



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марија С. Булић

**Испитивање антитуморских ефеката енона и
њихових соли на хуманим малигним ћелијама
*in vitro***

докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Marija S. Bulić

**Ispitivanje antitumorskih efekata enona i
njihovih soli na humanim malignim
ćelijama *in vitro***

doktorska disertacija

Kragujevac, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marija S. Bulic

**Investigation of the antitumor effect of enones
and their salts on human malignant
cells *in vitro***

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Аутор	
Име и презиме: Марија Булић	
Датум и место рођења: 16.06.1981. Пожега	
Садашње запослење: Центар за медицинску биохемију, Универзитетски клинички центар Србије, Београд	
Докторска дисертација	
Наслов: Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама in vitro	
Број страница: 110	
Број слика: 20 слика, 25 графика, 3 табеле	
Број библиографских података: 388	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу	
Научна област (УДК): Медицинске науке	
Ментор: Проф. др Марија Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу	
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:	
IV-03-383/19 18.06.2025.	

Autor	
Ime i prezime: Marija Bulić	
Datum i mesto rođenja: 16.06.1981. Požega	
Sadašnje zaposlenje: Centar za medicinsku biohemiju, Univerzitetski klinički centra Srbije, Beograd	
Doktorska disertacija	
Naslov: Ispitivanje antitumorskih efekata enona i njihovih soli na humanim malignim ćelijama in vitro	
Broj stranica: 110	
Broj slika: 20 slika, 25 grafika, 3 tabele	
Broj bibliografskih podataka: 388	
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu	
Naučna oblast (UDK): Medicinske nauke	
Mentor: Prof. dr Marija Andelković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu	
Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:	
IV-03-383/19 18.06.2025.	

Author
Name and surname: Marija Bulic
Date and place of birth: 16.06.1981. Pozega
Current employment: Center for Medical Biochemistry, University Clinical Center of Serbia, Belgrade
Doctoral Dissertation
Title: Investigation of the Antitumor Effect of Enones and Their Salts on Human Malignant Cells In Vitro
No. of pages: 110
No. of images: 20 images, 25 graphs, 3 tables
No. of bibliographic data: 388
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medical sciences
Mentor: Prof. dr Marija Andjelkovic, associate pro title, name and surname, position, name of faculty / institute and university professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
IV-03-383/19 18.06.2025.

Мојој мајци....

ЗАХВАЛНИЦА

Желела бих да изразим неизмерну захвалност менторки, проф. др Марији Анђелковић, за свеобухватну помоћ током израде свих фаза ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем проф. др Ивани Николић на смерницама и несебичној стручној помоћи током реализације тезе.

Велико хвала доц. др Сањи Станковић на моралној и стручној подршци.

Дугујем захвалност проф. др Марини Митровић на безрезервној стручној помоћи.

Захвална сам др Јовану Луковићу на помоћи у експерименталном део овог истраживања.

Велико хвала породици, пријатељима и колегама.

.

САЖЕТАК

Увод: Лечење тумора је удружено са проблемом ограничене ефикасности тренутних терапијских протокола. Велики број истраживања усмерен је на синтезу једињења са антитуморским дејством, а значајан број њих потиче од хемијских деривата природних супстанци или њихових модификованих аналога.

Циљ: Главни циљ овог истраживања је *in vitro* испитивање антитуморског дејства новосинтетисаних енона и њихових соли.

Метод: Истраживањем је испитан антитуморски ефекат осам новосинтетисаних супстанци - четири енона и њихових соли на хуманим ћелијским линијама карцинома дебелог црева и грлића материце, као и на здравим ћелијама. Такође је испитан ефекат ових супстанци на контролну групу здравих ћелија. Методологија истраживања обухватила је испитивање цитотоксичног ефекта коришћењем МТТ теста, проточну цитометрију за анализу ћелијског циклуса и апоптозе, као и имунофлуоресцентне технике испитивања молекуларних механизма који индукују ћелијску смрт.

Резултати: Новосинтетисани енони и њихове соли испољавају јачи цитотоксични ефекат на ћелијама карцинома дебелог црева и карцинома грлића материце *in vitro* у поређењу са референтном супстанцом - цисплатином. Ови резултати такође дају важне информације о селективности ових лекова према малигним ћелијама у односу на здраве ћелије, што је од суштинског значаја за развој ефикаснијих и безбеднијих терапеутика. Механизми који стоје у основи цитотоксичног дејства новосинтетисаних енона и њихових соли укључују индукцију апоптозе и њихов утицај на заустављање ћелијског циклуса.

Закључак: Новосинтетисани енони и њихове соли показују значајан цитотоксични ефекат на малигне ћелије *in vitro* и незнатан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама што указује на њихов потенцијал за *in vivo* истраживања.

Кључне речи: енони, соли енона, карцином, цитотоксичност, апоптоза, ћелијски циклус.

ABSTRACT

Introduction: Tumor treatment is associated with with limited efficacy of current therapeutic protocols. A large number of studies is focused on the synthesis of antitumor compounds originating from natural substances or their modified analogues.

Objective: The main objective of this research is to investigate the in vitro antitumor activity of newly synthesized enones and their salts.

Method: The research examined the antitumor effect of eight newly synthesized substances - four enones and their salts - on human colon and cervical cancer and healthy cell lines. The effect of these substances on a control group of healthy cells was also examined. The research methodology included determination of cytotoxic effect of investigated substances using the MTT assay, flow cytometry for cell cycle and apoptosis analysis, as well as immunofluorescence techniques for testing molecular mechanisms that.

Results: Newly synthesized enones and their salts exhibit a stronger cytotoxic effect on colon and cervical cancer cells in vitro compared to referent substance - cisplatin. These results also provide important information about the selectivity of these drugs towards malignant cells over healthy cells, which is essential for the development of more effective and safer therapeutics. The mechanisms underlying the cytotoxic effects of the newly synthesized enones and their salts include the induction of apoptosis and cell cycle arrest.

Conclusion: The newly synthesized enones and their salts show a significant cytotoxic effect on malignant cells in vitro and a slight cytotoxic effect on healthy cells, indicating their potential for in vivo research.

Keywords: enones, enone salts, cancer, cytotoxicity, apoptosis, cell cycle.

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Тумори.....	1
1.1.1. Подела тумора	2
1.2. Карцином колона.....	5
1.2.1. Етиологија карцинома дебелог црева	6
1.2.2. Патофизиологија карцинома колона.....	7
1.2.3. Лечење колоректалног карцинома.....	7
1.3. Карцином грлића материце.....	8
1.3.1. Етиологија карцинома грлића материце.....	9
1.3.2. Патофизиологија карцинома грлића материце.....	9
1.3.3. Лечење карцинома грлића материце.....	10
1.4. Ћелијски циклус.....	11
1.4.1. G1/S фаза ћелијског циклуса	11
1.4.2. G2/M фаза ћелијског циклуса	13
1.5. Програмирана ћелијска смрт	13
1.5.1. Процес апоптозе.....	14
1.5.2. Про и анти-апоптотични протеини – регулаторни протеини процеса апоптозе	14
1.5.3. Каспазе.....	15
1.5.4. Спољашњи (рецепторски) пут апоптозе.....	17
1.5.4. Унутрашњи (митохондријални) пут апоптозе	18
1.6. Природни молекули у терапији карцинома.....	20
1.6.1. Биолошки ефекти биљака	20
1.6.2. Биосинтеза енона и њихових соли.....	21

1.6.3. Општи поступци за синтезу енона E1 и E3.....	23
1.6.4. Општи поступци за синтезу енона E2 и E4.....	24
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	26
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	27
3.1. Врста студије.....	27
3.2. Култивисање ћелија, реагенси и испитиване супстанце.....	27
3.3. МТТ тест цитотоксичности	29
3.4. Морфологија третираних ћелија	29
3.5. Проточна цитометрија - <i>Annexin V-FITC</i> тест апоптотичности	30
3.6. Проточна цитометрија – анализа регулаторних протеина апоптозе - <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> и каспазе-3.....	31
3.7. Флуоресцентна микроскопија – одређивање експресије и локализације цитохрома <i>c</i>	31
3.8. Одређивање промене митохондријалног мембранског потенцијала.....	32
3.9. Ћелијски циклус.....	33
3.10. Статистичка анализа података.....	34
4. РЕЗУЛТАТИ.....	35
4.1. Цитотоксични ефекат енона и соли енона	35
4.2. IC_{50} вредност концентрација енона и соли енона	43
4.3. Индекс селективности	44
4.4. Утицај новосинтетисаних енона и соли енона на морфологију третираних туморских ћелија	44
4.5. Утицај енона и соли енона на апоптозу третираних ћелија	47
4.6 Утицај енона и соли енона на протеине <i>Bax</i> и <i>Bcl-2</i> у туморским ћелијама	54
4.7. Ефекат енона на каспазе у ћелијама <i>HCT-116</i> и <i>HeLa</i>	59
4.8. Утицај енона и соли енона на потенцијал митохондријалне мембране.....	61
4.9. Утицај енона и соли енона на ослобађање цитохрома <i>c</i> из интермембранозног простора у цитоплазму туморских ћелија	65

4.10. Утицај енона и соли енона на ћелијски циклус	71
5. ДИСКУСИЈА	74
6. ЗАКЉУЧАК.....	82
7. ЛИТЕРАТУРА	83

1. УВОД

Лечење тумора често није задовољавајуће с обзиром да актуелни терапијски протоколи некада не обезбеђују задовољавајућу ефикасност. За то постоји више разлога - хетерогеност ћелија тумора представља значајан проблем, јер различите ћелије унутар истог тумора показују варијације у осетљивости на лекове што доводи до парцијалног одговора на терапију и такође повећава ризик од рецидива (1). Још један од разлога незадовољавајуће ефикасности терапије је развој резистенције на лекове која је честа и компромитује дугорочну ефикасност терапије. Мутације или активација алтернативних сигналних путева су механизми путем којих тумори постају резистентни на дејство примењених лекова (2). Осим тога, незадовољавајућа специфичност неке терапије може као резултат имати значајно оштећење здравих ткива и довести до озбиљних нежељених ефеката, смањујући квалитет живота пацијената и ограничавајући дозу лека коју је могуће применити. Микроокружење тумора, које чине имунолошке ћелије, крвни судови и фибробласти, може имати улогу у одржавању и прогресији тумора и представљати додатне препреке за ефикасну терапију (3,4). Проблем су такође и економски аспекти због високе цене нових лекова и ограничења у приступу иновативним терапијама посебно у мање развијеним земљама. Важна тема у онкологији су и етичка питања у вези са клиничким испитивањима и приступ експерименталним терапијама.

Један од најзначајних фокуса савремене науке односи се на синтезу једињења која могу деловати као антитуморски (5–8) и антиинфламаторни агенси (9–11). Велики број ових потенцијалних терапеутских једињења су хемијски деривати природних супстанци или њихових модификованих аналога, што указује на важност природе као извора биолошки активних једињења (12–15). Истраживања показују да се интензитет антитуморских, антиинфламаторних и антимикотичних ефеката природних једињења може потенцирати увођењем одређених функционалних група у њихову структуру (16). Ова модификација често резултира значајним побољшањем биолошке активности, што омогућава добијање ефикаснијих лекова. Истраживање таквих једињења осим што помаже у развоју нових лекова доприноси и бољем познавању механизма деловања различитих биолошки активних супстанци. То је разлог да су синтеза и модификација природних једињења изузетно битан корак у проналажењу нових лекова са побољшаним терапеутским својствима.

1.1. Тумори

Тумор, у ширем смислу, представља сваки оток или израслину, а назив води порекло од латинске речи "*tumor*", што значи отеклина. Тумор је, у ствари, било какво локално увећање волумена ткива, неvezано за механизам који је довео до таквог увећања. Само увећање може бити последица различитих процеса – инфекције, упале или акумулације течности. Међутим, у ужем смислу, под термином тумор подразумева се неоплазма. Назив неоплазма потиче од грчких речи "*νέο-*" (*neo-*), која значи "ново", и "*πλάσμα*" (*plasma*), која значи "формирање" или "креација" (17). Неоплазма је специфичан процес где долази до абнормалне акумулације ткива, као последица неконтролисаног и нерегулисаног раста ћелија. То значи да настанак тумора претпоставља неопластични раст једне врсте ткива, што указује на патолошки процес. Тумор није само аномалија у расту ткива, већ и раст који измиче нормалним регулационим механизмима и нема

никакву корисну сврху у организму. Туморогенеза је аутономан процес јер тумор расте независно од потреба и сигнала којима је регулисан нормалан раст и функција здравих ткива.

Основне карактеристике тумора које одређују њихово понашање као и утицај на организам су (15):

1. Туморске ћелије су независне од нормалних физиолошких система организма, који су иначе задужени за контролу раста и функције ћелија. То значи да туморске ћелије расту и деле се без обзира на сигнале који регулишу те процесе у здравим ћелијама, чинећи их неконтролисаним и самосталним.
2. Туморске ћелије имају особине паразита - стварају однос у коме живе на рачун организма у коме настају. Оне користе ресурсе домаћина, кисеоник и хранљиве материје, чиме га исцрпљују доводећи до слабљења организма. Туморске ћелије не само да користе организам у коме су формиране, већ и стварају токсичне продукте који оштећују здраве ћелије.
3. Туморске ћелије немају никакву корисну улогу у организму. Шта више, оне су штетне и могу узроковати озбиљне последице по организам у коме су настале.
4. Док нормалне ћелије међусобно сарађују у формирању ткива и органа са специфичним функцијама, туморске ћелије не формирају нове, функционалне органе или ткива. Њихов раст је хаотичан, што доводи до дезорганизације структуре ткива у коме су присутне. Све то ремети нормалне функције захваћеног органа или ткива чиме настају озбиљне здравствене компликације.

Због ових одлика туморских ћелија веома је значајно лечити туморе, што је повезано са бројним проблемима баш због карактеристика туморских ћелија.

1.1.1. Подела тумора

Класификација тумора је важна због познавања њихове биологије, прогнозе и одговора на терапију. Тумори се могу класификовати према различитим критеријумима – на основу хистопатолошких, молекуларних и клиничких карактеристика. Основна подела тумора је на бенигне и малигне, где су бенигни тумори они који имају ограничен раст и не метастазирају, док малигни тумори имају потенцијал инвазије и метастазирања (18).

Хистопатолошка класификација се заснива на типу ћелија и ткива из којих тумори потичу. На пример, карциноми воде порекло из епителних ћелија, саркоми из мезенхималних ткива, а леукемије и лимфоми настају из хематопоеетских ћелија. Ова класификација је од помоћи у предикцији биолошког понашања тумора и избора терапије (15).

Молекуларна класификација тумора се заснива на генетским и епигенетским изменама које карактеришу различите типове тумора. То омогућава прецизнију идентификацију терапеутских циљева и развој персонализоване терапије. Тако на пример, тумори дојке се деле на подтипове као што су HER2-позитивни, хормонски рецептор-позитивни и троструко негативни, од којих сваки има специфичне терапијске импликације (1).

Клиничка класификација тумора подразумева стадирање и одређивање степена диференцијације. Стадирање тумора се обично врши према TNM систему, који је заснован на процени величине примарног тумора (T), присуству регионалних лимфних чворова (N) и присуству удаљених метастаза (M). Степен диференцијације говори о томе колико ћелије тумора личе на нормалне ћелије ткива од ког потичу, и то представља важан прогностички фактор (19).

На основу врсте ткива у којима су се канцерогене промене догодиле, може се говорити о карциномима, лимфомима, леукемијама, саркомима и мешовитим врстама канцера.

Карциноми су тип малигних тумора који се формирају из епителних ћелија које облажу како унутрашње тако и спољашње површине тела и органа. Ове ћелије образују епително ткиво, које обавља разне функције као што су заштита, секреција и апсорпција. За настанак карцинома није одговоран један етиолошки фактор него се ради о болести чијем настанку доприносе различити чиниоци. Неки од познатих фактора који се доводе у везу са настанком карцинома су исхрана и начин живота, зрачење, изложеност вирусима и хормонски фактори (19–21). Карциноми су најчешћи тип малигних болести код људи и имају бројне подтипове, у зависности од органа или ткива у којима се развијају. Постоје две основне врсте карцинома - аденокарциноми и сквамозни карциноми.

Аденокарциноми воде порекло од жлезданих епителних ћелија и често се јављају у органима као што су дојка, простата, дебело црево и плућа. С друге стране, сквамозни карциноми се формирају из сквамозних епителних ћелија које облажу површине као што су плућа, једњак и кожа. Трећа врста карцинома су карциноми прелазних ћелија - врсте епителних ћелија које облажу делове бубрега, уретре и мокраћне бешике.

Механизми карциногенезе укључују генетске мутације које резултирају неконтролисаним растом и пролиферацијом ћелија. Ове мутације се могу десити због изложености различитим канцерогенима – хемикалијама, зрачењу и вирусима, али такође могу бити и наследне. Генетске промене које су одговорне за развој карцинома често обухватају онкогене и тумор супресорске гене, којима су регулисани ћелијски циклус, апоптоза и поправка ДНК (20).

Карциноми имају особину да расту инвазивно и шире се на друга ткива и органе путем крвотока или лимфотока. Овај процес метастазирања представља главни узрок смртности код тих пацијената и главни разлог који компликује лечење и смањују шансе за излечење.

У лечењу карцинома примењује се хируршко уклањање тумора, хемотерапија, зрачна терапија и циљана терапија. Сазнања у истраживању молекуларних механизма карциногенезе резултирала су развојем персонализоване терапије, која циља специфичне мутације и биолошке путеве у ћелијама тумора (22–24).

Лимфоми су хематолошки малигнитети који захватају лимфоците, главне ћелије имунског система (25). Ова врста малигних болести почиње у лимфном систему, кога чине лимфни чворови, слезина, тимус и костна срж. Лимфоми се деле на две главне категорије - Хочкинов лимфом и не-Хочкинов лимфом, на основу специфичних карактеристика ћелија које их чине и на основу њиховог понашања.

Хочкинов лимфом је први пут описао Томас Хочкин у 19. веку, а карактеристичан је по присуству Рид-Штернбергових ћелија, које су абнормалне, велике лимфоцитне ћелије (26,27). Ова врста лимфома је генерално ретка и показује тенденцију ширења на организован начин од једног до другог лимфног чвора. Захваљујући напретку у терапији, Хочкинов лимфом је један од најбоље излечивих малигнитета, са високом стопом преживљавања.

Не-Хочкинов лимфом (НХЛ) је хетерогена група малигних болести са више од 60 различитих подтипова. Они могу потицати из било које врсте лимфоцита, укључујући Б лимфоците и Т лимфоците, а могу се јавити у било ком делу тела, лимфним чворовима, костној сржи и другим органима (28). НХЛ се међусобно разликују у клиничкој презентацији, патолошким карактеристикама и одговору на терапију, због чега је наглашена потреба за специфичним и персонализованим приступом у дијагностици и

лечењу. Етиолошки фактори ове болести су генетски фактори, имунолошки поремећаји и изложеност инфекцијама, као што су вируси Епштајн-Бар и ХИВ.

Лечење лимфома зависи од типа, стадијума и агресивности болести и обухвата хемотерапију, радиотерапију, имунотерапију и трансплантацију матичних ћелија (26,28–30).

Леукемије су хематолошке малигне болести које карактерише неконтролисана пролиферација абнормалних леукоцита у костној сржи и периферној крви. У зависности од типа ћелија које су захваћене и брзине прогресије болести, леукемија може бити миелоидна или лимфоидна, односно акутна или хронична (31).

Акутне леукемије одликује брзи раст незрелих крвних ћелија, које су познате као бласт ћелије. Ова болест захтева хитно лечење због агресивне природе. Акутна миелоидна леукемија (AML) и акутна лимфобластна леукемија (ALL) су два главна типа акутних леукемија. AML води порекло од миелоидних прекурсора и може се јавити и код одраслих и код деце, док ALL води порекло од лимфоидних прекурсора и најчешће се јавља у дечијем узрасту.

За хроничне леукемије је карактеристичан спорији раст и пролиферација зрелијих крвних ћелија. Хронична миелоидна леукемија (CML) и хронична лимфоцитна леукемија (CLL) су главне врсте хроничних леукемија. CML се карактерише специфичном генетском аберацијом познатом као Филадельфијски хромозом, који води до настанка хибридног гена BCR-ABL и конститутивне тирозин киназне активности. Код хроничне лимфоцитне леукемије, с друге стране, карактеристична је акумулација зрелијих, али функционално дефицијентних лимфоцита и обично се виђа код старијих особа (32,33).

Етиолошки фактори леукемија су генетски фактори, изложеност неким хемикалијама, зрачењу и неким вирусним инфекцијама. Дијагноза леукемије се поставља помоћу клиничких, хематолошких и молекуларних метода, укључујући комплетну крвну слику, биопсију костне сржи и цитогенетске анализе. Лечење зависи од типа и стадијума болести и може подразумевати хемотерапију, радиотерапију, имунотерапију и трансплантацију хематопоетских матичних ћелија. Прогноза леукемије зависи од више фактора као што су старост пацијента, специфичне генетске промене и одговор на терапију. Истраживања у области леукемије откривају нове молекуларне циљеве захваљујући чему су уведене нове терапијске могућности као што су примена инхибитора тирозин киназе, моноклонална антитела и генска терапија (33–35).

Саркоми су врста малигних тумора који воде порекло из мезенхималних ткива, попут костију, мишића, масног ткива, крвних судова и везивног ткива. Ова група малигних болести је ретка у односу на карциноме, али је значајна јер су у питању болести агресивне природе и великог потенцијала за инвазиван раст и метастазирање (36).

Саркоми су подељени на две главне групе - костне саркоме и саркоме меких ткива. Костни саркоми се даље деле на, остеосаркоме који се најчешће виђају код деце и младих особа и обично се јављају у дугим костима као што су фемур и тибија и Евингов сарком који се углавном јавља код младих и карактерише се специфичним генетским транслокацијама. Саркоми меких ткива обухватају већу групу тумора који настају у мишићима, масном ткиву, нервима, и фиброзним ткивима. Најчешћа врста су липосаркоми, који потичу из масног ткива, лејомиосаркоме, који настају из глатких мишића и рабдомиосаркоме, који настају из попречно-пругастих мишића и чести су у дечијем узрасту (37).

Познати етиолошки фактори који се везују за настанак саркома су генетски, укључујући наследне синдроме, нпр. Ли-Фраумени синдром и наследни ретинобластом. Изложеност зрачењу и неким хемикалијама такође може повећати ризик од појаве

саркома. Иако је учињен напредак у лечењу у односу на ранији период, саркоми и даље представљају велики проблем због своје хетерогености и агресивне природе (38–40).

