zatim profiltrirana kroz sterilnu filter mrežicu promera 50 µm, ćelije isprane u PBS i konačno resuspendovane u medijumu za gajenje obogaćenom 10% FBS i 50 µM β-merkaptetanolom.

3.3.3. Uslovi kultivacije

Ćelije su gajene u sterilnim plastičnim flašicama – flaskovima (25 cm³) (Sarstedt, Njuton, SAD) sa 5 ml medijuma za gajenje, u inkubatoru sa vlažnom atmosferom na temperaturi od 37°C i pri koncentraciji CO₂ od 5% (u daljem tekstu inkubacija).

3.4. Eksperimentalne životinje

U istraživanju su korišćeni miševi muškog pola soja C57BL/6, starosti 8–12 nedelja. Eksperimentalne životinje su uzete iz uzgajališta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima sa *ad libitum* pristupom hrani i vodi. Eksperimenti u kojima su korišćene životinje su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (br. 07-10/15).

3.5. Primenjene metode

3.5.1. Tripsinizacija ćelija

Kako bi se započeo rad sa adherentnim ćelijskim linijama, neophodno je odvojiti ih od laboratorijskog suda i međusobno, u postupku tripsinizacije. Nakon vizuelne procene da su kulture ćelijskih linija melanoma dostigle 80% konfluentnosti, medijum u kom su ćelije rasle je uklanjan, a ćelije isprane u PBS sa ciljem eliminacije zaostalog medijuma sa FBS koji bi inhibirao proces tripsinizacije. Zatim je dodavan rastvor za tripsinizaciju ćelija. Nakon 3 minuta inkubacije na 37°C, enzimska reakcija je prekidana dodavanjem medijuma za gajenje sa 10% FBS. Zatim je suspenzija

ćelija centrifugirana 3 minuta na 2000 rpm, i ćelijski talog resuspendovan u medijumu za gajenje, nakon čega se pristupilo brojanju vijabilnih ćelija.

3.5.2. Određivanje broja i procena vijabilnosti ćelija

Za određivanje broja živih ćelija u suspenziji korišćen je 0,1% rastvor boje tripan plavo u PBS. Ovo bojenje se zasniva na činjenici da žive ćelije poseduju neoštećenu membranu usled čega ne propuštaju negativno naelektrisanu hromoforu, pa stoga ostaju nebojene, dok se mrtve ćelije boje plavo. Suspenzija ćelija je mešana u odnosu 1:1 sa rastvorom tripan plavo boje, nakon čega su ćelije brojane pod svetlosnim mikroskopom u komori po Türker-Bürku sa ugraviranim poljima. Broj ćelija po ml suspenzije određivan je po formuli: broj ćelija/broj polja $\times 0,5 \times 10^6$. Na osnovu izračunatog broja ćelija, podešavana je gustina ćelija i pravljena ćelijska suspenzija neophodna za dalji eksperimentalni rad.

3.5.3. Priprema ćelijskih kultura

Za potrebe određivanja vijabiliteta, ćelije su ravnomerno sađene u sterilne plastične ploče sa 96 bunarića (Sarstedt): ćelije melanoma u broju 5×10^3 , NIH 3T3 fibroblasti u broju 2×10^4 , a ćelije peritonealnog eksudata u gustini 2×10^5 u 100 μ l medijuma za uzgajanje po bunariću. Keratinociti su sađeni u gustini 8×10^4 u 50 μ l medijuma za uzgajanje po bunariću

Za potrebe fluorescentne mikroskopije, ćelije melanoma su sađene na sterilne višekomorne mikroskopske pločice za kultivaciju ćelija (engl. *chamber slide*) u gustini 15×10^3 u 100 μ l medijuma za gajenje ćelija po komori. Za test fagocitoze *in vitro*, ćelije peritonealnog eksudata su sađene na mikroskopske pločice u gustini 1×10^3 u 100 μ l medijuma za gajenje ćelija po komori.

Za potrebe protočne citofluorimetrije, fluorescentne spektroskopije, imunoblota i određivanja parametara oksidativnog stresa, u sterilne plastične ploče sa šest bunarića (Sarstedt) ravnomerno je sađeno 3×10^5 ćelija melanoma u 1 ml medijuma za uzgajanje po bunariću.

3.5.4. Testovi vijabiliteta

3.5.4.1. Test kisele fosfataze

Test kisele fosfataze se zasniva na hidrolizi *p*-nitro-fenil-fosfata citosolnim kiselim fosfatazama u živim ćelijama pri čemu nastaje nebojeni *p*-nitrofenol. Promenom pH radnog rastvora ka baznim vrednostima, što se postiže dodavanjem NaOH, *p*-nitrofenol postaje žuto obojen. Po završetku tretmana, kulture su inkubirane sa 50 μ l supstrata za kiselu fosfatazu tokom 2 h na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 50 μ l 1,3 M NaOH. Intenzitet boje je određen merenjem apsorbance svetlosti na 405 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (LKB, Beč, Austrija). Vijabilitet tretiranih ćelija je računat kao procenat apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljeno 100% vijabilnosti. IC₅₀ vrednost (engl. *half maximal inhibitory concentration*) je definisana kao koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50% inhibicije rasta kulture.

3.5.4.2. MTT test

MTT test je kolorimetrijski test koji se zasniva na sposobnosti ćelija da redukuju tetrazolijumovu so u formazan, precipitat ljubičaste boje. Količina formazana je u korelaciji sa brojem živih ćelija. Po završetku tretmana, supernatant je odlivan, a kulturama dodavan rastvor MTT u medijumu za gajenje (0,5 mg/ml). Nakon inkubacije na 37°C 30–45 minuta, formirani kristali formazana su rastvarani u 50 µl DMSO. Intenzitet rastvorene boje određivan je merenjem apsorbance svetlosti na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB). Vijabilitet tretiranih ćelija je predstavljen kao procenat apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost vijabilnosti 100%.

3.5.4.3. CV test

CV test je kolorimetrijski test koji se zasniva na vezivanju bazne boje kristal violet za sve negativno naelektrisane polisaharide, proteine i nukleinske kiseline. Količina boje vezane od strane ćelija u kulturi je u korelaciji sa njihovim brojem. Nakon završetka tretmana, supernatanti su odliveni, a ćelije fiksirane za podlogu dodavanjem 50 µl 4% PFA tokom 10 minuta. Zatim su ćelije obojene 0,02% rastvorom CV u PBS tokom 15 minuta. Nevezana boja je uklonjena ispiranjem bunarića tekućom vodom, a ploče su osušene na sobnoj temperaturi. Vezana boja je rastvorena u 33% CH₃COOH, a intenzitet rastvorene boje određivan je merenjem apsorbance svetlosti na 540 nm uz pomoć automatskog čitača za mikrotitarske ploče (LKB). Vijabilitet tretiranih ćelija je predstavljen kao procenat apsorbance kontrolne kulture gajene u medijumu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost od 100%.

3.5.5. Bojenje ćelija DAPI bojom

DAPI je fluorescentna boja koja se visokim afinitetom vezuje za regione DNK bogate sadržajem adenina i timina i visoko je specifični marker DNK molekula [115]. Po završetku tretmana, supernatant je odlivan, a ćelije permeabilizovane u 4% PFA tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije melanoma su obojene i montirane pomoću medijuma sa DAPI bojom za montiranje fluorescentno obojenih preparata. Preparati su posmatrani na Axio Observer Z1 invertnom fluorescentnom mikroskopu (Carl Zeiss AG, Oberkuhen, Nemačka) i fotografisani pri uveličanju objektiva od 400 ×.

3.5.6. Fluorimetrija i protočna citofluorimetrija

Merenje intenziteta fluorescence obeleženih uzoraka vršeno je pomoću Chameleon fluorimetra (Hidex, Turku, Finska), CyFlow Space protočnog citofluorimetra (Partec, Minster, Nemačka), BD FACSAria™ III ćelijskog sortera (BD Biosciences, San Hose, SAD) i Fluorolog FL3-221 spektrofotometra (JobinYvon Horiba, Pariz, Francuska).

U eksperimentalnom radu su korišćene sledeće fluorescentne boje: CFSE, PI, DAPI, FITC-Ann V, FITC-konjugovani ApoStat, akridin-oranž, DAF-FM diacetat, DHR, fluorescentne polistirenske kuglice, FITC-konjugovano mišje anti-CD40 antitelo i PE-konjugovano mišje anti-F4/80 antitelo. Ekscitacioni i emisioni maksimumi ovih fluorescentnih boja su dati u Tabeli 1.

Tabela 1. Fluorescentne boje korišćene u eksperimentalnom radu

| Fluorescentna boja | λ_{ex} (nm) | λ_{em} (nm) |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CFSE | 492 | 517 |
| PI | 536 | 617 |
| DAPI | 358 | 461 |
| FITC | 494 | 518 |
| Akridin-oranž | 488 | 530/640 |
| DAF-FM diacetat | 495 | 515 |
| Fluorescentne polistirenske kuglice | 470 | 540 |
| DHR | 500 | 536 |
| PE | 496/546/565 | 578 |

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

3.5.6.1. Analiza ćelijskog ciklusa

Po završetku tretmana, supernatanti uzoraka iz bunarića su sakupljeni, pa spojeni sa suspenzijom ćelija dobijenom nakon tripsinizacije. Nakon ispiranja suspenzije ćelija u hladnom PBS i centrifugiranja 3 minuta na 750 g, pristupilo se fiksiranju ćelija 70% CH₃CH₂OH preko noći na 4°C. Ćelije su potom dva puta isprane u PBS, a onda inkubirane u rastvoru PI (20 µg/ml) i RNaze (0,1 mg/ml) u PBS 45 minuta na 37°C. Bojenje se zasniva na ravnomernom vezivanju PI za molekul DNK. Kako PI takođe može interkalirati u RNK, dodavanje RNaze u rastvor za bojenje eliminiše ovaj molekul, te je količina vezanog PI u strogoj korelaciji sa količinom DNK u ćeliji i direktna refleksija faze ćelijskog ciklusa u kojoj se ćelija nalazi. U određenim eksperimentima, nakon fiksiranja i ispiranja, ćelije su inkubirane u rastvoru DAPI boje (1 µg/ml) i 1% Triton X-100 u PBS tokom 10 minuta u mraku. Intenzitet crvene fluorescence PI, i plave fluorescence DAPI boje je analiziran na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) u FloMax softverskom programu, odnosno na BD FACSAria III ćelijskom sorteru (BD Biosciences) u BD FACS Diva softveru.

3.5.6.2. Analiza stope proliferacije

Za praćenje uticaja eksperimentalnog agensa na stopu proliferacije ćelija korišćena je CFSE boja. Ova fluorofora slobodno difunduje kroz ćelijske membrane i posredstvom sukcinimidil grupe kovalentno se vezuje za unutarćelijske molekule, prvenstveno lizinske ostatke, kao i druge izvore amina obeležavajući na taj način proteine citoplazme. Duplo slabiji intenzitet fluorescence u potomačkim ćelijama nakon svake deobe, čini ovaj molekul pogodnim za praćenje ćelijske proliferacije. Ćelije melanoma su najpre bojene u rastvoru 1 µM CFSE u 0,1% FBS-PBS tokom 10 minuta na 37°C. Reakcija bojenja je prekinuta dodavanjem medijuma za gajenje sa 10% FBS, a boja koja nije prošla ćelijsku membranu i vezala se za proteine unutar ćelije je uklonjena ispiranjem ćelija u PBS. Ćelije su potom posađene i tretirane. Po završetku tretmana, supernatanti iz bunarića su odbačeni, a ćelije tripsinizovane i dva puta isprane u PBS. Intenzitet zelene fluorescence je detektovan na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) i analiziran u FloMax softverskom programu.

3.5.6.3. Detekcija ćelija u apoptozi

Rano morfološko i biohemijsko obeležje apoptoze je translokacija fosfatidilserina (PS) sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane [116]. Visoko specifična i snažna interakcija PS sa aneksinom V obeleženim fluoroforom pruža mogućnost jednostavne detekcije njegove eksternalizacije [117]. Ovakvim pristupom omogućena je identifikacija populacije rano apoptotskih ćelija čiji je membranski permeabilitet još uvek intaktan. Kako se selektivna propustljivost membrane narušava u kasnijim stupnjevima apoptoze ili pak u inicijalnoj fazi nekroze, uvođenje PI kao druge boje, omogućava razlikovanje kako ranih od kasno apoptotskih ćelija, tako i osnovnu distinkciju između rane apoptoze i nekroze. Ovo je zasnovano na činjenici da PI ulazi u ćelije samo u uslovima narušenog integriteta ćelijske membrane. Po završetku tretmana, supernatanti iz bunarića su sakupljeni, pa spojeni sa suspenzijom ćelija nakon tripsinizacije. Nakon ispiranja u PBS, ćelije su obojene smešom FITC-Ann V (1,5 µl) i PI (1,5 µl 1 mg/ml rastvora) u 100 µl pufera za vezivanje aneksina tokom 15 minuta duge inkubacije na sobnoj temperaturi, u mraku. Reakcija bojenja je prekinuta dodavanjem 900 µl pufera za vezivanje aneksina. Fluorescenca je detektovana na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) i analizirana u FloMax softverskom programu, kao i Fluorolog FL3-221 fluorescentnom spektroskopu (JobinYvon Horiba) u FluorEssence 3.5 softverskom programu (Horiba Scientific, Kijoto, Japan).

3.5.6.4. Detekcija aktiviranih kaspaza

Za detekciju aktiviranih kaspaza je korišćen FITC-konjugovani inhibitor kaspaza, ApoStat. ApoStat slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu i ireverzibilno se vezuje za aktivirane forme ovih enzima. Po završetku tretmana, supernatanti iz bunarića su sakupljeni, pa spojeni sa suspenzijom ćelija dobijenom nakon tripsinizacije. Nakon ispiranja u PBS, ćelije su inkubirane u rastvoru ApoStat (1 µl u 100 µl rastvora 5% FBS u PBS), 30 minuta na 37°C. Nakon ispiranja ćelija i uklanjanja nevezane boje, talog je resuspendovan u 100 µl PBS. Promena u intenzitetu fluorescence je analizirana u FloMax softverskom programu.

3.5.6.5. Detekcija autofagije

Za detekciju autofagozoma, kiselih vezikula koje sadrže delove citoplazme i/ili ćelijske organele namenjene za proteolizu, i ujedno, karakterističnih markera autofagije, korišćena je akridin-oranž boja. Ovaj molekul ulazi u kisele kompartmente ćelije, kao što su lizozomi i autofagozomi, i pri niskom pH, emituje svetlost u narandžastom/crvenom delu spektra. Intenzitet crvene fluorescence je u korelaciji sa brojem prisutnih autofagozoma. Nakon završetka tretmana, supernatanti iz bunarića su sakupljeni i spojeni sa ćelijskom suspenzijom dobijenom nakon tripsinizacije. Ćelije su potom bojene sa 500 µl rastvora akridin-oranž boje (10 µM) u PBS 15 minuta na 37°C. Nakon ispiranja ćelija u PBS meren je intenzitet crvene fluorescence na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) i analiziran u FloMax softverskom programu.

3.5.6.6. Merenje količine unutarćelijskog NO

Za merenje količine unutarćelijskog NO korišćen je DAF-FM diacetat. Ova boja lako difunduje kroz ćelijske membrane zahvaljujući acetil grupama. Deacetilacijom od strane esteraza u citoplazmi ćelija oslobađa se slabo fluorescentni DAF-FM koji u kontaktu sa NO daje fluorescentni derivat benzotriazola. Nakon završetka tretmana, ćelije su isprane dva puta u PBS i inkubirane 1 h na 37°C u rastvoru 5 µM DAF-FM diacetata. DAF-FM je rastvoren u medijumu za gajenje ćelija bez fenol crvene boje koji je obogaćen sa 10% FBS. Ćelije su potom ponovo isprane dva puta u PBS i inkubirane dodatnih 15 minuta na 37 °C u medijumu bez fenol crvene boje i FBS, radi prekidanja reakcije deesterifikacije. Intenzitet zelene fluorescence je očitana na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) i analiziran u FloMax softverskom programu.

3.5.6.7. Detekcija unutarćelijske produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota

Kako bi se detektovala produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (engl. *Reactive oxygen and nitrogen species*, ROS/RNS) u ćelijama posle izlaganja tretmanu agensom tubugi 1, upotrebljena je DHR boja koja posle slobodnog ulaska u ćeliju, u prisustvu reaktivnih metabolita oksiduje do fluorescentnog rodamina 123. B16 ćelije su najpre inkubirane 20 minuta na 37°C u 1 µM rastvoru DHR u medijumu za gajenje, a zatim su posađene i tretirane. Nakon završetka tretmana, ćelije su tripsinizovane i oprane dva puta u PBS. Intenzitet zelene fluorescence je očitana na CyFlow Space protočnom citofluorimetru (Partec) i analiziran u FloMax softverskom programu.

3.5.7. Analiza parametara oksidativnog stresa

3.5.7.1. Određivanje sadržaja tiolnih grupa

Po završetku tretmana, supernatanti su sakupljeni, dok su ćelije isprane tri puta u PBS, zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C. Smrznute ćelije su odvojene od podloge teflonskim strugačem, rastvorene u puferu za ekstrakciju (0,1 M Na₃PO₄ pH 8,0 sa 1 mM EDTA) i centrifugirane 90 minuta na 30 000 g. Za određivanje sadržaja tiolnih (-SH) grupa u ćeliji korišćena je metoda po Ellmanu [118] koja se zasniva na spektrofotometrijskom merenju proizvoda reakcije DTNB sa tiolima u baznoj sredini. Uzorak (100 µl) je mešan sa 200 µl DTNB i 900 µl 0,1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7,3. Suspenzija je držana 10 minuta u mraku, nakon čega je intenzitet boje proizvoda meren na 412 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB). Standardna kriva za određivanje koncentracije tiola konstruisana je na osnovu standardne serije rastvora cisteina.

3.5.7.2. Analiza lipidne peroksidacije

Koncentracija malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije, u supernatantima ćelijskih kultura merena je metodom po Ohkawi [119]. MDA u kiselim uslovima reaguje sa TBA na 100°C formirajući MDA-TBA ružičasti kompleks. Uzorak (100 µl) je mešan sa 600 µl reagensa sačinjenog od 1% TBA u dH₂O i 20% CH₃COOH pH 3,5 u odnosu 1:1. Nakon 60 minuta inkubacije na 95°C, mešavina je kratko hladena na ledu. Intenzitet boje je meren na 535 nm na

automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB). Koncentracija MDA je izračunata upotrebom molarnog ekstinkcionog koeficijenta nastalog MDA–TBA kompleksa [$1,56 \times 10^5$ /M/cm].

3.5.7.3. Test za kvantifikaciju redukovanog glutationa (GSH)

Po završetku tretmana, supernatanti iz bunarića su sakupljeni, dok su ćelije isprane tri puta u PBS, zamrznute u tečnom azotu i čuvane na -80°C . Smrznute ćelije su lizirane na gore opisani način. Unutarćelijski oksidovani (GSSG) i ukupni glutation (GSH+GSSG) su spektrofotometrijski određeni metodom recikliranja GSH [120]. Merenje GSH+GSSG zasniva se na reakciji GSH sa DTNB kada GSH biva oksidovan do GSSG, a DTNB redukovan do obojenog produkta, 5-tionitrobenzoata (TNB). Zatim, GSSG biva redukovan glutation reduktazom i NADPH do GSH. Ćelijski lizati su inkubirani u 1 ml natrijum fosfatnog pufera koji sadrži 0,6 mM DTNB i 1 J/ml glutation reduktaze. Reakcija je inicirana dodavanjem 1,2 mM NADPH, a porast u apsorbanca na 412 nm izmeren na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB). Količina ukupnog GSH je određena standardnom krivom. Za određivanje količine GSSG, isti test recikliranja DTNB je korišćen posle uvođenja 2-vinilpiridina sa ciljem uklanjanja redukovanog GSH. Nivo GSH u ćeliji je izračunat oduzimanjem količine GSSG od GSH+GSSG i izražen kao nmol/mg proteina.

3.5.8. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Za merenje koncentracija proteina u uzorcima liziranih ćelija korišćena je metoda po Loriju [121]. Ova metoda se zasniva na biuretskoj reakciji Cu^{2+} sa peptidnim vezama ispitivanih proteina u alkalnoj sredini, kao i na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa sa bočnim ostacima tirozina i triptofana prisutnim u testiranom uzorku. Zajedno, kao rezultat se dobija plavo obojeni kompleks poznatog apsorpcijskog maksimuma. 20 μl uzoraka razblaženih deset puta u dH_2O mešano je sa 300 μl rastvora 2% Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH, 1% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ i 2% kalijim-natrijum-tartaratom u dH_2O , pomešanih u razmeri 98:1:1. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorcima je dodavano po 60 μl Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog pet puta u dH_2O . Narednih 30 minuta, koliko je potrebno za razvijanje plave boje, uzorci su držani na sobnoj temperaturi uz povremeno mešanje. Apsorbanca uzoraka merena je na 670 nm automatskim čitačem za mikrotitarske ploče (LKB). Koncentracija proteina u uzorcima je određena iz standardne krive dobijene merenjem apsorbanca za koncentracije (0.1–1 mg/ml) rastvora BSA u dH_2O .

3.5.9. Imunoblot analiza proteina

Tretman ćelija agensom tubugi 1 je prekidan u tačno definisanim vremenskim tačkama uklanjanjem supernatanata iz bunarića i dodavanjem ledeno hladnog rastvora PBS. Zatim je u bunariće dodat hladan rastvor za liziranje ćelija. Lizati su kuvani 5 minuta na 95°C , pa centrifugirani 20 minuta na 4°C , pri brzini od 20 000 g. Supernatanti sa rastvorenim proteinima su prebačeni u čiste tube i čuvani na -20°C . Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci (30 μg proteina) su mešani sa denaturišućim puferom za nalivanje uzoraka na gel za elektroforezu prema Lemliju i kuvani 5 minuta na 95°C [122]. Zatim su uzorci naneti i razdvojeni elektroforezom na 10–12% SDS–poliakrilamidnom gelu. Po završenoj elektroforezi, usledio je transfer proteina na polivinil difluoridnu membranu (EMD Millipore, Bilerika, SAD) korišćenjem polusuvog sistema za transfer (Fastblot B43, Biorad, Getingen, Nemačka). Nespecifično vezivanje antitela blokirano je 1 h na sobnoj temperaturi 5% BSA ili 5% rastvorom mleka u prahu u PBSTw, nakon čega su membrane

inkubirane u toku noći na 4°C sa antitelima kunića specifičnim na: p-IkB- α (Ser32), IkB- α , ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, p-Akt, Akt, p-S6 (Ser240/244), S6, p-p70S6K (Thr389), p70S6K, Bcl-2, Bax, kaspazu 3, kaspazu 7, kaspazu 9, p53, kaspazu 2, beclin-1, p62/SQSTM1, LC3B, α -tubulin ili β -aktin (rastvorenim u 1% BSA u PBSTw); Notch 1 (rastvorenim u 3% rastvoru mleka u PBSTw). Membrane su zatim ispirane pet puta po 5 minuta u PBSTw, a potom inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena, specifičnim na IgG kunića. Nakon ponovnog ispiranja membrana u PBSTw, vezana antitela detektovana su ECL sistemom hemiluminescencije (GE Healthcare). Upotrebom programa ImageJ (Nacionalni institut za zdravlje, SAD) denzitometrijski je merena količina proteina i izražena u odnosu na količinu totalnih, nefosforilisanih formi proteina ili na količinu α -tubulina/ β -aktina.

3.5.10. Analiza fagocitoze *in vitro*

Po isteku tretmana agensom tubugi 1, B16 apoptotske ćelije su sakupljene, isprane tri puta u PBS, zatim prebrojane (4×10^4 po komori) i potom dodate kulturama makrofaga izolovanim iz peritonealnog eksudata miša tokom 3 h na 37°C, kako bi se testirala njihova fagocitoza od strane makrofaga. Po isteku perioda ko-kultivacije, nefagocitovane apoptotske ćelije su isprane u PBS, dok su adherentne ćelije fiksirane u 4% PFA tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, potom isprane u PBS i na kraju obojene 0,02% rastvorom CV u PBS tokom 15 minuta. Pločice su montirane pomoću DPX medijuma za montiranje i tako pripremljeni preparati posmatrani su pomoću svetlosnog mikroskopa (Leica Microsystems, Veslar, Nemačka) pri uveličanju objektiva od $400 \times$.

3.5.11. Indukcija melanoma i tretman životinja

B16 ćelije u gustini $2,5 \times 10^5$ u 100 μ l PBS su potkožno ubrizgane u desni dorzalni lumbosakralni region singenih C57BL/6 miševa. Dvanaestog dana nakon indukcije, kada su tumori postali palpabilni, životinje su nasumično podeljene u četiri grupe od po osam jedinki i tretirane. Tubugi 1 je intraperitonealno aplikovan svakog drugog dana tokom deset dana u dve doze: 0,05 mg/kg i 0,1 mg/kg. PCT, kao pozitivna kontrola, je primenjivan u toksičnoj dozi (20 mg/kg) [123] u istom eksperimentalnom režimu, kao i testirani agens. Kontrolna grupa životinja je tretirana na isti način rastvaračem ispitivanih supstanci (2% DMSO u PBS). Rast tumora je praćen svakodnevno, a miševi su žrtvovani 22. dana nakon indukcije tumora. Tumori su izvađeni i izmereni u tri dimenzije pomoću kalipera. Njihov volumen je izračunat po obrascu: $a \times b^2 \times 0,52$, gde je a najduži, a b najkraći izmereni dijametar.

3.5.12. Određivanje parametara toksičnosti u urinu semikvantitativnom metodom

Na dan žrtvovanja životinja sakupljeni su uzorci urina. Biohemijska i hematološka analiza urina (leukociti, nitriti, urobilinogen, proteini, pH, eritrociti, specifična gustina, ketoni, bilirubin i glukoza) izvršena je Multistix 10 SG trakama za analizu urina (Bayer, Leverkusen, Nemačka), nakapavanjem uzoraka na tračice i poređenjem sa referentnim vrednostima.

3.5.13. Analiza fenotipa i fagocitnog kapaciteta makrofaga životinja tretiranih agensom tubugi 1

3.5.13.1. Analiza fagocitoze *ex vivo*

Na dan žrtvovanja životinja, iz miševa su sakupljene ćelije peritonealnog ispirka i uzorci kolekcionirani. Broj ćelija peritonealnog ispirka je podešen na 5×10^5 po uzorku. Fluorescentne polistirenske kuglice su opsonizovane u 50% rastvoru FBS u PBS tokom 1 h na 37°C. Kako bi se testirao kapacitet makrofaga za fagocitozu, rastvor fluorescentnih kuglica je dodat u ćelijsku suspenziju. Nakon 1 h kultivacije na 37°C ćelije su isprane. Kako bi se eliminisao signal poreklom od kuglica na površini ćelija, dodat je rastvor tripan plavo boje u trajanju dva minuta. Zelena fluorescenca je očitana na Chameleon fluorimetru (Hidex).

3.5.13.2. Analiza citotoksičnog potencijala makrofaga *ex vivo*

Ćelije peritonealnog ispirka poreklom iz tretiranih miševa (1×10^6 po uzorku) su posađene u sterilne ploče sa šest bunarića. Zatim je na adherirane ćelije po bunariću dodato 2×10^5 B16 ćelija prethodno obeleženih CFSE bojom. Ko-kultivacija je trajala 48 h na 37°C. Zelena fluorescenca, u direktnoj korelaciji sa brojem B16 ćelija, je očitana na Chameleon fluorimetru (Hidex).

3.5.13.3. Merenje koncentracije nitrita u supernatantima ćelijskih kultura

Ćelije peritonealnog ispirka (1×10^5 po uzorku) su posađene u sterilne ploče sa 96 bunarića i ostavljene 48 h na 37°C kako bi se izmerila količina produkovanog NO. Test po Griess-u daje mogućnost merenja nitrita (NO_2^-) koji predstavljaju primarne i stabilne metabolite NO. Ovaj test se zasniva na reakciji diazotizacije [124]. Naime, u kiselim uslovima sulfanilamid biva konvertovan u diazonijum so u reakciji sa nitritima. Diazonijum so zatim reaguje sa *N*-(1-naftil) etilendiamin dihidrochloridom pri čemu se formira molekul koji može biti spektrofotometrijski kvantifikovan. Određena zapremina supernatanta je inkubirana sa istovetnom zapreminom Griess-ovog reagensa u pločama sa 96 bunarića 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca svakog uzorka je merena na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LKB). Koncentracija nitrita u uzorcima je računata iz standardne krive dobijene merenjem apsorbanci za poznate koncentracije NaNO_2 .

3.5.13.4. Analiza fenotipa makrofaga

Ćelije peritonealnog ispirka (5×10^5 po uzorku) su dvostruko obeležene FITC-konjugovanim mišjim anti-CD40 antitelom i PE-konjugovanim mišjim anti-F4/80 antitelom u rastvoru 1% BSA u PBS tokom 1 h na 4°C. Nakon ispiranja dva puta u 1% rastvoru BSA u PBS, ćelije su resuspendovane u PBS i analizirane korišćenjem FloMax softverskog programa.

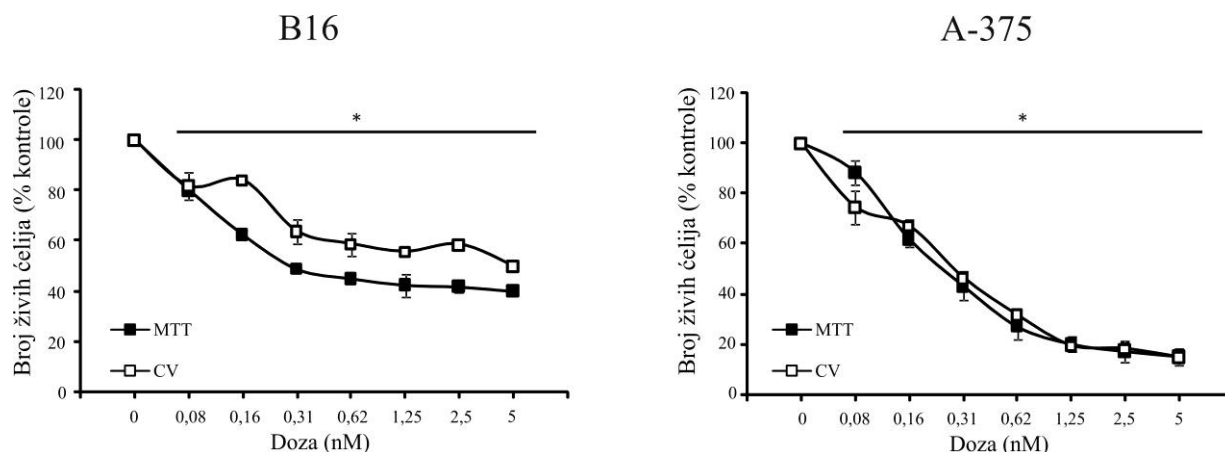
3.5.13. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SV) \pm standardna devijacija (SD) triplikata kultura jednog, reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri izvedena eksperimenta. Za procenu statističke značajnosti korišćen je Studentov t test. Za *in vivo* eksperiment, statistička značajnost rezultata određivana je Mann-Whitney testom. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4. Rezultati

4.1. Tubugi 1 inhibira rast ćelija melanoma *in vitro*, ali ne i rast primarnih ćelija

Kako bi se ispitaio antitumorski potencijal jedinjenja tubugi 1, ćelijske linije melanoma su izložene opsegu koncentracija (0,08–5 nM) pomenute supstance. Nakon 48 h inkubacije, relativni broj živih ćelija je određivan MTT i CV testom. Kao što se može videti sa Slike 13, tubugi 1 je doveo do pada vijabiliteta kod obe ćelijske linije na dozno-zavisan način.



Slika 13. **Tubugi 1 inhibira rast ćelija melanoma *in vitro*.** Procenat živih ćelija melanoma nakon tretmana tubugi 1 u trajanju 48 h, određen MTT i CV testom. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Dobijene koncentracije koje smanjuju rast ćelija melanoma za 50% se nalaze u nanomolarnom opsegu i prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. **IC₅₀ vrednosti* tubugi 1 izračunate iz MTT i CV testova**

| Ćelijska linija | IC ₅₀ (nM) | |
|-----------------|-----------------------|-----------|
| | MTT | CV |
| B16 | 0,4 ± 0,2 | 4,6 ± 0,5 |
| A-375 | 0,2 ± 0,1 | 0,2 ± 0,1 |

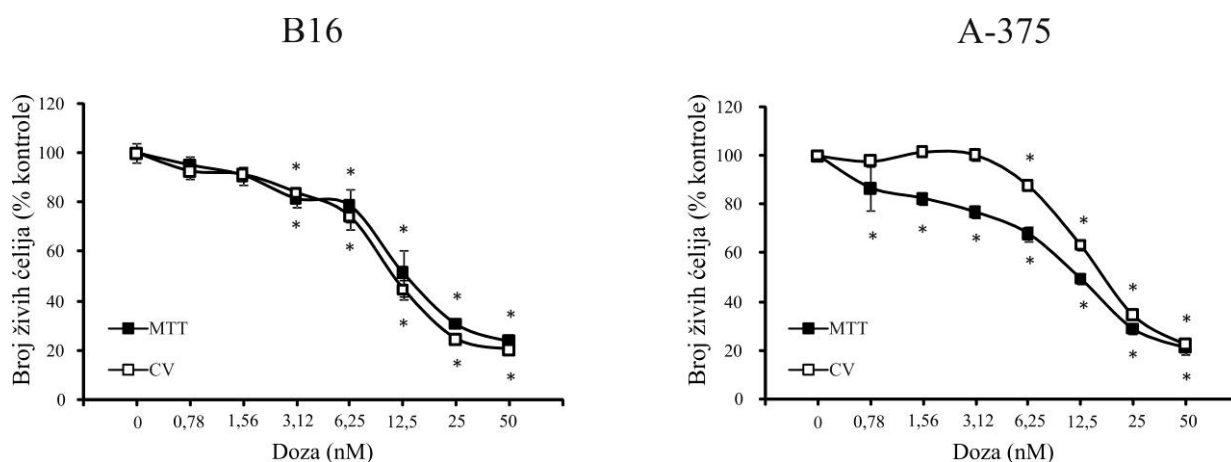
* predstavljaju SV ± SD tri nezavisno izvedena eksperimenta

Analiza rezultata prikazanih u Tabeli 2 ukazala je na neusklađenost vrednosti dobijenih primenjenim testovima za određivanje vijabiliteta B16 ćelija, što nije slučaj kod linije humanog melanoma visoke invazivnosti – A-375. Imajući u vidu činjenicu da klasa jedinjenja tubulizina ostvaruje svoje delovanje utičući na organizaciju mikrotubula, a time i na mitozu [125], rezultati za tubugi 1 dobijeni CV testom, zasnovani na vezivanju boje za DNK, moraju se uzeti sa rezervom. Dalje, koncentracije jedinjenja tubugi 1 dobijene MTT testom neophodne za inhibiciju rasta od 50%, kako B16 tako i A-375 ćelija, odgovarale su vrednostima za koje je pokazano na nivou

svetlosne mikroskopije da redukuju za oko 50% broj živih ćelija. Iz tog razloga podaci dobijeni ovim testom uzeti su za relevantne i korišćeni u narednim eksperimentima.

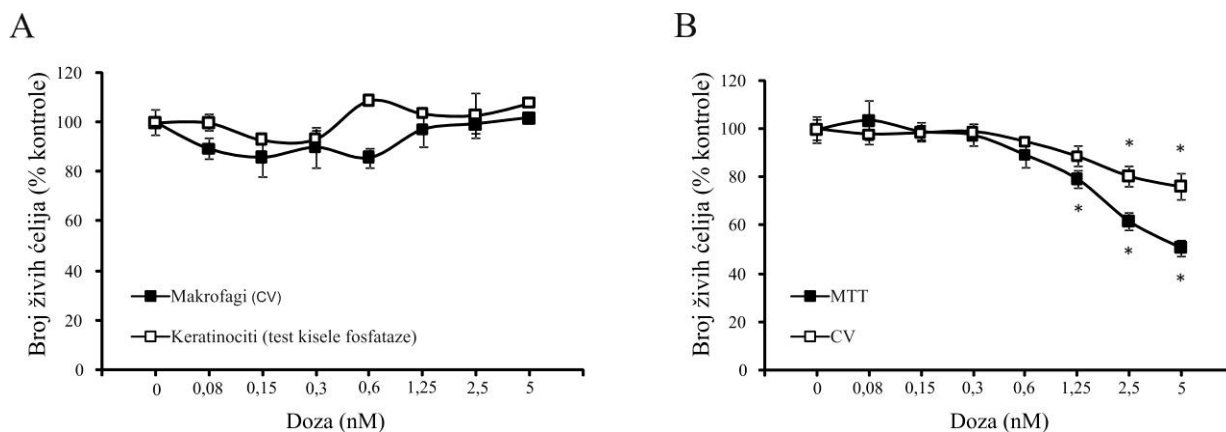
Iz svega navedenog se može zaključiti da tubugi 1 na dozno-zavisan način inhibira rast ćelija melanoma *in vitro*, kao i da su ove ćelijske linije podjednako osetljive na ispitivani agens, bez obzira na njihovo različito poreklo i različit stepen invazivnosti.

Paralelno je, radi poređenja aktivnosti testiranog jedinjenja sa konvencionalnim terapeutcima, ispitana osetljivost obe ćelijske linije na PCT. U tu svrhu, ćelije melanoma su tretirane opsegom različitih doza PCT (0,75–50 nM). Nakon 48 h, vijabilitet ćelija je određen MTT i CV testom. Rezultati su pokazali da su IC_{50} doze PCT na obe ćelijske linije značajno veće u poređenju sa odgovarajućim vrednostima za tubugi 1 (Slika 14), ukazujući na to da tubugi 1 ima veći citotoksični potencijal.



Slika 14. Tubugi 1 poseduje veću citotoksičnu aktivnost u odnosu na PCT. Procenat živih ćelija melanoma nakon tretmana PCT u trajanju 48 h, određen MTT i CV testom. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Dobijeni rezultati su ukazali na visoku citotoksičnu aktivnost jedinjenja tubugi 1 na linijama melanoma, što je, dalje, nametnulo potrebu za proverom njegove toksičnosti na primarnim ćelijama. U tu svrhu su izolovani makrofagi iz peritonealnog eksudata, kao i keratinociti iz uha miša, koji su tretirani istim rasponom doza ovog agensa. Paralelno, praćen je i uticaj supstance na transformisanoj, nemalignoj liniji mišjih NIH 3T3 fibroblasta. Nakon 48 h, vijabilitet makrofaga je utvrđen CV testom, s obzirom da je reč o kulturi koja je adherentna, dok je u slučaju mišjih keratinocita korišćen test kisele fosfataze pogodan za neadherentne kulture. Broj ćelija NIH 3T3 fibroblasta je određivan MTT i CV testovima. Dobijeni rezultati su pokazali da tubugi 1 pri korišćenim dozama ne dovodi do smanjenja broja makrofaga i keratinocita, kao i da je značajno manje toksičan po liniju primarnih fibroblasta (Slika 15), u poređenju sa ćelijama melanoma. Naime, IC_{50} vrednost za NIH 3T3 fibroblaste je oko 20 puta veća u odnosu na IC_{50} za ćelije melanoma.



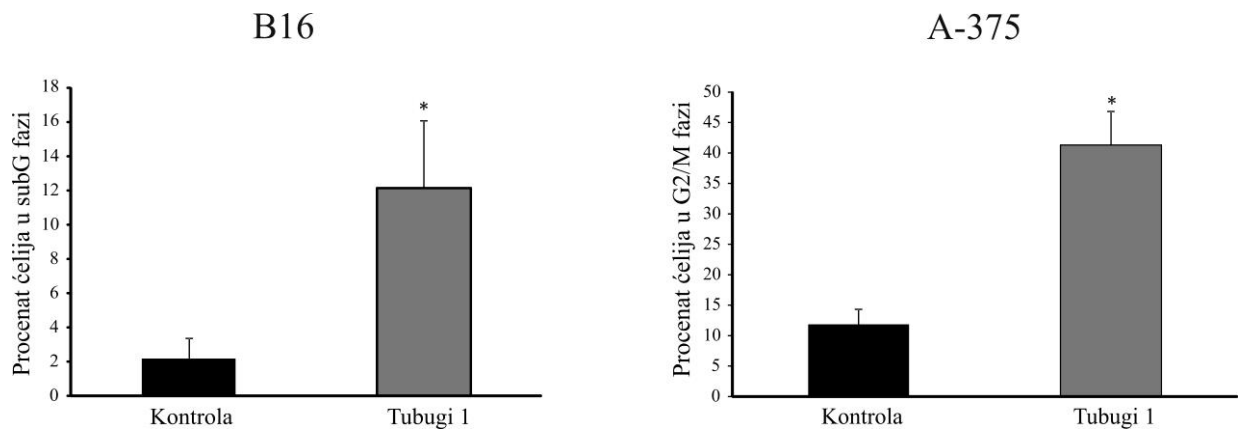
Slika 15. **Tubugi 1 u značajno manjoj meri inhibira rast primarnih ćelija.** Procenat živih A) primarnih i B) NIH 3T3 ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, određen specifičnim testovima vijabiliteta za adherentne i neadherentne kulture. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Iz opisanog eksperimenta se može zaključiti da postoji izražena selektivnost eksperimentalnog jedinjenja za maligni fenotip, pošto tubugi 1 pri primenjenom opsegu doza značajno smanjuje vijabilitet ćelijskih linija melanoma, ali ne i primarnih ćelija.

4.2. Tubugi 1 utiče na proliferaciju i remeti distribuciju ćelija melanoma po fazama ćelijskog ciklusa

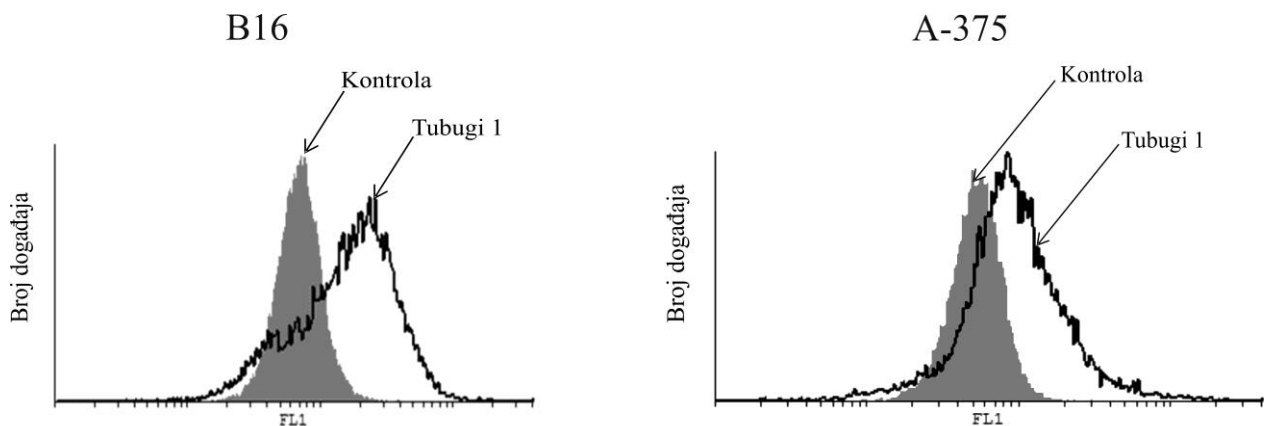
Kako pokazano smanjenje broja živih ćelija melanoma može biti posledica zaustavljanja ćelija u deobi i/ili umiranja u prisustvu navedene supstance, dalji tok istraživanja je usmeren ka rasvetljavanju mehanizma njegovog delovanja. Sa tim u vezi, urađena je analiza distribucije ćelija po različitim fazama ćelijskog ciklusa. Ćelije melanoma su izložene IC_{50} dozi agensa tubugi 1 tokom 48 h, a zatim obojene PI i analizirane metodom protočne citofluorimetrije. Tubugi 1 je kod B16 linije doveo do povećanja procenta ćelija u subG1/G0 fazi u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 16). S obzirom da ćelije u subG1/G0 fazi poseduju fragmentisanu DNK, može se zaključiti da eksperimentalni agens ima pretežno citocidni efekat na B16 liniju. U slučaju A-375 linije, uočena je akumulacija ćelija u G2/M fazi ciklusa u prisustvu ovog jedinjenja (Slika 16), što implicira citostatski efekat pomenutog agensa.

Uprkos istoj senzitivnosti ispitivanih linija, ovakva raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ukazuje na ćelijsku specifičnost u odgovoru na ispitivani agens.



Slika 16. **Tubugi 1 menja distribuciju ćelija melanoma po fazama ćelijskog ciklusa.** Procentat ćelija melanoma u fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1u trajanju 48 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Paralelno, vršeno je ispitivanje uticaja agensa tubugi 1 na proliferativni potencijal linija melanoma. Ćelije melanoma su obojene CFSE bojom i izložene IC₅₀ dozi eksperimentalnog agensa. Posle inkubacije u trajanju 72 h, ćelije su analizirane na protočnom citofluorimetru. Na Slici 17 se vidi da tubugi 1 umanjuje procenat podeljenih ćelija u odnosu na kulturu netretiranih ćelija kod obe linije.



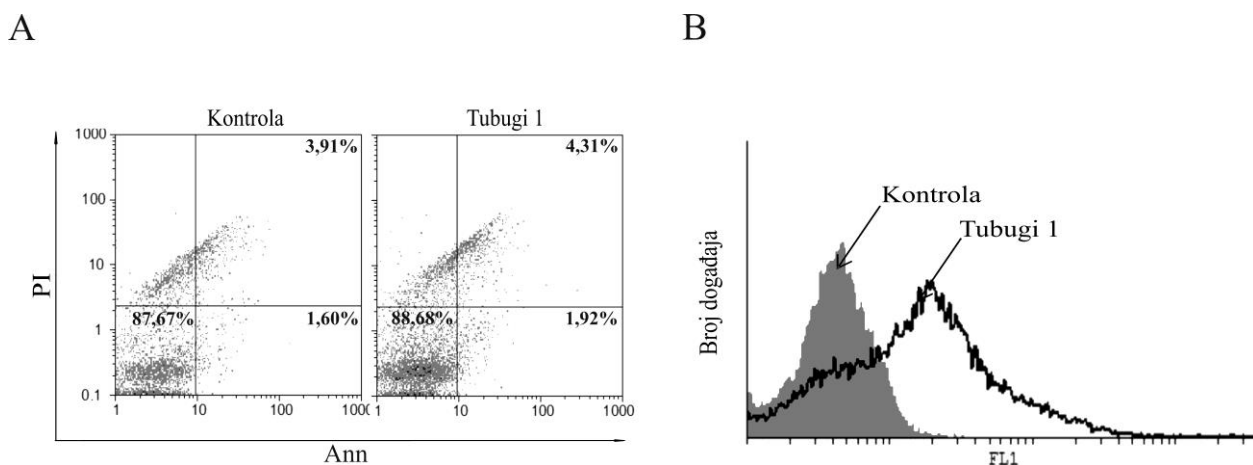
Slika 17. **Tubugi 1 inhibira proliferaciju ćelija melanoma.** Intenzitet fluorescence ćelija melanoma obojenih CFSE bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 72 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

Efekat sintetskog tubulizina u inhibiciji proliferacije nešto je izraženiji kod B16 ćelijske linije, što je očekivano s obzirom na oblik krive vijabiliteta i postignut plato pri koncentracijama većim od 0,3 nM (Slika 13). Zajedno sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa, opisani rezultat ukazuje da je indukcija ćelijske smrti, združena sa gubitkom deobnog potencijala preživele subpopulacije B16 ćelija, u osnovi antitumorskog delovanja opisanog agensa. U slučaju humanog melanoma, prikazani rezultati ukazuju na dominantan citostatski uticaj sintetskog tubulizina.

4.3. Tubugi 1 indukuje atipičnu apoptozu B16 ćelija zavisnu od aktivacije kaspaza

Prethodno dobijeni rezultati ukazali su na inhibiciju ćelijske proliferacije kao odgovor B16 ćelija na prisustvo jedinjenja tubugi 1, ali i na indukciju ćelijske smrti sudeći po subG1/G0 populaciji ćelija sa fragmentisanim genetičkim materijalom. Kako je fragmentacija DNK molekula prevashodno odlika apoptoze, dalje je ispitivan doprinos ovog tipa ćelijske smrti smanjenju broja B16 ćelija nakon tretmana navedenim jedinjenjem. U tu svrhu, B16 ćelije su tretirane IC_{50} dozom sintetskog analoga tubulizina u trajanju 48 h, a zatim dvostruko obojene FITC-Ann V/PI (Ann/PI) i analizirane na nivou protočne citofluorimetrije. Kao što je prikazano na Slici 18A, u poređenju sa kontrolnim ćelijama, pod tretmanom ne dolazi do značajnog povećanja procenta ćelija koje označavamo kao rano (Ann^+/PI^-) i kasno apoptotske/nekrotične (Ann^+/PI^+).

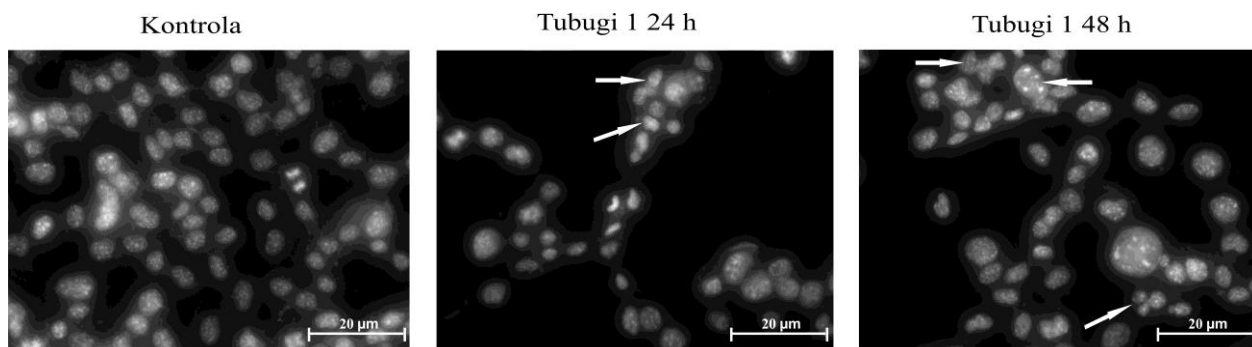
Sa ciljem da se ispita uloga kaspaza u realizaciji apoptotskog procesa, B16 ćelije su izložene citotoksičnoj dozi jedinjenja tubugi 1 (IC_{50} doza) tokom 48 h, a zatim obojene FITC-konjugovanim pan-kaspaznim inhibitorom (ApoStat) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati ove analize su pokazali da se pod navedenim tretmanom, u poređenju sa kontrolom, značajno povećava procenat ćelija sa aktiviranim kaspazama (Slika 18B).



Slika 18. Tubugi 1 ne povećava zastupljenost Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ B16 ćelija, ali aktivira kaspaze.

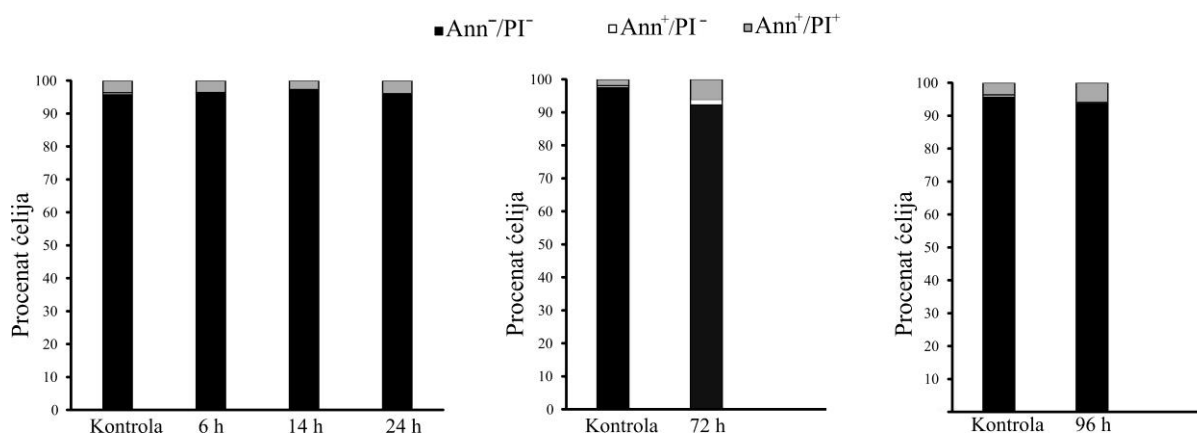
A) Procenat Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ B16 ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. B) Intenzitet fluorescencije B16 ćelija obojenih ApoStat bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

Kako rezultati dvostrukog bojenja Ann/PI, dobijeni metodom protočne citofluorimetrije nisu bili u saglasnosti sa pokazanom aktivacijom kaspaza, ali ni sa podacima koji su ukazali na jasno prisustvo ćelija sa fragmentisanom DNK u kulturi tretiranoj jedinjenjem tubugi 1, izvršena je mikroskopska analiza prisustva apoptoze na osnovu morfoloških karakteristika jedara. Ćelije su tretirane IC_{50} dozom eksperimentalnog agensa u trajanju 48 h, obojene DAPI bojom i posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom u dve vremenske tačke. Kao što se vidi na Slici 19, u kulturi tretiranih B16 ćelija jasno se uočavaju ćelije sa tipičnim morfološkim odlikama apoptoze kao što su kondenzacija hromatina i formiranje apoptotskih tela.



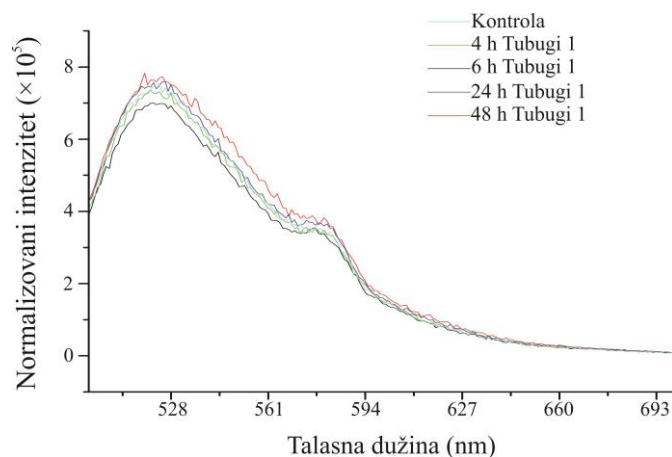
Slika 19. **Tubugi 1 indukuje morfološki prepoznatljivu apoptozu B16 ćelija.** Morfološke odlike jedara tipične za apoptozu (bele strelice) u kulturi B16 ćelija obojenih DAPI bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, na nivou fluorescentne mikroskopije. Orig. uveličanje 400 ×

Ovim je nedvosmisleno pokazano da tubugi 1 indukuje apoptozu ćelija mišjeg melanoma, što je ukazalo na potrebu za revidiranjem rezultata dobijenih dvostrukim bojenjem Ann/PI. Da bi se proverilo da li je odsustvo Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ ćelija posledica manjkavosti metode ili pak eksperimentalnog dizajna, analizirano je njihovo prisustvo nakon tretmana eksperimentalnom supstancom (IC_{50} doza), tokom kraćih ili dužih perioda inkubacije u odnosu na prethodno evaluiranih 48 h. Rezultati su pokazali da se dužina tretmana ćelija eksperimentalnim agensom nije odrazila na zastupljenost tj. odsustvo Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ ćelija (Slika 20).