Мешовити типови карцинома су хетерогена група малигних болести за које је карактеристично да садрже компоненте више од једног типа ћелија или ткива. Ови тумори се могу формирати из различитих ћелијских линија унутар истог тумора, али и као последица дивергентне диференцијације једне примарне ћелије. Мешовити карциноми имају комплексну биологију и варијабилно клиничко испољавање (41).

Један од најпознатијих представника мешовитих типова тумора јесте мешовити малигни Милеров тумор (карциносарком), који се најчешће развија у материци. Овај тумор има и карциноматозну (епителну) и саркоматозну (мезенхималну) компоненту, што указује да има двоструку природу. Карциносаркоми показују тенденцију агресивног понашања и често метастазирају. Тератоми су следећи пример мешовитих тумора који се обично појављују у јајницима или тестисима. У њима су присутне ћелије из сва три герминативна слоја: ектодерма, мезодерма и ендодерма. Тератоми могу бити како бенигни тако и малигни, а њихова сложена хистолошка структура захтева прецизну патолошку процену како би била одређена адекватна терапија. Мешовити тумори плувачних жлезда, чији је пример плеоморфни аденом, садрже комбинацију епителних и мезенхималних компоненти. Они су обично бенигних карактеристика, али у ретким случајевима могу претрпети малигну трансформацију, када је неопходно хируршко лечење (42).

Етиолошки фактори повезани са мешовитим туморима су генетски и молекуларни механизми који воде до различитих путева диференцијације и туморогенезе. За лечење ове врсте тумора карактеристичан је персонализован приступ захваљујући истраживањима у молекуларној биологији и генетским истраживањима (41–43).

1.2. Карцином колона

Дебело црево се састоји од десног колона (цекум, узлазно дебело црево и десне 2/3 попречног колона) и левог колона (лева трећина попречног дебелог црева, силазно дебело црево и сигмоидни колон). Дебело црево је васкуларизовано највећим делом из мезентеричне артерије, вене прате истоимене артерије, а лимфна мрежа се дренира преко регионалних лимфних чворова. Дебело црево је инервисано од стране вагуса и карличних нерава. Главна функција десне половине дебелог црева је апсорпција воде и неких хранљивих материја, а главна улога левог колона представља складиштење и излучивање фецеса. Дебело црево има и улогу у лучењу гастроинтестиналних хормона и алкалне течности.

Колоректални карцином је трећа најчешћа дијагноза и трећи по реду узрок смрти од малигних болести код оба пола у целом свету (44). У Србији је ова болест на другом месту по учесталости малигнитета и код мушкараца (после карцинома плућа) и код жена (после карцинома дојке), док је по морталитету на трећем месту код оба пола укупно (45). У западним земљама стопе инциденце карцинома дебелог црева су се смањивале највише захваљујући широкој примени колоноскопије као скрининга. Учесталост ове болести је у порасту међу млађим одраслим особама (43,46). Према месту настанка, карцином ректума чини 49,66%, карцином дебелог црева 49,09%, а обе локације заједно чине 1,25%. Карцином дебелог црева најчешће је локализован у сигмоидном цреву (55,0%), следи узлазно дебело црево (23,3%), попречни колон (8,5%), силазно дебело црево (8,1%), цекум (8,0%) и место укрштања дебелог црева. (2,1%) (47).

Већина карцинома дебелог црева се јавља спорадично, а око пет процената свих случајева се јавља због наследне генетске мутације, углавном због Линчевог синдрома (*Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer - HNPCC*) и породичне аденоматозне полипозе (*Familial Adenomatous Polyposis - FAP*). Трансформација нормалног епитела дебелог црева у инвазивни карцином обично захтева неколико година и углавном прати секвенцу коју одликује акумулација генетских мутација, формирање аденома и следствена карциногенеза (секвенца аденом-карцином) (48,49). За неке карциноме карактеристични су алтернативни путеви, као што су они који укључују поправку неусклађености ДНК (*Mismatch Repair - MMR*) и *BRAF* ген (50).

Скрининг карцинома дебелог црева најчешће се врши прегледом фецеса на окултно крварење. Водичи за почетак и праћење скрининга разликују се у различитим деловима света (51,52). Постављање дијагнозе карцинома дебелог црева обухвата биопсију ткива, обично добијену колоноскопијом. Битно је све новодијагностиковане карциноме дебелог црева тестирати на уобичајене генетске мутације, урадити комплетну колоноскопију и одређивање карциноембрионалног антигена (CEA) (53–57).

1.2.1. Етиологија карцинома дебелог црева

Већина карцинома дебелог црева, око 70% се јавља спорадично, док су стања као на пример наследне мутације гена (на пример *HNPCC* и *FAP*) присутне код око 3-5% пацијената. Код око 20-25% случајева региструје се породична историја карцинома дебелог црева, али без пронађених наслеђених мутација (58–60).

Постоји више познатих фактора ризика за развој карцинома дебелог црева:

- Старост - просечна старост у моменту дијагнозе спорадичног карцинома колоне је преко 65 година (56)
- Породична историја – у породицама у којима постоји карцином дебелог црева повећана је вероватноћа обољења код осталих чланова (60)
- Наслеђене мутације гена - *HNPCC*, *FAP* и *Peutz-Jegher* полипоза су идентификована генетска стања за која је познато да повећавају ризик од карцинома дебелог црева код особа које су њихови носиоци (58)
- Присуство аденома на скрининг колоноскопији, нарочито вилозних и сесилних назубљених полипа повећава ризик од развоја карцинома (61)
- Историја инфламаторне болести црева – познато је да код улцерозног колитиса у првих 10 до 20 година од дијагнозе карцином колоне има инциденцу од 0,5% годишње, са повећањем на 1% годишње након тог периода. У случају Кронове болести ризик од карцинома је повећан ако је захваћен илеоколични регион (62–64)
- Животни стил и фактори околине – пушење, конзумација алкохола, гојазност, инсулинска резистенција, исхрана богата прерађеним црвеним месом, претходно зрачење и имunosупресија повећавају ризик од карцинома дебелог црева (65–69).

Постоји више начина превенције развоја карцинома дебелог црева који су идентификовани у опсежним популационим студијама (70,71):

- Физичка активност
- Исхрана са високим садржајем влакана, воћем, поврћем, отпорним скробом и рибом

- Коришћење суплемената – фолна киселина, пиридоксин, калцијум, витамин Д и магнезијум
- Кафа
- Бели лук
- Лекови, нарочито нестероидни антиинфламаторни лекови, аспирин, хормонска супституциона терапија у менопаузи, бисфосфонати, статини, и инхибитори ангиотензина.

1.2.2. Патофизиологија карцинома колона

За преображај нормалног епитела дебелог црева у дисплазију потребне су генетске промене које се временом акумулирају, што за последицу има развој карцинома (72). Постоје три главна генетска пута развоја карцинома дебелог црева - Mismatch repair (MMR), хромозомска нестабилност (Chromosomal Instability, CIN) и CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) (50,73). Ови путеви не искључују један другог већ се у значајној мери преклапају.

За CIN пут је карактеристична класична секвенца аденом-карцином, код ње су присутне појачане мутације, што нарушава равнотежу између онкогена и туморских супресора. Најчешће су мутације APC, KRAS и TP53. APC мутације су веома често узрок карциногенезе и јављају се код око 60% случајева пацијената са карциномом дебелог црева. У нормалним околностима APC се везује за β -катенин и контролише *Bnt*-сигнални пут. APC мутације узрокују аберације на овом путу, и тако ремете раст, апоптозу и диференцијацију ћелија. KRAS и BRAF мутације се такође виђају у CIN туморима, мада нису искључиве за овај пут (74).

MMR се одликује мутацијама гена MLH1, MSH2, MSH6 или PMS2, што за последицу има акумулацију грешака у репликацији ДНК (75). У узорцима ткива региструје се нестабилност микросателита, нуспродукт MMR. Ове мутације су карактеристичне за HNPCC. Међутим, познато је да већина тумора са високом нестабилношћу микросателита (MSI-high) представља спорадичне случајеве. MSI-high лезије се често јављају у десној половини дебелог црева, хистолошки су слабо диференцирани или муцинозни и релативно су отпорне на терапију 5-FU. Ови малигнитети су осетљивији на имунотерапију у односу на микросателит стабилне туморе (76).

CIMP пут је присутан код око 15% карцинома дебелог црева и за њега је карактеристична хиперметилација CpG острва. Тумори удружени са CIMP-ом се обично јављају у назубљеним полипима, а не класичним аденомима и чести су случајеви повезани са KRAS и BRAF мутацијама. Када се посматра са MSI, прогноза је значајно повољнија од хиперметилованих тумора без MSI-high нивоа (76).

1.2.3. Лечење колоректалног карцинома

Лечење карцинома дебелог црева најчешће се заснива на хируршкој интервенцији коју прате хемотерапија, радиотерапија, имунотерапија, молекуларно циљана терапија (77–79). Према постојећим истраживањима петогодишња стопа преживљавања пацијената са раним карциномом дебелог црева који су лечени хируршки, већа је од 90% (78), због чега је операција основа лечења колоректалног карцинома. Код пацијената са туморима који су иницијално иноперабилни као и код неких пацијената са метастатском

болешћу, хируршко лечење се разматра након неoadјувантне хемотерапије. Хируршке методе могу да се деле на радикалне и палијативне.

Хемотерапија колоректалног карцинома углавном подразумева неoadјувантну хемотерапију, адјувантну хемотерапију након радикалне хируршке интервенције и палијативну хемотерапију (80). Неоадјувантна хемотерапија се често комбинује са радиотерапијом у циљу смањења клиничког стадијума тумора и превођења тумора у операбилно стање. Тиме се побољшава квалитет живота пацијената, а осим тога смањују се постоперативни рецидиви. Адјувантном хемотерапијом елиминишу се преостале туморске ћелије након радикалне хируршке интервенције. Циљ палијативне хемотерапије је побољшање квалитета живота пацијената и продужење времена преживљавања код случајева са узнапредовалим колоректалним карциномом.

Лекови који се најчешће користе као хемотерапија код пацијената са карциномом дебелог црева су флуороурацил, оксалиплатин, иринотекан, и ралтитрексед. Ови лекови се често комбинују, а најчешће коришћени протоколи комбиноване хемотерапије су (80):

- FOLFOX - леуковорин, 5-FU, оксиплатина
- FOLFIRI - леуковорин, 5-FU, иринотекан
- CAPEOKS - скапецитабин и оксиплатина
- FOLFOXIRI - леуковорин, 5-FU, оксиплатина, иринотекан

Клиничка испитивања нових лекова су битна за побољшање исхода лечења.

1.3. Карцином грлића материце

Грлић материце или цервикс представља доњи део материце који повезује шупљину материце са вагином. Анатомијски посматрано, грлић материце чине ендцервикс и ектоцервикс или егзоцервикс. Ендцервикс чини унутрашњи део грлића који се простире од унутрашњег отвора утеруса (*os uteri internum*) до спољашњег отвора утеруса (*os uteri externum*). Ектоцервикс је спољашњи део који се наставља у вагиналну шупљину.

Грлић материце је цилиндричног облика и дугачак је око 2.5 до 3cm. Основна функција је да повеже материцу и вагину чиме омогућава пролаз сперматозоида у материцу, као и пролаз фетуса из материце при порођају.

Епител грлића материце има два слоја. Ендцервикални канал има једнослојни цилиндрични епител који садржи мукозне жлезде чији је секрет цервикална слуз. Егзоцервикс има вишеслојни плочасти епител који је сличан вагиналном епителу, а служи за заштиту од механичких утицаја и инфекција (81).

Прелазна зона између ова два типа епитела је зона трансформације. Она има велики клинички значај пошто је подложна метапластичним променама и управо на њој најчешће настају преанцерозне и канцерозне лезије. Због тога цитолошки прегледи, као што је Папаниколау тест, циљају ову зону због ране детекције абнормалних ћелија које могу указивати на ризик од развоја цервикалног карцинома или пак на његово присуство. Васкуларизацију грлића материце обезбеђују гране *a. uterinae*, а венска крв се одводи у утерусни венски плексус. Лимфни судови цервикса одводе лимфу у параметријалне, обтураторне и хипогастричне лимфне чворове, што је важно за ширење малигних ћелија у случају цервикалног карцинома. Грлић материце је углавном инервисан симпатичким и парасимпатичким нервним влакнима која су део хипогастричног плексуса и имају улогу у регулисању мишићног тонуса и осетљивости на бол (81).

Карцином грлића материце је четврти по учесталости карцином код жена, са око 660 000 нових случајева у 2022. Исте године, било је 350 000 смртних случајева због карцинома грлића материце, од којих је 94% случајева забележено у земљама са ниским и средњим приходима (82). Највеће стопе инциденце и морталитета од карцинома цервикса присутне се у подсахарској Африци, Централној Америци и југоисточној Азији. У Србији је карцином грлића материце, исто као и у свету на четвртом месту по учесталости код жена (5,3% свих малигнитета), а на петом месту по смртности (4.7% морталитета од свих малигних болести) (83). Разлози за постојање регионалних разлика у оболевању од карцинома грлића материце су последица разлика у доступности вакцина, скринингу и лечењу, затим факторима ризика као што је преваленца ХИВ-а и друштвеним и економским одредницама као што је сиромаштво.

Жене заражене вирусом ХИВ имају шест пута већи ризик да развију карцином грлића материце у односу на општу популацију, а процењује се да се око 5% свих случајева карцинома грлића материце може приписати ХИВ-у (84). Карцином грлића материце се често јавља у млађој животној доби, и као резултат тога, 20% деце која су изгубила мајку због карцинома као узрок има управо карцином грлића материце (85).

1.3.1. Етиологија карцинома грлића материце

Инфекција хуманим папилома вирусом (*Human papillomavirus – HPV*) је главни етиолошки фактор за карцином грлића материце. Карцином грлића материце је малигни епителијални тумор настао трансформацијом здравог епитела грлића преко нискоградусне (*low grade*) до вискоградусне (*high grade*) интраепителне лезије (80,86,87). Идентификовано је више од 130 типова *HPV-a*, од којих 20 типова *HPV* може бити узрок карцинома грлића материце. *HPV* типови 16 и 18 су најчешће нађени *HPV* у инвазивном карциному грлића материце. Познати подаци о преваленци инфекције *HPV* код жена указују да 12% жена у свету има детектабилну *HPV* инфекцију са разликама у између региона света, као и старосној расподели старости (88,89).

Постојећи подаци указују на то да велики број сексуално активних мушкараца у неком тренутку, а најчешће на почетку ступања у сексуалну активност дође у контакт са *HPV*. Велика метаанализа која је обухватила 65 студија и 44 769 мушкараца, показује да преваленца инфекције свим типовима *HPV* износи 31%, при чему преваленца инфекције високоризичним типовима износи 21% и највиша је у млађој популацији, између 25 и 29 година, а морталитет од карцинома грлића материце достиже врхунац код жена између 40 и 50 година старости (82).

HPV се преноси непосредним контактом слузокожа током сексуалног односа, оралног секса и контакта од руке до гениталија. Фактори ризика за *HPV* инфекцију и карцином грлића материце су рано ступање у сексуалне контакте, већи број сексуалних партнера, пушење, херпес симплекс инфекција, *HIV* и друге гениталне инфекције, а такође и употреба оралних контрацептива (90).

1.3.2. Патофизиологија карцинома грлића материце

Највећи број случајева карцинома грлића материце, њих око 75% је узроковано инфекцијом високоризичним типовима *HPV16* и *HPV18*. Остали типови *HPV* такође могу изазвати малигну трансформацију, али са мањим ризиком. Неки нискоризични типови

HPV, посебно типови *HPV6* и *HPV11*, изазивају акуминатне кондиломе, које се обично зову аногениталне брадавице (91–93).

Онкопротеини Е6 и Е7 који су кодирани од стране ДНК *HPV* делују тако што ометају ћелијски циклус домаћина, на тај начин што Е6 интерферира са супресивним туморским протеином *p53*, док Е7 ремети протеин ретинобластома (*pRB*). Значајно је и то да протеин Е5 има улогу у избегавању имунитета домаћина. Ово су важни фактори неоплазије повезани са инфекцијом *HPV*, укључујући примарни карцином вагине (92). Сматра се да оксидативни стрес и микроРНК такође имају улогу у карциногенези у случају грлића материце (94,95).

1.3.3. Лечење карцинома грлића материце

Најважнију улогу у паду оболевања од карцинома грлића материце има вакцинација против *HPV*. Међутим, у мање развијеним земљама, где је обухваћеност вакцинацијом само 1%, инциденца је још увек висока (96). На располагању је више врста *HPV* вакцина: 9-валентна *HPV* вакцина (*Gardasil 9*), четворовалентна *HPV* вакцина (*Gardasil*) и бивалентна *HPV* вакцина (*Cervarix*). Клиничка испитивања којима је обухваћено више од 15 000 жена и мушкараца за *Gardasil 9*, више од 30 000 за *Cervarix* и преко 29 000 за *Gardasil* су показала њихову безбедност (97,98).

HPV 6 и *HPV 11* који су најчешћи узрочници гениталних брадавица и рекурентне респираторне папиломатозе, као и *HPV 16/18*, могу се спречити помоћу четворовалентне *Gardasil* вакцине, коју производи *Merck and Co., Inc.* Два високоризична типа *HPV 16/18*, могуће је спречити бивалентном вакцином *Cervarix*, коју производи *GlaxoSmithKline Biologicals*. Деватовалентна *Gardasil* вакцина штити од следећих девет типова вируса - *HPV 6/11/16/18/31/33/45/52/58* који заједно чине 90% узрочника карцинома грлића материце у свету (99,100).

Код жена млађих од 25 година преканцерозне лезије се лече конзервативно. Већина позитивних налаза код тих пацијенткиња су нискоризична цервикална дисплазија која се повлачи спонтано. За третман преканцерозних лезија ограничених по величини и дубини користе се ексцизија или криотерапија. Конизација, ласер или процедура електрохируршке ексцизије петље (*Loop Electrosurgical Excision Procedure LEEP*) се користе за лечење лезија које су опсежније и захватају и ендоцервикални канал. Ако се дијагностикује инвазивни облик карцинома, врши се градирање тумора у циљу планирања даљег лечења. Оцењивање је заснивано на величини и дубини захваћеног ткива као и знацима ширења на друге органе. У раној фази болести типично лечење је хируршка ресекција - од конизације до модификоване радикалне хистеректомије. Међутим, пацијенткињама код којих је присутан високоризични хистопатолошки налаз може бити неопходна адјувантна хемотерапија и зрачење. За пацијенткиње са узнапредовалим обликом болести, истовремена хемотерапија и зрачна терапија су стандардни третман (101,102).

Најчешће примењивани хемотерапијски лекови у лечењу карцинома грлића материце су цисплатина, карбоплатина, паклитаксел и топотекан.

Цисплатина је често први избор пошто има доказану ефикасност у комбинацији са радиотерапијом (конкомитантна хеморадиотерапија), што је сада стандардни третман за болест која је локално узнапредовала. Цисплатина делује као алкилирајући агенс, формира ДНК адукте који ремете репликацију ДНК и на тај начин узрокују ћелијску смрт (103).

Адјувантна хемотерапија се може применити након хируршке ресекције да би се смањио ризик од рецидива, посебно код оболелих са високим ризиком, као што су оне које имају увећане лимфне чворове или инвазију параметријума. У овом контексту, комбинације лекова као што су карбоплатина и паклитаксел се користе за побољшање исхода лечења (103).

Палијативна хемотерапија се примењује код пацијенткиња са метастазама карцинома грлића материце у циљу ублажавања симптома и продужавања преживљавања. За то се користе комбинације лекова као што су паклитаксел и топотекан које пружају симптоматско олакшање и побољшавају квалитет живота.

У новије време развијене су циљане терапије и имунотерапија које пружају нове могућности лечења за пацијенте са карциномом грлића материце. Агенси који циљају PD-1/PD-L1 путеве, као што је пембролизумаб, показали су значајне резултате у клиничким испитивањима, посебно код пацијенткиња са рецидивима или метастазама (104).

Хемотерапија карцинома грлића материце је, као и хемотерапија других карцинома повезана са доста нежељених ефекта као што су мучнина, повраћање, неутропенија и нефротоксичност.

1.4. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус представља сложен процес током кога долази до деобе ћелије. Ћелијски циклус еукариотских ћелија је сложенији у односу на прокариотске ћелије, због комплексности грађе, функционалних карактеристика еукариотске ћелије али и због веће количине ДНК молекула који је присутан у еукариотској ћелији. Карактеристике ћелијског циклуса прокариотских ћелија не укључују кондензацију ДНК молекула што је случај код еукариотских ћелија (105–107).

Сложени процес ћелијског циклуса може бити подељен на следеће фазе: интерфаза (у коју убрајамо G1, S и G2 фазу) и митоза (М фаза - профаза, метафаза, анафаза и телофаза). Поред деобе ћелије, током ћелијског циклуса такође долази до поправке оштећења ДНК молекула, ткивне хиперплазије, развоја ћелија карцинома, раста и пролиферације ћелија (107).

Фаза која претходи G1 фази, назива се G0 фаза. За ову фазу ћелијског циклуса карактеристично је да нема деобе и раста ћелије (ћелије мирују). Неке од ћелија које се физиолошки налазе у овој фази ћелијског циклуса су нервне ћелије, еритроцити, неутрофили и зрели миоцити. За ове ћелије (нецикличне ћелије) је карактеристично да се не деле и може се рећи да се налазе у константној, перманентној G0 фази (108). Прелазак ћелије из ове фазе у G1 фазу активиран је везивањем фактора раста за рецепторе и трансдукцијом сигнала у унутрашњост ћелије чиме се активира ћелијски циклус.

1.4.1. G1/S фаза ћелијског циклуса

За G1 фазу је карактеристично присуство такозваних контролних тачака (*control checkpoints*) које одређују да ли ћелија наставља даљи пут ка репликацији молекула ДНК или ка митози. Током ове фазе ћелијског циклуса долази до умножавања ћелијских компонената, изузев дупликације хромозома која се одвија током S фазе.

Регулација ћелијског циклуса реализује се посредством различитих протеина који су активирани на одређеним контролним тачкама. У G1 фази која регулише улазак ћелије

у S фазу, проверавају се параметри ћелије у које убрајамо њену величину, количину енергије и потенцијална оштећења ДНК молекула. Ово је омогућено активношћу протеина као што су циклин D1 (*bcl-1* или *PRAD-1*), циклин зависни киназни инхибитор p16^{INK4a} и ретинобластома протеин. Уколико је активност и функционалност ових контролних протеина измењена долази до поништавања контроле ћелијског циклуса и развоја канцера (109).

Циклин зависне киназе (енг. *cyclin dependent kinases, Cdk*s) су серин-треонин киназе које контролу ћелијског циклуса остварују процесом фосфорилације одређених аминокиселина у кључним протеинима. *Cdk*s најчешће су константно експримиране током ћелијског циклуса, али се активирају само у одређеним деловима ћелијског циклуса. Циклин зависне киназе које су укључене у регулацију ћелијског циклуса су CDK1, CDK2, CDK4 и CDK6. Циклин зависне киназе постижу своју максималну активност када дође до повећања активности одговарајућих циклина приликом чега долази до стварања CDK комплекса.

Циклини који поседују контролну, регулишућу улогу у прогресији ћелијског циклуса су циклини А (A1 и 2), циклин В, D (D1, 2 и 3) и циклини Е (Е1 и 2) (113,114). Промена активности циклина током ћелијског циклуса посредована је процесима протеинске разградње и транскрипције. Деградација циклина Е и D остварује се посредством SCF комплекса (*Skp1, Cullin1, F-box containing complex*) (110,111). Циклини D (D1, 2 и 3) граде везе са циклин зависним киназама, *Cdk4* и *Cdk6* чиме их активирају и омогућавају да се изврши фосфорилација протеина ретинобластома (*pRb*) (112–117).

У условима који су неповољни за наставак ћелијског циклуса долази до инхибиције *Cdk*s посредством инхибитора циклин зависних киназа (енг. *cyclin dependent kinase inhibitors, CKDIs*). Постоје две класе инхибитора циклин зависних киназа, чија је класификација извршена према структурној повезаности. У CIP/KIP класу спадају p21^{Cip1} (*Cdkn1a*), p27^{Kip1} (*Cdkn1b*) и p57^{Kip2} (*Cdkn1c*), док класи INK4 припадају p16^{INK4a} (*Cdkn2a*), p15^{INK4b} (*Cdkn2b*), p18^{INK4c} (*Cdkn2c*) и p19^{INK4d} (*Cdkn2d*) (118–122). Улога CIP/KIP протеина јесте да се везују за различите CDK комплексе вршећи њихову инхибицију или активацију; INK4 фамилија протеина специфично инхибира CDK4 и CDK6 активност чиме онемогућава њихово везивање за циклин D (121,122). Главна улога CKDIs јесте да у условима деловања одређених стимулуса, ДНК оштећења, интереагују са CDK комплексима чиме инхибирају киназну активност.

Током периода карактеристичног за G1 фазу ћелијског циклуса долази до значајног увећања ћелије и појачане синтезе протеина који испољавају различите улоге (ензимске, градивне и рецепторске). Управо због интензивне синтезе протеина као и припреме једра за S фазу, ова фаза ћелијског циклуса траје најдуже. Уласком ћелије у G1 фазу отпочиње процес синтезе циклина D, протеина који је одговоран за контролу процеса напредовања ћелијског циклуса. Са напредовањем фазе G1 количина циклина D и фосфорилисаног *pRb* протеина се повећава (123). Ово место у ћелијском циклусу представља рестрикциону тачку од које зависи даље напредовање ћелијског циклуса, односно прелазак у S фазу. Током ове фазе у једру се дешава репликација ДНК молекула, синтеза хистона и дуплирање центриола. Уколико је ДНК оштећење настало пре уласка ћелије у S фазу, долази до повећања активности транскрипционог фактора p53 који доводи до експресије различитих циљних гена укључених у репарацију ДНК, контролу ћелијског циклуса и апоптозу (124,125). Под утицајем активiranог p53 фактора повећана је синтеза p21 протеина одговорног за заустављање ћелијског циклуса у G1 фази услед инхибирања комплекса циклин D/Cdk4,6 и комплекса циклин E/Cdk2. Протеин p21 заузима значајно место у процедурама поправке оштећеног ДНК молекула (126,127). Уколико се не може извршити поправка ДНК молекула, долази до активације апоптозе посредством транскрипционог фактора p53 (128–131).

1.4.2. G2/M фаза ћелијског циклуса

G2 фаза ћелијског циклуса (постсинтетичка фаза), представља период у коме се ћелија припрема да уђе у фазу деобе (132,133). У овој фази количина ДНК молекула и хромозома је удвостручена у односу на количину која је била присутна у G1 фази.

Током G2 фазе дешавају се процеси кондензације хроматина као и дезинтеграција мембране једра условљени деловањем комплекса циклин/циклин зависна киназа, (циклина А - *Cdk2* и циклина В - *Cdk1*) (134–136). Правилно физиолошко функционисање ових комплекса - циклин/циклин зависних киназа омогућава улазак ћелије у М фазу ћелијског циклуса, јер је контролна тачка 2 (*G2 checkpoint*) тиме савладана.

Нагли пораст активности комплекса циклин/циклин зависних киназа одговоран је за појаву догађаја у раној М фази, формирања деобног вретена и причвршћивања центромера хромозома за нити деобног вретена. За успешно завршавање М фазе есенцијална је активност лигазе, APC (енг. *Anaphase-promoting complex*) која покреће и подстиче раздвајање хроматида. APC је одговоран за деградацију циклина што последично доводи до инактивације већине циклин зависних киназа што резултује завршавањем М фазе ћелијског циклуса (137,138).

Уколико ћелија не превазиђе контролну тачку G2 (*G2 checkpoint*) долази до заустављања ћелијског циклуса у G2 фази. Главни узрок тог прекида је или смањена количина циклина В и/или ефекат хиперфосфорилације *Cdk1*. Доказано је да дефект на нивоу хромозома условљава прекид G2 фазе услед активирања транскрипције p21 под дејством протеина p53 чиме престаје синтеза циклина В и *Cdk1* (139–141).

Прекид ћелијског циклуса у одређеној фази настаје услед оштећења ДНК молекула. Уколико контролни механизми не обезбеде репарацију оштећеног ДНК молекула, активирају се апоптотични механизми ћелијске смрти.

1.5. Програмирана ћелијска смрт

Пиониром за откривање апоптозе (грч. *απὸπτωσις*-означава опадање), као облика програмиране ћелијске смрти сматра се *Carl Vogt. Kerr; Wyllie i Currie* 1972. године описују морфолошке промене које настају у ћелији током овог процеса (142). Апоптоза представља строго „диригован“, генетски дефинисан облик ћелијске смрти током кога ћелија саму себе доводи до „самоуништења“.

Концепција израза, процеса „програмирана ћелијска смрт“ (енг. *Programmed Cell-Death: PCD*) огледа се у његовој есенцијалној важности за одржавање хомеостазе и развоја ткива (143,144), и у настанку бројних малигних обољења (145–149), неуродегенеративних (150–155), као и многобројних аутоимунских поремећаја (156–159). Поред апоптозе, неки од видова ћелијске смрти укључују и некроптозу, пироптозу и аутофагију (160).

Аутофагија (грч. *"auto"*-сам и *"phagein"*-јести) је биолошки процес који се дешава унутар саме ћелије, а представља механизам рециклирања цитоплазме и органела посредством аутофагозома. Аутофагија има пресудну улогу у преживљавању ћелије у условима одсуства фактора раста (161,162).

Некроптоза, настаје као последица оштећења ткива, карактерише се потпуном разградњом ћелијских мембрана и органела што индукује запаљенски процес који је праћен инфилтрацијом леукоцита и оштећењем ткива. У највећем броју случајева за

настајање некроптозе одговорне су инфекције, физичке и хемијске повреде ћелије, као и исхемија (умирање ћелије под утицајем спољашњих фактора) (163–165).

За пироптозу је карактеристична активација инфламаторних каспаза (каспазе-1, 4, 5, 11) које узрокују формирање перфорационих компоненти које доводе до руптуре ћелијске мембране, ћелијске смрти и ослобађања запаљенских медијатора (166–169).

1.5.1. Процес апоптозе

Апоптоза, програмирана ћелијска смрт, представља процес током кога се по тачно дефинисаном следу дешавају морфолошке и биохемијске промене које доводе до смрти ћелије. Апоптоза може бити индукована нефизиолошким и физиолошким факторима. Активира се при процесу уклањања дефектних ћелија (аутореактивне ћелије имунског система), ћелија са мутираним генетским материјалом, ћелија са неадекватним сигнаlima у ћелијском циклусу и при уклањању вирусом инфицираних ћелија (170–173).

Прве морфолошке промене које се дешавају у току апоптозе представљене су извртањем фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране, губитком међућелијских веза које настају као последица кондензације протеина цитоплазме и смањења величине ћелије. Хроматин подлеже кондензацији и деградацији узрокујући промену облика једра. Деловањем ендонуклеаза долази до цепања молекула ДНК на мање фрагменте, деформације ендоплазматичног ретикулума, промена у интегритету митохондријалне мембране и ослобађања цитохрома *c* из митохондрија.

Карактеристика апоптозе је формирање апоптотичних тела, која представљају мање делове ћелије настале индукцијом апоптозе. Апоптотична тела су мембраном оивичени фрагменти ћелија са делом ћелијске цитоплазме, протеинима, органелама, са или без фрагмената нуклеуса (174,175). Процесом формирања апоптотичних тела не долази до изливања садржаја ћелије у ванћелијски простор, сав садржај ћелије налази се унутар мембрана и тако формирана телашца бивају фагоцитована од стране макрофага, неопластичних или парехимских ћелија који их разграђују у фаголизозому. Услед постојања и очуваности интегритета апоптотичних тела, спречено је изливање садржаја у ванћелијски простор а самим тим изостају инфламација и оштећење ткива. Улога апоптотичних тела, поред процеса апоптозе огледа се и у имунској регулацији, ремоделовању ткива као и у настанку неуродегенеративних болести (176–180).

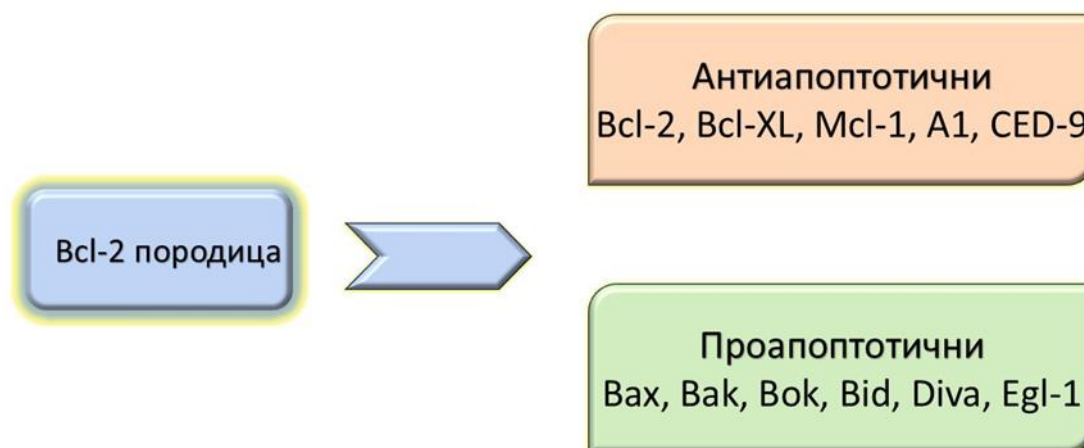
Биохемијски догађаји који су карактеристични за процес апоптозе поред премештања фосфатидилсерина представљају и повећану синтезу одређених протеина. Протеини/ензими директно укључени у процес апоптозе или су активирани у току процеса апоптозе или су синтетисани у току процеса програмиране ћелијске смрти. Регулаторни протеини процеса апоптозе могу бити подељени на два велике групе: анти-апоптотични (спречавају процес апоптозе) и про-апоптотични (активаторни апоптотични) протеини. Есенцијалну улогу у апоптози одигравају ензими који се називају каспазе (181–184).

1.5.2. Про и анти-апоптотични протеини – регулаторни протеини процеса апоптозе

Протеинска породица В ћелија лимфома (*Bcl-2*) представља кључну породицу протеина који су неопходни у регулацији процеса апоптозе (185,186).

На основу присуства ВН домена, ова породица протеина је структурно подељена на: анти-апоптотичне (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1*, *Bfl-1* и *Bcl-W*) (187–194) који поседују сва

четири домена BH1–4 и на про-апоптотичне, који имају само BH3 (*Bim*, *Puma*, *Noxa* и *Bid*) домен (195,196) и вишеструке BH домene (*Bak*, *Bax* и *Bok*) (197–203) (Слика 1). Про-апоптотични протеини активирају и омогућавају процес апоптозе формирањем пора на митохондријалној мембрани чиме долази до ослобађања митохондријалних протеина у цитоплазму ћелије.



Слика 1. Шематски приказ поделе протеина из Bcl-2 породице

Улога анти-апоптотичних протеина огледа се у очувању интегритета митохондрија које се спроводи инхибирањем деловања про-апоптотичних протеина (204–206). Управо нарушавање равнотеже у активности и деловању одређене групе протеина је тренутак који одређује да ли ће ћелија ући у апоптозу или у процес преживљавања. Уколико је дошло до преваге про-апоптотичних ефекторних протеина, долази до њихове олигомеризације на спољашњој мембрани митохондрија, стварања пора, ослобађања цитохрома c и активације каскаде каспаза које даље активирају нисходне протеине.

1.5.3. Каспазе

Главна улога у процесу апоптозе додељена је каспазама, тачније про-каспазама. Про-каспазе представљају неактивни облик каспаза, односно зимогени облик. У ћелији про-каспазе се могу наћи као мономерне или димерне јединице. Каспазе су јединствене, специфичне интрацелуларне ендопептидазе које учествују у протеолизи интрацелуларних протеина.

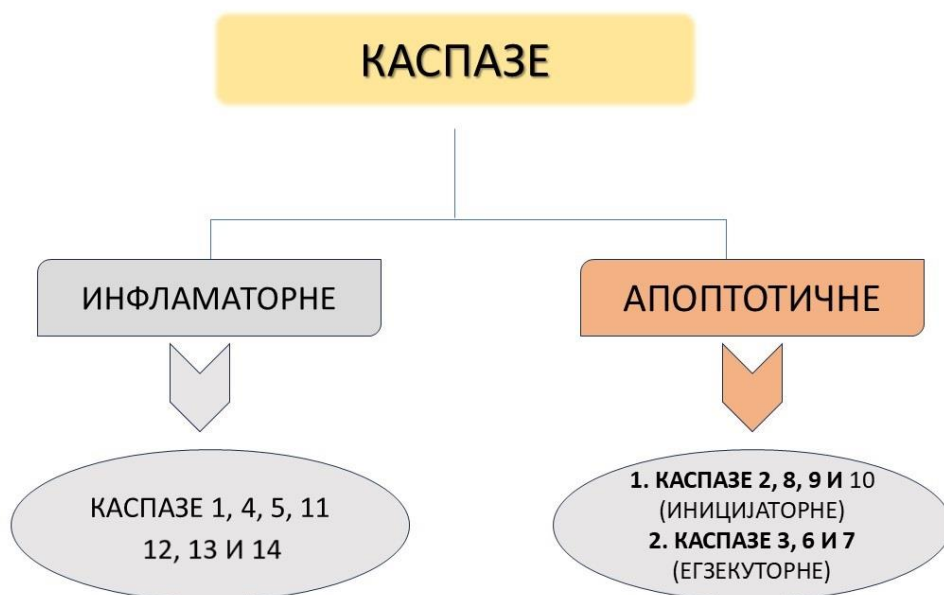
Аминокиселина цистеин смештена је у активном центру ове фамилије протеаза која цепа, односно разграђује протеински супстрат на местима где пептидну везу формира аминокиселина - аспарагинска киселина, иза аспартата.

Каспаза (енг. *caspase*, c-asp-ase од енг. *cysteine dependent aspartate-specific protease*) заправо је цистеин-аспартат протеаза. Поред кључне улоге у процесу апоптозе, каспазе имају и бројне улоге у различитим ћелијским процесима, као што су: диференцијација ћелија, инфламаторни одговори и ремоделовање неурона (207–210).

Класификација каспаза извршена је на основу главних улога које имају у ћелији. Оне су подељене на апоптотичне каспазе и инфламаторне каспазе (Слика 2). Апоптотичне каспазе заузимају значајно место у току процеса апоптозе и у овој групи припадају каспаза-2, -3, -6, -7, -8, -9, и -10 (211–214). Класи инфламаторних каспаза

припадају каспаза-1, -4, -5, -11, -12, -13 и -14 које имају значајну улогу у запаљенским реакцијама организма и у процесу активирања цитокина (209).

Међутим, основна подела каспаза извршена је на основу улоге који имају током процеса апоптозе. То су иницијаторске (каспазе-2, -8, -9, и -10) и егзекуторне тј. извршилачке, односно ефекторне каспазе (каспазе-3, -6 и -7), (215).



Слика 2. Шематски приказ поделе каспаза на инфламаторне и апоптотичне.

Начелно, иницијаторске про-каспазе обухватају дуге про-домене, за разлику од егзекуторских про-каспаза које карактеришу кратки про-домени. Иницијаторске и инфламаторне каспазе на свом аминокиселинском делу садрже око 100 аминокиселинских остатака, док код егзекуторних каспаза овај број аминокиселинских остатака је око 30. Још једна структурна разлика присутна је између иницијаторских и егзекуторних каспаза - иницијаторске каспазе су мономерни, док егзекуторне каспазе представљају димере.

За настанак каспазе као активног молекула неопходна је парцијална фрагментација, протеолиза, мономерне јединице про-каспазе на месту где су мала и велика субјединица повезане, као и стварање хетеротетрамерног комплекса процесом димеризације мономерних јединица. Држим речима, активација прокаспаза постиже се на један од три могућа начина: посредством друге активираних каспаза, процесом аутокатализе или удруживањем са активаторним протеином (пример је *APAF* - каспаза 9 - цитохром *c*) (216–218). За иницијаторске каспазе карактеристичан је процес аутокатализе, док је за егзекуторне каспазе карактеристично сечење кључних протеина на аспартатским резидуима, чиме се врши њихова инактивација (207,208,211,214,215,219).

Молекул каспазе представља димер хетеродимера састављен од две мале и две велике подјединице (218,220). *LSSL* представља ознаку за овај тетрамер, где *L* означава велику подјединицу (енг. *large subunit*), *S* представља малу субјединицу (енг. *small subunit*).

Адапторни молекули попут *FADD* (енг. *Fas Associated Death Domain*) и/или *TRADD* (енг. *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*), поспешују стварање активних облика каспаза процесом везивања за карактеристичне делове про-домена про-каспаза. Домен ефектора смрти (енг. *death effector domains* - *DED*) и домен регрутовања каспаза (енг. *caspase recruitment domains* - *CARD*) представљају

карактеристичне делове, секвенце про-домена про-каспаза, "домене смрти" (енг. *Death Domain, DD*) (221–223).

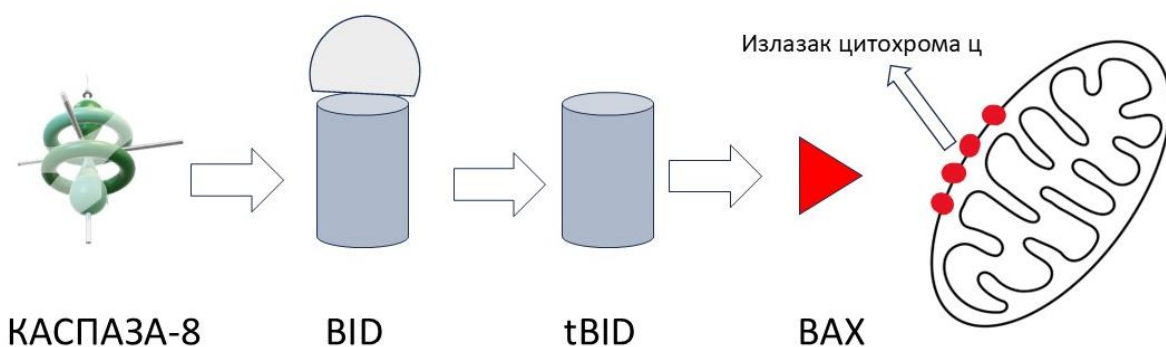
Иницијаторске каспазе представљају покретаче егзекуторских каспаза у имплементацији своје функције у процесу апоптозе. Како иницијаторске, тако и извршилачке (егзекуторске) каспазе у ћелији су у неактивном (зимогеном) облику све до момента док под дејством иницијаторских каспаза не буду делимично разграђене на малу и велику подјединицу. Делимична протеолиза условљава промене у структури ових молекула које су заслужне за образовање оперативних протеаза. Процес активације иницијаторских каспаза -8 и -9 не захтева делимичну протеолизу већ смо процес димеризације (224). Након активације прве извршилачке каспазе која не само да делује на другу каспазу активирајући је већ делује аутоактиваторно долази до амплификације апоптотичног сигнала.

Било који несклад у активности каспаза круцијалан је за настајање различитих обољења, било неуродегенеративних услед појачане активности каспаза или канцера услед ограниченог деловања каспаза.

Процес активације апоптозе зависно од надражаја реализује се преко два универзална апоптотична пута, а то су спољашњи (рецепторски) и унутрашњи (митохондријални) пут (225–227).

1.5.4. Спољашњи (рецепторски) пут апоптозе

Иницијација спољашњег пута апоптозе започиње стимулацијом специфичних рецептора лоцираних на ћелијској мембрани (*DD* - *death receptors* - рецептори смрти, трансмембрански протеини). Неки од припадника су суперфамилије протеина фактора некрозе тумора (енг. *tumor necrosis factor, TNF, DR3, DR4, DR5, DR6*) и *FAS* рецептор. Заједничка карактеристика припадника ових протеина јесте да поседују екстрацелуларне домене, (*NH2*-терминални сегмент), који су богати цистеином. Својим екстрацелуларним доменом ови рецептори везују сигналне молекуле и узрокују олигомеризацију интрацелуларног домена смрти. Интрацелуларни сегменти, (*C*-терминални сегмент), припадника ове суперфамилије протеина поседују секвенце које се називају домен смрти, (*DD*, енг. *death-domain*, ~ 80 аминокиселина) (228–230). Есенцијална функција домена смрти огледа се у преносу импулса са екстрацелуларног сегмента рецептора у интрацелуларни простор ћелије до адекватних интрацелуларних ензима. Међу овим рецепторима смрти и њиховим активаторима, лигандима, до сада су највише објашњени *TNF- α /TNFR1* (енг. *Tumor necrosis factor alpha/Tumor necrosis factor receptor 1*), *FasL/FasR* (енг. *Fatty acid synthetase ligand/Fatty acid synthetase receptor*), *Apo2L/DR4* (енг. *Apo2 ligand/Death receptor 4*), *Apo2L/DR5* (енг. *Apo2 ligand/Death receptor 5*) и *Apo3L/DR3* (енг. *Apo3 ligand/Death receptor 3*) (227,231–234). Након овога долази до асоцијације адапторног протеина *FADD*, енг. *Fas-associated-death-domain*; или *TRADD* енг. *TNFR - associated-death-domain*). Овако формиран молекули протеина и рецептора тј лиганда чине тзв. *DISC* - *death-inducing signaling complex* (235–238). Главна улога *DISC*-а је ангажовање иницијаторских про-каспаза 8 и 10. Про-каспаза 8 се активира и врши даљу активацију про-каспазе 10. Формирање активне каспазе 8 узрокује активацију (сечење) цитоплазматског *Bid* и формирање *tBid* (*truncated Bid*) (Слика 3 и 4). У циљу премештања *tBid* у митохондрије, неопходна је претходна активација *Bax*-а и промена пермеабилности митохондријалне мембране (239). Активација *Bid* и формирање *tBid* представљају један од примера сусретања унутрашњег и спољашњег апоптотичног пута (240–245).