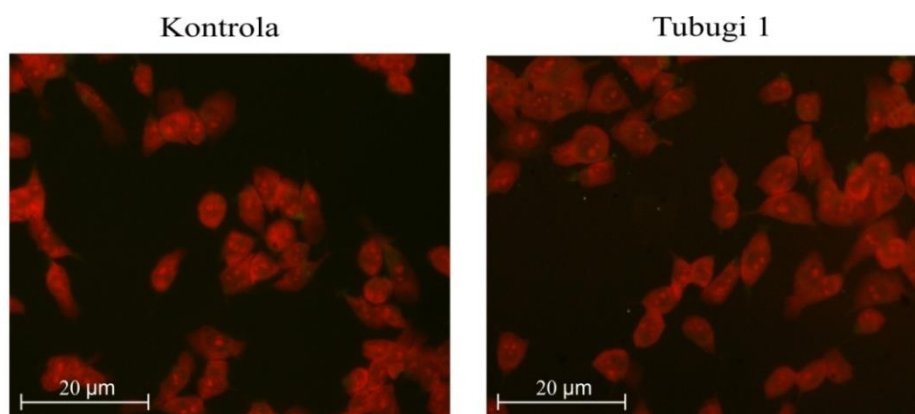
Slika 20. **Tubugi 1 ne potencira prisustvo Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ ćelija tokom tretmana B16 ćelijske linije u trajanju 96h.** Procenat Ann^+/PI^- i Ann^+/PI^+ B16 ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 6, 14, 24, 72 i 96 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

Takođe, izvršena je detekcija ovog fenomena senzitivnijom metodom – fluorescentnom spektroskopijom. Rezultati su pokazali da nakon izlaganja ćelija supstanci (IC_{50} doza) u trajanju od 48 h nije došlo do povećanja broja ćelija pozitivnih na aneksin (Ann^+) (Slika 21).



Slika 21. Metoda fluorescentne spektroskopije potvrđuje odsustvo povećanja broja Ann⁺ ćelija pod tretmanom tubugi 1 kod B16 ćelijske linije. Intenzitet fluorescence B16 ćelija obojenih FITC-Ann V nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 4, 6, 24 i 48 h, određen metodom fluorescentne spektroskopije

Inverzija PS je dodatno proverena i na nivou fluorescentne mikroskopije. B16 ćelije su tretirane jedinjenjem tubugi 1 (IC₅₀ doza) tokom 48 h, obojene FITC-Ann V, a zatim fiksirane, permeabilizovane i obojene PI. Odsustvo opisanog fenomena je potvrđeno i ovim putem (Slika 22).



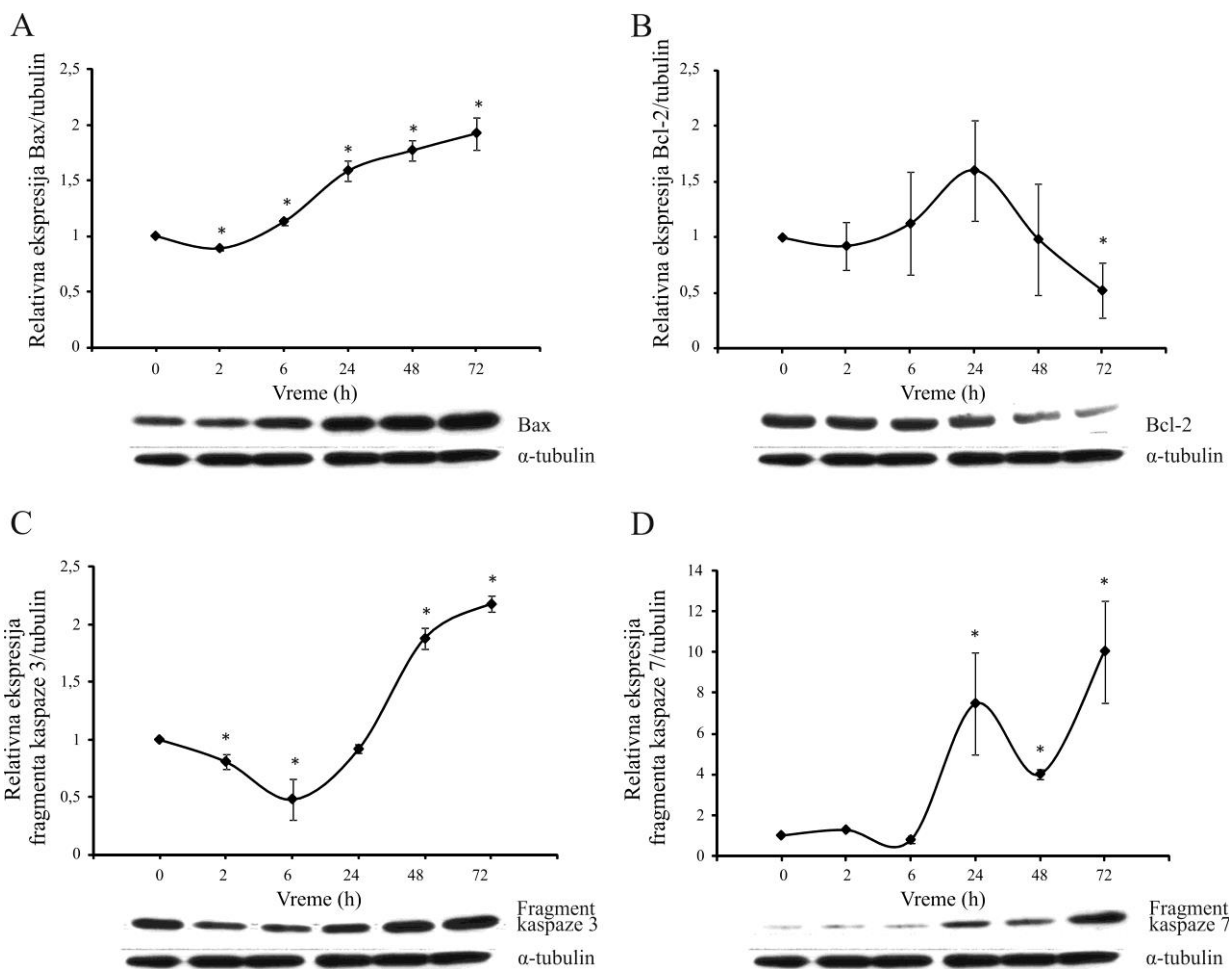
Slika 22. Metoda fluorescentne mikroskopije potvrđuje odsustvo Ann⁺ ćelija pod tretmanom tubugi 1 kod B16 ćelijske linije. Mikroskopska analiza inverzije PS na B16 ćelijama obojenim FITC-Ann V nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h. Orig. uveličanje 400 ×

Iako se detekcija Ann⁺ ćelija u literaturi eksplicitno izjednačava sa apoptozom, iz prethodno opisanih rezultata naše studije se može zaključiti da njihovo odsustvo nije odraz izostanka apoptoze, već verovatno pokretanja atipične forme ove ćelijske smrti pod uticajem eksperimentalnog agensa, u kojoj je izostao fenomen inverzije PS. Činjenica da se putem eksternalizacije PS odigrava niz fizioloških procesa koji se reflektuju na stanje u tumorskoj mikrosredini, uključujući aktivnosti ćelija imunskog sistema, ukazuje na značaj temeljne evaluacije istog.

4.4. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za proces apoptoze kod B16 ćelijske linije

Nakon što je pokazano da tubugi 1 indukuje apoptozu B16 ćelija, istraživanje je dalje fokusirano na analizu ekspresije proteina uključenih u inicijaciju i realizaciju procesa apoptoze. B16 ćelije su tretirane IC_{50} dozom eksperimentalnog terapeutika u trajanju 2, 6, 24, 48 i 72 h, a zatim je imunoblot metodom ispitana ekspresija proteina relevantnih za ovaj proces (Slika 23). Analiza ekspresije Bax proteina, odgovornog za formiranje pora na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani [126], ukazala je na kontinuirano povećanje njegove ekspresije kod ćelija mišjeg melanoma tretiranih ovim agensom (Slika 23A). Paralelno, ispitivana je promena u ekspresiji Bcl-2 proteina koji funkcioniše kao čuvar mitohondrijalne membrane, s obzirom na funkciju u inhibiciji aktivnosti Bax proteina [127]. Rezultati su ukazali da, posle vremenski ograničenog povećanja ekspresije Bcl-2 molekula, sledi faza inhibicije (Slika 23B), što doprinosi visokom odnosu Bax/Bcl-2, koji je ključan za pokretanje apoptoze. Takođe, detektovano je povećanje ekspresije aktiviranih egzekutorskih kaspaza 3 i 7 (Slika 23C i D), što odgovara rezultatima analize ukupne aktivnosti kaspaza dobijenim metodom protočne citofluorimetrije.

Gore navedeni rezultati potvrdili su na molekularnom nivou da tubugi 1 stimuliše unutrašnji mitohondrijalni put indukcije apoptoze B16 ćelija.

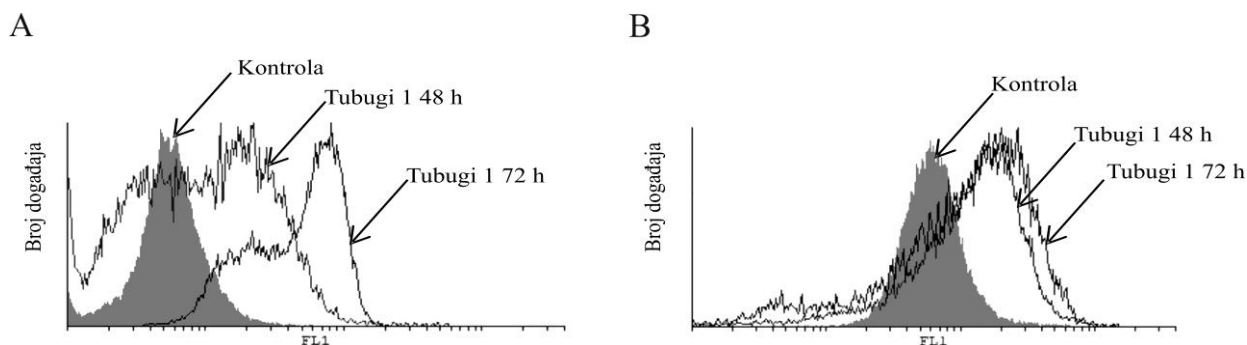


Slika 23. **Tubugi 1** menja ekspresiju proteina relevantnih za proces apoptoze kod B16 ćelijske linije. Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije A) Bax, B) Bcl-2, C) aktivirane kaspaze 3 i D) aktivirane kaspaze 7 sa imunoblotom. Ekspresija proteina ispitana je u navedenim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

4.5. Tubugi 1 indukuje oksidativni stres kod B16 ćelijske linije

Kako bi se utvrdilo da li oksidativni stres posreduje u apoptozi indukovanoj tretmanom, izvršena je kvantifikacija unutarćelijskog NO, kao i ROS/RNS. U cilju merenja NO, B16 ćelije su tretirane eksperimentalnim agensom u trajanju od 48 i 72 h, a zatim bojene DAF-FM acetatom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Posle 48 h tretmana, u kulturi B16 ćelija je evidentan porast nivoa NO, da bi se još intenzivnija produkcija uočila tokom 72 h inkubacije (Slika 24A).

Kako bi se detektovala i kvantifikovala produkcija ROS/RNS, B16 ćelije su obojene DHR bojom, pa izložene ispitivanom agensu tokom 48 i 72 h. Sa Slike 24B se može videti da tubugi 1 pokreće produkciju ROS/RNS.



Slika 24. **Tubugi 1 indukuje produkciju NO i ROS/RNS kod B16 ćelijske linije.** Intenzitet fluorescence B16 ćelija obojenih A) DAF-FM acetatom i B) DHR nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 72 h, analiziran metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

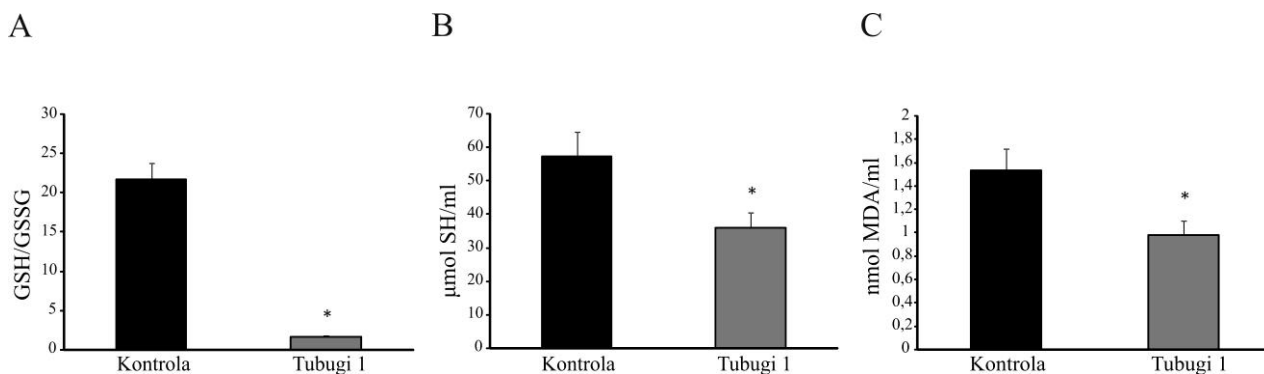
Dobijeni rezultati ukazuju da bi produkcija slobodnih radikala koja je pokrenuta u B16 kulturi u odgovoru na prisustvo jedinjenja tubugi 1, mogla biti dovedena u vezu sa kaskadom događaja u apoptotskom putu ćelijske smrti.

U cilju utvrđivanja stepena oksidativnog stresa u ćeliji, dalje se pristupilo određivanju količine GSH i –SH grupa, kao i intenziteta lipidne peroksidacije. B16 ćelije su tretirane IC_{50} dozom eksperimentalnog terapeutika u trajanju 48 h, a zatim lizirane. Rezultati merenja odnosa GSH/GSSG prikazani su na Slici 25A. Eksperimentalni agens je značajno snizio nivo GSH u poređenju sa istim kod ćelija gajenih u odsustvu tubugi 1. To ukazuje na stimulaciju antioksidativnog odgovora u cilju očuvanja redoks homeostaze.

Kako –SH grupe predstavljaju najčešća mesta interakcije proteina i slobodnih radikala, i izrazito su osetljive na proces oksidacije, dalje je analizirana njihova koncentracija u ćeliji. U ćelijama koje su bile izložene tretmanu tubugi 1, primetan je pad u ukupnom sadržaju –SH grupa u odnosu na kontrolne ćelije (Slika 25B). Navedeni rezultat ukazuje na smanjenje unutarćelijskog nivoa –SH grupa usled intenzivnog oksidativnog oštećenja ovih molekula.

Da bi se utvrdilo da li usled delovanja slobodnih radikala dolazi do oksidacije polinezasićenih masnih kiselina prisutnih u ćelijskoj membrani, meren je intenzitet peroksidacije lipida. Kao parametra za određivanje stepena oksidacije membranskih lipida, izvršena je kvantifikacija MDA koji predstavlja finalni proizvod peroksidacije u ćeliji [128]. Koncentracija MDA u supernatantima tretiranih ćelija je bila značajno niža u poređenju sa kontrolnim uzorcima, ukazujući na izostanak oksidacije lipida (Slika 25C).

Iz svega navedenog se može zaključiti da uprkos intenzivnoj produkciji reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta i sledstvenoj iscrpljenosti unutarćelijskih depoa glutaciona i –SH grupa u odgovoru na tubugi 1, lipidi membrane su, sudeći po količini MDA, isključeni iz kaskade oksidacionih reakcija u ćeliji.

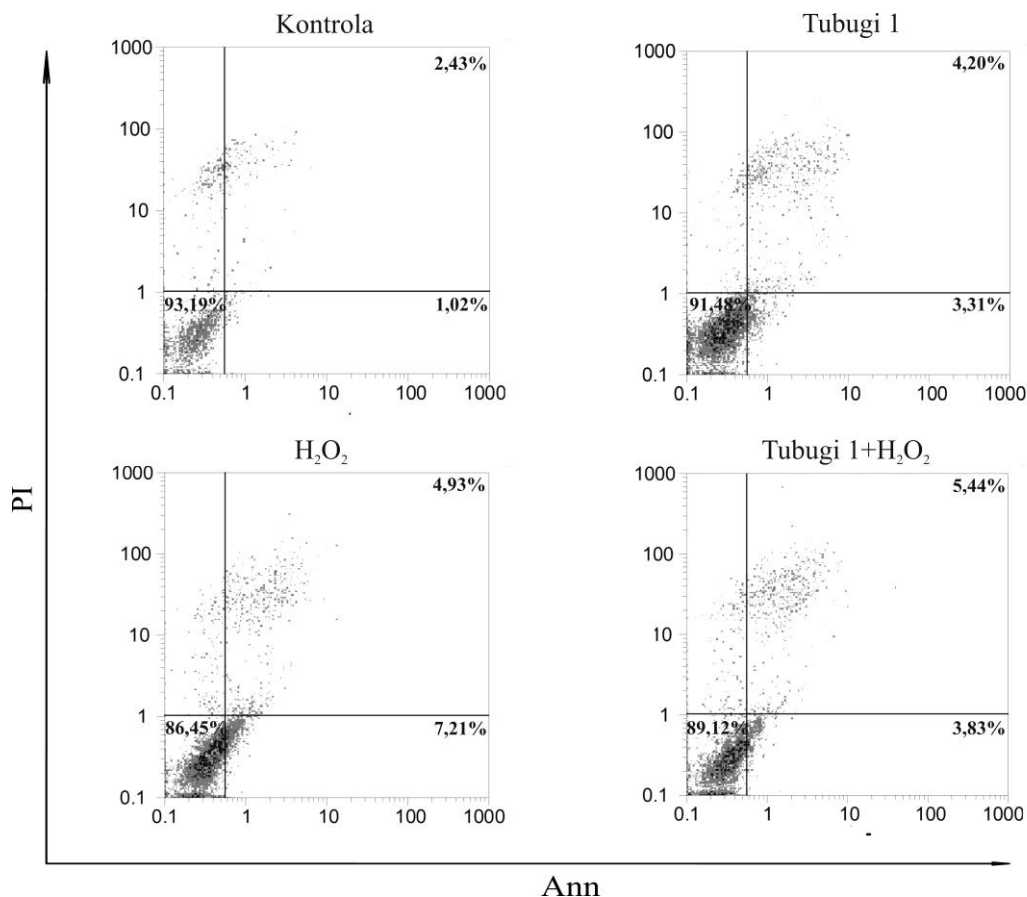


Slika 25. Tubugi 1 indukuje depleciju GSH i oksidaciju –SH grupa, ali ne i oksidaciju lipida membrane kod B16 ćelijske linije. A) Odnos GSH/GSSG, koncentracija B) –SH grupa i C) MDA kod B16 ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h. Rezultati predstavljaju SV \pm SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

4.6. Tubugi 1 sprečava eksternalizaciju PS kroz prevenciju peroksidacije lipida

Literaturni podaci ukazuju da translokaciji PS sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane prethodi njegova oksidacija [129]. Shodno tome, dobijeni rezultati merenja količine MDA koji su ukazali na statistički značajno smanjenu peroksidaciju membranskih fosfolipida dovode se u vezu sa sprečavanjem inverzije PS pod ispitivanim tretmanom. Kako bi se potvrdila ova relacija, korišćen je H_2O_2 sa ciljem izazivanja oksidacije membranskih lipida, a procenat ćelija sa eksternalizovanim PS kvantifikovan je dvostrukim bojenjem Ann/PI. U tu svrhu, B16 ćelije su izložene kratkotrajnom delovanju H_2O_2 i jedinjenja tubugi 1 (IC_{50} doza) u trajanju od 2h, pojedinačno ili u kombinaciji. Ćelije su zatim obojene Ann/PI, pa analizirane na protočnom citofluorimetru. U kulturi ćelija izloženoj H_2O_2 primetan je porast u procentu Ann⁺ ćelija. Suprotno, tretman ćelija agensom tubugi 1 je neznatno uticao na broj ćelija sa eksternalizovanim PS, dok je njegova primena istovremeno sa H_2O_2 redukovala procenat Ann⁺ ćelija za otprilike 50% (Slika 26), ukazujući da ovaj eksperimentalni agens bar delimično štiti ćelije od lipidne peroksidacije.

Uzimajući navedeno u obzir, može se zaključiti da tubugi 1, uprkos tome što indukuje snažan oksidativan stres i vodi apoptozi B16 ćelija, sprečava peroksidaciju lipida, što finalno sprečava eksternalizaciju PS u membrani apoptotske ćelije.

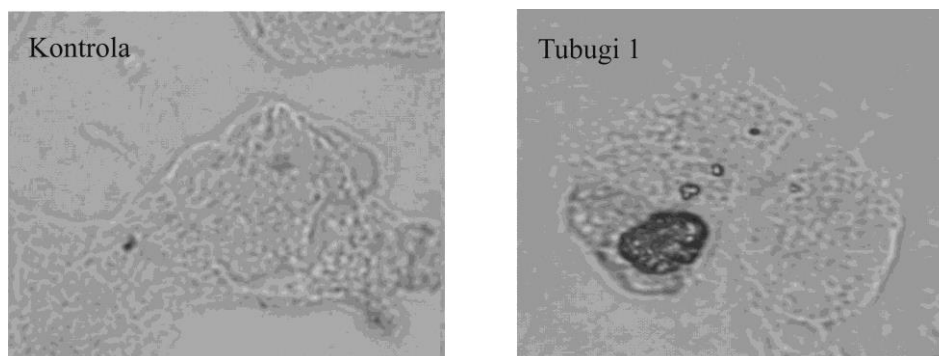


Slika 26. **Tubugi 1 sprečava eksternalizaciju fosfatidilserina putem prevencije oksidacije lipida kod B16 ćelijske linije.** Procenat B16 Ann⁺/PI⁻ i Ann⁺/PI⁺ ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1, pojedinačno ili u kombinaciji sa H₂O₂ u trajanju 2 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. H₂O₂ u finalnoj koncentraciji od 25 μM je dodavan svakih 30 minuta. U slučaju kombinovanog tretmana, tubugi 1 je dodavan 15 minuta pre H₂O₂. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

4.7. Tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu apoptotskih ćelija

Eksternalizacija PS na ćelijskoj membrani apoptotskih ćelija predstavlja signal za specifične receptore makrofaga koji omogućava uspešno prepoznavanje ovih ćelija i njihovo uklanjanje iz tkiva. Kako bi se odsustvo PS na spoljašnjoj strani membrane apoptotske ćelije moglo odraziti na proces fagocitoze, a time i na efekte tretmana agensom *in vivo*, dalji eksperimenti su imali za cilj utvrđivanje da li je fagocitoza očuvana u uslovima apoptoze koja nije praćena eksternalizacijom PS. U tu svrhu B16 ćelije su inkubirane sa IC₅₀ dozom agensa tubugi 1 tokom 48 h, a zatim apoptotske ćelije prebrojane i ponuđene primarnim makrofagima. Nakon 3 h ko-kultivacije, internalizacija apoptotskih ćelija je proverena na nivou svetlosne mikroskopije. Mikroskopska analiza je pokazala prisustvo fragmenata apoptotskih ćelija unutar makrofaga nakon tretmana eksperimentalnom supstancom (Slika 27). To implicira uspešno uklanjanje apoptotskih ćelija bez obzira na odsustvo PS na spoljašnjoj strani njihove membrane.

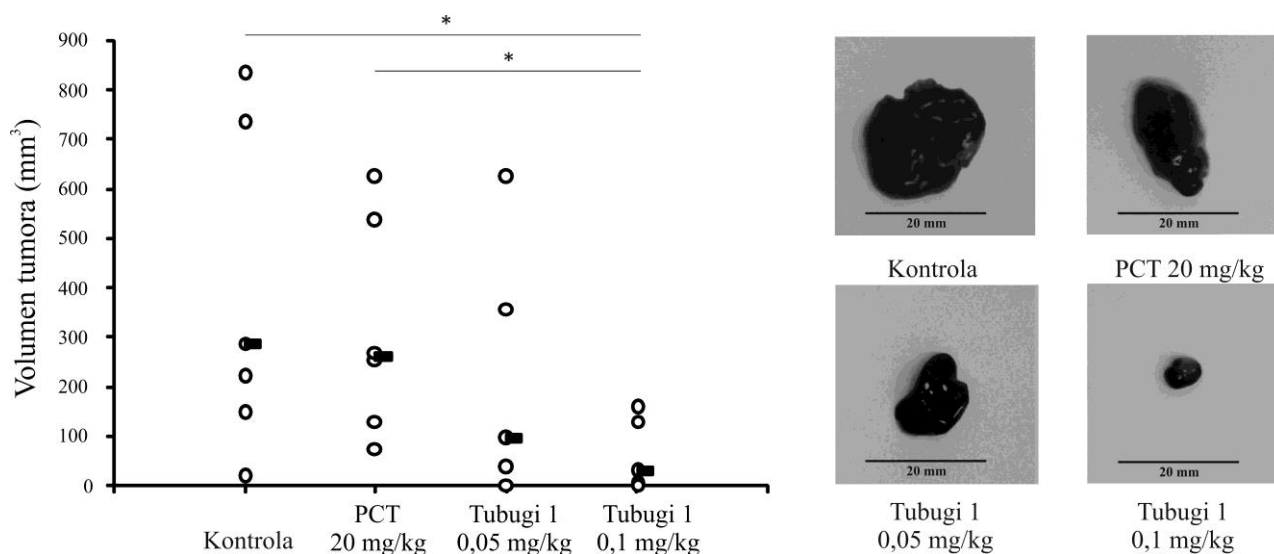
Iz navedenog se može zaključiti da atipična apoptoza indukovana tretmanom tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu apoptotskih ćelija u okruženju.



Slika 27. **Tubugi 1 ne utiče negativno na fagocitozu apoptotskih ćelija.** Mikroskopska analiza internalizacije B16 apoptotskih ćelija od strane primarnih makrofaga. Orig. uveličanje 400 ×

4.8. Tubugi 1 smanjuje rast melanoma *in vivo*

Nakon što je *in vitro* studija pokazala snažan potencijal jedinjenja tubugi 1 u inhibiciji rasta tumora, izvršena je analiza njegove efikasnosti *in vivo* na singenom modelu mišjeg solidnog melanoma. Kao što se vidi na Slici 28, volumen tumora životinja koje su primale ispitivani agens je smanjen u obe doze u odnosu na kontrolnu grupu životinja, ali je statistička značajnost postignuta samo prilikom primene više doze agensa. Takođe, tumori životinja koje su bile tretirane višom dozom eksperimentalnog agensa značajno su manjeg volumena u poređenju sa tumorima životinja koje su primale PCT. Sa druge strane, PCT, primenjen u ovom eksperimentalnom dizajnu u dozi koja se definiše kao terapijska, nije pokazao značajan učinak u redukciji volumena tumora.



Slika 28. **Tubugi 1 suprimira rast melanoma *in vivo*.** Volumeni tumora izmereni 22. dana nakon indukcije tumora kod C57BL/6 miševa (osam životinja po grupi, * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu i grupu tretiranu PCT)

4.9. Tubugi 1 ne pokazuje toksične efekte *in vivo*

Vizuelni znaci toksičnosti (gubitak krzna, promene u ponašanju životinja, povraćanje i dijareja) kao i gubitak telesne mase, nisu uočeni kod životinja koje su primale tubugi 1. Analiza biohemijskih i hematoloških parametara urina životinja (Tabela 3) na dan žrtvovanja ukazala je na povećano prisustvo proteina kod životinja tretiranih jedinjenjem tubugi 1, kao što je to slučaj sa urinom životinja iz grupe tretirane PCT, što može biti znak nefrotoksičnosti. Međutim, proteinurija je fenomen opisan kod zdravih miševa [130], te dobijeni rezultati ne moraju nužno biti pokazatelji narušene funkcije bubrega. Prisustvo leukocita zabeleženo je kod životinja koje su primale PCT, i u nešto manjoj meri kod životinja koje su tretirane nižom dozom jedinjenja tubugi 1, što može biti posledica inflamatornog procesa usled oštećenja bubrega. Nitriti i urobilinogen, kao parametri poremećaja u funkciji bubrega i jetre, primećeni kod životinja koje su primale tubugi 1 i PCT su u okviru referentnih vrednosti [131,132]. Ostali ispitivani parametri, poput pH i specifične gustine, kao i prisutnosti ketona i bilirubina ne razlikuju se značajno od vrednosti kod kontrolne grupe životinja.