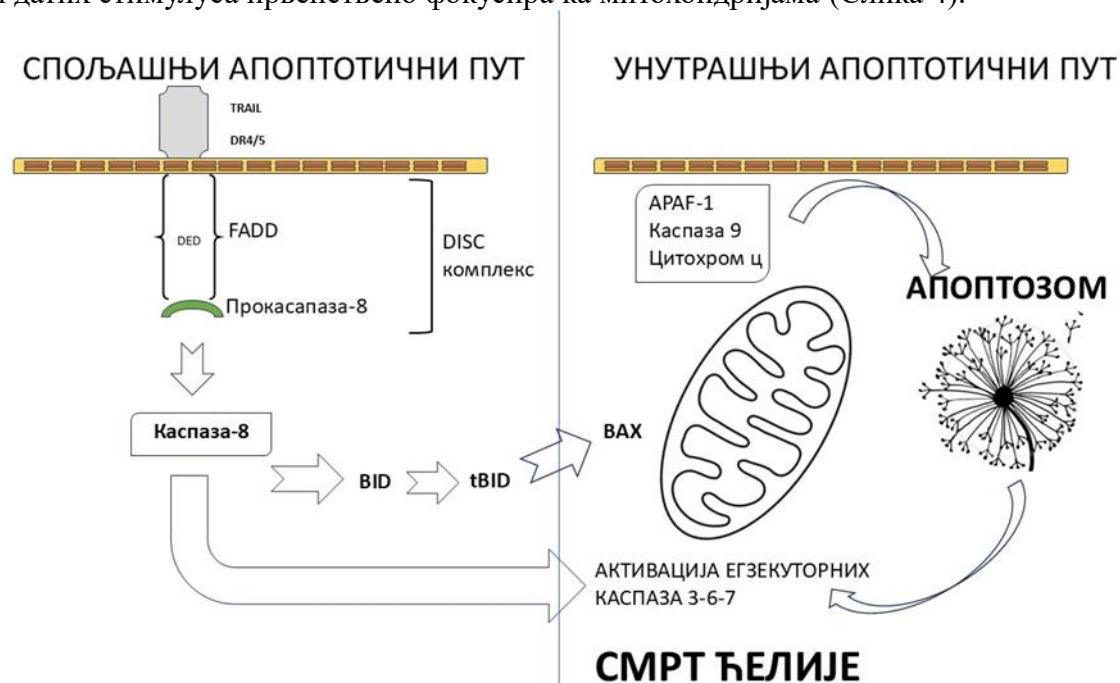


Слика 3. Сусретање унутрашњег и спољашњег апоптотичног пута посредством каспазе 8 која активира *BID*, који у даљој каскади активира *Bax* који учествује у формирању пора на митохондријалним мембранама и узрокује последично испуштање цитохрома *c* у цитоплазму ћелије.

1.5.4. Унутрашњи (митохондријални) пут апоптозе

За иницирање унутрашњег (митохондријалног) пута апоптозе одговорни су стимулуси који потичу из саме ћелије настали углавном као последица специфичних елемената стреса егзогеног или ендогеног порекла, као што су оксидативни стрес, хипоксија, токсини, радијација, вирусна инфекција, недовољно присуство извесних хормона, цитокина, фактора раста и друго (246).

Унутрашњи пут апоптозе другачије се назива митохондријални апоптотични пут јер се склоп датих стимулуса првенствено фокусира ка митохондријама (Слика 4).



Слика 4. Шематски приказ карактеристика спољашњег и унутрашњег апоптотичног пута, као и места сусретања два пута. Карактеристика спољашњег пута је та да се не одвија посредством митохондрија.

Улога одлучујућег оператора да ли ћелија улази у процес апоптозе или не додељена је припадницима *Bcl-2* фамилије протеина, пре него што дође до активације каспаза.

Централно место унутрашњег пута апоптозе представљају митохондрије. Про-апоптотски и анти-апоптотски стимулуси упоредо се генеришу и покрећу и оба стимулуса прогредирају ка мембрани митохондрија, а само у ситуацији када превагну про-апоптотски сигнали долази до повећане пропустљивости мембране митохондрија. То је уједно и кључни догађај унутрашњег пута апоптозе, тј. догађај – пермеабилizације спољашње мембране митохондрија (енг. *Mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP*) (246–248). *MOMP* имплицира иреверзибилан координисан процес од стране чланова *Bcl-2* фамилије протеина. Митохондрије су врло специфичне ћелијске органеле које поседују и унутрашњу (енг. *inner membrane – IM*) и спољашњу мембрану (енг. *outer membrane – OM*) са интрамембранским простором који их раздваја (енг. *intermembrane space – IMS*). Интрамембрански простор је испуњен садржајем бројних протеина кључних за иницирање процеса апоптозе, попут цитохрома *c*, фактора који индукује апоптозу (енг. *apoptosis-inducing factors – AIF*), *Smac/DIABLO* (енг. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*), серин протеазу *Omi/HtrA2* (енг. *High temperature requirement protein A2*), *Endo G* – ендонуклеазу *G* и друге.

Постоје два концепта по којима припадници *Bcl-2* фамилије протеина учествују и посредују у одвијању митохондријалног апоптотичног пута.

Један концепт учествовања/посредовања чланова *Bcl-2* фамилије протеина у одвијању унутрашњег апоптотичног пута означава процес у коме долази до посредног активирања *Bax*-а и *Bak*-а. У овом концепту протеини *Bad* и *Noxa*, спрежу се са анти-апоптотичним протеинима чиме ометају њихове функције што доводи активирања и отпуштања *Bax*-а и *Bak*-а протеина. Други концепт учествовања/посредовања чланова *Bcl-2* фамилије протеина у одвијању унутрашњег апоптотичног пута означава процес у коме долази до непосредног активирања *Bax*-а и *Bak*-а. У овом концепту протеини *Bim*, *Bid* и *Puma* непосредно се спрежу са *Bak* и *Bax* протеинима услед чега се они олигомеризују (247). Олигомеризација је процес који условљава активацију *Bax* и *Bak*, који као такви, активирани, генеришу поре на спољашњој митохондријалној мембрани, јер су и сами смештени на истој (249–251). Створене поре дозвољавају излазак апоптотичних протеина из интермембранског простора митохондрија у цитосол.

Цитохром *c*, као један од најутицајнијих апоптотичних протеина, у цитосолу реагује са адаптерним протеином - активирајућим фактором 1 апоптотске протеазе (енг. *Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1*). Адаптерни *Apaf-1* протеин састоји се из три домена, *N* терминалног домена, централног домена који је олигомерни нуклеотид везујући домен и *C* терминалног домена који има неколико репетитивних секвенци (252,253). За репетитивне секвенце *C* терминалног домена *Apaf-1* протеина везује се цитохром *c* услед чега долази до конформационих промена *Apaf-1* протеина, док секундарна промена у његовој конформацији али и олигомеризација, односно активација настаје услед везивања деоксиаденозинтрифосфата (*dATP*) за централни домен (254). Иницијаторска про-каспаза-9 успоставља везу са овако конституисаним комплексом стварајући мултипротеински комплекс који се назива апоптозом. Улога апоптозома је протеолитичка активација про-каспазе-9 помоћу енергије произведене хидролизом (АТФ). Све док се процес апоптозе одвија каспаза-9 мора, супротно од осталих иницијаторских каспаза, остати везана за *N* терминални домен *Apaf-1* протеина преко свог *CARD* домена чиме уједно чува своју каталитичку активност. Улога апоптозома је да етапно покрене про-каспазу-3, тачније активирана каспаза-9 из апоптозома доводи до активације каспазе-3, која је егзекуторна каспаза.

Кључни моменат унутрашњег пута апоптозе представља управо моменат покретања егзекуторне каспазе-3 (255,256). Овако покренута егзекуторна каспаза-3 покреће и друге егзекуторне каспазе, каспазу-6 и 7, али и саму каспазу-3 тзв. процесом аутоактивације. Као последица активације каспазне каскаде долази до продирања ефекторних каспаза у једро ћелије где интерагују са есенцијалним протеинима укљученим у процесе транскрипције и репликације ДНК молекула, али и протеинима који регулишу метаболизам ДНК и РНК молекула финално доводећи до фрагментације ДНК молекула ендонуклеазама (*DN*-азе).

1.6. Природни молекули у терапији карцинома

1.6.1. Биолошки ефекти биљака

Фитотерапија у прошлости је била једино средство лечења (различитих симптома, повреда, респираторних и кожних сметњи, деловала је умирујуће) до развоја савремене медицине и терапије. Поред развоја медицине и савремених терапијских поступака, фитотерапија није напуштена већ је своје место нашла у виду комбиноване терапије у онкологији. Људи су од давнина користили различите видове мелема, тинктура, чајева које су правили сакупљањем и презервацијом одређених делова лековитих биљака (сушење листова или цветова, потапање корена биљке у различите раствараче итд.).

Неке од биљака које се користе на нашем поднебљу су Бела имела (*Viscum album*) којој се услед присуства лектина, флавоноида, лигнина и биогених амида приписују антитуморски, седативни, антихипертензивни и антидијабетични ефекти (257–259).

Следећа биљка која је распрострањена у исхрани и у народној медицини је цвекла (*Beta vulgaris*). Користи се највише у терапији анемије (260), код деминерализације костију, за регулацију крвног притиска, смањења нивоа слободног холестерола, за превенцију тумора, лечење леукемије и као антиоксидативно средство (261–263). За лековита дејства цвекле заслужно је присуство антицијанина, минералних елемената, витамина Б1, Б2, Ц и Б12, бетанина, беталаина, бетаина, полифенола и каротеноида.

Ехинацеа (*Echinacea angustifolia*) је биљка која расте на нашим поднебљима. Од великог броја активних компоненти издвајају се ехинацин, фитостероли и алкалоиди који овој биљци обезбеђују имуностимулативно, антиинфламаторно, антивирусно и антитуморско дејство (264–268).

Поред ових наведених биљака које расту на нашем подручју, постоје и друге биљке које испољавају антитуморска дејства а карактеристичне су за топле и суве регионе. Један од ових представника је ђумбир (*Zingiber officinalis*) који расте у Азији. За лековита биолошка дејства ове биљке заслужна су етерична уља и микроелементи. Од биолошких дејстава у литератури се наводе: антибактеријско, антиинфламаторно, антиоксидативно, антиедематозно и антиканцерогено (269–273).

Алоја (*Aloe vera Barbadosensis Miller*), иако расте у подручјима топле и суве климе, ова биљка нашла је широку примену у медицини и козметологији управо због присуства витамина, антиоксиданаса, ензима (протеазе, липазе, амилазе). У медицини се користи као допунска терапија за смањење нежељених ефеката хемио и радио терапије, испољава антитуморско дејство и снижава ниво слободног холестерола (274–276).

Куркума (*Curcuma Longa*) је биљка из породице ђумбира. Распрострањена је у Азији, а за њено биолошко дејство заслужан је куркумин. У исхрани је врло распрострањена, и спада у зачинске биљке. Може да се користи у свежем стању или у

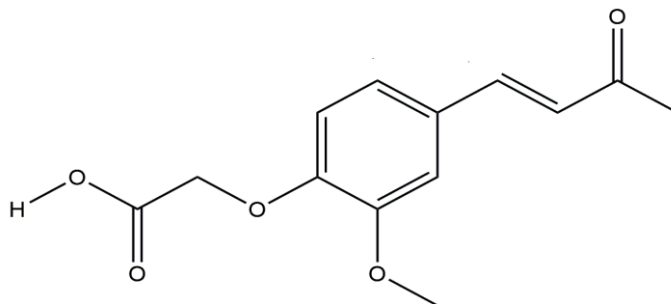
виду праха. Од биолошких дејстава најбитнија су: антиканцерогено, антиинфламаторно, радиопротективно (277–281).

Ванила (*Vanilla planifolia*) припада зачинским биљкама и као оваква представља ферметисан плод орхидеје из рода ванила. Од биолошки активних супстанци у ванили се налазе фитохемикалије као што су: бибензил, дихидрофенантрен и фенантрахинон. Ванилин и пиперонал представљају молекуле који су заслужни за мирис ваниле, али за ове молекуле је показано у различитим истраживањима да испољавају снажна биолошка дејства (282–287). Доступна истраживања указују на то да компоненте ванилинских деривата које у својој структури садрже сулфоило и фенил карбоксилатни систем испољавају снажну антиканцерогену активност према ћелијама тумора дојке *MCF-7* ћелије (358,359). *Narode* и сарадници (388) у свом истраживању синтетисали су дериват ванилина и испитивали су његово антимикробно и антиканцерогено дејство. Резултати њиховог истраживања показали су да тај дериват ванилина показује ефикасно антиканцерогено дејство према *HT-29* и *HCT-116* ћелијама канцера дебелог црева. Испитивање ефеката деривата ванилна – халкона на *HCT-116* ћелијској линији показало је да халкони доводе до промене морфологије *HCT-116* ћелија које одговарају променама карактеристичним за апоптотичне ћелије (312). Резултати студије ових аутора показали су да различити супституенти ванилинских деривата испољавају различите биолошке активности, међу којима је најважнија апоптотична тј. антитуморска активност на ћелијама канцера колона *HT-29* и *HCT-116* ћелија (357). На основу свих ових резултата може се очекивати да ће и новосинтетисани енони у овом истраживању испољити антитуморски ефекат на испитиваним туморским ћелијским линијама.

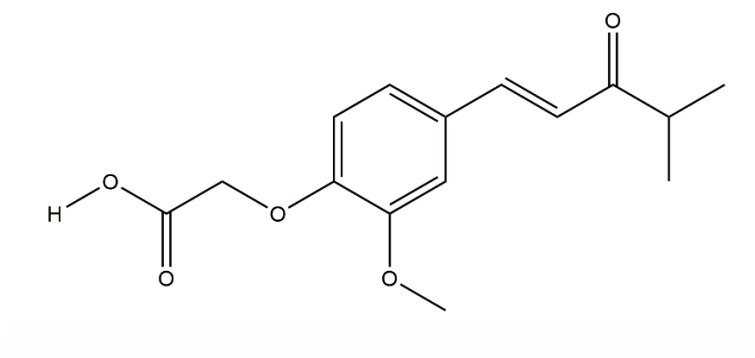
1.6.2. Биосинтеза енона и њихових соли

Четири нова енона (Е1–Е4) и њихове соли добијени су у веома добрим приносима. Структуре енона и соли енона приказане су на сликама 5–12.

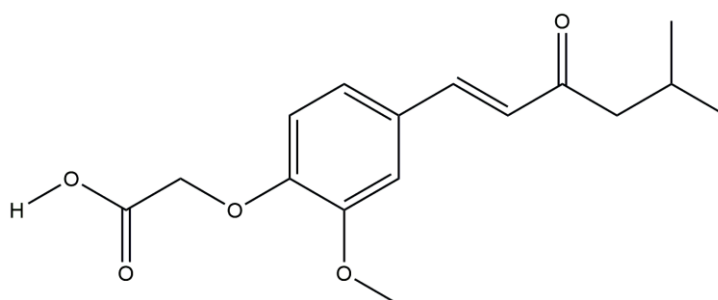
Структуре нових производа су карактерисане спектралним подацима (^1H NMR и ^{13}C NMR). Све полазне хемикалије биле су комерцијално доступне и коришћене су без додатне прераде, осим растварача који су прочишћени дестилацијом. IR спектри су снимљени на PerkinElmer Spectrum One FT-IR спектрометру, користећи KBr диск, у cm^{-1} . NMR спектри су снимљени на Varian Gemini 200 MHz спектрометру (200 MHz за ^1H и 50 MHz за ^{13}C), користећи DMSO- d_6 са 0,02% воде и TMS као интерни стандард. Хемијски помаци за ^1H и ^{13}C NMR дати су у деловима на милион (ppm) и реферисани су на пик растварача. Мултиплети су представљени као s (синглет), d (дуплет), t (триплет), dd (дуплет дуплета) и m (мултиплет). Константе спрезања (J) дате су у херцима (Hz). Температура топљења производа одређена је коришћењем уређаја MelTemp1000.



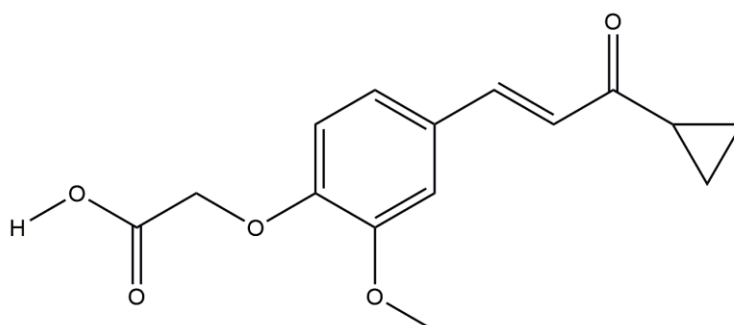
Слика 5. Енон 1 (*E*)-2- (2-метокси-4- (3-оксобут-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат



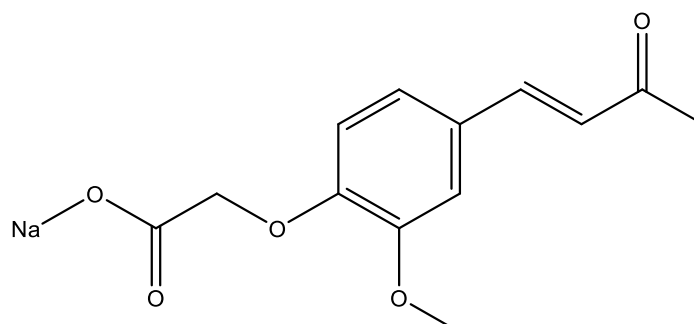
Слика 6. Енон 2 (*E*)-2- (2-метокси-4- (4-метил-3-оксопент-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат



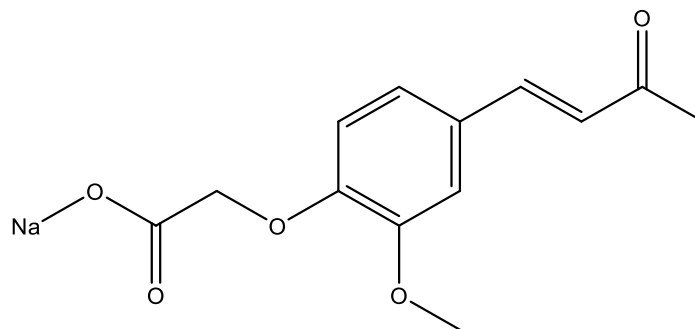
Слика 7. Енон 3 (*E*)-2- (2-метокси-4- (5-метил-3-оксхекс-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат



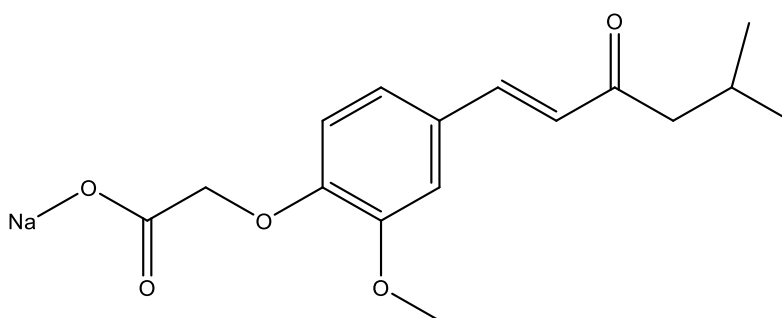
Слика 8. Енон 4 (*E*)-2-(3-циклопропил-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-метоксифенокси) ацетат



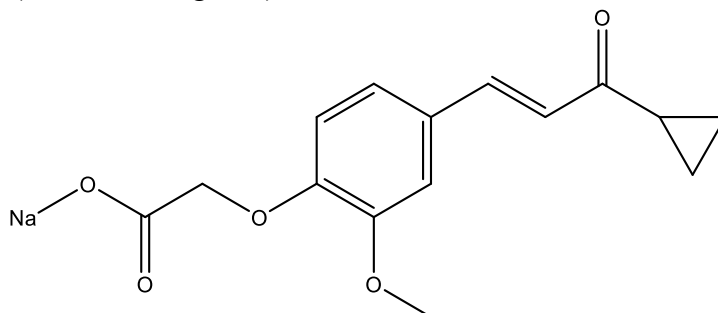
Слика 9. Со Енона 1 Натријум (*E*)-2- (2-метокси-4- (3-оксобут-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 272,23 \text{ g/mol}$)



Слика 10. Со Енона 2 Натријум (Е)-2- (2-метокси-4- (4-метил-3-оксопент-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 300,29 \text{ g/mol}$)



Слика 11. Со Енона 3 Натријум (Е)-2- (2-метокси-4- (5-метил-3-оксхекс-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 314,31 \text{ g/mol}$)



Слика 12. Со Енона 4. Натријум (Е)-2- (3-циклопропил-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-метокси фенокси) ацетат ($M_r = 298,27 \text{ g/mol}$)

1.6.3. Општи поступци за синтезу енона Е1 и Е3

Једињења Е1 и Е3 добијена су реакцијом приказаном на слици 13. Полазећи од ванилина и различитих метил кетона, припремљени су дехидрозингерон и његови аналози, следећи претходно описане методе (256–258). У даљој реакцији, ови фенолни производи (10mmol) су растворени у 40mL ацетона, додато је 15mmol (2,5g) етил-бромацетата и 50mmol (7g безводног) K_2CO_3 , а смеша је мешана под рефлуксом током ноћи. Ацетон и вишак естара су уклоњени под сниженим притиском, а чврсти остатак је растворен у води и екстрахован са CH_2Cl_2 (3×50mL). Органски слој је испран водом (2×50mL) и раствором натријум-хлорида (2×50mL), затим осушен. Главни део растварања

је уклоњен под сниженим притиском, а концентрована сировина је прочишћена кратком колоном силика гела, дајући чврсте естре.

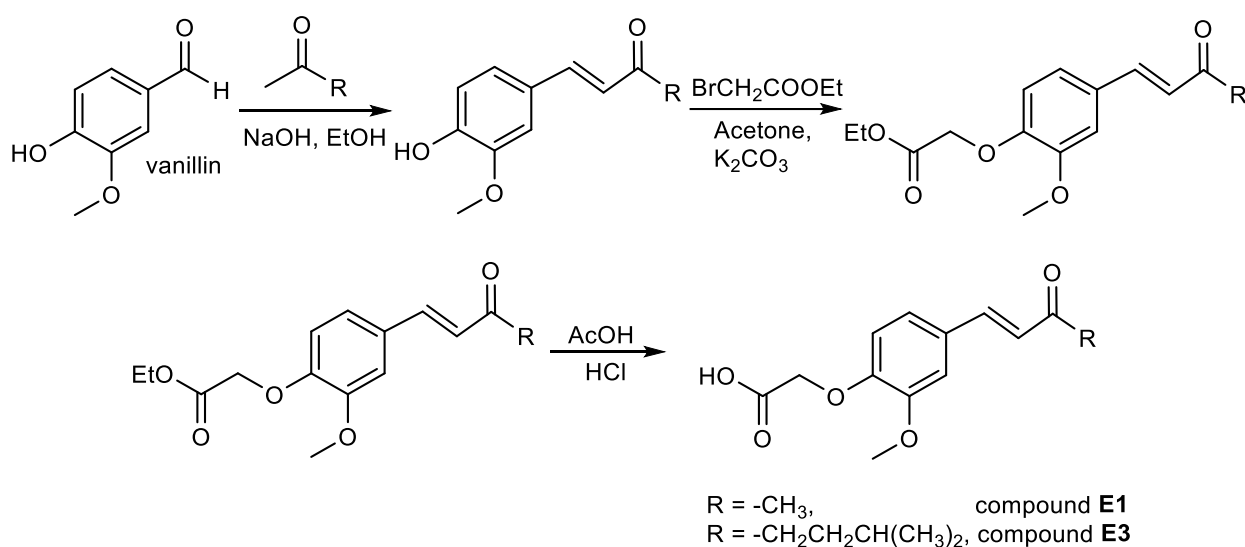
Одговарајући естар (5mmol) је растворен у 10mL сирћетне киселине и додато је 5mL 2M HCl. Реакциона смеша је загревана 30 минута на 95°C, затим охлађена и додата у 100g уситњеног леда. Након стајања у замрзивачу током ноћи, издвојена чврста супстанца је профильтрирана и осушена. Енони E1 и E3 су добијени као бели чврсти производи.

1.6.4. Општи поступци за синтезу енона E2 и E4

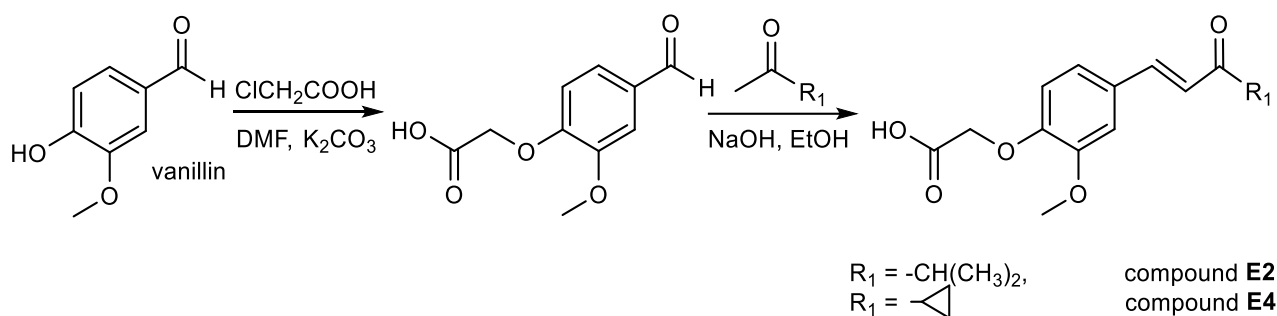
Једињења E2 и E4 добијена су реакцијом приказаном на слици 14.

Ванилин (10mmol, 1,52g) је растворен у 15mL DMF, додати су хлоросирћетна киселина (11mmol, 1,1g) и K₂CO₃ (20mmol, 2,8g). Реакциона смеша је загревана преко ноћи на 50°C, затим охлађена и додата у 100g уситњеног леда. Мешавина је неутрализована 3M HCl, што је довело до формирања прашкасте таложне супстанце. Након стајања у замрзивачу током ноћи, добијени чврсти производ је профильтриран и осушен. Добијени алкилирани ванилин коришћен је за даље реакције.

Алкилирани ванилин (1mmol) и одговарајући метил кетон (20mmol) растворени су у 15mL етанола, смеша је мешана 10 минута, а затим је додато 25mL 2%NaOH. Реакциона смеша је остављена да се меша на собној температури преко ноћи. Настала смеша је охлађена и додата у воду. Након стајања у замрзивачу током ноћи, издвојена чврста супстанца је профильтрирана и осушена.



Слика 13. Синтеза Енона E1 и E3



Слика 14. Синтеза енона E2 и E4

(E)-2-(2-methoxy-4-(3-oxobut-1-en-1-yl)phenoxy)acetic acid (E1)

Принос: 85.2%; m.p. 143-144°C; IR (KBr): 3469, 2920, 1715, 1626, 1594, 1509, 1417, 1227, 1134, 1026, 972, 804 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2.31 (s, 3H, CH_3CO), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 4.74 (s, 2H, OCH_2), 6.74 (d, 1H, $J=16.4$ Hz, CH), 6.89 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 7.21 (dd, 1H, $J=8.4, 2.0$ Hz, Ar-H), 7.35 (d, 1H, $J=2.0$ Hz, Ar-H), 7.55 (d, 1H, $J=16.4$ Hz, CH), 13.10 (br. s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 27.3, 55.8, 65.1, 111.3, 113.1, 122.5, 125.5, 127.9, 143.2, 149.1, 149.4, 169.8, 197.7 (CO).

(E)-2-(2-methoxy-4-(4-methyl-3-oxopent-1-en-1-yl)phenoxy)acetic acid (E2)

Принос: 62.7%; m.p. 115-116°C; IR (KBr): 3508, 2911, 1755, 1575, 1509, 1423, 1270, 1207, 1141, 1012, 977, 795 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 1.07 (d, 1H, $J=6.8$ Hz, 2CH_3), 2.91-3.05 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 4.73 (s, 2H, OCH_2), 6.86-6.98 (m, 1H, Ar-H), 6.94 (d, 1H, $J=16.0$ Hz, CH), 7.23 (dd, 1H, $J=8.4, 1.6$ Hz, Ar-H), 7.38-7.39 (m, 1H, Ar-H), 7.54 (d, 1H, $J=16.0$ Hz, CH), 13.06 (br. s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 18.6, 38.2, 55.9, 65, 111.3, 112.9, 122.7, 123.1, 128, 141.9, 149.1, 149.4, 169.8, 202.9 (CO).

(E)-2-(2-methoxy-4-(5-methyl-3-oxohex-1-en-1-yl)phenoxy)acetic acid (E3)

Принос: 93.2%; m.p. 117-118°C; IR (KBr): 3494, 2957, 1748, 1578, 1509, 1421, 1267, 1208, 1137, 1030, 819, 793 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 0.90 (d, 6H, $J=6.6$ Hz, 2CH_3), 2.01-2.21 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.48-2.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 4.72 (s, 2H, OCH_2), 6.81 (d, 1H, $J=16.4$ Hz, CH), 6.89 (s, 1H, Ar-H), 7.22 (dd, 1H, $J=8.4, 1.8$ Hz, Ar-H), 7.36 (d, 1H, $J=1.8$ Hz, Ar-H), 7.53 (d, 1H, $J=16.2$ Hz, CH), 13.12 (br. s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 22.6, 24.8, 48.9, 55.8, 65, 111.2, 112.9, 122.6, 125.1, 127.9, 142.2, 149.1, 149.4, 169.8, 199.5 (CO).

(E)-2-(4-(3-cyclopropyl-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenoxy)acetic acid (E4)

Принос: 90.8%; m.p. 89-90°C; IR (KBr): 3416, 1722, 1633, 1510, 1426, 1393, 1224, 1144, 1077, 989, 787 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 0.92-0.95 (m, 4H, 2CH_2), 2.36-2.45 (m, 1H, CH), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.74 (s, 2H, OCH_2), 6.89 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, Ar-H), 6.98 (d, 1H, $J=16.0$ Hz, CH), 7.24 (dd, 1H, $J=8.4, 1.6$ Hz, Ar-H), 7.39 (d, 1H, $J=1.8$ Hz, Ar-H), 7.62 (d, 1H, $J=16.2$ Hz, CH), 13.07 (br. s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 10.6, 18.9, 55.9, 65, 111.3, 113, 122.8, 124.8, 128, 141.9, 149.1, 149.4, 169.9, 199.1 (CO).

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ овог истраживања био је испитивање антитуморског ефекта и механизма дејства четири новосинтетисана енона: (Е)-2- (2-метокси-4- (3-оксобут-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат (**Е1**), (Е)-2- (2-метокси-4- (4-метил-3-оксопент-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат (**Е2**), (Е)-2- (2-метокси-4- (5-метил-3-оксхекс-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат (**Е3**), (Е)-2- (3-циклопропил-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-метоксифенокси) ацетат (**Е4**) и њихових натријумових соли на различитим врстама туморских ћелија, као и на здравим контролним ћелијама.

А) Главни циљеви овог истраживања били су:

1. Испитати потенцијални цитотоксични ефекат и механизам деловања енона и њихових соли на ћелије карцинома дебелог црева и грлића материце.
2. Испитати који од испитиваних молекула нема значајан цитотоксични ефекат према здравим ћелијама - контролним ћелијама фибробласта.
3. Упоредити цитотоксични ефекат енона и њихових соли у односу на референтну супстанцу (цисплатина).
4. Утврдити доминантан тип ћелијске смрти.
5. Утврдити ефекат енона и њихових соли на експресију, локализацију као и активацију протеина *Bax*, *Bcl-2* и активне каспазе-3.
6. Испитати ефекат енона и њихових соли на митохондријални мембрански потенцијал ($\Delta\Psi$), експресију и локализацију цитохрома *c*.
7. Утврдити ефекат енона и њихових соли на ћелијски циклус малигних ћелија.

Б) Хипотезе истраживања биле су:

1. Енони и соли енона показују цитотоксични ефекат на хумане туморске ћелије, уз минимално цитотоксично дејство на здраве ћелије.
2. Енони и соли енона испољавају јачи биолошки (антитуморски) ефекат у односу на цисплатину (референтну супстанцу).
3. Енони и соли енона индукују апоптозу хуманих туморских ћелија.
4. Енони и соли енона повећавају експресију *Bax*, смањују експресију протеина *Bcl-2* у туморским ћелијама доводећи до премештања цитохрома *c* у цитосол ћелије и активације егзекуторске каспазе-3.
5. Енони и соли енона смањују митохондријални мембрански потенцијал у испитиваним туморским ћелијама.
6. Енони и соли енона индукују акумулацију туморских ћелија у G₂/М фази ћелијског циклуса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

Тип студије је експериментална студија *in vitro* на материјалу хуманог порекла. Комплетна студија била је реализована у лабораторијама Института Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Антитуморски ефекат енона и соли енона испитиван је на две врсте туморских ћелија хуманог порекла ((аденокарцином грлића материце *HeLa* (ATCC® CCL-2™) и карцином колона *HCT-116* (ATCC® CCL-247™)), а као здрава контрола коришћена је ћелијска линија фибробласта плућа хуманог порекла - *MRC-5* (ATCC® CCL-171™).

Као референтна супстанца коришћена је цисплатина.

3.2. Култивисање ћелија, реагенси и испитиване супстанце

Три хумане ћелијске линије коришћене у овом истраживању биле су *HeLa* (аденокарцинома грлића материце, пасаж 4), *HCT-116* (карцинома дебелог црева, пасаж 9) и *MRC-5* (здрави фибробласти плућа, пасаж 6) култивисане су у медијуму *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*, *Sigma Aldrich D5671*) на 37°C у атмосфери са 5%CO₂. Пре припреме медијума, неопходно је било да се 10%*FBS* (фетални говеђи серум) инаktivира у воденом купатилу на 37°C и да се филтрира коришћењем шприца са нитроцелулозном мембраном (*Sartorius*, 16534-K). За припремање комплетног *DMEM* медијума било је потребно 10% инаktiviranог феталног говеђег серума (*FBS*, *Sigma-Aldrich*, F7524), 100IU пеницилина, 100µg/mL стрептомицина (*Roche*, 11074440001) и 1% неесенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich*, M7145).

Све ћелије које су коришћене у овом раду биле су чуване залеђене у течном азоту на температури од -196°C. Пре експеримента ћелије су биле одлеђене следећом процедуром. У топлој води залеђена криовајлица је отопљена, у епрувету је сипан медијум и њему је додат садржај криовајлице у коме су суспендоване ћелије. Епрувета са ћелијама је центрифугирана на 2000 обртаја/минуто у циљу добијања талоба ћелија. Супернатант из епрувете се одлаже, а ћелијски талог је поново ресуспендован свежим медијумом у циљу добијања суспензије ћелија која је преношена у стерилне флашкове за ћелијску културу од 25cm² (*Greiner Bio-One*, 690160). Флашкови за гајење са ћелијама су одлагани у инкубатор до постизања конfluентности од 80-90%.

Након што је постигнута конfluентност ћелија (80-90%) у флашковима, медијум је екстрахован, док су ћелије остале адхериране на пластици култиваторног флашка. Ћелије су испране 3 пута 1×*PBS*-ом. У циљу одлепљивања ћелија од пластичне подлоге флашка у флашкове је додаван по 1mL трипсина (*Sigma-Aldrich*, 85450C). Флашкови са ћелијама су држани 3-4 минута у инкубатору, да би после тога потврда да су се ћелије одлепиле била визуализована помоћу инвертног микроскопа. За даље експерименте је коришћена одвојена суспензија ћелија.

Да би се обезбедило да у сваком бунару буде исти број ћелија, пре експеримента потребно је било урадити бројање ћелија. Ћелије су избројане употребом бројача са две коморе. Пипетирано је 10µL ћелијске суспензије испод покровног стакла које потпуно покрива обе коморе за бројање ћелија. Ћелије су бројане у четири квадрата након чега је

рачуната средња вредност броја ћелија у једном квадрату, и та средња вредност је множена са 10^5 у циљу добијања броја ћелија у 1 mL ћелијске суспензије.

Четири енона и њихове четири соли синтетисала је Јована Мушкиња (Катедра за хемију, Природно-математички факултет, Крагујевац), а цисплатина је купљена од добављача *Calbiochem* (CAS 15663-27-1).

Сви испитивани енони су растворени у *DMSO*-у (*Sigma Chemical, ST. Lois, Mo*) до укупних концентрација од 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M и 300 μ M, при чему је коначна концентрација *DMSO*-а била већа од 0,5%. Соли енона биле су растворене у комплетном медијуму до радних концентрација.

Независне варијабле су представљене апликацијом новосинтетисаних енона и њихових соли, зависне варијабле: вијабилност ћелија, цитотоксични ефекат, про-апоптотични ефекат укључујући активацију цитохрома *c* и каспазе-3, промене у експресији *Bax* и *Bcl-2*, промене у митохондријалном мембранском потенцијалу, и утицај на ћелијски циклус. Збуњујуће варијабле: нису идентификоване.

Цитотоксични ефекат испитиваних супстанци одређиван је употребом МТТ теста. Ћелије (туморске – третиране и контролне и здраве ћелије - третиране и контролне) су биле третиране испитиваним супстанцама током 48 и 72 сата. За одређивање степена цитотоксичне ефикасности испитиваних енона и њихових соли, као контролна супстанца коришћена је цисплатина чији је цитотоксични ефекат на овим туморским ћелијама већ утврђен (одељак: Увод).

У следећем кораку истраживања, испитиван је антитуморски ефекат енона и њихових соли. За даље истраживање било је неопходно потврдити туморску селективност енона и њихових соли. То је значило да испитивање цитотоксичног и апоптотичног дејства енона и њихових соли може бити испитивано једино под условом да ове супстанце не испољавају цитотоксични ефекат на здравим - контролним ћелијама за шта су коришћене ћелије хуманих фибробласта – ћелијска линија *MRC-5*.

Тип ћелијске смрти одређиван је употребом проточне цитометрије (*flow cytometry*) помоћу *Annexin V-FITC* и 7-аминоактиномицин *D* бојења. Да би се утврдио тип ћелијске смрти, *HeLa* и *HCT-116* ћелије су инкубирале 48 сати испитиваним супстанцама у концентрацијама које одговарају њиховим IC_{50} вредностима. Проценат апоптотичних и некротичних ћелија утврђен је у односу на контролне ћелије - нетретиране *HeLa* и *HCT-116* ћелије.

У циљу испитивања механизма апоптозе која је индукована од стране испитиваних енона и њихових соли, коришћена је метода проточне цитометрије и флуоросцентне микроскопије.

Проточна цитометрија користила се за одређивање експресије регулаторних протеина апоптозе *Bax*-а, *Bcl-2* и каспазе-3 после 48 часовног третмана *HeLa* и *HCT-116* ћелија IC_{50} концентрацијама испитиваних супстанци - енона и њихових соли.

Флуоресцентна микроскопија коришћена је за одређивање експресије активног *Bax* (про-апоптотичног), *Bcl-2* (анти-апоптотичног) протеина и каспазе-3 након култивације у трајању од 24 сата *HeLa* и *HCT-116* ћелија IC_{50} вредностима, у третираним ћелијама, у односу на контролне, нетретиране ћелије, како би био утврђен механизам апоптозе.

3.3. MTT тест цитотоксичности

Цитотоксични ефекат испитиваних супстанци одређен је помоћу MTT колориметријског теста. Принцип MTT теста заснива се на особини живих, метаболички активних ћелија које деловањем митохондријалних оксидоредуктаза редукују жути 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид до формаза који је љубичасте боје и не раствара се.

MTT тест је извођен у микротитар плочама са 96 бунара (96 Greiner Bio-One, CLS6509). После трипсинизације и бројања ћелија, помоћу мултиканалне пипете у сваки бунар је засејан једнак број ћелија (5×10^3 ћелија по бунару). Ћелије у плочи се остављају у инкубатор 24 сата како би им се омогућила адхеренција за дно бунара. После овог периода, приступа се третирању ћелија (*HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5* ћелија) енонима и њиховим солима у концентрационим размацима од 0,3 до 100 μM (1, 3, 10, 30 и 100 μM) у трајању од 48 и 72 сата. Након завршеног третирања ћелија испитиваним супстанцама, уклања се медијум са леком, а сваком бунару је додато по 100 μL радног раствора MTT. Радни MTT раствор је добијен из MTT штока. MTT шток се прави тако што се 5mg жутог тетразолијум-бромида (енгл. *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*, *Abcam*, M2128-5G) раствара у 1,1mL PBS који је разблажен DMEM-ом у односу 1:10. Овај раствор стоји у плочи 2 сата на температури од 37°C у атмосфери са 0,5% CO_2 . Након овог периода, MTT раствор се вади и у бунаре се сипа по 200 μL 100%-тног диметил-сулфоксида (DMSO-а) чија је улога да створене кристале формаза раствори. Интензитет љубичасте боје одређиван је мерењем апсорбанци на 595nm помоћу читача 96-микротитар плоча (*Zenyth 3100*, *Anthos Labtec Instruments*).

За одређивање концентрације испитиваних супстанци које одговарају IC_{50} вредностима након третмана од 48 и 72 сата коришћен је софтвер *Microsoft Office Excel 2016*, *ED50plus v1.0* или *GraphPad Prism 8*. Проценат цитотоксичних ћелија одређен је формулом: Цитотоксичност (%) = $(1 - (\text{апсорбанца експерименталне групе} / \text{апсорбанца контролне групе}) \times 100)$.

3.4. Морфологија третираних ћелија

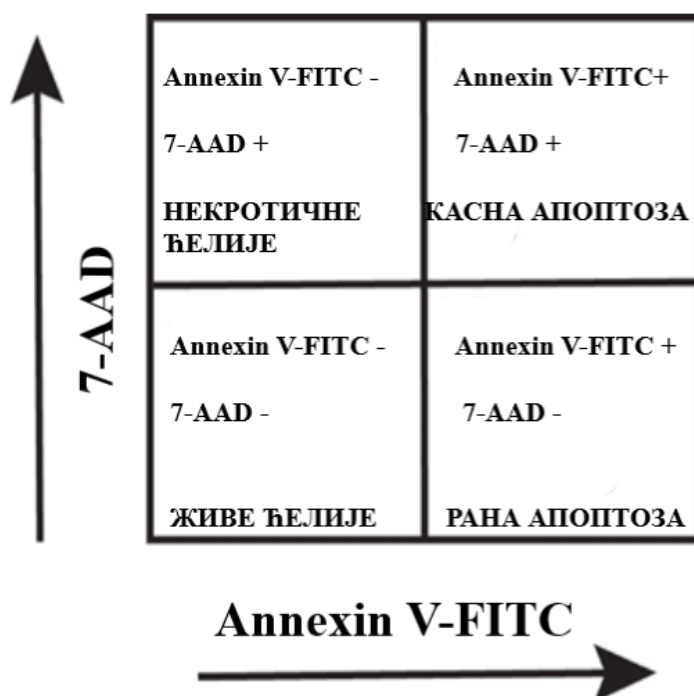
Потенцијални цитотоксични ефекат енона и њихових соли, поред стандардних молекуларних метода такође може бити испитан и потврђен употребом нативне фотографије. Наиме, цитотоксични и апоптотични ефекат супстанци неизоставно оставља последице које су лако уочљиве у изгледу третираних ћелија. Главне карактеристике морфологије сваке ћелије представљене су њеним обликом, адхерентношћу, контактном са другим околним ћелијама, бројем, обликом саме ћелије, обликом хроматина. Супстанце са цитотоксичним ефектом нарушавају нормалну морфологију ћелија које се могу визуализовати и детектовати употребом фазног микроскопа марке *Olimpus*, на увећању 100X. Морфологија туморских и здравих ћелија које су третиране енонима и њиховим солима упоређује се са морфологијом контролних туморских и здравих ћелија.