Dobijeni rezultati ukazuju da je tubugi 1 efikasan u supresiji rasta melanoma *in vivo* uz minimalnu toksičnost.

Tabela 3. Biohemijski i hematološki parametri urina C57BL/6 miševa nakon tretmana PCT, tubugi 1 0,05 mg/kg i tubugi 1 0,1 mg/kg

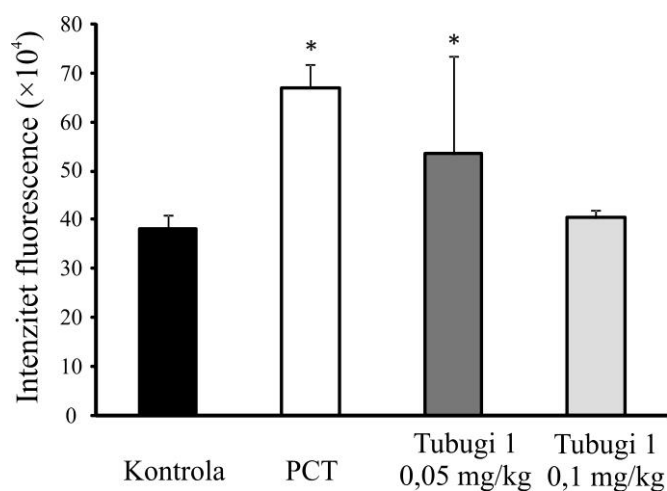
| | Kontrola | PCT | Tubugi 1 0,05 mg/kg | Tubugi 1 0,1 mg/kg |
|--------------------------|--------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Leukociti (leu/ μ l) | 0 | 46,7 \pm 40,4 | 15 \pm 0 | 0 |
| Nitriti | 0 | 1 \pm 0 | 0,7 \pm 0,6 | 1 \pm 0 |
| Urobilinogen (mg/dl) | 0 | 0,2 \pm 0 | 0,2 \pm 0 | 0,2 \pm 0 |
| Proteini (mg/dl) | 30 \pm 0 | 43,3 \pm 51,3 | 45 \pm 40,4 | 47,5 \pm 35 |
| pH | 6 \pm 0 | 5,3 \pm 0,6 | 5,8 \pm 0,5 | 6 \pm 0 |
| Krv (eri/ μ l) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Specifična gustina | 1030 \pm 0 | 1030 \pm 0 | 1029 \pm 2,5 | 1029 \pm 2,5 |
| Ketoni (mg/dl) | 5 \pm 0 | 3,3 \pm 2,9 | 3,8 \pm 2,5 | 1,3 \pm 2,5 |
| Bilirubin (mg/dl) | 4 \pm 0 | 4 \pm 0 | 4 \pm 0 | 3,3 \pm 1,2 |

Rezultati predstavljaju SV \pm SD

4.10. Tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu, promoviše citotoksični potencijal makrofaga i njihovu polarizaciju ka M1 fenotipu *ex vivo*

4.10.1. Tubugi 1 ne inhibira fagocitnu aktivnost makrofaga

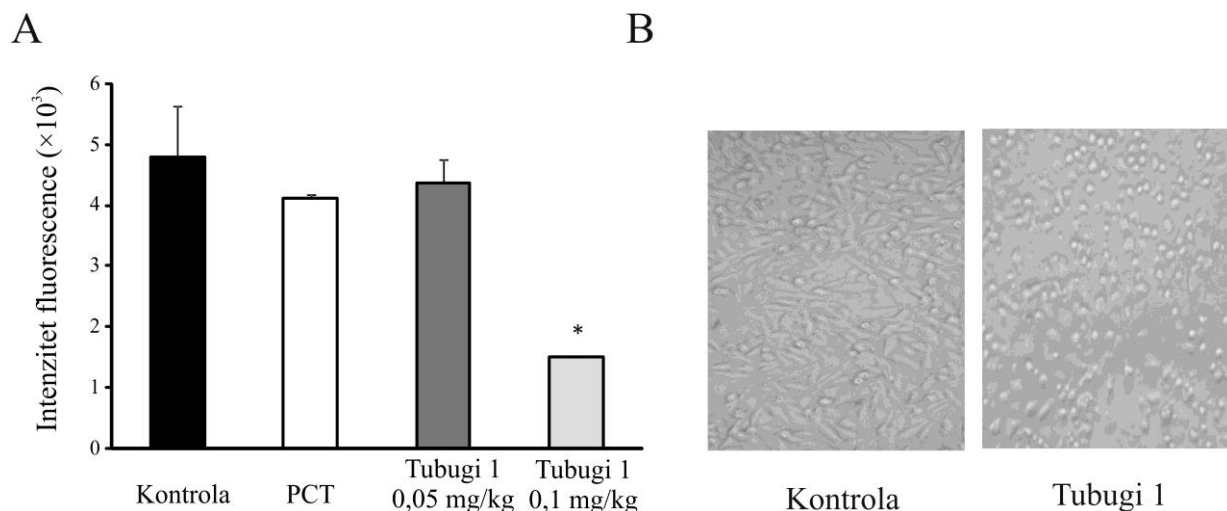
Kako bi se ispitaio uticaj tretmana na efikasnost urođenog imunskog odgovora protiv tumora, u momentu žrtvovanja životinja izolovane su ćelije peritonealnog eksudata, a fenotip i citotoksična aktivnost dobijene populacije makrofaga analizirane nizom testova. S obzirom da je pokazano da je fagocitoza *in vitro* očuvana bez obzira na nedostatak PS na površini apoptotske ćelije, od prioriteta je bilo proveriti fagocitnu sposobnost makrofaga poreklom iz životinja koje su primale tubugi 1. Sa tom namerom, makrofagi su inkubirani sa fluorescentnim kuglicama opsonizovanim FBS. Po isteku 1 h inkubacije, internalizacija kuglica proverena je fluorimetrijski. Makrofagi izolovani iz grupa životinja koje su primale PCT i tubugi 1 su pokazali veće preuzimanje fluorescentnih kuglica u odnosu na makrofage poreklom iz kontrolne grupe životinja, što ukazuje na njihovu očuvanu fagocitnu aktivnost (Slika 29).



Slika 29. **Tubugi 1 ne utiče negativno na fagocitnu aktivnost makrofaga *ex vivo*.** Intenzitet fluorescence ćelija peritonealnog eksudata nakon kultivacije sa kuglicama opsonizovanim sa FBS, određen fluorimetrom. Rezultati predstavljaju $SV \pm SV$. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

4.10.2. Tubugi 1 promoviše citotoksični potencijal makrofaga

Zatim se pristupilo ispitivanju citotoksičnog potencijala makrofaga poreklom iz tretiranih životinja. CFSE-obeležene B16 ćelije su ko-kultivisane sa makrofagima iz eksperimentalnih životinja, a intenzitet fluorescence koja odgovara broju B16 ćelija, izmeren fluorimetrijski. Niža doza (0,05 mg/kg) jedinjenja tubugi 1 i PCT u toksičnoj dozi nisu značajno uticali na citotoksičnu aktivnost makrofaga. Međutim, broj B16 ćelija koje su inkubirane sa makrofagima poreklom iz životinja koje su primale višu dozu jedinjenja tubugi 1 (0,1 mg/kg) je dramatično redukovano (Slika 30A). Mikroskopska analiza je pokazala da, za razliku od kontrole gde su u ko-kulturi makrofagi u potpunosti prekriveni populacijom B16 ćelija, kod tretmana višom dozom tubugi 1 predominantnu populaciju ćelija čine upravo makrofagi (Slika 30B).



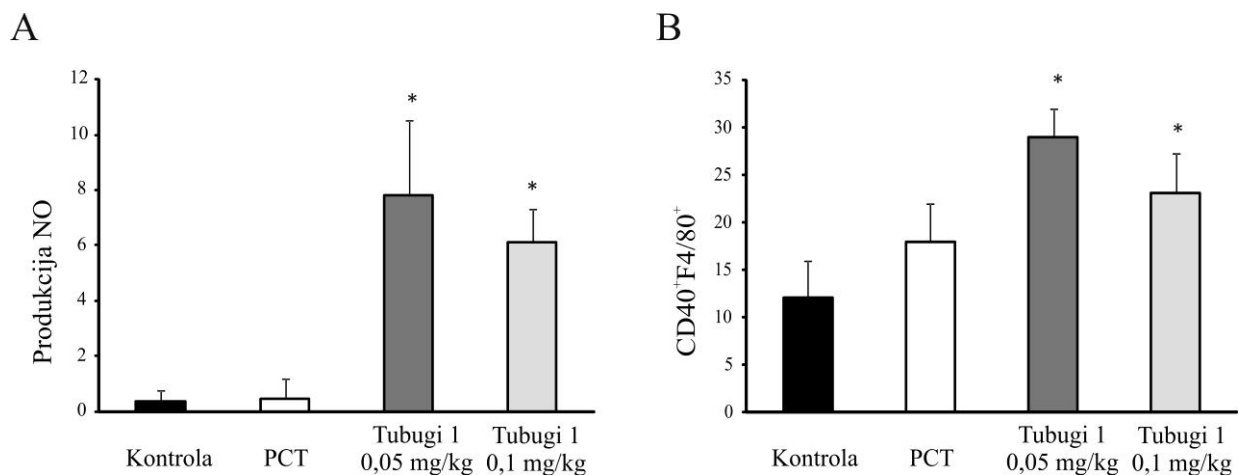
Grafik 30. **Tubugi 1 stimuliše citotoksični potencijal makrofaga *ex vivo***. A) Intenzitet fluorescence CFSE-obojenih B16 ćelija nakon kultivacije sa makrofagima poreklom iz eksperimentalnih životinja u trajanju 48 h, izmeren fluorimetrom. B) Ko-kultivacija B16 ćelija i makrofaga poreklom iz eksperimentalnih životinja na nivou svetlosne mikroskopije. U ko-kultivaciji tumorskih ćelija sa makrofagima poreklom iz životinja tretiranih višom dozom jedinjenja tubugi 1, predominantnu populaciju ćelija čine makrofagi sa specifičnom okruglom morfologijom, dok su u kulturi kontrolnih ćelija makrofagi u potpunosti prekriveni populacijom B16 ćelija. Orig. uveličanje 400 ×. Rezultati predstavljaju SV ± SD. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Iz svega se može zaključiti da efikasna doza tubugi 1 generiše jak nespecifični imunski odgovor upravljen protiv tumora, koji višestruko prevazilazi isti indukovan konvencionalnim citostatikom, PCT, primenjen u mnogo većoj dozi.

4.10.3. Tubugi 1 stimuliše polarizaciju makrofaga ka M1 fenotipu

Imajući navedeno u vidu, od značaja je bilo definisati fenotip makrofaga poreklom iz tretiranih životinja. Kako produkcija NO predstavlja parametar jasne razlike između M1 i M2 fenotipa, s obzirom da M1 makrofagi intenzivno produkuju NO, dalje se pristupilo kvantifikaciji ovog molekula u supernatantima kultura makrofaga poreklom iz eksperimentalnih životinja. Nasuprot kulturi makrofaga iz kontrolne i grupe životinja koja je tretirana PCT, u kulturi makrofaga iz životinja koje su primale tubugi 1 uočena je intenzivna produkcija NO (Slika 31A).

Konačno, s obzirom na dobijene rezultate o izraženoj citotoksičnoj aktivnosti i intenzivnoj produkciji NO makrofaga poreklom iz životinja tretiranih agensom tubugi 1, pristupilo se ispitivanju fenotipa makrofaga eksperimentalnih životinja. U tu svrhu, izvršena je analiza ekspresije proteinskih markera makrofaga, F4/80 i M1 fenotipa, CD40, na nivou protočne citofluorimetrije. Dobijeni rezultati su ukazali na povećan procenat CD40⁺F4/80⁺ ćelija u uzorku peritonealnih ćelija poreklom iz životinja koje su tretirane jedinjenjem tubugi 1 u poređenju sa peritonealnim ćelijama iz kontrolnih životinja (Slika 31B).



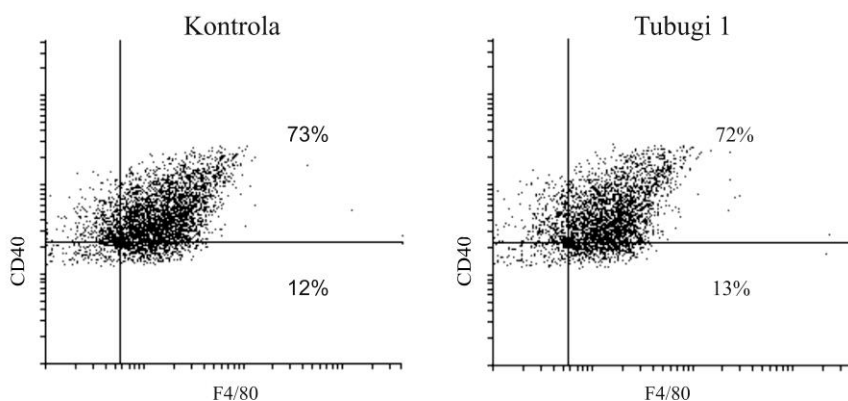
Slika 31. **Tubugi 1 indukuje polarizaciju makrofaga ka M1 fenotipu.** A) Koncentracija NO u supernatantima kultura makrofaga poreklom iz eksperimentalnih životinja, izmerena Griess-ovim reagensom nakon 48 h. B) Procenat CD40⁺F4/80⁺ ćelija u uzorcima peritonealnih ćelija poreklom iz eksperimentalnih životinja, određen metodom protočne citofluorimetrije. Rezultati predstavljaju SV ± SD. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

U celini, navedeni podaci ukazuju na polarizaciju makrofaga poreklom iz životinja koje su bile izložene jedinjenju tubugi 1 ka M1 fenotipu, što je u saglasnosti sa prethodno pokazanim povećanjem citotoksične aktivnosti ovih ćelija i povećanom produkcijom NO.

4.10.4. Polarizacija makrofaga ka M1 fenotipu, uzrokovana je indirektno, promenom fenotipa apoptotskih ćelija

Kako bi se rasvetlilo da li je M1 fenotip makrofaga iz životinja koje su primale tubugi 1 posledica njegovog direktnog uticaja na makrofage, ili je možda u vezi sa ingestijom atipičnih apoptotskih ćelija bez prisutnog PS, peritonealne ćelije iz intaktnih životinja su izložene ispitivanom agensu *in vitro*, a zatim je njihov fenotip ispitan metodom protočne citofluorimetrije posle dvostrukog bojenja F4/80 i CD40. Rezultati su pokazali da ne postoji razlika u ekspresiji CD40 markera između kontrolnih makrofaga i makrofaga tretiranih jedinjenjem tubugi 1 (Slika 32), na osnovu čega se može zaključiti da je polarizacija makrofaga ka M1 fenotipu najverovatnije posredovana specifičnom apoptozom ćelija nezavisnom od PS, a ne direktnim delovanjem na makrofage.

Na osnovu svega, jasno je da tubugi 1, pored snažnog tumoricidnog efekta, poseduje svojstvo potenciranja antitumorskog imunskog odgovora.



Slika 32. Polarizacija makrofaga ka M1 fenotipu nije uzrokovana direktnim dejstvom jedinjenja tubugi 1 na ove ćelije. Procenat CD40⁺F4/80⁺ ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h određen metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

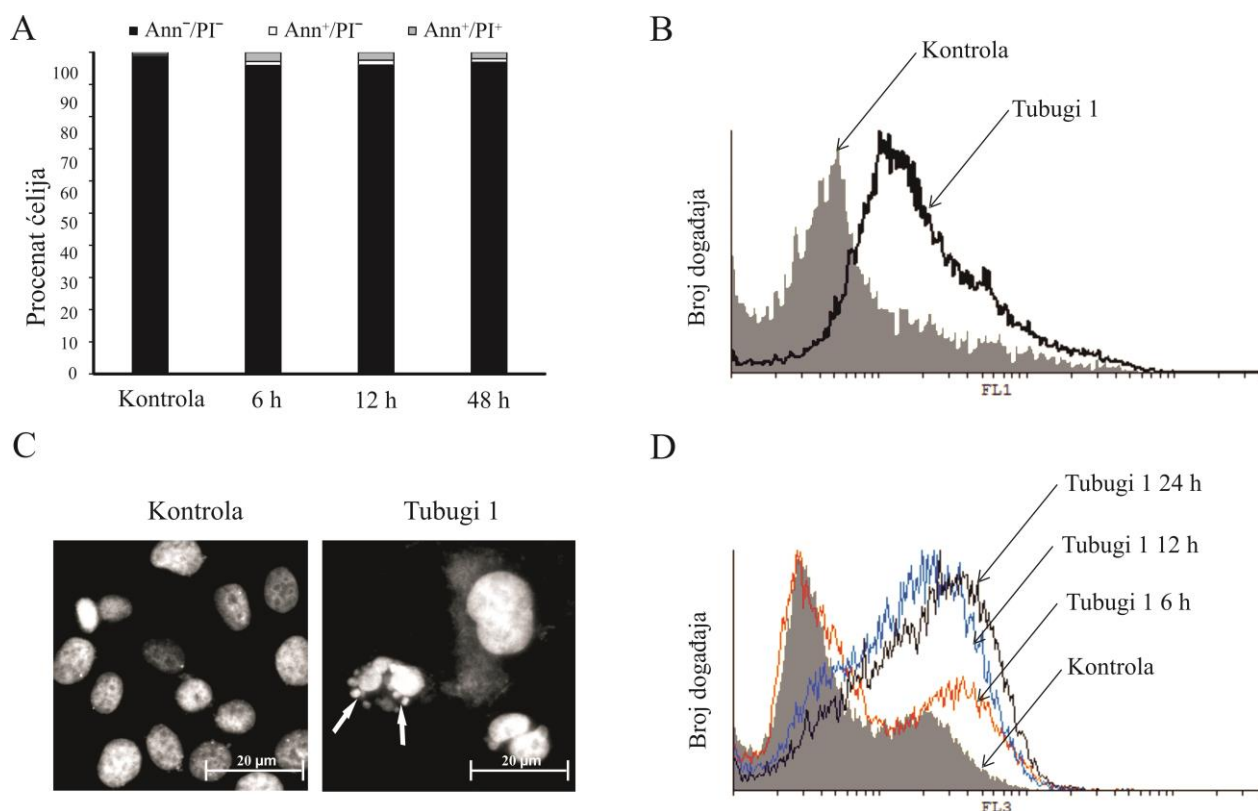
4.11. Tubugi 1 indukuje mitotsku katastrofu sinhronizovanu sa autofagijom kod A-375 ćelijske linije

Dobijeni rezultati o zadržavanju tretiranih A-375 ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa i njihovom smanjenom deobnom kapacitetu ukazali su na izražen citostatski efekat jedinjenja tubugi 1 na ćelijskoj liniji invazivnog humanog melanoma. Kako bi bio proveren citocidni učinak ispitivanog agensa na navedenoj ćelijskoj liniji, najpre je analizirano prisustvo ćelijske smrti apoptozom. A-375 ćelije su tretirane IC₅₀ dozom jedinjenja tubugi 1 u trajanju 48 h i dvostruko obojene sa Ann/PI. Rezultati protočne citofluorimetrije su pokazali da između netretirane i kulture tretirane eksperimentalnom supstancom nema značajne razlike u procentu apoptotskih ćelija (Slika 33A). Paralelno, ispitivana je uloga kaspaza kao medijatora apoptoze. A-375 ćelije su izložene toksičnoj dozi jedinjenja tubugi 1 tokom 48 h, a zatim bojene FITC-konjugovanim inhibitorom kaspaza (ApoStat) i analizirane na protočnom citofluorimetru. Sa Slike 33B se može videti da je agens, kao i u slučaju B16 ćelija, indukovao snažnu aktivaciju kaspaza. Prethodno dobijeni rezultati na modelu mišjeg melanoma i atipična apoptoza indukovana agensom tubugi 1 pokazali su da odsustvo Ann⁺ ćelija ne znači eksplicitno i odsustvo apoptoze, već samo njenih specifičnih markera. S tim na umu, dalje se pristupilo mikroskopskoj analizi morfologije jedara A-375 ćelija nakon DAPI bojenja. U kulturi ćelija koje su gajene u prisustvu jedinjenja tubugi 1 bila je evidentna pojava mnogobrojnih mikronukleacija (Slika 33C).

Budući da mikronukleacije predstavljaju morfološki marker mitotske katastrofe, ćelijske smrti koja nastaje usled aberantne mitoze, može se zaključiti da je smanjenje vijabilитета A-375 ćelija u vezi sa ovim tipom ćelijskog umiranja.

Kako je veza autofagije i mitotske katastrofe nedavno okarakterisana [133], naredni korak je bio ispitivanje njenog prisustva u kulturi ćelija humanog melanoma nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1. Sa tim u vezi, A-375 ćelije su izložene IC₅₀ dozi eksperimentalnog agensa tokom 6, 12 i 24 h, a zatim bojene akridin-oranžom. Analiza protočnom citofluorimetrijom je pokazala povećano prisustvo autofagozoma u citoplazmi ćelija tretiranih jedinjenjem tubugi 1 već posle 6 h inkubacije (Slika 33D), što implicira koegzistenciju autofagije i mitotske katastrofe u tretiranoj kulturi.

Zajedno, izlaganje A-375 ćelija agensu tubugi 1 rezultuje u intenzivnoj mitotskoj katastrofi sinhronizovanoj sa autofagijom i aktivacijom kaspaza.



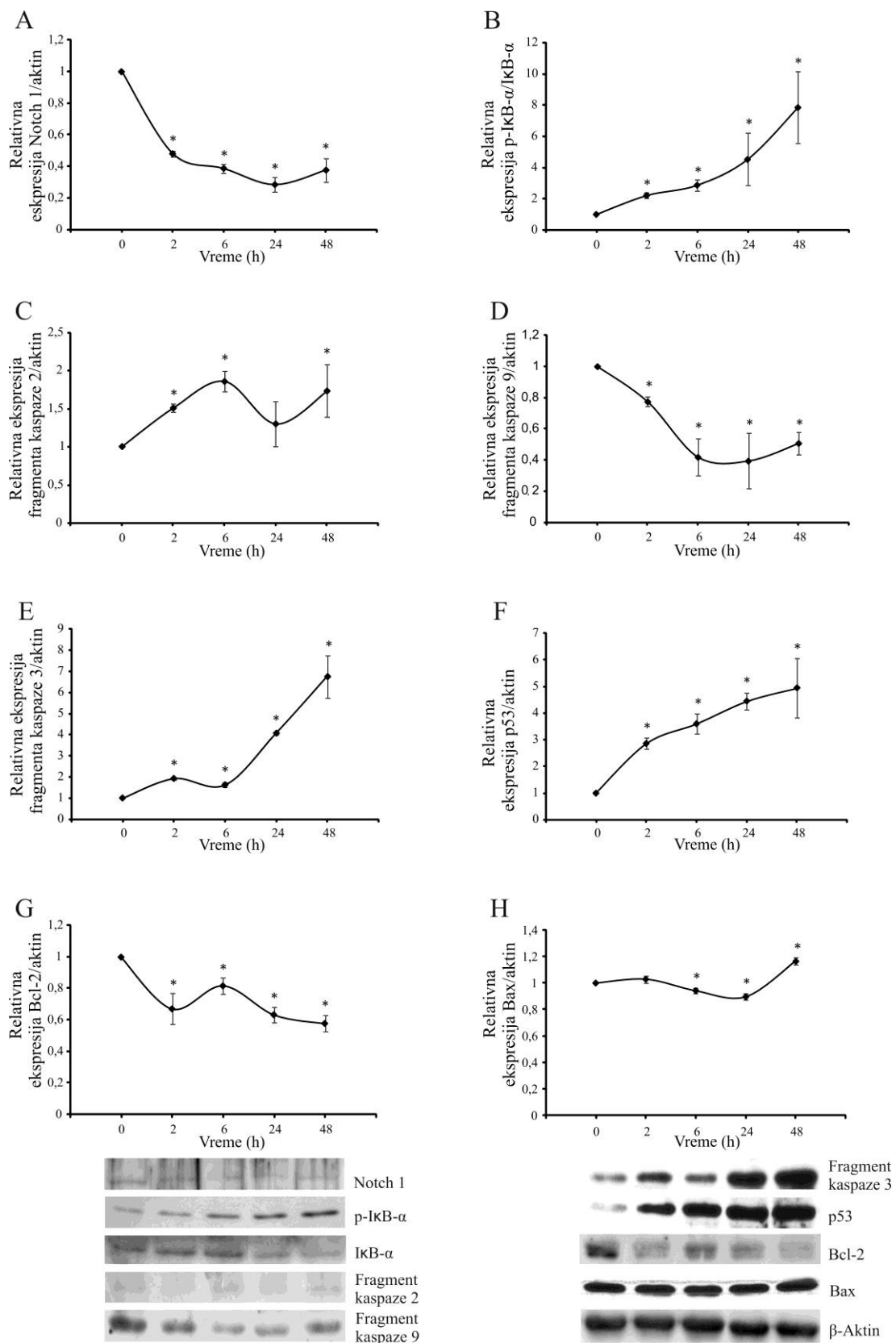
Slika 33. Tubugi 1 indukuje mitotsku katastrofu sinhronizovanu sa autofagijom i aktivacijom kaspaza kod A-375 ćelijske linije. A) Procenat apoptotskih A-375 ćelija nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 6, 12 i 48 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. B) Intenzitet fluorescence A-375 ćelija obojenih ApoStat bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. C) Prisustvo mikronukleacija (bele strelice) kod A-375 ćelija obojenih DAPI bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 48 h, ustanovljeno na nivou fluorescentne mikroskopije. Orig. uveličanje $400 \times$ D) Intenzitet fluorescence A-375 ćelija obojenih akridin-oranž bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1 u trajanju 6, 12 i 24 h, određen metodom protočne citofluorimetrije. Prikazan je reprezentativni rezultat jednog od tri nezavisno izvedena eksperimenta

4.12. Tubugi 1 menja ekspresiju medijatora mitotske katastrofe kod A-375 ćelijske linije

Kako je prisustvo mitotske katastrofe morfološki pokazano u kulturi ćelija izloženoj agensu tubugi 1, od interesa je bilo opisati događaje na unutarćelijskom nivou koji se nalaze u pozadini zapaženog fenomena. S obzirom da mitotska katastrofa uglavnom završava apoptozom, pristupilo se analizi ekspresije proteina bitnih za ova dva procesa. A-375 ćelije su tretirane IC_{50} dozom eksperimentalnog terapeutika u trajanju 2, 6, 24 i 48 h, a zatim je ekspresija proteina ispitana metodom imunoblota. Notch 1 i nukleusni faktor κB (NF- κB) su dva glavna proteina uključena u regulaciju ekspresije ciklina B1 – ključnog proteina ćelijskog ciklusa [134], i stoga relevantni sa aspekta pokretanja mitotske katastrofe, te je bilo od važnosti ispitati njihovu ekspresiju u tretiranim ćelijama. Analiza ekspresije Notch 1 ukazala je na njegovu kontinuiranu inhibiciju (Slika 34A), dok je, sudeći po analizi nivoa fosforilacije I κB - α (Slika 34B), NF- κB snažno aktiviran pod tretmanom agensom tubugi 1. Kako je obeležje mitotske katastrofe aktivacija kaspaze 2, dalje je analiziran nivo

ovog proteina kod tretiranih A-375 ćelija. Sa Slike 34C se može videti da je došlo do porasta u koncentraciji fragmenta kaspaze 2 (33 kDa) u kulturi ćelija gajenih u prisustvu eksperimentalnog agensa. Dalje, ispitan je nivo ekspresije kaspaza 9 i 3. Rezultati imunoblot analize ukazali su na trajnu inhibiciju fragmenta kaspaze 9 pod tretmanom (Slika 34D), što potvrđuje mitotsku katastrofu kao mehanizam delovanja kada je reč o ispitivanom agensu, imajući u vidu korelaciju ovog proteina sa apoptotskim procesom. Paralelno, rezultati su ukazali na aktivaciju kaspaze 3, posebno nakon 48 h tretmana ćelija (Slika 34E), što sugerise pokretanje apoptoze. Kako kaspaza 2 pozitivno reguliše funkciju p53 proteina [135], sledeći korak je bio provera ekspresije ovog proteina. Sa Slike 34F se može uočiti da je p53 protein pojačano eksprimiran u ćelijama koje su bile izložene agensu. S obzirom da je aktivnost Bcl-2 proteina ključna determinanta sudbine ćelija nakon mitotske katastrofe [136], ispitana je i njegova količina u tretiranim ćelijama. Rezultati su ukazali na smanjenu ekspresiju Bcl-2 u ćelijama nakon izlaganja agensu tubugi 1 (Slika 34G). Dodatno, analizirana je ekspresija Bax proteina. Na Slici 34H se može uočiti da do povećanja ekspresije Bax dolazi u poslednjim vremenskim tačkama tretmana, što zajedno sa pokazanom supresijom Bcl-2, ukazuje na pokretanje apoptoze kao krajnjeg ishoda u kaskadi događaja iniciranih u odgovoru na prisustvo supstance tubugi 1.