3.5. Проточна цитометрија - *Annexin V-FITC* тест апоптотичности

Након што је утврђено да постоји статистички значајна цитотоксичност испитиваних енона и њихових соли на *HeLa* и *HCT-116* ћелијама, у следећем кораку испитиван је њихов ефекат на апоптозу помоћу проточне цитометрије коришћењем боје *Annexin V-FITC/7-AAD* (640922, *Biolegend*).

Принцип методе се заснива на карактеристикама фосфатидил-серина који се код здравих ћелија налази унутар ћелијске мембране, оријентисан према цитоплазми ћелије. Деловањем цитотоксично-апоптотичних супстанци долази до активирања ових процеса и извртања фосфатидил-серина према екстрацелуларном простору деловањем ензима фосфолипаза при истовременој инхибицији аминоксидних транслоказа. У циљу детектовања дислоцираног фосфатидил-серина код апоптотичних ћелија користи се *Annexin V* коњугован флуоресцеин изотиоцијанатом -*FITC*. *Annexin V-FITC* се користи као маркер за идентификацију ћелија које се налазе у раном стадијуму апоптозе. Везивањем фосфатидил-серина за *Annexin V-FITC* на таласној дужини од 488 nm долази до емисије зелене боје која идентификује апоптотичне ћелије.

7-AAD представља флуоресцентну боју која показује афинитет према *GC* регионима у молекулу ДНК. Карактеристика овог једињења јесте та да не може дифундовати кроз мембрану живих ћелија. У ћелијама код којих је интегритет мембране нарушен, долази до уласка ове боје и њеног везивања за поменуте регионе на молекулу ДНК. Везивањем *7-AAD* и молекула ДНК долази до стварања комплекса *7-AAD- DNA* који емитује црвену флуоресценцију (647nm) приликом побуђивања ласером чиме се идентификује проценат некротичних ћелија. Такође, покретањем апоптотичне машинерије услед нарушеног интегритета ћелијске мембране *Annexin V-FITC* слободно дифундује унутар ћелије чиме је омогућено да се *FITC* веже за молекулу ДНК што служи као маркер за идентификацију ћелија које су у касном стадијуму апоптозе. Различити стадијуми апоптозе бојених ћелија приказани су на слици 15.



Слика 15. Различити стадијуми апоптозе бојених ћелија (*Annexin V-FITC/7-AAD*).

За живе ћелије карактеристично је да се не боје *Annexin V-FITC/7-AAD* бојама (*Annexin V-FITC*⁻ и *7-AAD*⁻); ћелије које се налазе у раном стадијуму апоптозе су позитивне на бојење анексином а негативне на *7-AAD* (*Annexin V-FITC*⁺ и *7-AAD*⁻); ћелије у стадијуму касне апоптозе су дуго позитивне на бојење анексином и *7-AAD* (*Annexin V-FITC*⁺ и *7-AAD*⁺) и некротичне ћелије су негативне на бојење анексином а позитивне на бојење *7-AAD* (*Annexin V-FITC*⁻ и *7-AAD*⁺). Укупни проценат ћелија које се налазе у процесу апоптозе добија се сабирањем процената ћелија које су у раном и касном стадијуму апоптозе.

Након трипсинизације и бројања, *HeLa* и *HCT-116* ћелије су засејаване у плоче са 24 бунара (1×10^5 ћелија по бунару; *Greiner Bio-One*, 662160). Након инкубације ћелија током 24 сата, спроведен је третман IC_{50} вредностима енона и солима енона у току 48 сати. После 48 часовног третмана, ћелије су пребачене у епрувете за проточну цитометрију, затим три пута испране хладним *PBS*-ом и ресуспендоване у 100 μ L хладног $1 \times$ *binding buffer* (раствор *FACS buffer* и дестиловане воде у размери 1:10), обојене са 10 μ L *Annexin V-FITC* и 20 μ L *7-AAD* и онда инкубиране 15 минута у мраку. После инкубације у сваку епрувету је додато по 400 μ L *binding buffer*, а проценат *HeLa* и *HCT-116* ћелија које су у апоптози анализиран је помоћу проточног цитометра *Cytomics FC500* (*Beckman Coulter, USA*).

3.6. Проточна цитометрија – анализа регулаторних протеина апоптозе - *Bax*, *Bcl-2* и каспазе-3

У циљу утврђивања механизма апоптозе неопходно је било одредити експресију протеина који регулишу апоптозу (*Bax*-а, *Bcl-2* и активне каспазе-3) што је вршено након 48 часовног третмана *HeLa* и *HCT-116* ћелија IC_{50} вредностима енона и њихових соли. Третман ћелија је праћен испирањем ћелија у хладном *PBS*-у и фиксацијом-пермеабилizацијом ћелија употребом фиксационог и пермеабилizационог комплета (*Fixation and Permeabilization Kit*, *eBioscience*, 88-824-00).

После пермеабилizације ћелија, урађена је инкубација примарним антителима у трајању од 20 минута ((разблажење примарног антитела у *PBS*-у износило је 1:500), антитело за активни *Bax* (*N20*, *sc-493*, *Santa Cruz Biotech. Inc*), *Bcl-2* (*mhbcl01*, *Life technologies*) и за каспазу-3 (*#9661*, *Cell signaling Technology, USA*)). Након инкубације ћелије, додавања 4 mL *PBS*-а, а потом центрифугирања и одливања супернатанта ћелије су биле ресуспендоване у 100 μ L *PBS*-а и потом инкубиране секундарним антителом *Alexa 488* (*11001*, *Invitrogen, USA*). Разблажење секундарних антитела је било 1:1000 и вршено је у мраку 15 минута.

После инкубације и још једног испирања *PBS*-ом, а затим центрифугирања и одливања супернатанта, ћелије су биле ресуспендоване у 300 μ L *PBS*-а и анализиране на проточном цитометру. Експресија протеина *Bax*-а, *Bcl-2* и активне каспазе-3 анализирана је помоћу софтвера за проточну цитометрију (*Flowing Software 2*).

Интензитет флуоресценције (*IF*) ћелија за *Bax*, *Bcl-2* и активну каспазу-3 израчунат је у односу на интензитет флуоресценције изотипске контроле.

3.7. Флуоресцентна микроскопија – одређивање експресије и локализације цитохрома *c*

У циљу потврде механизма апоптозе методом флуоресцентне микроскопије утврђена је експресија и локализација цитохрома *c* после 48 часовног третмана *HeLa* и

HCT-116 ћелија IC_{50} вредностима енона. Експресија и локализација цитохрома *c* рађене су на стакленим љуспицама на којима су ћелије биле адхериране. Процедура за постављање стаклених љуспица подразумевала је следећи приступ: непосредно пре засејавања ћелија, стаклене љуспице се стерилишу помоћу 80%-тног етанола и пламена. Стерилисане љуспице се потом помоћу стерилне пинцете постављају на дно бунара плоче (24 well plate).

Култивисане ћелије су потом подигнуте коришћењем трипсина, избројане су (1×10^5 ћелија на сваку стаклену љуспицу), постављене на стаклене љуспице и остављене 24 сата у инкубатор. После 24 сата, ћелије су биле третиране испитиваним енонима током 48 сати, након чега су стаклене љуспице из бунара плоча биле извађене и постављене на носаче. Љуспице на чијој горњој страни се налазе ћелије испране су хладним *PBS*-ом и фиксиране помоћу 4% формалдехида у периоду од 30 минута.

После фиксације, љуспице са ћелијама су биле испране *PBS*-ом и пермеабелизоване употребом 0,2%-тног *Tween 20* (*Sigma-Aldrich*, P1379). После пермеабелизације уследило је поновно испирање и блокирање употребом *blocking buffer-a* (0,1% *Tween 20* и 10% *FBS-a* у *PBS-y*) у трајању од десет минута. Уклањање блокирајућег буфера врши се накнадним испирањем љуспица након чега се приступа инкубацији ћелија примарним антителом за цитохром *c* (антитело разблажено 1:100 у *blocking buffer-y*) у периоду од сат времена.

Након инкубације примарним антителом, љуспице се испирају у *PBS-y* и ћелије се потом инкубирају у мраку секундарним антителом *Alexa 488* и *Alexa 594* у разблажењу 1:200 у трајању од 30 минута.

После инкубације секундарним антителима, љуспице су три пута опране у *PBS-y*, три пута у дупло дестилованој води и залепљене глицеролом на покривна стакла. Након тога посматрана су на микроскопу *Olympus*, модел *BX51* са увећањем 400 $\times$ и 1000 $\times$. Софтвер *ImageJ* је коришћен за мерење интензитета флуоресценције

3.8. Одређивање промене митохондријалног мембранског потенцијала

Очување стабилности митохондријалног мембранског потенцијала представља једну од основних карактеристика здраве ћелије. Промене у виду смањења митохондријалног мембранског потенцијала узрокују поремећаје у пропустљивости митохондријалних мембрана за велики број молекула у које убрајамо и егзогене, цитотоксичне молекуле или једињења.

Дисфункције које су везане за промене у митохондријалном мембранском потенцијалу везане су за велики број обољења у које убрајамо дијабетес, кардиоваскуларна обољења, различите видове карцинома и неуродегенеративне болести.

У здравим ћелијама *JC-10* боја је локализована у митохондријалном матриксу у виду агрегата (црвена флуоресценција), док код ћелија које су ушле у процес апоптозе и или некрозе, услед нарушеног потенцијала боја из матрикса митохондрија дифундује, постаје мономерна и мења флуоресценцију у зелену. Управо из овог разлога нарушавање интегритета митохондријалног мембранског потенцијала које је праћено транслокацијом *JC-10* боје служи као један од маркера за рану апоптозу што се детектује употребом *Flow* цитометра или флуоресцентног микроскопа.

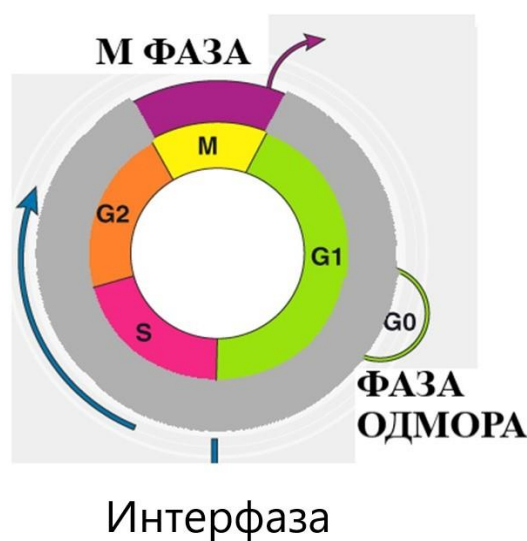
За одређивање митохондријалног мембранског потенцијала коришћена је *JC-10* боја (*Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA*). *HCT-116* ћелије су култивисане у плочи са 24 бунара (3×10^4 ћелија по бунару) 24 сата пре третирања у инкубатору (5% CO_2 , 37°C). Третман ћелија вршен је IC_{50} вредностима испитиваних енона у периоду од 48 сати.

Након истека третмана, медијум у коме су енони је извађен из бунара и ћелије су благо опране топлим *PBS* раствором и инкубиране су са 2.5 μ M *JC-10* боје у инкубатору на 5%CO₂, 37°C у периоду од 20 минута.

Након истека овог инкубационог периода, ћелије су испране топлим *1xPBS*-ом и посматране испод инвертног флуоресцентног микроскопа марке *Olympus IX50*. Добијене слике су анализиране помоћу *ImageJ* софтвера. За квантификациону анализу коришћен је однос флуоресцентне емисије на 525nm и 590nm.

3.9. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус представља низ сложених процеса који доводе до дупликације и подједнаке дистрибуције генетичког материјала ћелијама потомцима. Ћелијски циклус може да се подели на две главне фазе: интерфаза (G0, G1, S и G2 фаза) и М фаза. Током интерфазе у ћелијама долази до повећања ћелије услед активираних синтезе РНК и протеина (слика 16). За *Gap 0* (G0) подфазу карактеристично је да се ћелија налази у периоду стагнације, тј. нема деобе. У следећој *Gap1* (G1) подфази ћелија се увеличава и синтетише велики број протеина. За ову подфазу карактеристично је присуство прве контролне тачке (*G1 Checkpoint*) током које се проверава да ли је ћелија спремна за даљи ток у ћелијском циклусу. Током S фазе (синтезе) долази до умножавања молекула ДНК (репликација); *Gap2* (G2) представља фазу у ћелијском циклусу током које постоји пауза између синтезе ДНК и митозе. За ову фазу је карактеристична друга контролна тачка (*G2 Checkpoint*). Током последње фазе ћелијског циклуса, митозе, долази до раздвајања хромозома и ћелијске деобе.



Слика 16. Шематски приказ фаза ћелијског циклуса

За одређивање ефеката енона на ћелијски циклус, *HCT-116* и *HeLa* ћелије су третиране IC₅₀ вредностима испитиваних супстанци у периоду од 48 сати. Након третирања, ћелије су биле испране помоћу *PBS*-а и фиксирани у хладном 70% етанолу током ноћи на температури од +4°C. Фиксирани ћелије се ресуспендују и инкубирају у 1mL *PBS*-са *RNA-зом A* (500 μ g/mL) (12091021, Sigma Aldrich) на 37°C у трајању од 30 минута. Додавањем 5 μ L раствора за бојење (10mg пропиридијум јодид/mL *PBS*) (B7758,

Biotrend) ћелије се инкубирају 15 минута у мраку. Након овог периода следи анализирање ћелијског циклуса користећи *flow* цитометар, *Cytomics FC500*. Садржај ДНК је био одређен употребом *Flowing Software*-а а сама дистрибуција ћелија у ћелијском циклусу је представљена помоћу хистограма.

3.10. Статистичка анализа података

Нумерички подаци су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (*SD*) за три пута поновљена појединачна експеримента. За статистичку анализу података коришћен је комерцијални програмски пакет *SPSS* (верзија 20). За анализу података са нормалном расподелом коришћен је *Student*-ов *t*-теста, а за податке који нису пратили нормалну расподелу коришћен је *Kruskal-Wallis*-ов тест.

Mann-Whitney-јев тест је примењен за обраду података суме рангова. Статистички значајним резултатима сматрани су они резултати код којих је *p* вредност била мања или једнака вредности од 0,05.

4. РЕЗУЛТАТИ

У циљу испитивања биолошких ефеката новосинтетисаних енона, употребом МТТ теста одређиван је цитотоксични ефекат енона на свим испитиваним ћелијама у периоду од 48 и 72 сата. Цитотоксични ефекат новосинтетисаних енона упоређиван је са цитотоксичним ефектом цисплатине која је коришћена као позитивна контрола.

4.1. Цитотоксични ефекат енона и соли енона

Да би новосинтетисане супстанце могле да буду предмет испитивања биолошких ефеката на туморским ћелијама, најпре је неопходно доказати да не испољавају цитотоксично дејство на здравим ћелијама. Новосинтетисани молекули енона примењени у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и 100 μ М не испољавају цитотоксични ефекат према здравим ћелијама (*MRC-5*). Резултати МТТ теста показали су да су сви новосинтетисани енони (Е1-Е4) испољили статистички значајно мањи ($p < 0,05^*$) цитотоксични ефекат према здравим *MRC-5* ћелијама у односу на туморске ћелије ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) током 48 часовног третмана (График 1). Цитотоксични ефекат свих новосинтетисаних енона био је дозно зависан.

Најпре је испитиван цитотоксични ефекат новосинтетисаних енона на здравим *MRC-5* ћелијама. За Енон 1 (График 1А), који је апликован у свим испитиваним концентрацијама током 48 сати, проценат цитотоксичних *MRC-5* ћелија кретао се у опсегу од 2,55% до максималних 17,38% за највећу апликовану дозу Енона 1 од 100 μ М. Енон 2 (График 1Б) је током 48 сати имао статистички значајно најнижи цитотоксични ефекат ($p < 0,05^*$) према здравим ћелијама. Проценат цитотоксичности кретао се од 3,7% (за најнижу коришћену концентрацију - 1 μ М) до 13,6% (за највишу коришћену концентрацију - 100 μ М).

Проценат цитотоксичних *MRC-5* ћелија које су третиране Еноном 3 (График 1В) током 48 сати износио је од 1,6% (за најнижу дозу 1 μ М) до 16,38% за највишу апликовану дозу (100 μ М). Проценат цитотоксичних *MRC-5* ћелија третираних Еноном 4 (График 1Г) је био највећи током третмана од 48 сати. Проценат цитотоксичних *MRC-5* ћелија кретао се од 2,2% до 17,5% за највећу апликовану дозу. МТТ тестом цитотоксичности показано је да сви новосинтетисани енони испољавају статистички значајно ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) слабији цитотоксични ефекат према здравим ћелијама чиме је био испуњен услов за њихово даље испитивање и одређивање цитотоксичног ефекта према различитим ћелијама тумора (*HeLa* и *HCT-116*).

Цитотоксични ефекти новосинтетисаних енона и њихових соли били су упоређивани са цитотоксичним ефектима цисплатине која је била примењена у истим концентрацијама у истим временским интервалима на испитиваним туморским ћелијама. Сви резултати испитивања цитотоксичних дејстава испитиваних супстанци били су упоређивани са њиховим ефектима на здравим, контролним ћелијама.

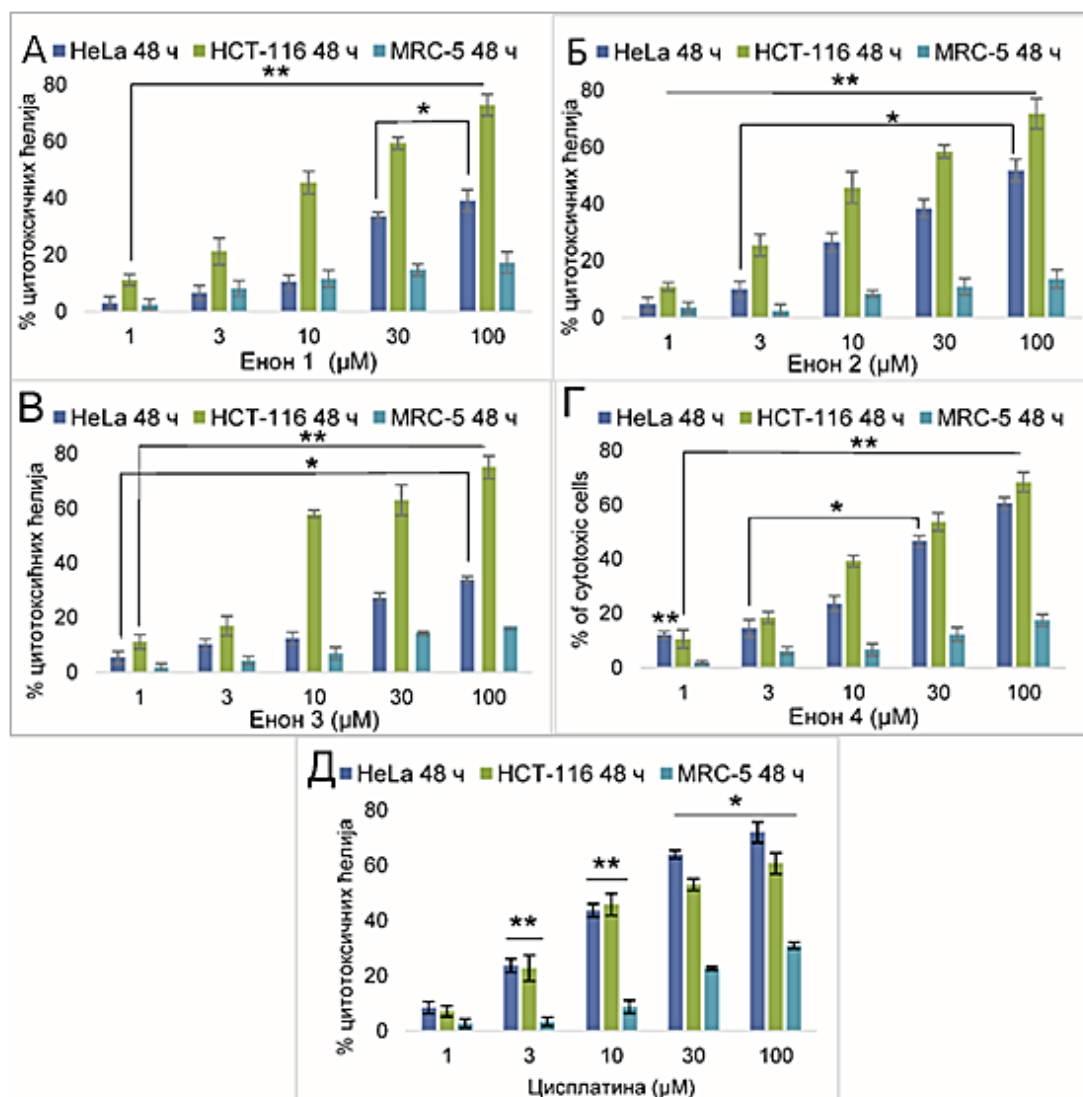


График 1. Цитотоксични ефекти различитих новосинтетисаних енона (Е1-Е4) примењених у различитим концентрацијама током 48 часова на три врсте испитиваних ћелија (*HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5*) (А, Б, В и Г). Д. Цитотоксични ефекат цисплатине примењене у различитим концентрацијама током 48 часова на испитиваним ћелијама. Цисплатина је коришћена као позитивна контрола. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Резултати МТТ теста за новосинтетисане еноне и на туморским ћелијама показали су да су сви испитивани енони испољили статистички значајан ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) цитотоксични ефекат на туморским ћелијама у односу на здраве, контролне ћелије.

За Енон 1 (График 1А), који је апликован у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и 100 μM током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у распону од 3,1% до максималних 39,2% за највећу апликовану дозу (100 μM). Статистички значајно повећање ($p < 0,05^*$) процента цитотоксичних *HeLa* у односу на здраве *MRC-5* ћелије (2,3 пута) било је присутно при дозама Енона 1 од 30 и 100 μM. Цитотоксични ефекат Енона 1 примењеног у свим испитиваним концентрацијама испољио је високу статистичку значајност ($p < 0,01^{**}$) према *HCT-116* у односу на здраве *MRC-5* ћелије. Цитотоксични

ефекат Енона 1 у концентрацији од 1 μ M на *HCT-116* ћелијама (График 1А) био је 5,25 пута већи у односу на здраве *MRC-5* и 4,3 пута већи у односу на *HeLa* ћелије. При највећој концентрацији (100 μ M) Енон 1 на *HCT-116* ћелијама испољио је 1,7 пута већи цитотоксични ефекат у односу на *HeLa* ћелије и 3,9 пута већу цитотоксичност у односу на здраве ћелије.

За Енон 2 (График 1Б), који је апликован у концентрацијама (1, 3, 10, 30 и 100 μ M) током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 4,75% до максималних 52% за највећу апликовану дозу (100 μ M). Статистички значајно повећање ($p<0,05^*$) процента цитотоксичних *HeLa* у односу на здраве *MRC-5* ћелије (четири пута) било је присутно при дози Енона 2 од 3 до 100 μ M. Цитотоксични ефекат Енона 2 примењеног у свим испитиваним концентрацијама испољио је високу статистичку значајност ($p<0,01^{**}$) према *HCT-116* у односу на здраве *MRC-5* ћелије. Цитотоксични ефекат Енона 2 у концентрацији од 1 μ M на *HCT-116* ћелијама (График 1Б) био је 3 пута већи у односу на здраве *MRC-5* и 2,3 пута већи у односу на *HeLa* ћелије. При највећој концентрацији (100 μ M) Енон 2 на *HCT-116* ћелијама испољио је 1,4 пута већи цитотоксични ефекат у односу на *HeLa* ћелије и 5,3 пута већу цитотоксичност у односу на здраве ћелије.

За Енон 3 (График 1В), који је апликован у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и 100 μ M током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 5,4% до максималних 33,9% за највећу апликовану дозу (100 μ M). Статистички значајно повећање процента цитотоксичних *HeLa* у односу на здраве *MRC-5* ћелије било је регистровано при свим апликованим дозама Енона 3 ($p<0,05^*$). Цитотоксични ефекат Енона 3 примењеног у свим испитиваним концентрацијама испољио је високу статистичку значајност ($p<0,01^{**}$) према *HCT-116* у односу на здраве *MRC-5* ћелије. Цитотоксични ефекат Енона 3 у концентрацији од 1 μ M на *HCT-116* ћелијама (График 1В) био је седам пута већи у односу на здраве *MRC-5* и два пута већи у односу на *HeLa* ћелије. При највећој концентрацији (100 μ M) Енон 3 на *HCT-116* ћелијама испољио је 2,2 пута већи цитотоксични ефекат у односу на *HeLa* ћелије и 4,5 пута већу цитотоксичност у односу на здраве ћелије.

За Енон 4 (График 1Г), који је апликован у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и 100 μ M током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 12,1% до максималних 60,7% за највећу апликовану дозу (100 μ M). Статистички значајно повећање ($p<0,01^{**}$) процента цитотоксичних *HeLa* у односу на здраве *MRC-5* ћелије (5,7 пута) било је присутно при дози Енона 4 од 1 μ M. Остале испитиване концентрације Енона 4 на *HeLa* туморским ћелијама показале су статистички значајну ($p<0,05^*$) разлику у односу на контролне ћелије. Цитотоксични ефекат Енона 4 у концентрацији од 1 μ M на *HCT-116* ћелијама (График 1В) био је пет пута већи у односу на здраве *MRC-5* ћелије. При највећој концентрацији (100 μ M) Енон 4 на *HCT-116* и *HeLa* ћелијама испољио је сличан, статистички значајан ($p<0,01^{**}$) цитотоксични ефекат док је проценат цитотоксичних *HCT-116* ћелија био четири пута већи у односу на здраве ћелије.

Цитотоксични ефекат цисплатине према туморским ћелијама, иако је сличан цитотоксичним ефектима новосинтетисаних енона, није даље узиман у обзир и у експерименталне процедуре услед високог степена цитотоксичности које цисплатина показује према здравим ћелијама, за разлику од новосинтетисаних енона код којих је цитотоксични ефекат према здравим ћелијама био значајно мањи у односу на ефекте цисплатине. Цисплатина примењена током 48 сати на туморским ћелијама испољила је статистички значајно већи цитотоксични ефекат ($p<0,01^{**}$) у односу на ефекат према здравим ћелијама при дозама од 3 и 10 μ M.

Добијени резултати показали су да новосинтетисани енони испољавају најјачи цитотоксични ефекат на *HCT-116* ћелијама, потом на *HeLa* ћелијама и на крају најнижи

цитотоксични ефекат био је испољен на здравим ћелијама. На основу добијених резултата МТТ теста, редослед (секвенца) цитотоксичности испитиваних новосинтетисаних енона (од највеће ка најмањој) према туморским *HCT-116* ћелијама може се приказати на следећи начин – E2-E1-E3-E4 (42,54; 41,69; 40,89 и 38,13). Редослед (секвенца) цитотоксичности испитиваних новосинтетисаних енона (од највеће ка најмањој) према туморским *HeLa* ћелијама може се приказати на следећи начин – E4-E2-E1-E3 (38,13; 26,35; 18,66 и 17,92). Просечна цитотоксичност испитиваних новосинтетисаних енона (од највеће ка најмањој) према здравим *MRC-5* ћелијама може се приказати на следећи начин – E1-E4-E3-E2 (10,91; 8,97; 8,81 и 7,84).

Резултати испитивања цитотоксичних ефеката новосинтетисаних енона на испитиваним ћелијама током 72 сата (График 2) дали су следеће резултате - проценат цитотоксичних здравих *MRC-5* ћелија након 72 сата третмана новосинтетисаним енонима био је статистички значајно повећан у односу на третман од 48 сати ($p < 0,01^{**}$); проценат цитотоксичних *HCT-116* туморских ћелија након третмана свим испитиваним енонима био је статистички значајно повећан у односу на контролне ћелије ($p < 0,05^{*}$), а на *HeLa* ћелијама цитотоксични ефекат испитиваних није испољио статистичку значајност у односу на контролне, здраве ћелије.

Цитотоксични ефекат Енона 1 примењеног у свим испитиваним концентрацијама током 72 часа имао је високу статистичку значајност ($p < 0,05^{*}$) према *HCT-116* у односу на здраве *MRC-5* ћелије. Цитотоксични ефекат Енона 1 према *HCT-116* ћелијама (График 2А) кретао се у опсегу од 66-73% за све испитиване концентрације. За Енон 2 проценти цитотоксичних *HCT-116* ћелија кретали су се у опсегу од 65-72%; за Енон 3 од 66-70% и за Енон 4 - 66-71%.

Такође још једна значајност била је испољена у случају испитиваног Енона 4. Наиме, за овај енон није постојала разлика у цитотоксичном ефекту према туморским ћелијама у односу на контролне, здраве ћелије. Јасни тренд у цитотоксичном ефекту новосинтетисаних енона као и у дозно зависном цитотоксичном ефекту према туморским ћелијама није био толико јасно диференциран и уочљив током третмана од 72 сата као у случају третмана у трајању од 48 сати.

Сви испитивани енони (у свим концентрацијама) током 72 сата имали су сличне вредности процента апоптотичних ћелија уколико се посматрају појединачне туморске ћелије. Управо овакви резултати показали су да се секвенца (редослед) цитотоксичног дејства енона не може успоставити током периода од 72 сата.

Цитотоксични ефекти цисплатине током 72 сата на испитиваним ћелијама (туморским и здравим) показали су висок степен неселективности. Једина статистички значајна разлика ($p < 0,05^{*}$) у цитотоксичном дејству цисплатине била је присутна на *HeLa* ћелијама при дози од 3 μ М (График 2Д).

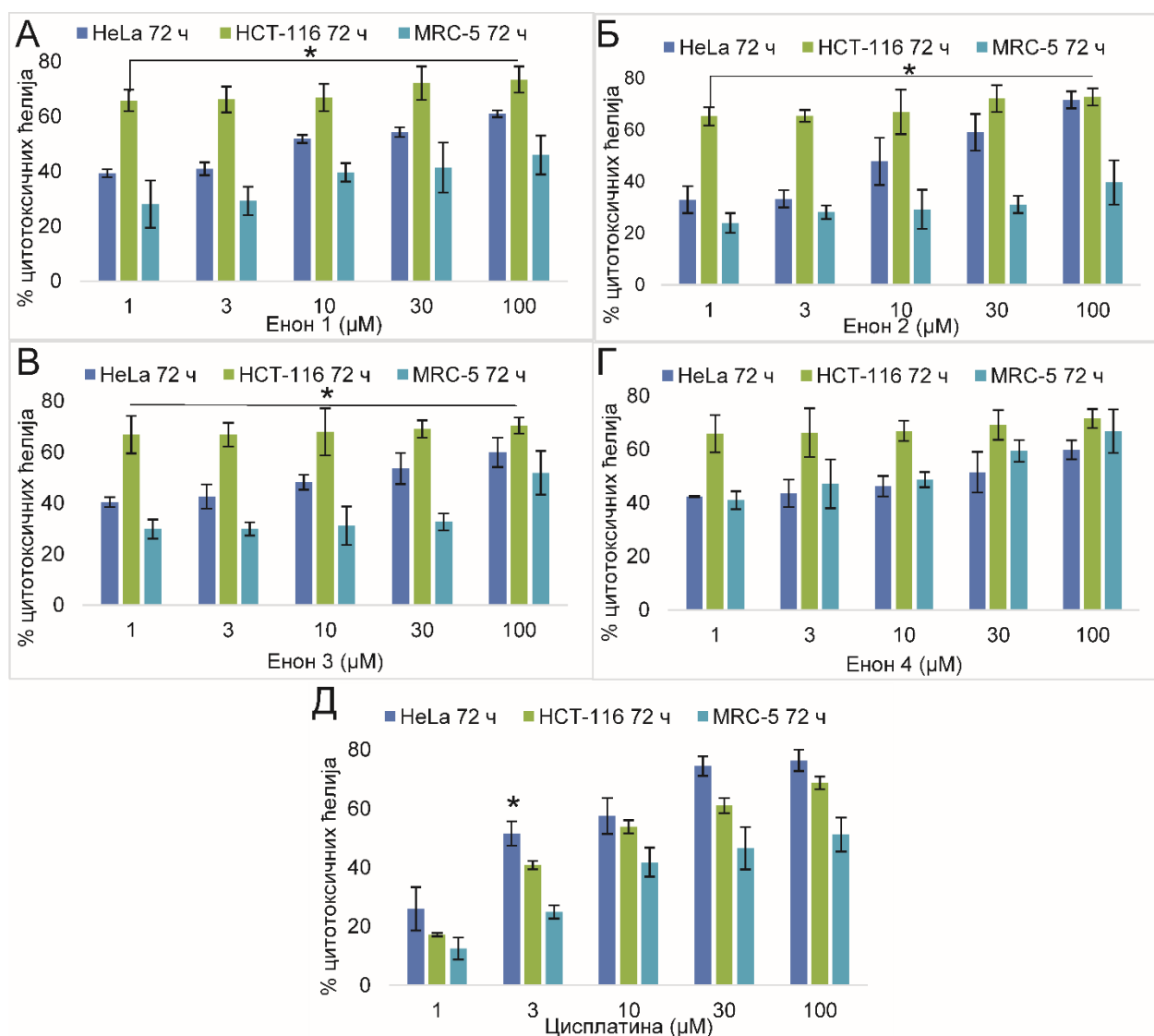


График 2. Цитотоксични ефекти различитих новосинтетисаних енона (Е1-Е4) примењених у различитим концентрацијама током 72 сата на три врсте испитиваних ћелијских линија (*HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5*) (А, Б, В и Г). Д. Цитотоксични ефекат цисплатине примењене у различитим концентрацијама током 72 часа на испитиваним ћелијама. Цисплатина је коришћена као позитивна контрола. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $<0,05$ (*) и $<0,01$ (**).

Након испитивања цитотоксичног дејства новосинтетисаних енона, у даљим експериментима били су испитивани цитотоксични ефекти соли енона на туморским и здравим ћелијама током оба временска интервала (График 3 и 4). Најпре је испитиван цитотоксични ефекат новосинтетисаних соли енона на здравим *MRC-5* ћелијама у периоду од 48 сати (График 3).

Резултати су показали да су цитотоксични ефекти новосинтетисаних соли енона на здравим ћелијама значајно нижи у односу на цитотоксичне ефекте које су соли енона имале према туморским ћелијама. Проценсти цитотоксичних *MRC-5* ћелија третираних солима Енона 1 (од најниже до највише коришћене концентрације) кретали су се у опсегу

од 5,78 до максималних 12,5%. За со Енона 2 (од 2,45 до 9,47%), со Енона 3 (од 6,6 до 14%) и со Енона 4 (од 7,4 до 28,5%).

Резултати МТТ теста за новосинтетисане соли енона на туморским ћелијама показали су следеће - већина испитиваних соли енона су испољиле статистички значајне ($p < 0,01^{**}$) цитотоксичне ефекте на туморским ћелијама у односу на здраве, контролне ћелије.

Со Енона 1 (График 3А), која је апликована у концентрацији од $1\mu\text{M}$ није испољила статистички значајну разлику у цитотоксичном ефекту између туморских и здравих ћелија. Међутим со Енона 1 апликована у дозама од 3, 10, 30 и $100\mu\text{M}$ током 48 сати, испољила је статистички значајан цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелијама који се кретао у опсегу од 19% ($3\mu\text{M}$) до максималних 34% за највећу апликовану дозу ($100\mu\text{M}$), док се за *HCT-116* ћелије овај опсег кретао од 21 до 55% (од најниже до највише коришћене дозе соли Енона 1).

Соли Енона 1 (График 3А) испољиле су статистички значајну ($p < 0,01^{**}$) разлику у цитотоксичном ефекту између туморских *HCT-116* и *HeLa* у односу на здраве *MRC-5* ћелије при дозама од 3- $100\mu\text{M}$. Соли Енона 1 су испољиле снажнији цитотоксични ефекат према туморским *HCT-116* у односу на *HeLa* ћелије.

За со Енона 2 (График 3Б), која је апликована у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и $100\mu\text{M}$ током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 11% до максималних 42% за највећу апликовану дозу ($100\mu\text{M}$), за *HCT-116* ћелије овај опсег је износио од 13% до 57% (од најниже до највише коришћене дозе соли Енона 2). Статистички значајно повећање ($p < 0,01^{**}$) процента цитотоксичних *HeLa* и *HCT-116* у односу на здраве *MRC-5* ћелије било је присутно у свим испитиваним дозама соли Енона 2.

За со Енона 3 (График 3В), која је апликована у концентрацијама од 1, 3, 10, 30 и $100\mu\text{M}$ током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 7,5% до максималних 32% за највећу апликовану дозу ($100\mu\text{M}$), а за *HCT-116* ћелије овај опсег је износио од 11,5% до 48% (од најниже до највише апликоване дозе соли Енона 3). Со Енона 3 примењена у концентрацијама од 10, 30 и $100\mu\text{M}$ током 48 сати показала је високу статистички значајну ($p < 0,01^{**}$) разлику између цитотоксичног ефекта на туморским *HeLa* и *HCT-116* у односу на здраве, контролне ћелије.

За со Енона 4 (График 3Г), која је апликована у концентрацијама (1, 3, 10, 30 и $100\mu\text{M}$) током 48 сати, проценат цитотоксичних *HeLa* ћелија био је у опсегу од 6,5% до максималних 32% за највећу апликовану дозу ($100\mu\text{M}$), а за *HCT-116* ћелије овај опсег је износио од 11 до 42% (од најниже до највише апликоване дозе соли Енона 4). Со Енона 4 на *HeLa* и *HCT-116* ћелијама имала је значајан ($p < 0,01^{**}$) цитотоксични ефекат (у концентрацијама од 10, 30 и $100\mu\text{M}$) у односу на здраве, контролне ћелије.

Цитотоксични ефекти цисплатине (График 3Д) показали су високу статистички значајну ($p < 0,01^{**}$) разлику између туморских и здравих, контролних ћелија (у концентрацијама од 3- $100\mu\text{M}$). Цисплатина је имала већи цитотоксични ефекат у односу на испитиване соли енона, али такође је имала и висок степен цитотоксичних здравих ћелија.

На основу добијених резултата МТТ теста, просечна цитотоксичност испитиваних новосинтетисаних соли енона (од највеће ка најмањој) према туморским *HCT-116* ћелијама може се приказати на следећи начин – Е2-Е1-Е3-Е4 (39; 37; 32 и 29). Средња вредност цитотоксичност испитиваних новосинтетисаних соли енона (од највеће ка најмањој) према туморским *HeLa* ћелијама може се приказати на следећи начин – Е2-Е1-Е3-Е4 (29; 25; 22 и 22 – средње вредности цитотоксичности).

Средња вредност цитотоксичност испитиваних новосинтетисаних соли енона (од највеће ка најмањој) према здравим *MRC-5* ћелијама може се приказати на следећи начин

– E2-E1-E3-E4 (8; 12; 14 и 15). У поређењу са енонима, соли енона испољавају статистички значајно слабији цитотоксични ефекат на туморске ћелије током 48 сати. Све испитиване соли енона током третмана од 48 сати имале су дозно зависан ефекат.

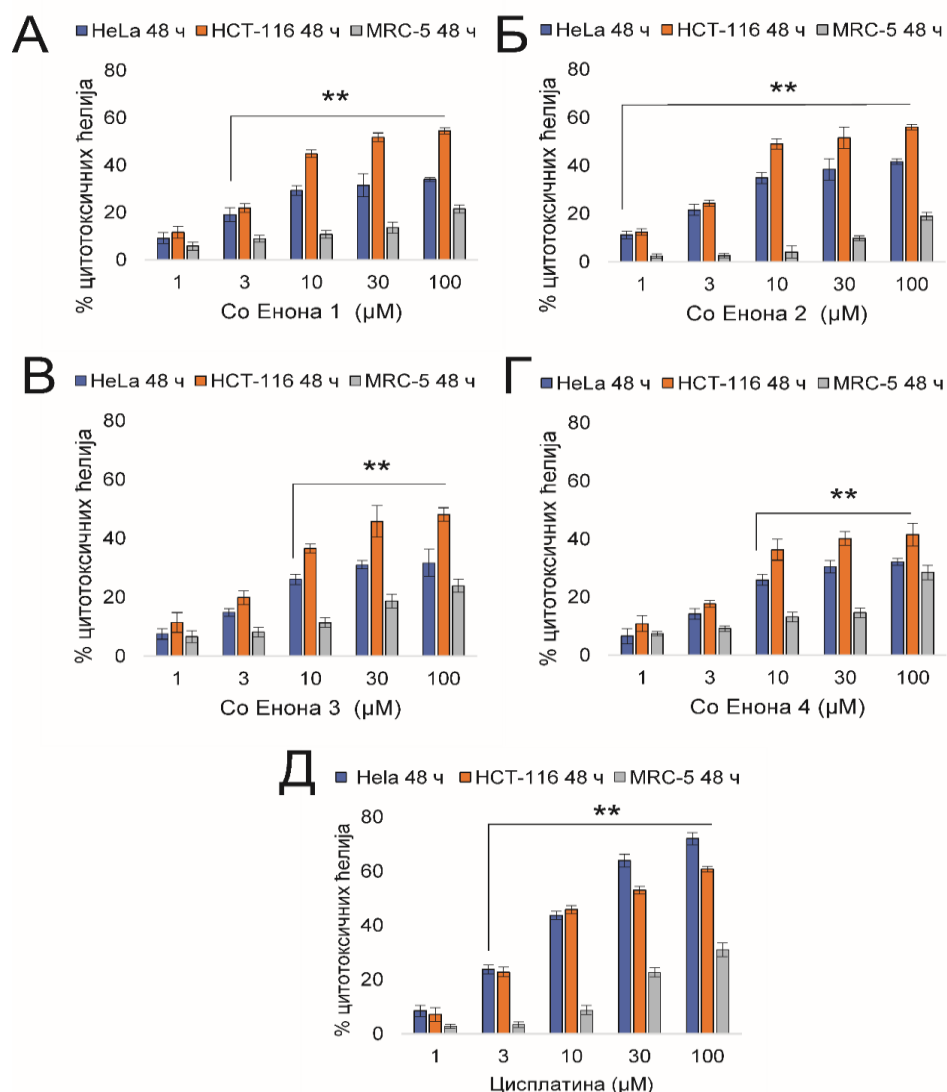


График 3. Цитотоксични ефекти различитих новосинтетисаних соли енона (Со Е1-Е4) примењених у различитим концентрацијама током 48 сати на три врсте испитиваних ћелијских линија (*HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5*) (А, Б, В и Г). Д. Цитотоксични ефекат цисплатине примењене у различитим концентрацијама током 48 сати на испитиваним ћелијама. Цисплатина је коришћена као позитивна контрола. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Цитотоксични ефекти новосинтетисаних соли енона на здравим *MRC-5* ћелијама у периоду од 72 сата кретали су се у опсегу од 22-40% (со Енона 1), 24-33% (со Енона 2), 25-39% (со Енона 3) и 23-43% за со Енона 4.

Соли енона нису испољиле статистички значајну разлику у цитотоксичном дејству између туморских *HeLa* и здравих *MRC-5* ћелија. Со Енона 1 није имала статистички значајан цитотоксични ефекат на туморским *HCT-116* ћелијама у односу на контролне, здраве ћелије (График 4А). У случају соли Енона 2 примењених у свим концентрацијама

током периода од 72 сата на туморским *HCT-116* ћелијама резултати МТТ теста показали су статистички значајну ($p < 0,01^{**}$) разлику у односу на здраве ћелије (График 4Б). За соли Енона 3 и 4 (примењене у високим концентрацијама— График 4В и Г) статистичка разлика у цитотоксичности на *HCT-116* ћелијама је износила $0,05^{*}$ у односу на здраве ћелије. Такође, резултати МТТ теста након третмана од 72 сата указују на то да нема статистички значајне разлике у цитотоксичном ефекту различитих соли енона између *HeLa* и здравих *MRC-5* ћелија.