Konačno, može se zaključiti da opisani događaji na unutarćelijskom nivou u potpunosti potvrđuju rezultate dobijene protočnom citofluorimetrijom i mikroskopskom analizom morfologije jedara tretiranih ćelija, koji su pokazali da dolazi do indukcije mitotske katastrofe u odgovoru na tretman ispitivanim agensom.

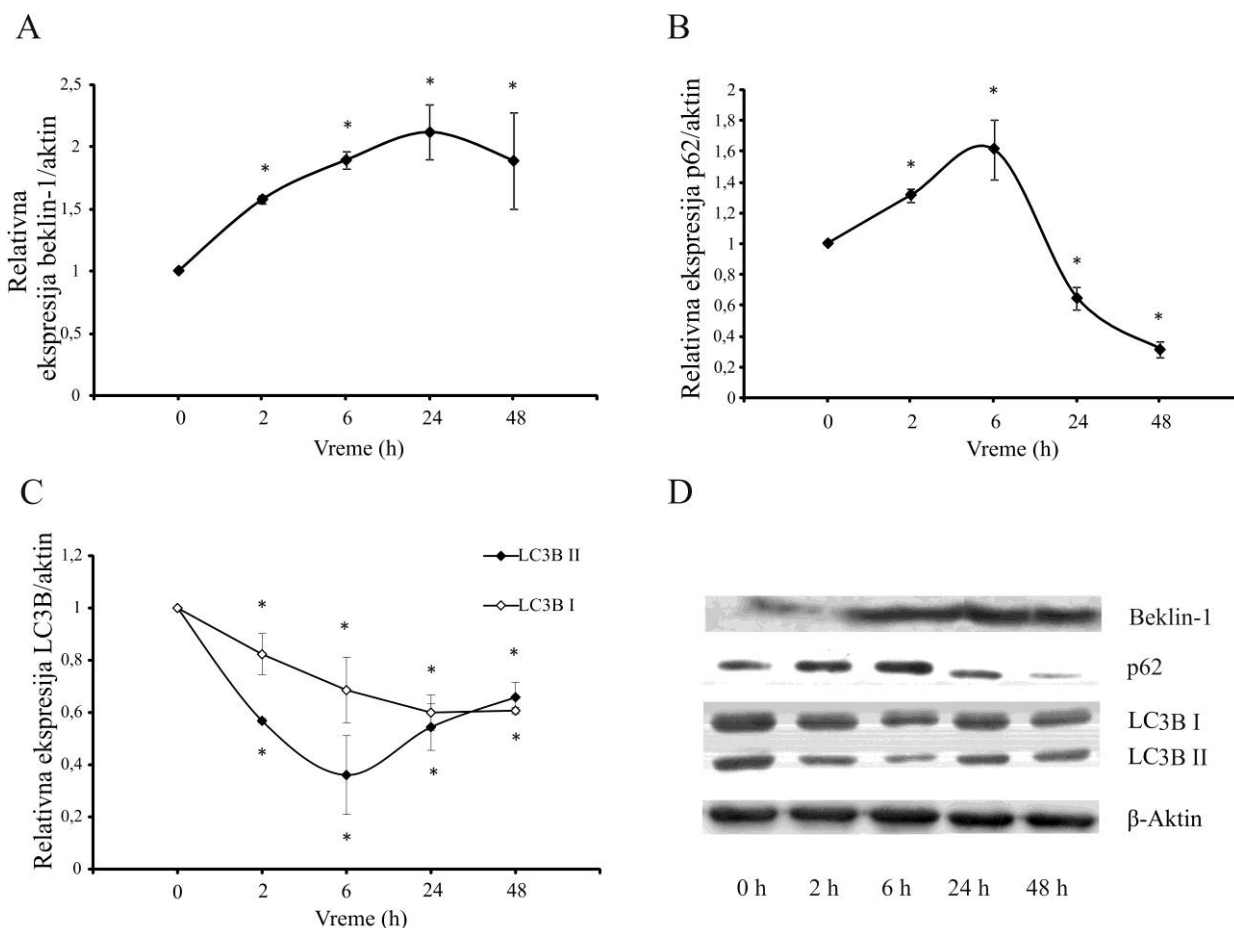


Slika 34. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za mitotsku katastrofu i apoptozu kod A-375 ćelijske linije. Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije i imunoblot za: A) Notch 1, B) IkB-α, C) aktiviranu kaspazu 2, D) aktiviranu kaspazu 9, E) aktiviranu kaspazu 3, F) p53, G) Bcl-2 i H) Bax. Ekspresija proteina ispitana je u navedenim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

4.13. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za autofagiju kod A-375 ćelijske linije

Kao što je pokazano, tubugi 1 indukuje autofagiju ćelija A-375 humanog melanoma. Kako bi se na unutarćelijskom nivou potvrdio rezultat dobijen protočnom citofluorimetrijom, analizirana je ekspresija proteina relevantnih za proces autofagije. A-375 ćelije su inkubirane 2, 6, 24 i 48 h u prisustvu IC₅₀ doze tubugi 1, nakon čega je analizirana ekspresija beklina-1, p62, LC3BI i LC3BII imunoblot metodom. Rezultati su pokazali povećanu ekspresiju beklina-1 u ćelijama izloženim eksperimentalnom agensu (Slika 35A). Kako je beklin uključen u formiranje autofagozoma, dobijeni rezultat podržava prisustvo autofagije. Paralelno, nivo p62 proteina, pouzdanog indikatora broja autofagozoma u ćeliji, posle inicijalnih 6 h inkubacije ćelija sa eksperimentalnom supstancom, počinje da pada (Slika 35B), što je obrazac tipičan za proces autofagije i u skladu sa rezultatima bojenja akridin-oranžom. Na kraju, rezultati analize ekspresije LC3B su pokazali da nivo citosolne forme proteina (LC3B I), kao i forme proteina koja se ugrađuje u membranu autofagozoma (LC3B II) opada, što odgovara uslovima intenzivirane autofagije (Slika 35C).

Sumarno, rezultati analize ekspresije proteina relevantnih za autofagiju, potvrđuju da tubugi 1 indukuje autofagiju, kao što je pokazano na nivou protočne citofluorimetrije.

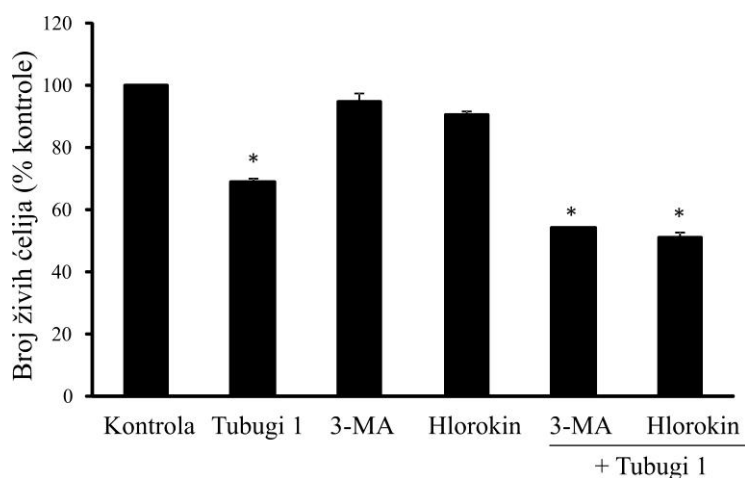


Slika 35. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina relevantnih za autofagiju kod A-375 ćelijske linije. Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije A) beklina-1, B) p62 i C) LC3B i D) odgovarajući imunoblotovi. Ekspresija proteina ispitana je u navedenim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

4.14. Tubugi 1 indukuje citoprotektivnu autofagiju kod A-375 ćelijske linije

Kako bi definisali ulogu autofagije pokrenute delovanjem agensa tubugi 1, A-375 ćelije su uz tretman IC_{50} dozom agensa tubugi 1 inkubirane u prisustvu dva različita inhibitora autofagije, hlorokina i 3-MA. Hlorokin menja pH lizozoma, na taj način inhibirajući proteolitičku degradaciju u njima [137], dok 3-MA blokira formiranje autofagozoma inhibicijom fosfatidilinozitol 3-kinaze (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K) [138]. Nakon 48 h, vijabilitet ćelija je determinisan CV testom. Sa Slike 36 se vidi da je kombinovani tretman hlorokinom ili, alternativno, 3-MA sa eksperimentalnim agensom indukovao još izraženiji pad vijabiliteta ćelija u poređenju sa agensom primenjenim pojedinačno.

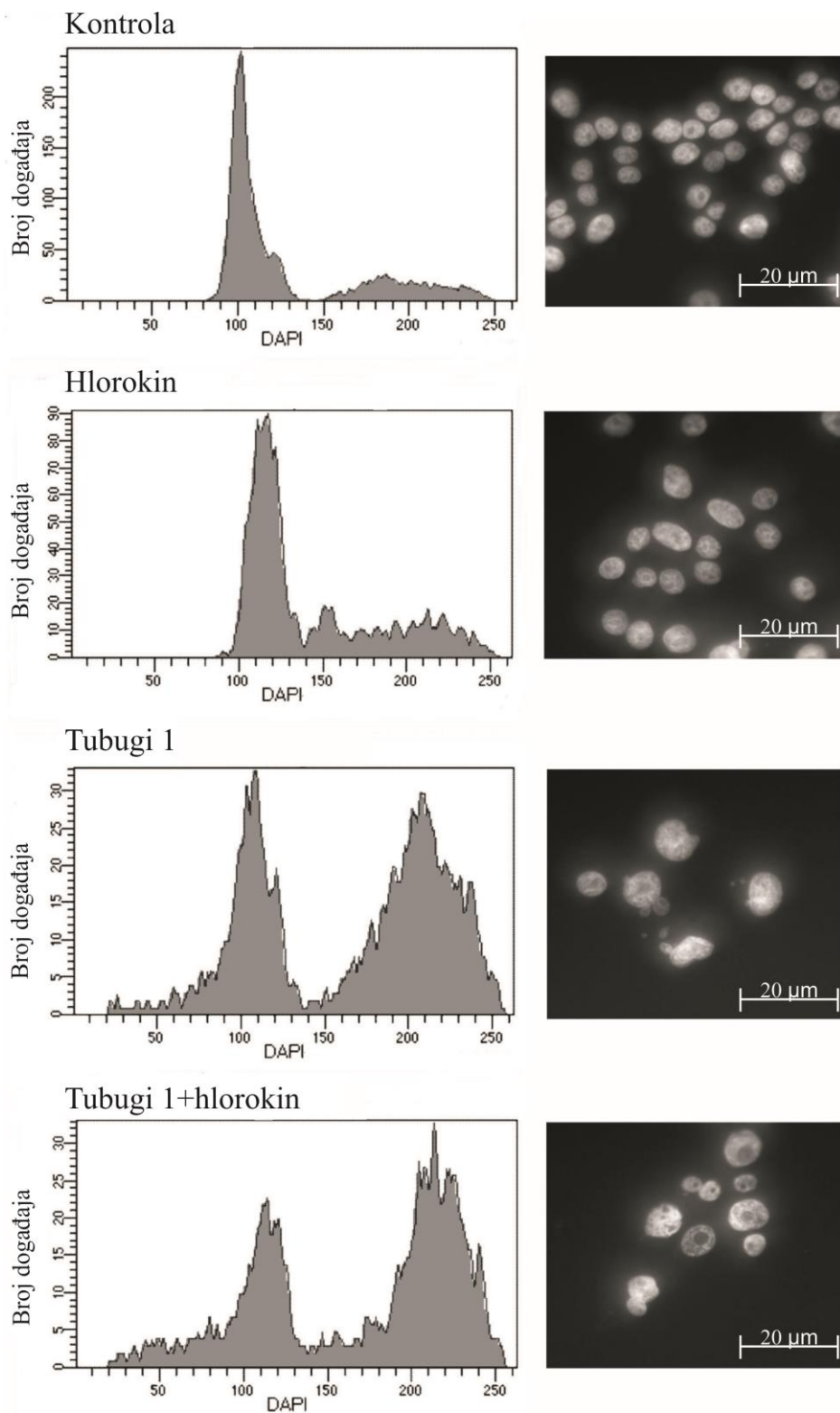
Dobijeni rezultat ukazuje na citoprotektivnu ulogu autofagije.



Slika 36. **Tubugi 1 indukuje citoprotektivnu autofagiju na A-375 liniji.** Procenat živih A-375 ćelija nakon kombinovanog tretmana jedinjenjem tubugi 1 i inhibitorima autofagije, hlorokinom i 3-MA, u trajanju 48 h, određen CV testom. Rezultati predstavljaju $SV \pm SD$ reprezentativnog od tri nezavisno izvedena eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

Shodno tome, za očekivati je da bi eliminacija autofagije intenzivirala citotoksični potencijal agensa tubugi 1. Kako bi navedena pretpostavka bila proverena, ćelije su izložene kombinovanom tretmanu hlorokinom (netoksična doza) i tubugi 1 (IC_{50} doza) tokom 48 h. Procena morfologije jedara izvršena je fluorescentnom mikroskopijom nakon bojenja ćelija DAPI bojom, a analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije takođe nakon bojenja ćelija DAPI bojom. Kombinovani tretman inhibitorom autofagije i tubugi 1 doveo je do akumulacije ćelija u subG1/G0 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 37 levi panel). Paralelno, nasuprot pojavi mikronukleacija kao obeležja mitotske katastrofe u kulturi ćelija tretiranoj agensom tubugi 1, kod kombinovanog tretmana očigledne su morfološke promene jedara tipičnih za apoptozu, kao što su kondenzacija hromatina i smanjenje volumena nukleusa (Slika 37 desni panel).

Posle svega navedenog, može se utvrditi da eliminacija autofagije pojačava citotoksičnost agensa tubugi 1.

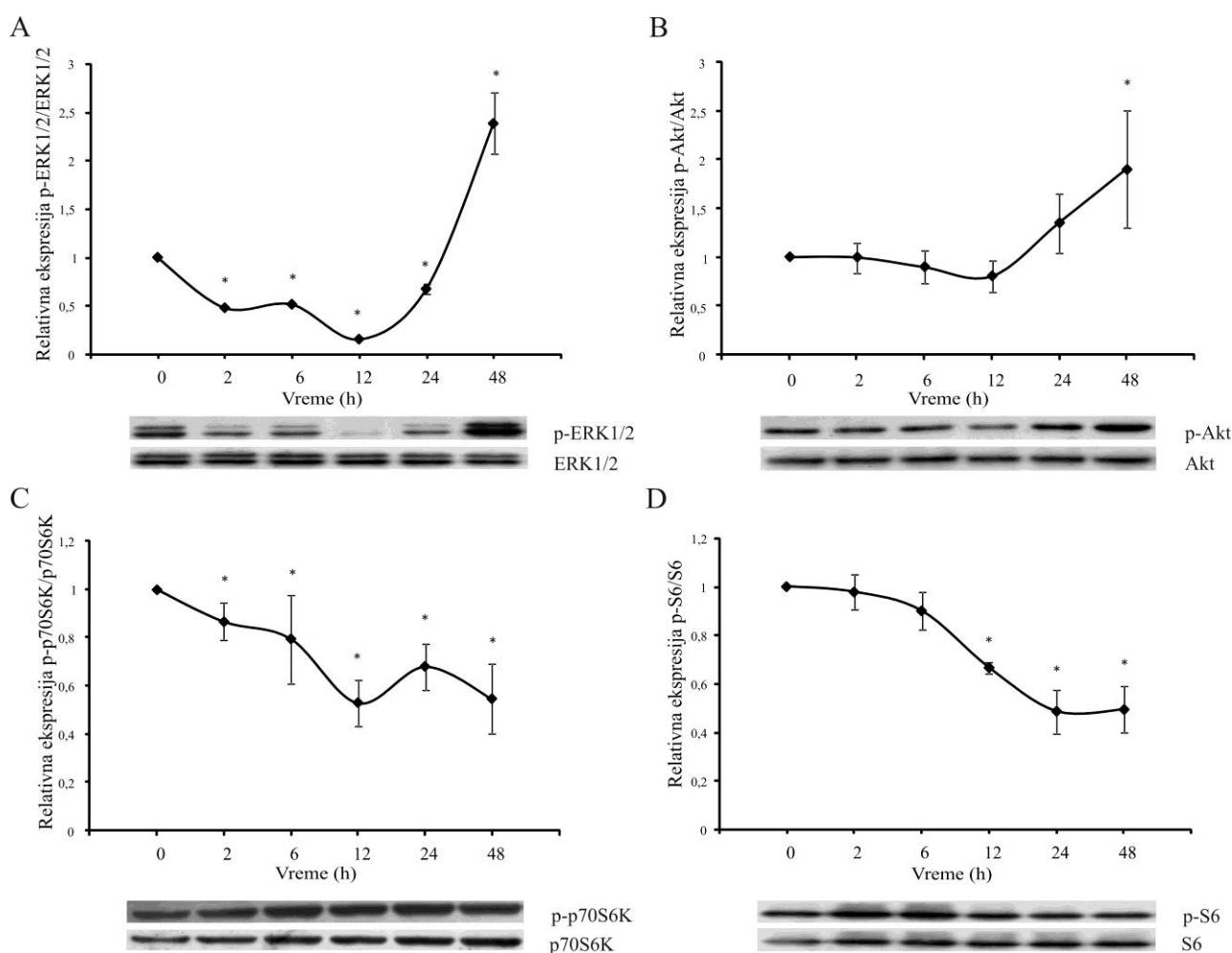


Slika 37. **Tubugi 1 u odsustvu autofagije indukuje apoptozu kod A-375 ćelijske linije.** Intenzitet fluorescence A-375 ćelija obojenih DAPI bojom nakon tretmana tubugi 1, pojedinačno ili u kombinaciji sa hlorokinom, u trajanju 48 h određen metodom protočne citofluorimetrije (levi panel). Morfološke promene jedara A-375 ćelija obojenih DAPI bojom nakon tretmana jedinjenjem tubugi 1, pojedinačno ili u kombinaciji sa hlorokinom, u trajanju 48 h analizirane na nivou fluorescentne mikroskopije (desni panel). Orig. uveličanje 400 ×

4.15. Tubugi 1 menja ekspresiju proteina signalnih puteva uključenih u realizaciju ćelijske smrti i deobe kod A-375 ćelijske linije

Kako bi se definisao uticaj sintetskog tubulizina na glavne signalne puteve uključene u regulaciju ćelijske deobe i smrti, A-375 ćelije su izložene IC₅₀ koncentraciji eksperimentalnog jedinjenja tokom 2, 6, 12, 24 i 48 h, nakon čega se pristupilo analizi ekspresije ERK1/2, Akt, p70S6K i S6 proteina imunoblot metodom. Aktivacija proteina je određivana iz odnosa aktivirane (fosforilisane) forme i ukupne količine određenog proteina. Rezultati su pokazali da nakon prolaznog smanjenja aktivnosti tokom prvih 12 h, tubugi 1 dovodi do aktivacije ERK1/2 (Slika 38A). Dalje, ekspresija Akt nije bitno promenjena tokom 24 h inkubacije ćelija sa agensom tubugi 1 (Slika 38B), dok je aktivnost p70S6K i S6 proteina značajno smanjena (Slika 38C i D), ukazujući da gornji deo ovog signalnog puta nije pod direktnim uticajem eksperimentalnog agensa.

Ovakav obrazac ekspresije navedenih proteina ukazuje na prolongiranu i prolaznu autofagiju u kombinaciji sa dolazećom apoptozom.



Slika 38. Tubugi 1 utiče na ekspresiju proteina uključenih u regulaciju ćelijske deobe i smrti kod A-375 ćelijske linije. Grafički prikaz denzitometrijske analize ekspresije i imunoblot za A) ERK1/2, B) Akt, C) p70S6K i D) S6. Ekspresija proteina ispitana je u navedenim vremenskim tačkama. Rezultati predstavljaju SV ± SD reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta. * $p < 0,05$ u odnosu na kontrolne uzorke

5. Diskusija

Ćelijska deoba je jedan od najbazičnijih procesa u živom svetu. Mehanizmi njene kontrole su trajno narušeni u malignoj ćeliji, i kao takvi predstavljaju neprekidan podsticaj za pronalažanjem načina koji bi obuzdali nekontrolisanu deobu ćelija. Upravo narušavanje organizacije struktura neophodnih za pravilnu deobu ćelija, kao što su DNK i mikrotubule, jeste koncept koji se primenjuje u terapiji malignih bolesti više od dve decenije [139]. Trenutak kada eukariotska ćelija vrši segregaciju dupliranih hromozoma već dugo se smatra potencijalnom metom za delovanje hemoterapeutika. Efikasnost grupe lekova čija je meta mitotsko vreteno je potvrđena uspešnom, dve decenije dugom, kliničkom primenom taksana i vinka alkaloida u terapiji mnogobrojnih tipova kancera. Znanja tradicionalne medicine se i danas koriste u terapiji raznih bolesti [140]. Tako, 60% jedinjenja koja se koriste u lečenju malignih bolesti potiču iz prirode [94]. Važna osobina mikrobakterija je njihov bogat sekundarni metabolizam što ih svrstava u red najpoznatijih prirodnih proizvođača biološki aktivnih supstanci. Oko 30% ovih metabolita ispoljava antiproliferativni efekat utičući na citoskelet eukariotske ćelije [125]. Među njima, tubulizini remete strukturu i funkciju mikrotubula i poseduju veliki terapijski potencijal budući da inhibiraju rast različitih tumorskih linija *in vitro* [101–104]. Tumorske ćelije su pokazale izuzetnu osetljivost na prirodne tubulizine, s obzirom da je red veličine njihove efikasne koncentracije u piko- i nanomolarnom opsegu [101]. Podjednaku senzitivnost prema navedenim jedinjenjima pokazali su i višestruko rezistentni klonovi [101,103]. U osnovi antitumorskog delovanja tubulizina A nalazi se kako direktna interakcija sa tubulinom putem inhibicije polimerizacije ovog proteina, tako i depolimerizacija intaktnih mikrotubula [106]. Vrlo ograničena količina prirodnih metabolita, ali i njihova nestabilnost usled sklonosti da formiraju manje potentne derivate, ciklotubulizine, postavlja ozbiljna ograničenja u kontekstu dalje karakterizacije antitumorskog kapaciteta članova familije tubulizina. Potreba za dodatnim izvorima ovih jedinjenja je dovela do sinteze prvih tubulizina [107,108,141], ali i njihovog prvog sintetskog derivata [109].

Tubugi 1 je sintetski analog tubulizina koji poseduje veću hemijsku stabilnost u odnosu na same tubulizine. Preliminarne studije citotoksičnosti ukazale su na očuvan antiproliferativni potencijal ovog molekula, budući da je uspešno suprimirao rast kancera prostate i kolona *in vitro* [109]. Njegova aktivnost slična je antitumorskoj aktivnosti tubulizina A i preko 30 puta prevazilazi istu kod PCT. U studiji opisanoj ovom disertacijom pokazana je efikasnost sintetskog derivata tubulizina, tubugi 1, u supresiji rasta melanoma *in vitro* i *in vivo*. Aktivnost ovog molekula ispitana je i sa aspekta uticaja na urođeni imunski odgovor.

Testovi citotoksičnosti su potvrdili snažan antitumorski potencijal jedinjenja tubugi 1, sličan onom pokazanom u studiji Pando i saradnika [109]. Izlaganje ćelijskih linija humanog i mišjeg melanoma eksperimentalnom agensu rezultovalo je dozno-zavisnim padom vijabiliteta ćelija sa IC_{50} dozama u nanomolarnom opsegu. Sa druge strane, tubugi 1 nije uticao na vijabilitet primarnih makrofaga i keratinocita. Smanjen vijabilitet linije primarnih fibroblasta može se objasniti visokom stopom proliferacije ovih ćelija, s obzirom da je reč o transformisanoj ćelijskoj liniji. I pored toga, u poređenju sa linijama melanoma, IC_{50} vrednost dobijena na ovoj liniji je bila desetostruko veća. Činjenica da ovaj molekul *per se* nije toksičan za normalne, niskoproliferativne ćelije, nezavisno od direktnog delovanja na mikrotubule, čini ga relativno selektivnim agensom za tumorske ćelije.

Apoptoza je opisana kao dominantan mehanizam delovanja grupe jedinjenja čija je antitumorska aktivnost posledica direktnog efekta na mitotsko vreteno. Literaturni podaci ukazuju da ćelije tretirane tubulizinom A podležu apoptozi [104,106]. U osnovi antitumorskog delovanja sintetskog tubulizinskog analoga, tubugi 1, na ćelijskoj liniji kolona jeste, takođe, apoptoza [110]. Shodno tome, nametnula se potreba da se ispita prisustvo ovog oblika ćelijske smrti u kulturama ćelija melanoma izloženih eksperimentalnom terapeutiku. U ovoj studiji je pokazano da B16 ćelije u prisustvu agensa tubugi 1, stiču morfološke osobenosti apoptotskih ćelija, kao što su smanjivanje ćelijskog i jedarnog volumena, kondenzacija hromatina i formiranje apoptotskih tela. Akumulacija ćelija sa fragmentisanom DNK, njihov smanjen proliferativni kapacitet, kao i aktivacija kaspaza su

detektovani u kulturi ovih ćelija izloženoj delovanju navedenog agensa. Ovi rezultati su u potpunosti saglasni sa pokazanom morfološkom slikom apoptoze, kao i na unutarćelijskom nivou, sa rezultatima ekspresije medijatora apoptoze, Bax i Bcl-2 proteina i aktivnih kaspaza 3 i 7. Međutim, rezultati protočne citofluorimetrije su nedvosmisleno ukazali na jasno odsustvo ćelija sa eksternalizovanim PS. Pošto se eksternalizacija PS smatra jednim od ključnih markera ovog tipa ćelijske smrti, neuspeli pokušaji detektovanja apoptotskih ćelija sistemom koji koristi visoko specifičnu interakciju membranskog PS i aneksina ukazali su na atipična svojstva membrane apoptotskih ćelija pod tretmanom ispitivanim jedinjenjem. Nemogućnost detekcije apoptotskih ćelija dvostrukim Ann/PI bojenjem metodom protočne citofluorimetrije, kao i metodom konfokalne mikroskopije i fluorescentne spektroskopije, ukazali su na postojanje specifičnog apoptotskog obrasca, različitog od onog opšte prihvaćenog u naučnoj javnosti. Oskudni su podaci u literaturi da je apoptoza u uslovima neeksternalizovanog PS moguća. Tyurina i saradnici su pokazali da tretman HL-60 ćelija etoposidom izaziva apoptozu sinhronizovanu sa snažnom produkcijom ROS [129]. Međutim, usled isključivanja lipida membrane iz serije oksidacionih reakcija u ćeliji, ekspozicija PS na apoptotskim ćelijama je izostala. Po prvi put, ova studija je ukazala da, bez obzira na genuz ROS i konsekvantno oštećenje brojnih unutarćelijskih molekula, testirani agens poseduje selektivno antioksidativno svojstvo kada se radi o membranskim fosfolipidima, čuvajući njih, ali ne i druge ćelijske mete, od povrede i oštećenja. Saglasno, pokazano je da, u ko-tretmanu sa H₂O₂ koji je poznat po svom snažnom oksidativnom dejstvu na lipide, etoposid, iako dovodi do apoptoze, blokira oksidaciju fosfolipida, uključujući i PS, tako sprečavajući njihovu ekspoziciju. Slično, naši rezultati su pokazali da je tubugi 1 izazvao morfološki tipičnu, ali po bihemijskim svojstvima specifičnu apoptozu. Tubugi 1 je u B16 ćelijama pokrenuo genuz NO i ROS/RNS i sledstveno, snažnu depleciju GSH i -SH grupa. Paradoksalno, pad u količini MDA, prvog dugoživećeg produkta lipidne peroksidacije, jasno je ukazao na odsustvo oksidacije lipida u uslovima oksidativnog stresa i narušene redoks homeostaze u ćeliji. Tako, inhibirajući oksidaciju membranskih fosfolipida, tubugi 1 je sprečio eksternalizaciju PS prilikom istovremene primene sa H₂O₂. Ovaj efekat je verovatno direktno odgovoran za odsustvo PS na površini umirućih ćelija melanoma.

Apoptoza finalizuje eferocitozom, što je termin kojim se opisuje fagocitoza, tj. brzo uklanjanje i degradacija ostataka ćelija od strane fagocita [142]. PS je jedan od ključnih liganada apoptotske ćelije koji se vezuje za odgovarajući PS receptor na membrani fagocita i tako olakšava proces eferocitoze [143]. Ovaj fosfolipid je najzastupljeniji u membrani ćelije i lokalizovan je sa njene unutrašnje strane kod većine ćelijskih tipova [144]. Brojni fiziološki i patološki faktori dovode do njegove translokacije, kao i drugih fosfolipida u spoljašnji monosloj plazma membrane [145]. Prisustvo PS na spoljašnjoj strani membrane može pokrenuti niz različitih fizioloških odgovora [145]. Inverzija PS predstavlja znak za kontrolisanu eliminaciju oštećenih, inficiranih, aktiviranih ili senescentnih ćelija kako bi se sprečilo da oslobode potencijalno štetan ćelijski sadržaj [146]. Kontakt imunskih ćelija sa ćelijama koje poseduju eksternalizovani PS pokreće antiinflamatorni i neimunogeni signal neophodan za razvoj tolerancije i izbegavanje lokalne i sistemske aktivacije imunskog sistema. S obzirom na značaj prisustva PS u spoljašnjem monosloju plazma membrane, reperkusije izostanka njegove eksternalizacije u živom sistemu i ishod terapije kancera i infektivnih bolesti mogu biti značajne. Naime, ukoliko ne dođe do uklanjanja apoptotskih ćelija, iste mogu podleći sekundarnoj nekrozi, fenomenu koji je opisan u patogenezi hroničnih, inflamatornih i autoimunskih bolesti [147]. Za razliku od etoposida za koji je pokazano da negativno reguliše uklanjanje apoptotskih ćelija od strane makrofaga usled blokade eksternalizacije PS, u ovoj studiji odsustvo PS nije kompromitovalo proces fagocitoze, pošto su makrofagi izolovani iz intaktnih životinja uspešno uklonili apoptotske ćelije. Očuvan potencijal makrofaga da internalizuju ostatke apoptotskih ćelija ukazao je na postojanje PS-nezavisnog puta u uklanjanju umirućih ćelija sa atipičnim svojstvima membrane. Iako je PS dominantan i, do danas najbolje okarakterisan profagocitni ligand, identifikovani su brojni drugi molekuli koji na sličan način regulišu eferocitozu. I fosfatidiletanolamin se svrstava u red potencijalnih medijatora fagocitoze, pošto je pokazano da i

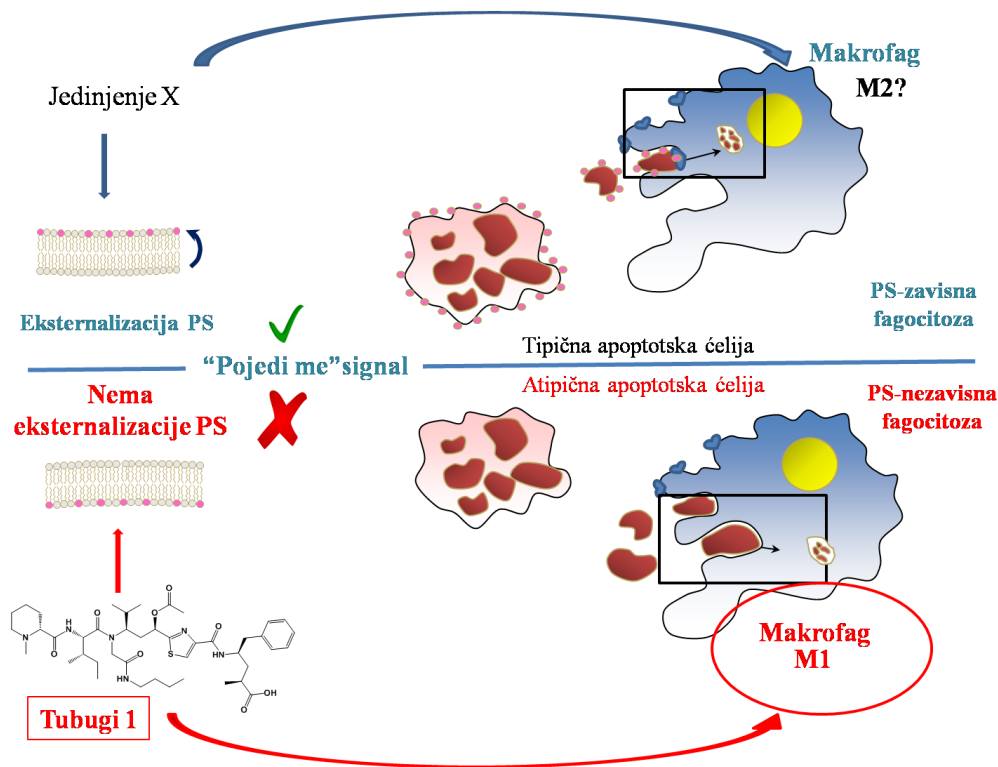
on može da se eksternalizuje usled istovetne regulacije lokalizacije sa PS [148]. Međutim, kako se radi o istoj klasi molekula, a oksidacija lipida membrane koja je preduslov za njihovu ekspoziciju izostaje pod ispitivanim agensom, onda se ni fosfatidiletanolamin ne može posmatrati u svetlu posrednika u procesu uklanjanja umirućih ćelija melanoma u ovoj studiji. Feng i saradnici su ukazali na proces programirane ćelijske fagocitoze u kom aktivirani makrofagi sekretuju kalretikulin koji se vezuje za površinu ciljnih ćelija i na taj način ih markira za uklanjanje [149]. Primarno lokalizovan u endoplazmatičnom retikulumu, poslednjih godina kalretikulin se izučava sa aspekta uloga koje ima van ove organele, a koje se predominantno odnose na obezbeđivanje profagocitnog signala i promociju eferocitoze apoptotskih ćelija, ali i uklanjanje tumorskih ćelija. Do sada, translokacija kalretikulina na površinu tumorske ćelije prijavljena je nakon tretmana sa određenim hemoterapeutcima kao što su doksorubicin, mitoksantron, oksaliplatin, bortezomib, kao i nakon zračenja i fotodinamske terapije [150]. S obzirom da dosadašnji literaturni podaci ne pružaju uvid u mehanističku prirodu procesa fagocitoze apoptotskih ćelija indukovanih tubulizinskom familijom agenasa, i generalno, grupom inhibitora mitotskog vretena, kalretikulin je jedan od mogućih kandidata u ulozi medijatora eferocitoze.

Kao što je poznato, tumor nije samo skup maligno izmenjenih ćelija, već njegov rast i progresiju determinišu brojni signali poreklom od drugih ćelijskih tipova koji naseljavaju njegovu stromu. Iz tog razloga je bilo značajno ispitati delovanje supstance tubugi 1 *in vivo*. Do sada je *in vivo* pokazana efikasnost biosintetskog prekursora tubulizina – pretubulizina, u nekoliko modela u supresiji rasta tumora i metastaza [151,152], kao i parentalnog tubulizina A [104]. U studiji obuhvaćenoj ovom doktorskom disertacijom, korišćen je singeni model mišjeg solidnog melanoma. Saglasno sa rezultatima *in vitro* dela studije, ispitivani agens, primenjen u terapijskom eksperimentalnom režimu, je značajno smanjio volumen tumora u poređenju sa kontrolnim životinjama, ali i sa onima koje su primale PCT u dozi koja je u literaturi označena kao efikasna [123]. Parametri toksičnosti poput promene telesne mase, ponašanja, gastrointestinalne toksičnosti nisu bili uočeni kod životinja tretiranih jedinjenjem tubugi 1. Povećano prisustvo proteina u urinu životinja tretiranih agensom tubugi 1, ali i kod jedinki koje su primale PCT, može ali ne mora biti indikator narušene funkcije bubrega, s obzirom na fenomen fiziološke proteinurije opisan kod miševa [130]. Leukociti i nitriti, sa druge strane, mogu biti pokazatelji inflamacije usled oštećenja bubrega nakon tretmana. Urobilinogen u urinu može ukazivati na poremećaj funkcije jetre, međutim vrednosti detektovane kod tretiranih životinja pokazane su i u fiziološkim uslovima [132]. Može se zaključiti da je tubugi 1 pokazao značajan učinak u redukciji veličine tumora uz minimalne toksične efekte po organizam. S druge strane, PCT primenjen u terapijskoj dozi (koja je oko 200 puta viša od primenjene doze sintetskog tubulizina) nije doveo do značajnog smanjenja volumena melanoma *in vivo*. Zajedno, rezultati *in vivo* studije ukazali su na veći terapijski potencijal supstance tubugi 1 u odnosu na konvencionalno korišćen citostatik, PCT.

Rezultat koji je ukazao na očuvan fagocitni potencijal makrofaga *in vitro* osnažen je mnogo značajnijom činjenicom da su makrofagi, poreklom iz životinja koje su primale tubugi 1 nakon indukcije tumora, pokazali veću fagocitnu sposobnost u poređenju sa makrofagima kontrolnih životinja. Isti fenomen zapažen je u i slučaju životinja koje su primale PCT u terapijskoj dozi. Međutim, jasna razlika između ćelija peritonealnog eksudata poreklom iz životinja tretiranih agensom tubugi 1 i onih izolovanih iz životinja koje su primale PCT, ustanovljena je upravo prema kriterijumu citotoksičnosti makrofaga usmerene ka tumorskim ćelijama. Konkretno, u ko-kulturi sa makrofagima iz životinja koje su primale tubugi 1, rast B16 ćelija je skoro u potpunosti zaustavljen. Ovaj citotoksični efekat u korelaciji je sa povećanom produkcijom NO. Dodatno, ovi makrofagi su zadobili karakteristike M1 fenotipa. Makrofagi su ćelije sa izuzetno velikom plastičnošću koja im omogućava da oblikuju svoj fenotip spram različitih stimulusa iz okolne sredine [153]. M1 ili klasično aktivirani makrofagi se javljaju posle nekih infekcija i karakterišu se sekrecijom proinflamatornih citokina kao što su TNF- α (engl. *Tumor necrosis factor- α*), interleukin 6 (IL-6), IL-12 i IL-1 β [154]. Takođe ih odlikuje intenzivirana produkcija ROS [155]. M2 ili alternativno

aktivirani makrofagi poseduju visoku fagocitnu aktivnost, proizvode komponente vanćelijskog matriksa, angiogene i hemotoksične faktore i antiinflamatorni citokin IL-10. Služe kao čistači apoptotskih ćelija, ublažavaju inflamaciju i promovišu zarastanje rana. U tumorskoj mikrosredini, M2 makrofagi su izvori faktora rasta za maligne ćelije i poseduju imunosupresivnu aktivnost [156]. Proizvode enzime i proteaze kao što su matriksne metaloproteinaze, plazmin, osteonektin i katepsini koji promovišu degradaciju vanćelijskog matriksa, na taj način pozitivno utičući na diseminaciju tumorskih ćelija i proces metastaziranja [157]. Takođe, podstiču angiogenezu jer prvenstveno naseljavaju hipoksične regione tumora gde promovišu ekspresiju hipoksijom indukovanog faktora-1 α (engl. *Hypoxia-Inducible Factor 1 α* , HIF-1 α) koji potom indukuje transkripciju vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) i drugih faktora neophodnih za proces neovaskularizacije [157]. Mnoge studije su pokazale da u malignim tumorima makrofagi poseduju upravo M2 fenotip [154]. Može se zaključiti da su M2 makrofagi među glavnim učesnicima u stimulaciji progresije tumora. Uspostavljanje M1 fenotipa makrofaga pod tretmanom agensom tubugi 1, stoga, predstavlja veoma važan rezultat ove studije, ukazujući da ovaj agens, pored direktnog tumoricidnog delovanja na ćelije melanoma, poseduje osobinu da pobudi makrofage i urođenu imunost protiv tumora. Ova studija je među prvima koje pokazuje da jedinjenje dizajnirano kao destabilizator deobnog vretena jeste u stanju da, pored svoje primarne uloge, pojača učinak osnaživanjem citotoksičnih aktivnosti nespecifičnog antitumorskog imunskog odgovora. U kojoj meri makrofagi mogu uticati na tumorske ćelije, a posebno na njihov odgovor na hemoterapeutike, opisano je u studiji Shree i saradnika, gde je pokazano da makrofagi koji ekspimiraju katepsin štite ćelije karcinoma dojke od smrti podstaknute tretmanom PCT [158]. Slično, pokazano je da je apoptoza tumorskih ćelija indukovana etoposidom jasno redukovana u prisustvu THP-1 linije M2 makrofaga. Suprotno, apoptoza je intenzivirana u ko-kultivaciji tumorskih ćelija sa M1 makrofagima, dok agens aplikovan pojedinačno nije uticao na polarizaciju makrofaga [159].

Sa druge strane, pokazano je da je kontakt PS na površini membrane apoptotskih ćelija sa specifičnim receptorima na fagocitima odgovoran kako za efikasno uklanjanje umirućih ćelija, tako i za uspostavljanje antiinflamatornog okruženja, favorizujući M2 fenotip makrofaga [143]. Stoga, svojstvo supstance tubugi 1 da polarizuje makrofage ka M1 verovatno je u vezi sa jedinstvenom osobinom ovog agensa da indukuje apoptotsku ćelijsku smrt bez inverzije PS (Slika 39). To je podržano opservacijom da direktno izlaganje makrofaga agensu tubugi 1 *in vitro* ne indukuje ekspresiju CD40, markera M1 populacije makrofaga.



Slika 39. Tubugi 1 polarizuje makrofage ka M1 u uslovima atipične apoptoze koja nije praćena eksternalizacijom PS. Slika preuzeta i modifikovana iz Drača i saradnici, 2019 [160]

Imajući sve navedeno na umu, moglo bi se zaključiti da apoptoza bez inverzije PS, indukovana u odgovoru na tretman agensom tubugi 1, i opisani sled događaja, favorizuju razvoj za tumor nepovoljne sredine. Eksternalizovan PS najverovatnije funkcioniše kao kontrolna tačka imunskog sistema koja suprimira razvoj imunosti. Poznato je da neki patogeni koriste eksternalizovani PS i njegov imunosupresivni efekat kako bi osigurali sopstveno preživljavanje ili uspostavili latentnu infekciju [143]. Štaviše, eksternalizovani PS je, bez izuzetka, prisutan u svim tumorima i obezbeđuje snažnu imunosupresiju u mikrosredini tumora [161]. Navedeni podaci ukazuju na mogućnost postavljanja novog koncepta u terapiji kancera tako što bi se blokadom eksternalizacije PS rekonstituisala imunost protiv tumora. Ran i saradnici su pokazali da se u spoljašnjem monosloju ćelijske membrane endotelnih ćelija tumora nalazi PS, čime se otvara mogućnost terapije koja deluje na krvne sudove tumora [145]. Ovi fosfolipidi su veoma atraktivna meta s obzirom na njihov ogroman broj po tumorskoj ćeliji, poziciju na luminalnoj strani tumorskog endotelijuma i samim tim izloženosti krvotoku i leku, i činjenici da su odsutni na endotelijumu zdravih tkiva [145]. Pokazano je da je ko-tretman docetakselom i 2aG4 antitelom na PS kod miševa sa tumorom prostate rezultovao snažnom supresijom rasta tumora, deplecijom brojnosti M2 i porastom brojnosti M1 makrofaga, kao i zrelih dendritičnih ćelija u tumoru. Dodatno, primena ovog antitela je upadljivo pomerila ravnotežu citokina u tumorskoj sredini od imunosupresivne ka imunostimulatornoj [162]. Činjenica da tubugi 1 *per se* dovodi do odsustva eksternalizacije PS i konsekvntno stimuliše makrofage i urođeni imunski odgovor, čini ga trenutno veoma perspektivnim kandidatom u moru drugih, sa aspekta iznalaženja povoljnog terapijskog ishoda u lečenju kancera. Znajući da tumorska mikrosredina snažno kontroliše sudbinu malignih ćelija ne samo u kontekstu deobe, svojstva invadiranja i metastaziranja, već i odgovora na terapiju, rezultati ovog dela studije mogli bi biti od izuzetnog značaja za oblikovanje budućih terapijskih režima.

Svakako da je jedan od najvećih izazova i poteškoća u terapiji kancera pojava metastaza s obzirom na drugačiju hemosenzitivnost metastatskih lezija u odnosu na njihove primarne lezije, kao i čestu pojavu rezistencije [163]. Kako bi se sagledao ovaj aspekt, a imajući u vidu da je A-375 ćelijska linija predstavnik visoko gradusnih melanoma neosetljivih na skoro sve trenutno dostupne terapijske režime, drugi deo studije je usmeren ka evaluaciji osetljivosti ove ćelijske linije na tretman agensom tubugi 1. A-375 ćelije su nisko diferentovane i amelanotične sa jedinstvenom osobinom konstitutivne ekspresije iNOS [164]. NO produkovan od strane iNOS stimuliše proliferaciju ćelija, dovodi do rezistencije ćelija melanoma na apoptozu i podstiče proces neovaskularizacije [164]. Konstitutivna ekspresija iNOS u tumorskim ćelijama mnogih obolelih, kao i izrazita korelacija ekspresije ovog enzima sa slabijim preživljavanjem, postavila je iNOS za marker loše prognoze, kao što je nedavno pokazano kod kolorektalnog karcinoma i karcinoma prostate i želuca [113]. Dodatno, povećana ekspresija iNOS je udružena sa hemorezistencijom značajnog broja različitih tipova kancera, uključujući i melanom [113].

Tubugi 1 je, za razliku od prethodno opisanih efekata na modelu mišjeg melanoma, na A-375 liniji, pokrenuo kompleksnu interakciju autofagije, mitotske katastrofe i apoptoze, sa mitotskom katastrofom kao ključnom determinantom sudbine ćelije. Kao i kod B16 linije mišjeg melanoma, ni kod A-375 linije nije pokazano prisustvo Ann⁺ ćelija. Međutim, fluorescentnom mikroskopskom analizom je utvrđena pojava mikronukleusa u kulturi A-375 ćelija nakon primenjenog tretmana. Mikronukleusi (hromozomi ili delovi hromozoma koji nisu ravnomerno raspoređeni među kćerkama ćelijama) i multinukleusne ćelije (javljaju se kao rezultat izostanka citokineze) su morfološka obeležja mitotske katastrofe. Mitotska katastrofa se javlja za vreme ili ubrzo nakon prolongirane, aberantne mitoze. Prema klasifikaciji tipova ćelijskih smrti, mitotska katastrofa *per se* ne predstavlja formu regulisane ćelijske smrti [165], već samo stupanj koji najčešće prethodi apoptozi, nekrozi ili senescenciji, sa krajnjim ciljem sprečavanja proliferacije defektnih ćelija [166]. Mitotska katastrofa se može definisati kao tumor-supresivni mehanizam, s obzirom da promoviše eliminaciju onih ćelija kod kojih je došlo do nepravilne podele hromozoma i izvor su kariotipskih aberacija. Biva pokrenuta kombinacijom oštećenja DNK ili mitotskog aparata ćelije i različitih defekata kontrolnih mehanizama ćelijskog ciklusa, koji bi inače zaustavili ulazak ćelije u mitozu dok se ne poprave prisutna oštećenja [167]. Poznato je da usled određenih nepravilnosti u funkcionisanju mitotskog aparata, ćelije bivaju zaustavljene u momentu tranzicije metafaze u anafazu. Imajući navedeno u vidu, kao i to da testirani agens narušava organizaciju deobnog vretena, nisu iznenađujući rezultati naše studije koji ukazuju na suprimiranu stopu deobe tretiranih A-375 ćelija i njihovo zadržavanje u G2/M fazi ćelijskog ciklusa. Brojne studije su pokazale da mitotska katastrofa može biti izazvana agensima koji utiču na funkciju deobnog vretena ili promovišu oštećenja DNK, kao što su: taksani, epotiloni, vinka alkaloidi, kolhicin [168–170]. Dodatno, pokazana ukupna aktivacija kaspaza u kulturi A-375 ćelija izloženoj eksperimentalnom agensu, potkrepljuje povezanost mitotske katastrofe sa umiranjem ovih ćelija.

Brojni podaci iz literature pokazuju da je mitotska katastrofa regulisana brojnim molekulima kao što su kinaze specifične za ćelijski ciklus (Cdk1 (engl. *Cyclin-Dependent Kinase*)/ciklin B1 kompleks, Aurora kinaze), proteini kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa, survivin, p53, kaspaze i članovi Bcl-2 familije [167]. Cdk1 interaguje sa ciklinom B1 i formira aktivni heterodimer – pokretač mitoze. Ovaj kompleks je odgovoran za progresiju ćelija iz G2 u M fazu, a njegova neprekidna aktivacija neophodna za tranziciju od profaze ka metafazi. Konkretno, Cdk1/ciklin B1 fosforiliše supstrate uključene u kondenzaciju hromatina, degradaciju nukleusnog ovoja, formiranje deobnog vretena, i konačno aktivaciju SAC [171]. Ulazak ćelije u anafazu mitoze praćen je naglom degradacijom ovog heterodimera od strane anafaza-promovišućeg kompleksa (engl. *Anaphase-Promoting Complex*, APC) [167]. Shodno tome, za očekivati je da se uočeni zastoj ćelija nakon tretmana agensom tubugi 1, na prelazu metafaza-anafaza odlikuje visokim nivoom ciklina B1. Povećana ekspresija ciklina B1 pronađena je u mnogim primerima mitotske katastrofe indukovane farmakološkim agensima, kao što je to slučaj sa humanim kolorektalnim adenokarcinomom tretiranim

fluorouracilom [172]. Notch i NF- κ B su dva glavna proteina uključena u regulaciju ekspresije ciklina B1 [134]. Notch proteini su visoko konzervisani transmembranski receptori koji služe kao transkripcioni aktivatori. Ovaj signalni put je upleten u diferencijaciju stem ćelija i tipičan za visoko gradusne tumore kao što su karcinom dojke, pluća, mozga i sarkomi [173,174]. Curry i saradnici su pokazali da inhibicija Notch proteina u KS ćelijskoj liniji dovodi do G2/M zastoja i mitotske katastrofe sa pojavom mikronukleusa [134]. Naime, inhibicija Notch proteina indukuje neprekidni rast nivoa ciklina B1, ukazujući da Notch signalni put može uticati na ekspresiju ovog ključnog proteina ćelijskog ciklusa. Dalje, visok nivo ciklina B1 i nemogućnost tranzicije ćelije u anafazu mogli bi bar delimično biti objašnjeni povećanom aktivnošću NF- κ B [134]. NF- κ B reguliše čitav niz gena odgovornih za proliferaciju i preživljavanje ćelija. Aktivnost NF- κ B je regulisana I κ B koji vezuje i zadržava ovaj molekul u citoplazmi, na taj način sprečavajući njegovu translokaciju u jedro i vezivanje za DNK [134]. Naime, fosforilacija I κ B- α dovodi do oslobađanja NF- κ B, a time i do njegove aktivacije. Sumarno, mitotska katastrofa indukovana jedinjenjem tubugi 1 u A-375 ćelijama je praćena snažnom inhibicijom Notch 1 proteina i intenziviranom aktivnošću NF- κ B, sudeći po povećanom nivou fosforilacije I κ B- α .

Dalje, naša studija ukazuje na aktivaciju kaspaze 2 u A-375 ćelijama u odgovoru na prisustvo agensa tubugi 1. Vitale i saradnici su potvrdili egzekutorsku ulogu kaspaze 2 u mitotskoj katastrofi [175]. Ovaj protein je lociran u jedru, a njegova aktivacija, prouzrokovana oštećenjem DNK, dalje vodi permeabilizaciji membrane mitohondrija, kao i aktivaciji kaspaze 3 [167]. Pojačana ekspresija fragmenta kaspaze 3, uočena u A-375 ćelijama nakon tretmana agensom tubugi 1 je u saglasnosti sa navedenim. Zanimljivo, pronađeno je da u odgovoru na UV zračenje ili TNF- α , aktivacija kaspaze 2 zavisi od kaspaza 3 i 9 [176]. Eksplicitna povezanost sa kaspazom 9 je pronađena u slučaju unutrašnjeg apoptotskog puta, ali ne i u slučaju spoljašnjeg [177]. Stoga, nije iznenađujuće da u ovoj studiji, aktivacija kaspaze 2 nije praćena ekspresijom aktivirane kaspaze 9. Štaviše, povećana ekspresija fragmenta kaspaze 2 mogla bi biti odgovorna za uočenu pozitivnu regulaciju NF- κ B [178].

Jedna od posledica aktivirane kaspaze 2 je i povećana ekspresija p53 tumor supresora, kao što je pokazano u našoj studiji pri tretmanu A-375 ćelija agensom tubugi 1. To je očekivano, s obzirom da je kaspaza 2 odgovorna za degradaciju Mdm2 – negativnog regulatora funkcije p53 proteina [135]. Po indukciji mitotske katastrofe, povećana regulacija p53 je pronađena i kod humane ćelijske linije kolona nakon tretmana doksorubicinom [133]. p53 ima ključnu ulogu u pokretanju apoptoze u odgovoru na oštećenja u ćeliji [179]. Ovaj protein kontroliše balans između pro- i antiapoptotskih proteina Bcl-2 familije i reguliše formiranje pora na spoljašnjoj membrani mitohondrija [133]. Shodno tome, smanjena ekspresija Bcl-2 proteina u uslovima povećane ekspresije p53 [180], pokazana pri tretmanu agensom tubugi 1, je očekivana. Sa druge strane, aktivni kompleks Cdk1/ciklin B1 direktno fosforiliše Bcl-2 i negativno reguliše njegovu aktivnost [181]. To sprečava formiranje heterodimera ovog molekula sa proapoptotskim Bax proteinom. Kao posledica, javlja se oligomerizacija Bax na spoljašnjoj membrani mitohondrija [182]. Mitotska katastrofa je takođe moguća u p53-deficijentnim tumorskim ćelijama, ističući irelevantnost p53 proteina za njenu realizaciju [167,183]. Uočeno povećanje ekspresije ukupnog p53 proteina u tretiranim A-375 ćelijama, zajedno sa aktivacijom kaspaze 2 i negativnom regulacijom Bcl-2, ukazuje da je p53 uključen u krajnji ishod tretmana. Na kraju, p53 dovodi do stimulacije transkripcije proapoptotskih proteina kao što je Bax [167], na taj način inicirajući mitohondrijalnu apoptozu. U saglasnosti sa pomenutim, može se pretpostaviti da hromozomski prekidni tokom mitotske katastrofe promovišu apoptozu posredovanu p53 proteinom [184].

Sem mitotske katastrofe, tretman A-375 ćelija agensom tubugi 1 je rezultovao snažnom, ali tranzitornom autofagijom koja je posle 72 h ugašena. To je potvrđeno analizom medijatora autofagije na unutarćelijskom nivou, kao što su beclin-1, p62 i LC3B. Nedavno je pronađeno da autofagija može biti indukovana hromozomskim prekidima [185], što se može dovesti u vezu sa

uočenom mitotskom katastrofom. Fenomen spontanog gašenja autofagije mogao bi biti povezan sa prethodno pomenutom pozitivnom regulacijom kaspaze 2 i inhibiranom ekspresijom aktivne forme kaspaze 9. Naime, poznato je da je kaspaza 2 endogeni supresor autofagije [186], dok inhibirana kaspaza 9 remeti citoprotektivnu autofagiju kroz modulaciju pH lizozoma i aktivnost katepsina [187]. Fulda i saradnici su prijavili da autofagija u velikoj meri utiče na sudbinu ćelije [188], dok je nedavno opisana kompleksna interakcija autofagije, mitotske katastrofe i apoptoze [133]. Naime, pokazano je da indukcija mitotske katastrofe kod HCT116 ćelijske linije vodi stimulaciji autofagije koja je praćena apoptozom [133]. S obzirom da je inhibicija autofagije hlorokinom ili 3-MA rezultovala u još izraženijoj toksičnosti supstance tubugi 1, u našoj studiji autofagija može biti razmatrana kao primarno citoprotektivni mehanizam. Slično, PCT je indukovao protektivnu autofagiju u A549 ćelijama [189]. Otuda, nije iznenađujući rezultat da je eliminacija autofagije dovela do povećane akumulacije ćelija u subG1/G0 fazi ćelijskog ciklusa i pojave apoptotskih tela u kulturi ćelija izloženoj ko-tretmanu eksperimentalnim agensom i hlorokinom. Kombinacija stabilnog sintetskog analoga tubulizina sa inhibitorima autofagije mogla bi predstavljati obećavajući pristup u borbi protiv tipova kancera sa inicijalno izraženom autofagijom ili u kojima se autofagija pokreće u odgovoru na tretman. Ovo je u saglasnosti sa prethodno uočenim povećanjem osetljivosti endometrijalnog karcinoma na PCT u prisustvu inhibitora autofagije [190]. Nakon dužeg izlaganja agensu tubugi 1, spontano gašenje autofagije je sinhronizovano sa intenziviranjem signala za apoptozu (pozitivna regulacija p53, Bax proteina i fragmenta kaspaze 3 na kraju tretmana). Očigledno je da kompleksna interakcija mitotske katastrofe, autofagije i apoptoze definiše ishod ovog tretmana.

S obzirom na mnogobrojne interakcije učesnika ovih procesa, teško je definisati eksplicitni ili primarni uticaj tretmana na signalni put ERK1/2 i PI3K/Akt. ERK1/2 signalni put reguliše skoro sve procese u ćeliji, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i preživljavanje ćelija, ali i apoptozu i odgovor na stres [191]. Zavisno od stimulusa, ERK može posredovati u različitim antiproliferativnim događajima u ćeliji, kao što su apoptoza, autofagija i senescencija *in vitro* i *in vivo* [192]. Sa jedne strane, ključni proteini autofagije – p62 i LC3B II služe kao platforma za regulisanje fosforilacije, odnosno aktivacije ERK proteina. Direktna interakcija p62 sa ERK mogla bi biti odgovorna za negativnu regulaciju njegove aktivacije i funkcije od strane p62 [193], što upućuje na kompleksnu povezanost autofagije i ERK proteina. Stoga, pozitivna regulacija ERK pod tretmanom agensom tubugi 1 ukazuje na smanjenu ekspresiju p62, što je i pokazano u ovoj studiji. Sa druge strane, povezanost aktivacije ERK proteina i apoptoze je dobro definisana [192], posebno u odgovoru na ćelijska oštećenja indukovana različitim agensima. Pronađeno je da aktivnost ERK proteina utiče na mitohondrije inhibirajući njihovu respiraciju i narušavajući membranski potencijal, što bi moglo da dovede do oslobađanja citohroma C [194,195]. Aktivirani ERK takođe može da dovede do oslobađanja citohroma C tako što menja ekspresiju proteina Bcl-2 familije, odnosno pozitivno reguliše ekspresiju Bax proteina, a negativno utiče na nivo antiapoptotskog Bcl-2 [192]. Stoga, intenzivirana aktivnost ERK proteina u terminalnim časovima inkubacije sa eksperimentalnom supstancom, posle inicijalne supresije potvrđuje da je prolazna autofagija zamenjena apoptozom.

PI3K/Akt signalni put kontroliše proliferaciju i preživljavanje ćelija, ali i njenu progresiju kroz ćelijski ciklus [196]. U ovoj studiji ekspresija Akt proteina nije značajno promenjena tokom prvih 24 h inkubacije sa eksperimentalnim agensom, dok je ekspresija nizvodnih proteina, kao što su p70S6K i S6, značajno smanjena. Naime, Akt dovodi do sinteze proteina preko efekata p70S6K na fosforilaciju ribozomskog proteina S6, komponente male subjedinice ribozoma [197]. Rezultati naše studije ukazuju da uzvodni elementi ovog signalnog puta nisu pod direktnim uticajem agensa, ali da dolazi do nizvodne regulacije koja vodi inhibiciji proteinske sinteze. Kasna pozitivna regulacija Akt proteina u 48 h tretmana je verovatno posledica perzistentne inhibicije p70S6K [198]. Blommaert i saradnici su ukazali da fosforilacija S6 može biti posmatrana u svetlu determinante koja određuje da li će doći do pokretanja sinteze proteina ili autofagije u ćeliji [199]. Fosforilisani S6 stimuliše

vezivanje ribozoma za endoplazmatični retikulum (ER), što redukuje regione ER bez vezanih ribozoma koji su zapravo izvor konstituentna membrane autofagozoma u inicijalnoj fazi autofagije [200]. Uočena autofagija pod tretmanom agensom tubugi 1, može se, barem delimično objasniti i kontinuiranom inhibicijom S6.

Takođe, Akt promoviše rast ćelija regulišući G1 fazu ćelijskog ciklusa aktivacijom ciklin/Cdk kompleksa i inaktivacijom inhibitora Cdk [196]. Međutim, uticaj Akt proteina na G2/M tranziciju ostaje nejasan [201]. Katayama i saradnici su pokazali da Akt indirektno dovodi do inhibitorne fosforilacije Cdk1, na taj način blokirajući tranziciju iz G2 u M fazu [196]. U tom smislu, pozitivna regulacija Akt proteina pod tretmanom agensom tubugi 1 mogla bi biti odgovorna za uočeni G2/M zastoj.

Sumarno, indukcija mitotske katastrofe agensom tubugi 1 je centralni događaj na klackalici autofagije i apoptoze kod visoko invazivne A-375 ćelijske linije, čime se otvara mogućnost intenziviranja efikasnosti agensa manipulacijom odnosa ovih procesa. Stimulacija autofagije posle indukcije mitotske katastrofe može predstavljati novi, poboljšani vid terapije kancera. Kada autofagija nije u stanju da podrži homeostazu ćelije, i praćena je pokretanjem ćelijske smrti, imunski odgovor biva stimulisan [202]. Određene *in vivo* studije ukazale su na vezu između autofagije i aktivacije kaspaze 1, i sledstvene aktivacije IL-1 β [203].

Da li će ćelija krenuti putem mitotske katastrofe ili će aktivirati apoptotski mehanizam umiranja u odgovoru na primenjeni tretman, zavisi isključivo od uslova koji vladaju u ćeliji u tom trenutku. Konačno, ono što je izvesno je da, uprkos sličnoj senzitivnosti ćelija melanoma različite invazivnosti, tubugi 1 pokreće različite mehanizme delovanja koji se mogu prilagoditi tipovima tumora sa različitim biološkom i genetičkom pozadinom i podjednako su efikasni. Sa jedne strane, pokretanje mitotske katastrofe predstavlja važan terapijski pristup, budući da radio- i hemorezistencija tumorskih ćelija mogu biti uspešno prevaziđene ovim fiziološkim procesom [204]. Značajna populacija tumorskih ćelija su tetraploidne ili aneuploidne, i često nemaju odgovarajuću regulaciju progresije kroz ćelijski ciklus, što ih čini posebno senzitivnim na lekove koji svoje delovanje ostvaruju indukcijom mitotske katastrofe [204]. Uticaj na proces citoprotektivne autofagije koja karakteriše tumore uznapredovalog stupnja mogao bi biti iskorišćen za prevazilaženje njihove rezistencije na tretman inhibitorima mitotskog vretena. Sa druge strane, imunosupresija, koja skoro bez izuzetka prati hemoterapiju, mogla bi biti izbegnuta terapijom baziranom na ovim jedinjenjima. Imajući sve navedeno u vidu, tubugi 1 bi nesumnjivo pružio niz prednosti u poređenju sa konvencionalnim hemoterapeutima koji su danas u upotrebi.

6. Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima studije i na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Tubugi 1 smanjuje vijabilitet ćelijskih linija melanoma B16 poreklom iz miša i A-375 poreklom od čoveka *in vitro*.
2. Tubugi 1 je značajno manje toksičan za primarne ćelije te stoga pokazuje visoku selektivnost prema malignom fenotipu.
3. Tubugi 1 izaziva morfološki tipičnu, ali po biohemijskim svojstvima specifičnu, apoptozu i inhibira proliferaciju preživelih klonova kod B16 ćelijske linije.
4. Tubugi 1 u B16 ćelijama indukuje oksidativni stres pri čemu lipidi membrane ne podležu reakciji oksidacije, što je najverovatnije odgovorno za izostanak eksternalizacije PS.
5. Fagocitoza *in vitro* je očuvana u uslovima apoptoze koja nije praćena eksternalizacijom PS.
6. Tubugi 1 smanjuje rast melanoma *in vivo*.
7. Tubugi 1 ne kompromituje fagocitozu, stimuliše citotoksični potencijal makrofaga i njihovu polarizaciju ka M1 fenotipu *ex vivo*.
8. Tubugi 1 inhibira proliferaciju i indukuje zastoj u G2/M fazi ćelijskog ciklusa u A-375 ćelijama.
9. Tubugi 1 pokreće mitotsku katastrofu u A-375 ćelijama praćenu sniženom ekspresijom Notch 1 i Bcl-2, dok je ekspresija kaspaze 2, p53 i NF-κB intenzivirana.
10. Pojava mitotske katastrofe je sinhronizovana sa tranzitornom autofagijom citoprotektivnog karaktera, što je potvrđeno i na nivou ekspresije beclin-1, p62 i LC3B.
11. Sa gašenjem autofagije mitotska katastrofa progredira u apoptozu što je pored morfoloških karakteristika, potvrđeno i na unutarćelijskom nivou kroz povećanu ekspresiju proapoptotskog proteina Bax i aktivaciju kaspaze 3.
12. Kompleksna interakcija mitotske katastrofe, autofagije i apoptoze korelira sa dinamikom promena u ekspresiji proteina signalnih puteva uključenih u ćelijsku deobu i smrt, MAPK i PI3K/Akt, sa dominantnom inhibicijom p70S6K i S6 proteina.

7. Literatura

1. de Gruijl, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB Radiation. *Skin Pharmacology and Physiology* **2002**, *15*, 316–320.
2. Riley, P.A. Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1997**, *29*, 1235–1239.
3. Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A.; Tymińska, A. Skin melanocytes: biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology* **2013**, *1*, 30–41.
4. Brito, F.C.; Kos, L. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell & Melanoma Research* **2008**, *21*, 464–470.
5. Tachibana, M. Sound Needs Sound Melanocytes to Be Heard. *Pigment Cell Research* **1999**, *12*, 344–354.
6. Plonka, P.M.; Passeron, T.; Brenner, M.; Tobin, D.J.; Shibahara, S.; Thomas, A.; Slominski, A.; Kadekaro, A.L.; Hershkovitz, D.; Peters, E.; Nordlund, J.J.; Abdel-Malek, Z.; Takeda, K.; Paus, R.; Ortonne, J.P.; Hearing, V.J.; Schallreuter, K.U. What are melanocytes really doing all day long...? *Experimental Dermatology* **2009**, *18*, 799–819.
7. Jhappan, C.; Noonan, F.P.; Merlino, G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* **2003**, *22*, 3099–3112.
8. Park, H.Y.; Kosmadaki, M.; Yaar, M.; Gilchrist, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, *66*, 1493–1506.
9. Hirobe, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell & Melanoma Research* **2011**, *24*, 462–478.
10. Wang, Z.; Coleman, D.J.; Bajaj, G.; Liang, X.; Ganguli-Indra, G.; Indra, A.K. RXR α Ablation in Epidermal Keratinocytes Enhances UVR-Induced DNA Damage, Apoptosis, and Proliferation of Keratinocytes and Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, *131*, 177–187.
11. Lu, Y.; Zhu, W.; Tan, C.; Yu, G.; Gu, J. Melanocytes are Potential Immunocompetent Cells: Evidence from Recognition of Immunological Characteristics of Cultured Human Melanocytes. *Pigment Cell Research* **2002**, *15*, 454–460.
12. Simon, J.D.; Peles, D.; Wakamatsu, K.; Ito, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell & Melanoma Research* **2009**, *22*, 563–579.
13. Slominski, A.; Tobin, D.J.; Shibahara, S.; Wortsman, J. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews* **2004**, *84*, 1155–1228.
14. Abdel-Malek, Z.A.; Kadekaro, A.L.; Swope, V.B. Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. *Pigment Cell & Melanoma Research* **2010**, *23*, 171–186.
15. Marks, M.S.; Seabra, M.C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**, *2*, 738–748.
16. Hearing, V.J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science* **2005**, *37*, 3–14.
17. Jimbow, K.; Quevedo, W.C.; Fitzpatrick, T.B.; Szabo, G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *Journal of Investigative Dermatology* **1976**, *67*, 72–89.
18. Gupta, A.; Avci, P.; Dai, T.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Advances in Wound Care* **2013**, *2*, 422–437.

19. Rigel, D.S.; Carucci, J.A. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2000**, *50*, 215–236.
20. Kosary, C.L.; Altekruze, S.F.; Ruhl, J.; Lee, R.; Dickie, L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: Collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer* **2014**, *120*, 3807–3814.
21. Garbe, C.; Leiter, U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology* **2009**, *27*, 3–9.
22. Guy, G.P.; Machlin, S.R.; Ekwueme, D.U.; Yabroff, K.R. Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002–2006 and 2007–2011. *American Journal of Preventive Medicine* **2015**, *48*, 183–187.
23. Erdei, E.; Torres, S.M. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2010**, *10*, 1811–1823.
24. Gilchrest, B.A.; Eller, M.S.; Geller, A.C.; Yaar, M. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *New England Journal of Medicine* **1999**, *340*, 1341–1348.
25. Koh, H.K.; Geller, A.C.; Miller, D.R.; Grossbart, T.A.; Lew, R.A. Prevention and Early Detection Strategies for Melanoma and Skin Cancer. *Archives of Dermatology* **1996**, *132*, 436.
26. Day, C.-P.; Marchalik, R.; Merlino, G.; Michael, H. Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance. *Laboratory Investigation* **2017**, *97*, 698–705.
27. Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Cadet, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2001**, *63*, 88–102.
28. Wang, Y.; Zhao, Y.; Ma, S. Racial differences in six major subtypes of melanoma: Descriptive epidemiology. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 691.
29. Hearing, V.J. Determination of Melanin Synthetic Pathways. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, *131*, E8–E11.
30. Brenner, M.; Hearing, V.J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. *Photochemistry and Photobiology* **2008**, *84*, 539–549.
31. Lancaster, H.O. Some geographical aspects of the mortality of melanoma in Europeans. *Medical Journal of Australia* **1956**, *1*, 1082–1087.
32. Tucker, M.A.; Goldstein, A.M. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* **2003**, *22*, 3042–3052.
33. Houghton, A.N.; Polsky, D. Focus on melanoma. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 275–278.
34. Li, W.-Q.; Qureshi, A.A.; Ma, J.; Goldstein, A.M.; Giovannucci, E.L.; Stampfer, M.J.; Han, J. Personal History of Prostate Cancer and Increased Risk of Incident Melanoma in the United States. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, *31*, 4394–4399.
35. Watt, A.J.; Kotsis, S. V.; Chung, K.C. Risk of Melanoma Arising in Large Congenital Melanocytic Nevi: A Systematic Review. *Plastic and Reconstructive Surgery* **2004**, *113*, 1968–1974.
36. Gandini, S.; Sera, F.; Cattaruzza, M.S.; Pasquini, P.; Abeni, D.; Boyle, P.; Melchi, C.F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European Journal of Cancer* **2005**, *41*, 28–44.

37. Bevona, C. Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Archives of Dermatology* **2003**, *139*, 1620.
38. Goldstein, A.M.; Tucker, M.A. Genetic Epidemiology of Cutaneous Melanoma. *Archives of Dermatology* **2001**, *137*, 1493–1496.
39. Ross, M.I.; Gershenwald, J.E. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. *Journal of Surgical Oncology* **2011**, *104*, 341–353.
40. Sandru, A.; Voinea, S.; Panaitescu, E.; Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *Journal of Medicine and Life* **2014**, *7*, 572.
41. Gupta, A.; Gomes, F.; Lorigan, P. The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. *Melanoma Management* **2017**, *4*, 125–136.
42. Balch, C.M.; Gershenwald, J.E.; Soong, S.; Thompson, J.F.; Atkins, M.B.; Byrd, D.R.; Buzaid, A.C.; Cochran, A.J.; Coit, D.G.; Ding, S.; Eggermont, A.M.; Flaherty, K.T.; Gimotty, P.A.; Kirkwood, J.M.; McMasters, K.M.; Mihm, M.C.; Morton, D.L.; Ross, M.I.; Sober, A.J.; Sondak, V.K. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 6199–6206.
43. Ribas, A.; Hamid, O.; Daud, A.; Hodi, F.S.; Wolchok, J.D.; Kefford, R.; Joshua, A.M.; Patnaik, A.; Hwu, W.-J.; Weber, J.S.; Gangadhar, T.C.; Hersey, P.; Dronca, R.; Joseph, R.W.; Zarour, H.; Chmielowski, B.; Lawrence, D.P.; Algazi, A.; Rizvi, N.A.; Hoffner, B.; Mateus, C.; Gergich, K.; Lindia, J.A.; Giannotti, M.; Li, X.N.; Ebbinghaus, S.; Kang, S.P.; Robert, C. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *Journal of American Medical Association* **2016**, *315*, 1600.
44. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A.J.M.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J.M.; Linette, G.P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C.H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J.I.; Wolchok, J.D.; Weber, J.S.; Tian, J.; Yellin, M.J.; Nichol, G.M.; Hoos, A.; Urban, W.J. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 711–723.
45. Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Demidov, L. V.; Jouary, T.; Gutzmer, R.; Millward, M.; Rutkowski, P.; Blank, C.U.; Miller, W.H.; Kaempgen, E.; Martín-Algarra, S.; Karaszewska, B.; Mauch, C.; Chiarion-Sileni, V.; Martin, A.-M.; Swann, S.; Haney, P.; Mirakhur, B.; Guckert, M.E.; Goodman, V.; Chapman, P.B. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* **2012**, *380*, 358–365.
46. McArthur, G.A.; Chapman, P.B.; Robert, C.; Larkin, J.; Haanen, J.B.; Dummer, R.; Ribas, A.; Hogg, D.; Hamid, O.; Ascierto, P.A.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; Lorigan, P.; Lebbé, C.; Jouary, T.; Schadendorf, D.; O'Day, S.J.; Kirkwood, J.M.; Eggermont, A.M.; Dréno, B.; Sosman, J.A.; Flaherty, K.T.; Yin, M.; Caro, I.; Cheng, S.; Trunzer, K.; Hauschild, A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology* **2014**, *15*, 323–332.

47. Long, G. V.; Stroyakovskiy, D.; Gogas, H.; Levchenko, E.; de Braud, F.; Larkin, J.; Garbe, C.; Jouary, T.; Hauschild, A.; Grob, J.-J.; Chiarion-Sileni, V.; Lebbe, C.; Mandalà, M.; Millward, M.; Arance, A.; Bondarenko, I.; Haanen, J.B.A.G.; Hansson, J.; Utikal, J.; Ferraresi, V.; Kovalenko, N.; Mohr, P.; Probachai, V.; Schadendorf, D.; Nathan, P.; Robert, C.; Ribas, A.; DeMarini, D.J.; Irani, J.G.; Swann, S.; Legos, J.J.; Jin, F.; Mookerjee, B.; Flaherty, K. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet* **2015**, *386*, 444–451.
48. Ribas, A.; Puzanov, I.; Dummer, R.; Schadendorf, D.; Hamid, O.; Robert, C.; Hodi, F.S.; Schachter, J.; Pavlick, A.C.; Lewis, K.D.; Cranmer, L.D.; Blank, C.U.; O’Day, S.J.; Ascierto, P.A.; Salama, A.K.S.; Margolin, K.A.; Loquai, C.; Eigentler, T.K.; Gangadhar, T.C.; Carlino, M.S.; Agarwala, S.S.; Moschos, S.J.; Sosman, J.A.; Goldinger, S.M.; Shapira-Frommer, R.; Gonzalez, R.; Kirkwood, J.M.; Wolchok, J.D.; Eggermont, A.; Li, X.N.; Zhou, W.; Zernhelt, A.M.; Lis, J.; Ebbinghaus, S.; Kang, S.P.; Daud, A. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **2015**, *16*, 908–918.
49. Weber, J.S.; D’Angelo, S.P.; Minor, D.; Hodi, F.S.; Gutzmer, R.; Neyns, B.; Hoeller, C.; Khushalani, N.I.; Miller, W.H.; Lao, C.D.; Linette, G.P.; Thomas, L.; Lorigan, P.; Grossmann, K.F.; Hassel, J.C.; Maio, M.; Sznol, M.; Ascierto, P.A.; Mohr, P.; Chmielowski, B.; Bryce, A.; Svane, I.M.; Grob, J.-J.; Krackhardt, A.M.; Horak, C.; Lambert, A.; Yang, A.S.; Larkin, J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2015**, *16*, 375–384.
50. Ascierto, P.A.; McArthur, G.A.; Dréno, B.; Atkinson, V.; Liskay, G.; Di Giacomo, A.M.; Mandalà, M.; Demidov, L.; Stroyakovskiy, D.; Thomas, L.; de la Cruz-Merino, L.; Dutriaux, C.; Garbe, C.; Yan, Y.; Wongchenko, M.; Chang, I.; Hsu, J.J.; Koralek, D.O.; Rooney, I.; Ribas, A.; Larkin, J. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2016**, *17*, 1248–1260.
51. Wilson, L. Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1975**, *253*, 213–231.
52. Parker, A.L.; Kavallaris, M.; McCarroll, J.A. Microtubules and Their Role in Cellular Stress in Cancer. *Frontiers in Oncology* **2014**, *4*, 153.
53. Ludueña, R.F. Are tubulin isotypes functionally significant. *Molecular Biology of the Cell* **1993**, *4*, 445.
54. Downing, K.H.; Nogales, E. Tubulin and microtubule structure. *Current Opinion in Cell Biology* **1998**, *10*, 16–22.
55. Wiese, C.; Zheng, Y. Microtubule nucleation: -tubulin and beyond. *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 4143–4153.
56. Moritz, M.; Braunfeld, M.B.; Sedat, J.W.; Alberts, B.; Agard, D.A. Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* **1995**, *378*, 638–640.
57. Zheng, Y.; Wong, M.L.; Alberts, B.; Mitchison, T. Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* **1995**, *378*, 578–583.
58. Brouhard, G.J.; Rice, L.M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2018**, *19*, 451–463.

59. Desai, A.; Mitchison, T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1997**, *13*, 83–117.
60. Jordan, M.A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* **2004**, *4*, 253–265,.
61. McIntosh, J.R. The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells. *The Journal of Cell Biology* **1971**, *49*, 468–497.
62. Kline-Smith, S.L.; Walczak, C.E. Mitotic Spindle Assembly and Chromosome Segregation. *Molecular Cell* **2004**, *15*, 317–327.
63. Kwon, M.; Scholey, J.M. Spindle mechanics and dynamics during mitosis in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology* **2004**, *14*, 194–205.
64. Hyman, A.A.; Salser, S.; Drechsel, D.N.; Unwin, N.; Mitchison, T.J. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular Biology of the Cell* **1992**, *3*, 1155–1167.
65. Walker, R.A. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology* **1988**, *107*, 1437–1448.
66. Akhmanova, A.; Steinmetz, M.O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2015**, *16*, 711–726.
67. Margolis, R.L.; Wilson, L. Microtubule treadmills—possible molecular machinery. *Nature* **1981**, *293*, 705–711.
68. Kingston, D.G.I. Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents(1). *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 507–515.
69. Barbuti, A.; Chen, Z.-S. Paclitaxel Through the Ages of Anticancer Therapy: Exploring Its Role in Chemoresistance and Radiation Therapy. *Cancers* **2015**, *7*, 2360–2371.
70. Rieder, C.L.; Maiato, H. Stuck in Division or Passing through. *Developmental Cell* **2004**, *7*, 637–651.
71. Panvichian, R.; Orth, K.; Day, M.L.; Day, K.C.; Pilat, M.J.; Pienta, K.J. Paclitaxel-associated Multiminucleation Is Permitted by the Inhibition of Caspase Activation: A Potential Early Step in Drug Resistance. *Cancer Research* **1998**, *58*, 4667–4672.
72. Jordan, M.A.; Wendell, K.; Gardiner, S.; Derry, W.B.; Copp, H.; Wilson, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research* **1996**, *56*, 816–825.
73. Tao, W.; South, V.J.; Zhang, Y.; Davide, J.P.; Farrell, L.; Kohl, N.E.; Sepp-Lorenzino, L.; Lobell, R.B. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 49–59.
74. Chen, J.-G.; Horwitz, S.B. Differential Mitotic Responses to Microtubule-stabilizing and -destabilizing Drugs. *Cancer Research* **2002**, *62*, 1935–1938.
75. Gascoigne, K.E.; Taylor, S.S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science* **2009**, *122*, 2579–2585.
76. Gascoigne, K.E.; Taylor, S.S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 111–122.

77. Weaver, B.A.A.; Cleveland, D.W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 7–12.
78. Torres, K.; Horwitz, S.B. Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer research* **1998**, *58*, 3620–3626.
79. Wang, T.H.; Wang, H.S.; Soong, Y.K. Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* **2000**, *88*, 2619–2628.
80. Sale, S.; Sung, R.; Shen, P.; Yu, K.; Wang, Y.; Duran, G.E.; Kim, J.-H.; Fojo, T.; Oefner, P.J.; Sikic, B.I. Conservation of the class I beta-tubulin gene in human populations and lack of mutations in lung cancers and paclitaxel-resistant ovarian cancers. *Molecular cancer therapeutics* **2002**, *1*, 215–225.
81. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer* **2010**, *10*, 194–204.
82. Martello, L.A.; Verdier-Pinard, P.; Shen, H.-J.; He, L.; Torres, K.; Orr, G.A.; Horwitz, S.B. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. *Cancer research* **2003**, *63*, 1207–1213.
83. Schiff, P.B.; Horwitz, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77*, 1561–1565.
84. Sohail, M.F.; Rehman, M.; Sarwar, H.S.; Naveed, S.; Qureshi, O.S.; Bukhari, N.I.; Hussain, I.; Webster, T.J.; Shahnaz, G. Advancements in the oral delivery of Docetaxel: challenges, current state-of-the-art and future trends. *International Journal of Nanomedicine* **2018**, *13*, 3145–3161.
85. Patel, S.; Hoffman-Censits, J. Cabazitaxel in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: patient selection and special considerations. *OncoTargets and Therapy* **2017**, *10*, 4089–4098.
86. Kundranda, M.; Niu, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug Design, Development and Therapy* **2015**, *9*, 3767.
87. Nogales, E. Structural Insights into Microtubule Function. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, *69*, 277–302.
88. Jordan, M.A.; Toso, R.J.; Thrower, D.; Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90*, 9552–9556.
89. Forli, S. Etoposides: From discovery to clinical trials. *Current topics in medicinal chemistry* **2014**, *14*, 2312–2321.
90. van Vuuren, R.J.; Visagie, M.H.; Theron, A.E.; Joubert, A.M. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **2015**, *76*, 1101–1112.
91. Rogalska, A.; Marczak, A.; Gajek, A.; Szwed, M.; Śliwińska, A.; Drzewoski, J.; Józwiak, Z. Induction of apoptosis in human ovarian cancer cells by new anticancer compounds, etoposide A and B. *Toxicology in Vitro* **2013**, *27*, 239–249.
92. Cortazar, P.; Justice, R.; Johnson, J.; Sridhara, R.; Keegan, P.; Pazdur, R. US Food and Drug Administration Approval Overview in Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2012**, *30*, 1705–1711.
93. Lichota, A.; Gwozdziński, K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 3533.

94. Martino, E.; Casamassima, G.; Castiglione, S.; Cellupica, E.; Pantalone, S.; Papagni, F.; Rui, M.; Siciliano, A.M.; Collina, S. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28*, 2816–2826.
95. Rai, S.S.; Wolff, J. Localization of the Vinblastine-binding Site on β -Tubulin. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 14707–14711.
96. Lin, Z.-Y.; Wu, C.-C.; Chuang, Y.-H.; Chuang, W.-L. Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. *Life Sciences* **2013**, *93*, 323–328.
97. Wu, C.-C.; Lin, Z.-Y.; Kuoc, C.-H.; Chuang, W.-L. Clinically acceptable colchicine concentrations have potential for the palliative treatment of human cholangiocarcinoma. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* **2015**, *31*, 229–234.
98. Pettit, G.R.; Kamano, Y.; Herald, C.L.; Tuinman, A.A.; Boettner, F.E.; Kizu, H.; Schmidt, J.M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K.B.; Bontems, R.J. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 6883–6885.
99. Bai, R.; Petit, G.R.; Hamel, E. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal: Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochemical Pharmacology* **1990**, *39*, 1941–1949.
100. Elnakady, Y.A.; Sasse, F.; Lünsdorf, H.; Reichenbach, H. Disorazol A1, a highly effective antimetabolic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *67*, 927–935.
101. Sasse, F.; Steinmetz, H.; Heil, J.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *The Journal of antibiotics* **2000**, *53*, 879–885.
102. Balasubramanian, R.; Raghavan, B.; Begaye, A.; Sackett, D.L.; Fecik, R.A. Total Synthesis and Biological Evaluation of Tubulysin U, Tubulysin V, and Their Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 238–240.
103. Steinmetz, H.; Glaser, N.; Herdtweck, E.; Sasse, F.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Isolation, Crystal and Solution Structure Determination, and Biosynthesis of Tubulysins—Powerful Inhibitors of Tubulin Polymerization from Myxobacteria. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 4888–4892.
104. Kaur, G.; Hollingshead, M.; Holbeck, S.; Schauer-Vukasinović, V.; Camalier, R.F.; Dömling, A.; Agarwal, S. Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product. *The Biochemical journal* **2006**, *396*, 235–242.
105. Ullrich, A.; Herrmann, J.; Mäüller, R.; Kazmaier, U. Synthesis and Biological Evaluation of Pretubulysin and Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009*, 6367–6378.
106. Khalil, M.W.; Sasse, F.; Lünsdorf, H.; Elnakady, Y.A.; Reichenbach, H. Mechanism of Action of Tubulysin, an Antimetabolic Peptide from Myxobacteria. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 678–683.
107. Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L.A. Total synthesis of tubulysin U and V. *Angewandte Chemie International Ed. English* **2006**, *45*, 7235–7239.

108. Peltier, H.M.; McMahon, J.P.; Patterson, A.W.; Ellman, J.A. The total synthesis of tubulysin D. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16018–16019.
109. Pando, O.; Stark, S.; Denkert, A.; Porzel, A.; Preusentanz, R.; Wessjohann, L.A. The Multiple Multicomponent Approach to Natural Product Mimics: Tubugis, N-Substituted Anticancer Peptides with Picomolar Activity. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 7692–7695.
110. Denkert, A.; Kaluđerović, G.N.; Seliger, B.; Wessjohann, L.A. Tubugi 1 induce destabilization of tubulin polymerization and intrinsic apoptosis in Colo320 colon cell line: in vitro and proteomics study (u pripremi za štampu).
111. Kufka, R.; Rennert, R.; Kaluđerović, G.N.; Weber, L.; Richter, W.; Wessjohann, L.A. Synthesis of a tubugi-1-toxin conjugate by a modulizable disulfide linker system with a neuropeptide Y analogue showing selectivity for hY1R-overexpressing tumor cells. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2019**, *15*, 96–105.
112. Rodeck, U.; Herlyn, M. Characteristics of cultured human melanocytes from different stages of tumor progression. *Cancer treatment and research* **1988**, *43*, 3–16.
113. Liao, W.; Ye, T.; Liu, H. Prognostic Value of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Human Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International* **2019**, *2019*, 1–9.
114. Todaro, G.J. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology* **1963**, *17*, 299–313.
115. Kubista, M.; Akerman, B.; Norden, B. Characterization of Interaction between DNA and 4',6-Diamidino-2-phenylindole by Optical Spectroscopy. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4545–4553.
116. van Engeland, M.; Nieland, L.J.; Ramaekers, F.C.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **1998**, *31*, 1–9.
117. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* **1995**, *184*, 39–51.
118. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics* **1959**, *82*, 70–77.
119. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* **1979**, *95*, 351–358.
120. Ravindranath, V. Animal models and molecular markers for cerebral ischemia-reperfusion injury in brain. *Methods in enzymology* **1994**, *233*, 610–619.
121. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **1951**, *193*, 265–275.
122. Karlsson, J.O.; Ostwald, K.; Kabjorn, C.; Andersson, M. A Method for Protein Assay in Laemmli Buffer. *Analytical Biochemistry* **1994**, *219*, 144–146.
123. Kalechman, Y.; Longo, D.L.; Catane, R.; Shani, A.; Albeck, M.; Sredni, B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (taxol)+AS101 in a murine model of B16 melanoma: Association with ras-dependent signal-transduction pathways. *International Journal of Cancer* **2000**, *86*, 281–288.

124. Granger D, L.; Taintor R, R.; Boockvar K, S.; Hibbs J, B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods in enzymology* **1996**, 268, 8607.
125. Weissman, K.J.; Müller, R. Myxobacterial secondary metabolites: Bioactivities and modes-of-action. *Natural Product Reports* **2010**, 27, 1276–1295.
126. Alves, S.; Neiri, L.; Chaves, S.R.; Vieira, S.; Trindade, D.; Manon, S.; Dominguez, V.; Pintado, B.; Jonckheere, V.; Van Damme, P.; Silva, R.D.; Aldabe, R.; Côrte-Real, M. N-terminal acetylation modulates Bax targeting to mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2018**, 95, 35–42.
127. Mohan, S.; Abdelwahab, S.I.; Kamalidehghan, B.; Syam, S.; May, K.S.; Harmal, N.S.M.; Shafifiyaz, N.; Hadi, A.H.A.; Hashim, N.M.; Rahmani, M.; Taha, M.M.E.; Cheah, S.-C.; Zajmi, A. Involvement of NF- κ B and Bcl2/Bax signaling pathways in the apoptosis of MCF7 cells induced by a xanthone compound Pyranocycloartobiloxanthone A. *Phytomedicine* **2012**, 19, 1007–1015.
128. Gawel, S.; Wardas, M.; Niedworok, E.; Wardas, P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)* **2004**, 57, 453–455.
129. Tyurina, Y.Y.; Serinkan, F.B.; Tyurin, V.A.; Kini, V.; Yalowich, J.C.; Schroit, A.J.; Fadeel, B.; Kagan, V.E. Lipid Antioxidant, Etoposide, Inhibits Phosphatidylserine Externalization and Macrophage Clearance of Apoptotic Cells by Preventing Phosphatidylserine Oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 6056–6064.
130. Thung, P.J. Physiological proteinuria in mice. *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica* **1962**, 10, 248–261.
131. Poljakovic, M.; Persson, K. Urinary tract infection in iNOS-deficient mice with focus on bacterial sensitivity to nitric oxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2003**, 284, F22–F31.
132. Aysan, E.; Sahin, F.; Telci, D.; Yalvac, M.E.; Emre, S.H.; Karaca, C.; Muslumanoglu, M. Body Weight Reducing Effect of Oral Boric Acid Intake. *International Journal of Medical Sciences* **2011**, 8, 653–658.
133. Sorokina, I. V.; Denisenko, T. V.; Imreh, G.; Tyurin-Kuzmin, P.A.; Kaminsky, V.O.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Involvement of autophagy in the outcome of mitotic catastrophe. *Scientific Reports* **2017**, 7, 14571.
134. Curry, C.L.; Reed, L.L.; Broude, E.; Golde, T.E.; Miele, L.; Foreman, K.E. Notch inhibition in Kaposi's sarcoma tumor cells leads to mitotic catastrophe through nuclear factor- B signaling. *Molecular Cancer Therapeutics* **2007**, 6, 1983–1992.
135. Bouchier-Hayes, L.; Green, D.R. Caspase-2: The orphan caspase. *Cell Death and Differentiation* **2012**, 19, 51–57.
136. Mc Gee, M.M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators of inflammation* **2015**, 2015, 146282.
137. Homewood, C.A.; Warhurst, D.C.; Peters, W.; Baggaley, V.C. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature* **1972**, 235, 50–52.
138. Wu, Y.T.; Tan, H.L.; Shui, G.; Bauvy, C.; Huang, Q.; Wenk, M.R.; Ong, C.N.; Codogno, P.; Shen, H.M. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 10850–10861.

139. Yue, Q.-X.; Liu, X.; Guo, D.-A. Microtubule-Binding Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Medica* **2010**, *76*, 1037–1043.
140. Rodriguez-Garcia, A.; Hosseini, S.; Martinez-Chapa, S.O.; Cordell, G.A. Multi-target Activities of Selected Alkaloids and Terpenoids. *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2017**, *14*, 272–279.
141. Pando, O.; Dörner, S.; Preusentanz, R.; Denkert, A.; Porzel, A.; Richter, W.; Wessjohann, L. First Total Synthesis of Tubulysin B. *Organic Letters* **2009**, *11*, 5567–5569.
142. DeCathelineau, A.M.; Henson, P.M. The final step in programmed cell death: Phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays in Biochemistry* **2003**, *39*, 105–117.
143. Birge, R.B.; Boeltz, S.; Kumar, S.; Carlson, J.; Wanderley, J.; Calianese, D.; Barcinski, M.; Brekken, R.A.; Huang, X.; Hutchins, J.T.; Freimark, B.; Empig, C.; Mercer, J.; Schroit, A.J.; Schett, G.; Herrmann, M. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease and cancer. *Cell Death & Differentiation* **2016**, *23*, 962–978.
144. Williamson, P.; Schlegel, R.A. Back and Forth: The regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells (review). *Molecular Membrane Biology* **1994**, *11*, 199–216.
145. Ran, S.; Downes, A.; Thorpe, P.E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Research* **2002**, *62*, 6132–6140.
146. McEvoy, L.; Williamson, P.; Schlegel, R.A. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*, 3311–3315.
147. Nagata, S.; Hanayama, R.; Kawane, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **2010**, *140*, 619–630.
148. Umeda, M.; Emoto, K. Membrane phospholipid dynamics during cytokinesis: regulation of actin filament assembly by redistribution of membrane surface phospholipid. *Chemistry and physics of lipids* **1999**, *101*, 81–91.
149. Feng, M.; Marjon, K.D.; Zhu, F.; Weissman-Tsukamoto, R.; Levett, A.; Sullivan, K.; Kao, K.S.; Markovic, M.; Bump, P.A.; Jackson, H.M.; Choi, T.S.; Chen, J.; Banuelos, A.M.; Liu, J.; Gip, P.; Cheng, L.; Wang, D.; Weissman, I.L. Programmed cell removal by calreticulin in tissue homeostasis and cancer. *Nature communications* **2018**, *9*, 3194.
150. Schcolnik-Cabrera, A.; Oldak, B.; Juárez, M.; Cruz-Rivera, M.; Flisser, A.; Mendlovic, F. Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **2019**, *24*, 245–255.
151. Braig, S.; Wiedmann, R.M.; Liebl, J.; Singer, M.; Kubisch, R.; Schreiner, L.; Abhari, B.A.; Wagner, E.; Kazmaier, U.; Fulda, S.; Vollmar, A.M. Pretubulysin: a new option for the treatment of metastatic cancer. *Cell death & disease* **2014**, *5*, e1001.
152. Kubisch, R.; von Gamm, M.; Braig, S.; Ullrich, A.; Burkhart, J.L.; Colling, L.; Hermann, J.; Scherer, O.; Müller, R.; Werz, O.; Kazmaier, U.; Vollmar, A.M. Simplified Pretubulysin Derivatives and Their Biological Effects on Cancer Cells. *Journal of Natural Products* **2014**, *77*, 536–542.
153. Gordon, S.; Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* **2005**, *5*, 953–964.

154. Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* **2002**, *23*, 549–555.
155. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3*, 23–35.
156. Hagemann, T.; Biswas, S.K.; Lawrence, T.; Sica, A.; Lewis, C.E. Regulation of macrophage function in tumors: The multifaceted role of NF- κ B. *Blood* **2009**, *113*, 3139–3146.
157. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* **2018**, *233*, 6425–6440.
158. Shree, T.; Olson, O.C.; Elie, B.T.; Kester, J.C.; Garfall, A.L.; Simpson, K.; Bell-Mcguinn, K.M.; Zabor, E.C.; Brogi, E.; Joyce, J.A. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes and Development* **2011**, *25*, 2465–2479.
159. Genin, M.; Clement, F.; Fattaccioli, A.; Raes, M.; Michiels, C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 577.
160. Drača, D.; Mijatović, S.; Krajnović, T.; Pristov, J.B.; Đukić, T.; Kaluđerović, G.N.; Wessjohann, L.A.; Maksimović-Ivanić, D. The synthetic tubulysin derivative, tubugi-1, improves the innate immune response by macrophage polarization in addition to its direct cytotoxic effects in a murine melanoma model. *Experimental Cell Research* **2019**, *380*, 159–170.
161. Vallabhapurapu, S.D.; Blanco, V.M.; Sulaiman, M.K.; Vallabhapurapu, S.L.; Chu, Z.; Franco, R.S.; Qi, X. Variation in human cancer cell external phosphatidylserine is regulated by flippase activity and intracellular calcium. *Oncotarget* **2015**, *6*, 34375–34388.
162. Yin, Y.; Huang, X.; Lynn, K.D.; Thorpe, P.E. Phosphatidylserine-Targeting Antibody Induces M1 Macrophage Polarization and Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cell Differentiation. *Cancer Immunology Research* **2013**, *1*, 256–268.
163. Higashiyama, M.; Okami, J.; Maeda, J.; Tokunaga, T.; Fujiwara, A.; Kodama, K.; Imamura, F.; Kobayashi, H. Differences in chemosensitivity between primary and paired metastatic lung cancer tissues: In vitro analysis based on the collagen gel droplet embedded culture drug test (CD-DST). *Journal of thoracic disease* **2012**, *4*, 40–47.
164. Grimm, E.A.; Ellerhorst, J.; Tang, C.-H.; Ekmekcioglu, S. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 133–137.

165. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Antonov, A. V.; Arama, E.; Baehrecke, E.H.; Barlev, N.A.; Bazan, N.G.; Bernassola, F.; Bertrand, M.J.M.; Bianchi, K.; Blagosklonny, M. V.; Blomgren, K.; Borner, C.; Boya, P.; Brenner, C.; Campanella, M.; Candi, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Cecconi, F.; Chan, F.K.M.; Chandel, N.S.; Cheng, E.H.; Chipuk, J.E.; Cidlowski, J.A.; Ciechanover, A.; Cohen, G.M.; Conrad, M.; Cubillos-Ruiz, J.R.; Czabotar, P.E.; D'Angiolella, V.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L.; De Laurenzi, V.; De Maria, R.; Debatin, K.-M.; DeBerardinis, R.J.; Deshmukh, M.; Di Daniele, N.; Di Virgilio, F.; Dixit, V.M.; Dixon, S.J.; Duckett, C.S.; Dynlacht, B.D.; El-Deiry, W.S.; Elrod, J.W.; Fimia, G.M.; Fulda, S.; García-Sáez, A.J.; Garg, A.D.; Garrido, C.; Gavathiotis, E.; Golstein, P.; Gottlieb, E.; Green, D.R.; Greene, L.A.; Gronemeyer, H.; Gross, A.; Hajnoczky, G.; Hardwick, J.M.; Harris, I.S.; Hengartner, M.O.; Hetz, C.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Joseph, B.; Jost, P.J.; Juin, P.P.; Kaiser, W.J.; Karin, M.; Kaufmann, T.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Kitsis, R.N.; Klionsky, D.J.; Knight, R.A.; Kumar, S.; Lee, S.W.; Lemasters, J.J.; Levine, B.; Linkermann, A.; Lipton, S.A.; Lockshin, R.A.; López-Otín, C.; Lowe, S.W.; Luedde, T.; Lugli, E.; MacFarlane, M.; Madeo, F.; Malewicz, M.; Malorni, W.; Manic, G.; Marine, J.-C.; Martin, S.J.; Martinou, J.-C.; Medema, J.P.; Mehlen, P.; Meier, P.; Melino, S.; Miao, E.A.; Molkenkin, J.D.; Moll, U.M.; Muñoz-Pinedo, C.; Nagata, S.; Nuñez, G.; Oberst, A.; Oren, M.; Overholtzer, M.; Pagano, M.; Panaretakis, T.; Pasparakis, M.; Penninger, J.M.; Pereira, D.M.; Pervaiz, S.; Peter, M.E.; Piacentini, M.; Pinton, P.; Prehn, J.H.M.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G.A.; Rehm, M.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C.M.P.; Rubinsztein, D.C.; Rudel, T.; Ryan, K.M.; Sayan, E.; Scorrano, L.; Shao, F.; Shi, Y.; Silke, J.; Simon, H.-U.; Sistigu, A.; Stockwell, B.R.; Strasser, A.; Szabadkai, G.; Tait, S.W.G.; Tang, D.; Tavernarakis, N.; Thorburn, A.; Tsujimoto, Y.; Turk, B.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P.; Vander Heiden, M.G.; Villunger, A.; Virgin, H.W.; Vousden, K.H.; Vucic, D.; Wagner, E.F.; Walczak, H.; Wallach, D.; Wang, Y.; Wells, J.A.; Wood, W.; Yuan, J.; Zakeri, Z.; Zhivotovsky, B.; Zitvogel, L.; Melino, G.; Kroemer, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* **2018**, *25*, 486–541.
166. Vitale, I.; Galluzzi, L.; Castedo, M.; Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**, *12*, 385–392.
167. Castedo, M.; Perfettini, J.-L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R.; Kroemer, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **2004**, *23*, 2825–2837.
168. Mukherjee, A.; Misra, S.; Howlett, N.G.; Karmakar, P. Multinucleation regulated by the Akt/PTEN signaling pathway is a survival strategy for HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2013**, *755*, 135–140.
169. Nakayama, Y.; Uno, N.; Uno, K.; Mizoguchi, Y.; Komoto, S.; Kazuki, Y.; Nanba, E.; Inoue, T.; Oshimura, M. Recurrent Micronucleation through Cell Cycle Progression in the Presence of Microtubule Inhibitors. *Cell Structure and Function* **2015**, *40*, 51–59.
170. Klimaszewska-Wisniewska, A.; Halas-Wisniewska, M.; Tadrowski, T.; Gagat, M.; Grzanka, D.; Grzanka, A. Paclitaxel and the dietary flavonoid fisetin: a synergistic combination that induces mitotic catastrophe and autophagic cell death in A549 non-small cell lung cancer cells. *Cancer cell international* **2016**, *16*, 10.
171. Hochegger, H.; Takeda, S.; Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 910–916.

172. Yoshikawa, R.; Kusunoki, M.; Yanagi, H.; Noda, M.; Furuyama, J.I.; Yamamura, T.; Hashimoto-Tamaoki, T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: A novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Research* **2001**, *61*, 1029–1037.
173. Nickoloff, B.J.; Osborne, B.A.; Miele, L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* **2003**, *22*, 6598–6608.
174. Radtke, F.; Raj, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 756–767.
175. Vitale, I.; Manic, G.; Castedo, M.; Kroemer, G. Caspase 2 in mitotic catastrophe: The terminator of aneuploid and tetraploid cells. *Molecular & Cellular Oncology* **2017**, *4*, e1299274.
176. Paroni, G.; Henderson, C.; Schneider, C.; Brancolini, C. Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 21907–21915.
177. Samraj, A.K.; Sohn, D.; Schulze-Osthoff, K.; Schmitz, I. Loss of Caspase-9 Reveals Its Essential Role for Caspase-2 Activation and Mitochondrial Membrane Depolarization. *Molecular Biology of the Cell* **2007**, *18*, 84–93.
178. Lamkanfi, M.; D'hondt, K.; Vande Walle, L.; van Gorp, M.; Denecker, G.; Demeulemeester, J.; Kalai, M.; Declercq, W.; Saelens, X.; Vandenamee, P. A Novel Caspase-2 Complex Containing TRAF2 and RIP1. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 6923–6932.
179. Aubrey, B.J.; Kelly, G.L.; Janic, A.; Herold, M.J.; Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation* **2018**, *25*, 104–113.
180. Vaseva, A. V.; Moll, U.M. The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2009**, *1787*, 414–420.
181. Terrano, D.T.; Upreti, M.; Chambers, T.C. Cyclin-Dependent Kinase 1-Mediated Bcl-xL/Bcl-2 Phosphorylation Acts as a Functional Link Coupling Mitotic Arrest and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **2010**, *30*, 640–656.
182. Han, C.R.; Jun, D.Y.; Lee, J.Y.; Kim, Y.H. Prometaphase arrest-dependent phosphorylation of Bcl-2 and Bim reduces the association of Bcl-2 with Bak or Bim, provoking Bak activation and mitochondrial apoptosis in nocodazole-treated Jurkat T cells. *Apoptosis* **2014**, *19*, 224–240.
183. Ranjan, A.; Iwakuma, T. Non-canonical cell death induced by p53. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, pii: E2068.
184. Imreh, G.; Norberg, H.V.; Imreh, S.; Zhivotovsky, B. Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger γ H2AX–ATM–p53-mediated apoptosis. *Journal of Cell Science* **2016**, *129*, 1950–1950.
185. Corazzari, M.; Rapino, F.; Ciccocanti, F.; Giglio, P.; Antonioli, M.; Conti, B.; Fimia, G.M.; Lovat, P.E.; Piacentini, M. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death and Differentiation* **2015**, *22*, 946–958.
186. Tiwari, M.; Sharma, L.K.; Vanegas, D.; Callaway, D.A.; Bai, Y.; Lechleiter, J.D.; Herman, B. A nonapoptotic role for CASP2/caspase 2. *Autophagy* **2014**, *10*, 1054–1070.

187. Jeong, H.-S.; Choi, H.Y.; Lee, E.-R.; Kim, J.-H.; Jeon, K.; Lee, H.-J.; Cho, S.-G. Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2011**, *1813*, 80–90.
188. Fulda, S. Autophagy in Cancer Therapy. *Frontiers in oncology* **2017**, *7*, 128.
189. Xi, G.; Hu, X.; Wu, B.; Jiang, H.; Young, C.Y.F.; Pang, Y.; Yuan, H. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Letters* **2011**, *307*, 141–148.
190. Liu, S.; Li, X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel. *International Journal of Oncology* **2015**, *46*, 2399–2408.
191. Wortzel, I.; Seger, R. The ERK cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. *Genes and Cancer* **2011**, *2*, 195–209.
192. Cagnol, S.; Chambard, J.-C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal* **2010**, *277*, 2–21.
193. Rodriguez, A.; Durán, A.; Selloum, M.; Champy, M.-F.; Diez-Guerra, F.J.; Flores, J.M.; Serrano, M.; Auwerx, J.; Diaz-Meco, M.T.; Moscat, J. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metabolism* **2006**, *3*, 211–222.
194. Zhang, X.; Shan, P.; Sasidhar, M.; Chupp, G.L.; Flavell, R.A.; Choi, A.M.K.; Lee, P.J. Reactive Oxygen Species and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediate Hyperoxia-Induced Cell Death in Lung Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2003**, *28*, 305–315.
195. Nowak, G.; Clifton, G.L.; Godwin, M.L.; Bakajsova, D. Activation of ERK1/2 pathway mediates oxidant-induced decreases in mitochondrial function in renal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2006**, *291*, F840–F855.
196. Katayama, K.; Fujita, N.; Tsuruo, T. Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Molecular and cellular biology* **2005**, *25*, 5725–5737.
197. Ruggero, D.; Sonenberg, N. The Akt of translational control. *Oncogene* **2005**, *24*, 7426–7434.
198. Delgoffe, G.M.; Pollizzi, K.N.; Waickman, A.T.; Heikamp, E.; Meyers, D.J.; Horton, M.R.; Xiao, B.; Worley, P.F.; Powell, J.D. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nature Immunology* **2011**, *12*, 295–303.
199. Blommaart, E.F.; Luiken, J.J.; Blommaart, P.J.; van Woerkom, G.M.; Meijer, A.J. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270*, 2320–2326.
200. Dunn, W.A. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology* **1990**, *110*, 1935–1945.
201. Skladanowski, A.; Bozko, P.; Sabisz, M.; Larsen, A.K. Cell Cycle Dual Inhibition of PI3K/Akt Signaling and the DNA Damage Checkpoint in p53-Deficient Cells with Strong Survival Signaling: Implications for Cancer Therapy) Dual Inhibition of PI3K/Akt Signaling and the DNA Damage Checkpoint in p53-Deficient Cells with Strong Survival Signaling: Implications for. *Cancer Therapy, Cell Cycle* **2007**, *6*, 2268–2275.
202. Ma, Y.; Galluzzi, L.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **2013**, *39*, 211–227.

203. Suzuki, T.; Franchi, L.; Toma, C.; Ashida, H.; Ogawa, M.; Yoshikawa, Y.; Mimuro, H.; Inohara, N.; Sasakawa, C.; Nuñez, G. Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathogens* **2007**, *3*, 1082–1091.
204. Denisenko, T. V.; Sorokina, I. V.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken. *Drug Resistance Updates* **2016**, *24*, 1–12.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dijana Drača rođena je 16. maja 1986. godine u Zadru. Školske 2005/2006. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Molekularna biologija i fiziologija. Fakultet je završila u aprilu 2013. godine, sa prosečnom ocenom 8,94 i diplomskim radom pod nazivom „Polimorfizam RAD51 gena 135G>C u sistematskom uzorku žena sa karcinomom dojke u Srbiji“ sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je školske 2013/2014. godine na modulu Molekularna onkologija, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, i položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,27. Od 01.01.2015. godine, Dijana je kao istraživač pripravnik zaposlena na Odeljenju za imunologiju, Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju. Zvanje istraživač saradnik stiče u septembru 2017. godine. Dijana je do danas autor/koautor 10 radova u časopisima međunarodnog značaja, ima tri saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i dva na skupovima nacionalnog značaja. Iz doktorske disertacije proistekla su dva rada, u časopisima M22 i M23 kategorije.