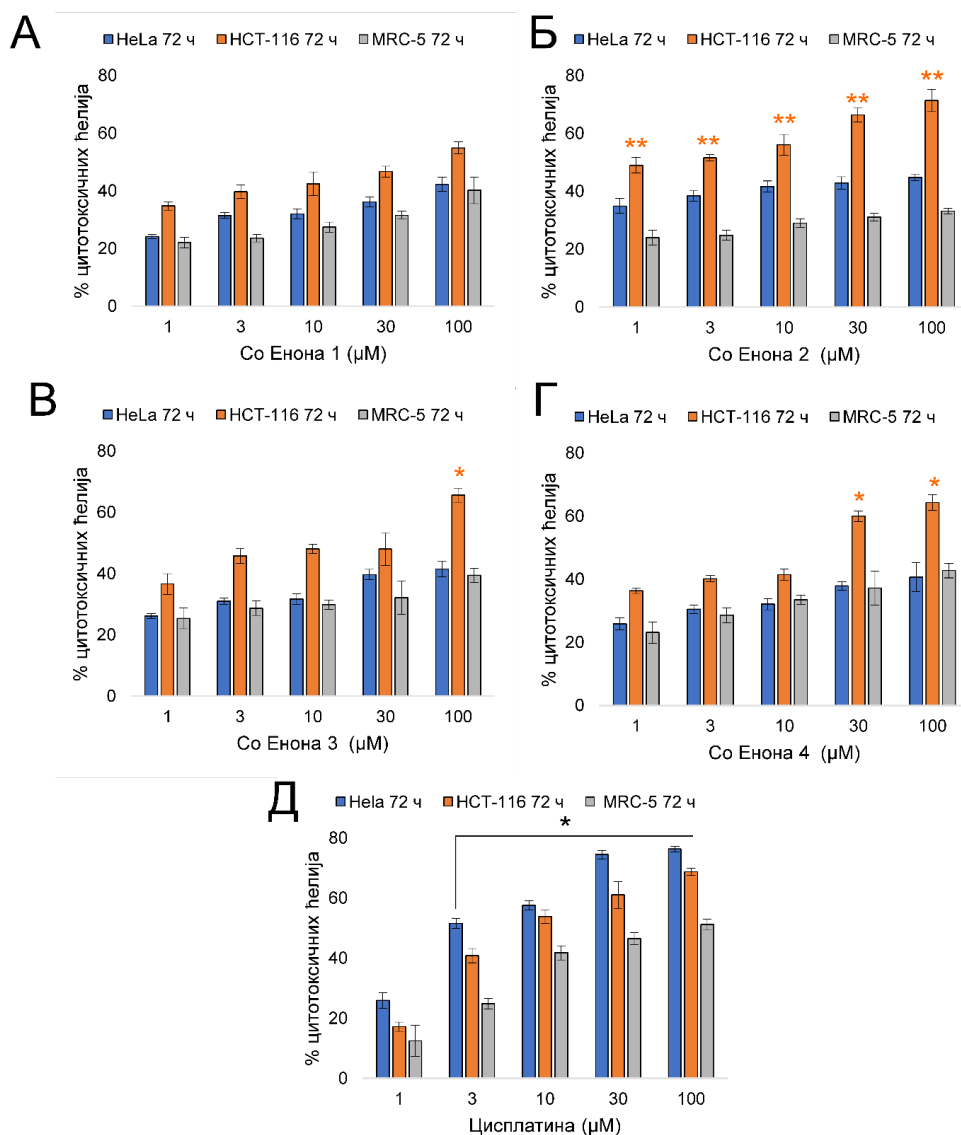


График 4. Цитотоксични ефекти различитих новосинтетисаних соли енона (Со Е1-Е4) примењених у различитим концентрацијама током 72 сата на три врсте испитиваних ћелијских линија (*HeLa*, *HCT-116* и *MRC-5*) (А, Б, В и Г). Д. Цитотоксични ефекат цисплатине примењене у различитим концентрацијама током 72 сата на испитиваним ћелијама. Цисплатина је коришћена као позитивна контрола. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности $<0,05$ (*) и $<0,01$ (**).

4.2. IC₅₀ вредност концентрација енона и соли енона

Након добијених резултата цитотоксичних ефеката новосинтетисаних енона и њихових соли на туморским ћелијама, у даљем експерименталном кораку била је израчуната IC₅₀ вредност концентрација свих испитиваних супстанци у испитиваним временским интервалима (Табела 1а и 1б).

Под IC₅₀ (половина максималне инхибиторне концентрације) вредности подразумева се концентрација неке супстанце која у испитиваном временском интервалу узрокује инхибицију одређеног процеса за 50%. У циљу израчунавања IC₅₀ вредности коришћени су доступни програмски пакети (видети одељак материјал и методе).

У Табели 1 и 2 израчунате IC₅₀ вредности за новосинтетисане еноне и њихове соли у испитиваним временским интервалима показали су да следеће најниже IC₅₀ вредности новосинтетисаних енона за 48 часова израчунате су према *HCT-116* ћелијама (од 5,106-E2; 6,06-E1; 6,8-E3 и 9,425μM за E4); потом су следеће израчунате IC₅₀ вредности биле за *HeLa* ћелије (13,37-E2; 17,31-E1; 18,19-E3 и 20,13μM за E4).

Израчунате вредности IC₅₀ за здраве ћелије су биле статистички значајно веће у поређењу са IC₅₀ вредностима за испитиване туморске ћелије. За следећи испитивани интервал од 72 сата, IC₅₀ вредности су биле очекивано ниже у односу на интервал од 48 сати.

	IC ₅₀ (μM)					
	48 ч			72 ч		
	HeLa	HCT-116	MRC-5	HeLa	HCT-116	MRC-5
E1	17.31±1.19	6.06±0.96	>150	3.59±0.3	1.12±0.1	68.85±2,3
E2	13.37±1.43	5.106±0.92	>200	3.43±0.09	0.9±0.2	91.47±1,98
E3	18.19±1.33	6.8±1.01	>100	3.96±0.1	1.64±0.1	74.42±9,84
E4	20.13±1.19	9.425±1.78	>100	4.129±0.8	2.0±0.1	81.51±2,54
CisPt	16,5±0,98	13,6±1,45	30.98±2,67	3.62±0,82	7.08±1,6	86.1±1,65

Табела 1. IC₅₀ вредности испитиваних енона на туморским ћелијама у периоду од 48 и 72 сата.

	IC ₅₀ (μM)					
	48 ч			72 ч		
	HeLa	HCT-116	MRC-5	HeLa	HCT-116	MRC-5
Co E1	51.34±0.19	32.66±1.82	>100	20.67±1.05	14.85±0.76	88.85±1,3
Co E2	49.76±1.22	30.94±2.11	>90	18.12±0.93	14.25±0.78	91.31±1,28
Co E3	54.71±2.03	55.27±2.08	>100	23.14±1.81	14.92±0.86	76.42±1,37
Co E4	55.19±1.89	77.11±3.82	>100	29,05±1.43	15.65±1.03	84.51±1,24
CisPt	16,5±0,98	13,6±1,45	30.98±2,67	3.62±0,82	7.08±1,6	32.1±1,05

Табела 2. IC₅₀ вредности испитиваних соли енона на туморским ћелијама у периоду од 48 и 72 сата.

Израчунате IC₅₀ вредности за испитиване соли енона током третмана од 48 и 72 часа, приказане су у Табели 1б. На основу приказаних резултата, јасно се може закључити да су у оба испитивана временска интервала сви испитивани енони имали ниже IC₅₀

вредности у односу на соли енона. Као и у случају енона, соли енона су имале ниже IC₅₀ вредности на ћелијама карцинома колона у односу на карцином цервикса. Поред виших IC₅₀ вредности соли енона, ови молекули су испунили услов за даље испитивање.

4.3. Индекс селективности

Индекс селективности представља степен или меру токсичности одређене супстанце на туморским ћелијама у односу на здраве ћелије што нам даје увид у специфичност одређене супстанце према туморским ћелијама. Резултати који су приказани у Табели 3 указују на висок степен селективности енона и њихових одговарајућих соли. Индекс селективности био је виши код енона у односу на њихове одговарајуће соли, и био је виши према ћелијама карцинома колона у односу на ћелије карцинома цервикса.

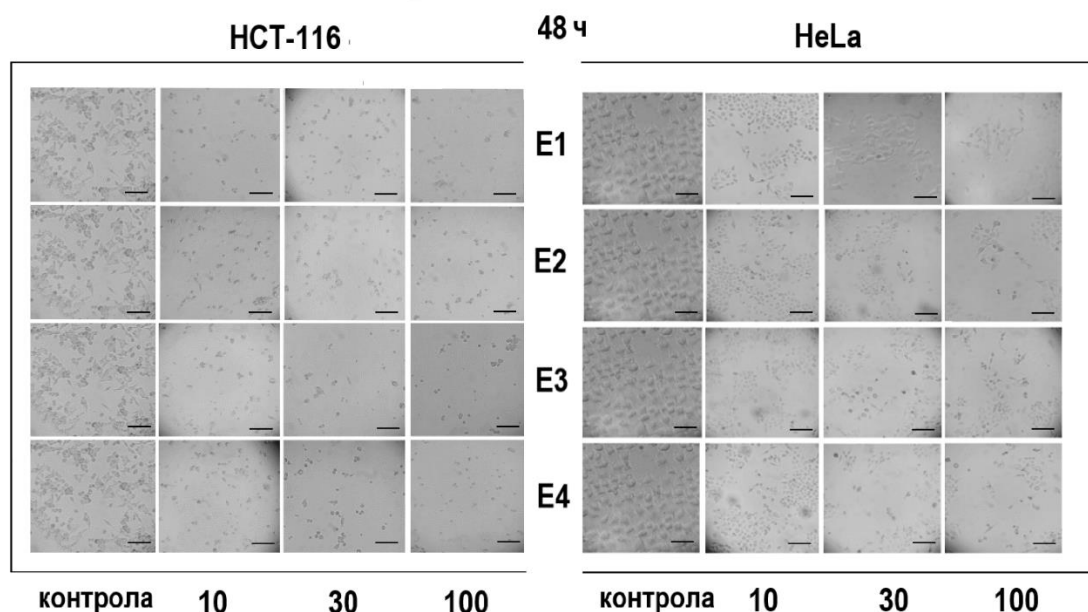
SI (selectivity index)	48h		72h	
	HeLa	HCT-116	HeLa	HCT-116
E1	8.67	24.75	19.18	61.47
E2	14.96	39.22	26.67	101.63
E3	5.50	14.71	18.79	45.38
E4	4.97	10.62	19.74	40.76
cisPt	1.88	2.28	23.78	12.16

Табела 3. Индекс селективности енона у периоду од 48 и 72 сата на испитиваним туморским ћелијама

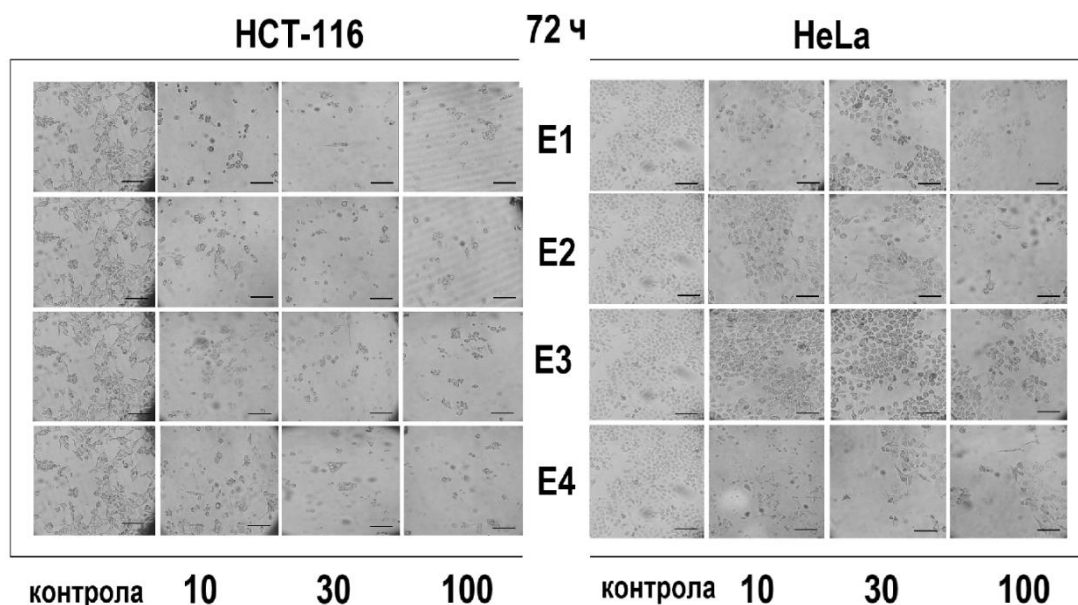
4.4. Утицај новосинтетисаних енона и соли енона на морфологију третираних туморских ћелија

Нормална морфологија ћелија представља једну од карактеристика свих здравих и туморских ћелија. Очувана морфологија је неопходна за нормалан метаболизам, раст, развој, контакте са околним ћелијама и нормалну адхерентност за подлогу раста. Деловањем различитих фактора долази до поремећаја нормалне морфологије ћелија и нарушавања њених основних ентитета. Променом равнотеже у правцу различитих типова ћелијске смрти, директно се утиче на метаболизам и морфологију ћелија.

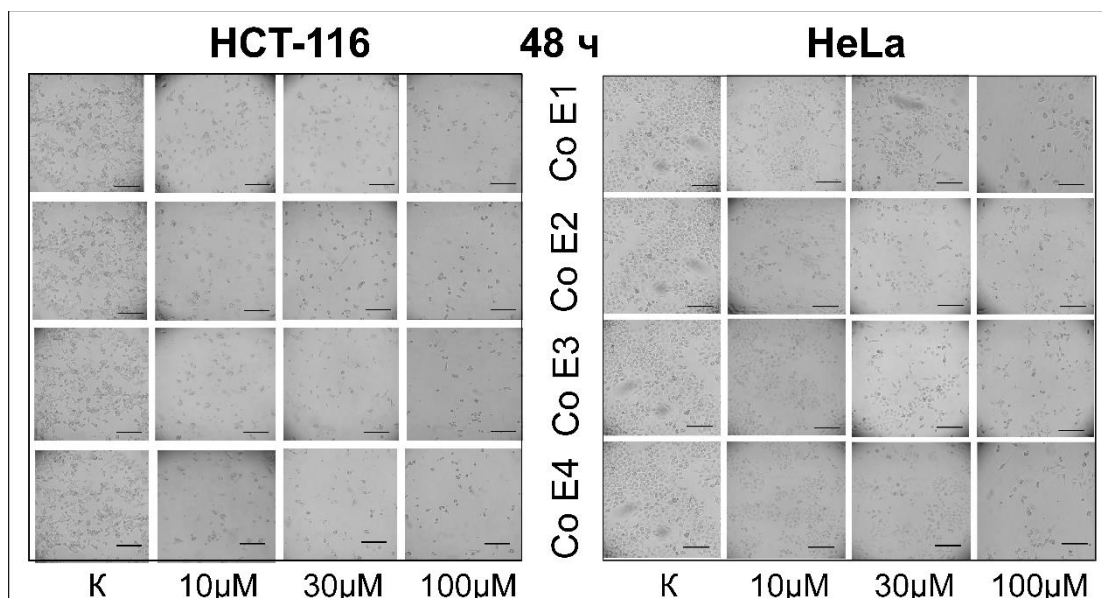
Даље испитивање односило се на ефекат новосинтетисаних енона и њихових соли на морфологију и изглед туморских ћелија након третмана испитиваним супстанцама током 48 сати и 72 сата. Морфологија третираних туморских ћелија била је упоређивана у односу на нетретиране туморске ћелије (Слика 17-20).



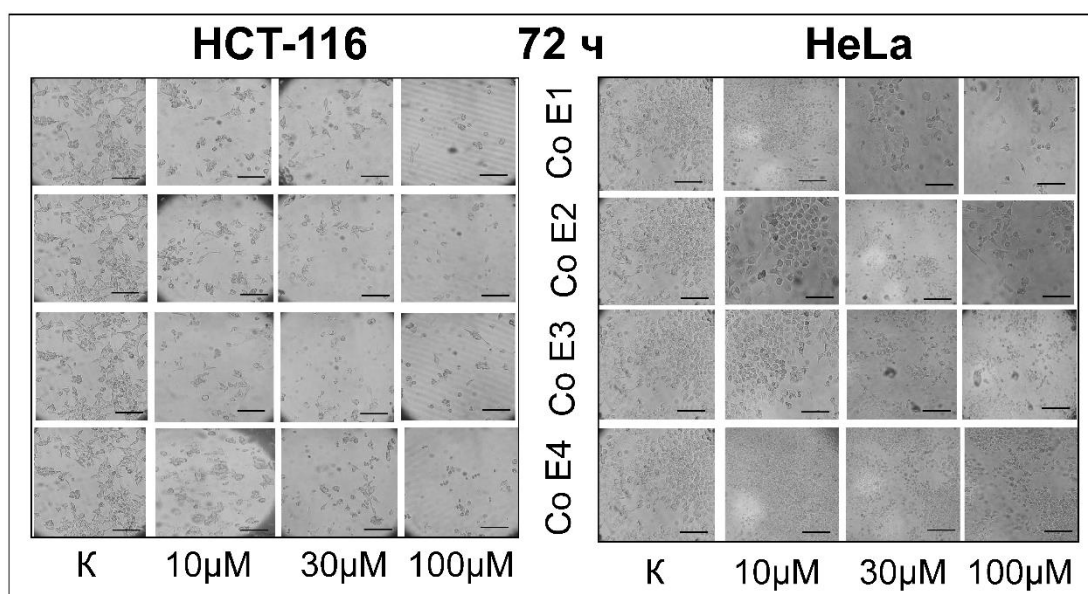
Слика 17. Морфологија туморских (*HCT-116* и *HeLa*) ћелија након третмана испитиваним новосинтетисаним енонима у периоду од 48 сати. Морфологија третираних туморских ћелија упоређивана је са контролним, нетретираним туморским ћелијама. У испитивању ефеката новосинтетисаних енона на морфологију туморских ћелија коришћене су концентрације од 10, 30 и 100 μ M. На сликама је дат граничник који представља величину од 100 μ m, 20x увећање за *HeLa* и 40x увећање за *HCT-116* ћелије.



Слика 18. Морфологија туморских (*HCT-116* и *HeLa*) ћелија након третмана испитиваним новосинтетисаним енонима у периоду од 72 сата. Морфологија третираних туморских ћелија упоређивана је са контролним, нетретираним туморским ћелијама. У испитивању ефеката новосинтетисаних енона на морфологију туморских ћелија коришћене су концентрације од 10, 30 и 100 μ M. На сликама је дат граничник који представља величину од 100 μ m, 20x увећање за *HeLa* и 40x увећање за *HCT-116* ћелије.



Слика 19. Морфологија туморских (*HCT-116* и *HeLa*) ћелија након третмана испитиваним новосинтетисаним солима енона у периоду од 48 сати. Морфологија третираних туморских ћелија упоређивана је са контролним, нетретираним туморским ћелијама. У испитивању ефеката соли енона на морфологију туморских ћелија коришћене су концентрације од 10, 30 и 100 μM . На сликама је дат граничник који представља величину од 100 μm , 20х увеличање за *HeLa* и 40х увеличање за *HCT-116* ћелије.



Слика 20. Морфологија туморских (*HCT-116* и *HeLa*) ћелија након третмана испитиваним новосинтетисаним солима енона у периоду од 72 сата. Морфологија третираних туморских ћелија упоређивана је са контролним, нетретираним туморским ћелијама. У испитивању ефеката соли енона на морфологију туморских ћелија коришћене су концентрације од 10, 30 и 100 μM . На сликама је дат граничник који представља величину од 100 μm , 20х увеличање за *HeLa* и 40х увеличање за *HCT-116* ћелије.

Резултати испитивања ефеката новосинтетисаних енона и њихових соли на морфологију туморских ћелија показали су да испитиване супстанце узрокују дозно зависан ефекат на смањење основних ентитета морфологије ћелија. Број третираних ћелија био је смањен и био је у директном односу у односу са примењеном дозом новосинтетисаних енона и њихових соли. Облик третираних туморских ћелија у односу на њихове контролне ћелије био је значајно измењен услед третмана испитиваним супстанцама.

Третиране туморске ћелије су постале округле, скраћене, њихов број је био значајно смањен и са последичним губитком контакта са околним ћелијама и значајним губитком адхерентности што је резултовало „одлепљивањем“ ћелија од површине. Све промене морфологије испитиваних туморских ћелија на основу доступне литературе, могу да се опишу као промене морфологије које одговарају процесу апоптозе.

4.5. Утицај енона и соли енона на апоптозу третираних ћелија

Након утврђивања цитотоксичних ефеката новосинтетисаних енона и њихових соли, као и измене у морфологији третираних туморских (*HCT-116* и *HeLa*) ћелија, у следећем кораку одређиван је тип ћелијске смрти индуковане од стране испитиваних супстанци на туморским ћелијама. Туморске (*HCT-116* и *HeLa*) ћелије биле су култивисане до достизања конфлуентности (одељак Материјал и методе) и потом су биле третиране IC_{50} вредностима испитиваних супстанци у периоду од 48 сати. Бојење туморских ћелија спроведено је употребом *Annexin V-FITC/7-AAD* (*7-amino-actinomycin-D*) боје а добијени резултати су били очитани коришћењем *Flow cytometer-a*. Апоптотични ефекат новосинтетисаних енона и њихових соли на туморским ћелијама био је упоређиван са апоптотичним ефектом цисплатине и упоређиван је са контролним, нетретираним туморским ћелијама (График 5 и 6).

Резултати анализе апоптотичног дејства новосинтетисаних енона на *HCT-116* ћелијама показали су да су сви новосинтетисани енони статистички значајно повећали проценат ћелија у апоптози у односу на контролне ћелије (* $p < 0,05$) (График 1Б). Контролне *HCT-116* ћелије имале су 92,7% живих, 0,3% некротичних и 6,98% апоптотичних (од тога 1,5% ћелија је било у касној и 5,48% у раној фази апоптозе) ћелија.

Енон 1 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HCT-116* ћелија (59,5%) у односу на контролне ћелије (контрола-6,98%); смањено је проценат живих ћелија (40,4%) у односу на контролне (92,7%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,1%) у односу на контролне (0,3%) ћелије.

Енон 2 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HCT-116* ћелија (61,6%) у односу на контролне ћелије (контрола-6,98%); смањено је проценат живих ћелија (38,4%) у односу на контролне (92,7%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,2%) у односу на контролне (0,3%) ћелије.

Енон 3 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HCT-116* ћелија (52,1%) у односу на контролне ћелије (контрола-6,98%); смањено је проценат живих ћелија (47,7%) у односу на контролне (92,7%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,2%) у односу на контролне (0,3%) ћелије.

Енон 4 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HCT-116* ћелија (47,2%) у односу на контролне ћелије (контрола-6,98%); смањено је проценат живих ћелија (52,6%) у односу на контролне (92,7%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,11%) у односу на контролне (0,3%) ћелије.

Апоптотични ефекат цисплатине (59,69%) такође је био статистички значајно повећан (* $p < 0,05$) у односу на контролне ћелије (6,98%), али није показивао статистички

значајну разлику у односу на апоптотични ефекат новосинтетисаних енона (изузев E4) (* $p < 0,05$).

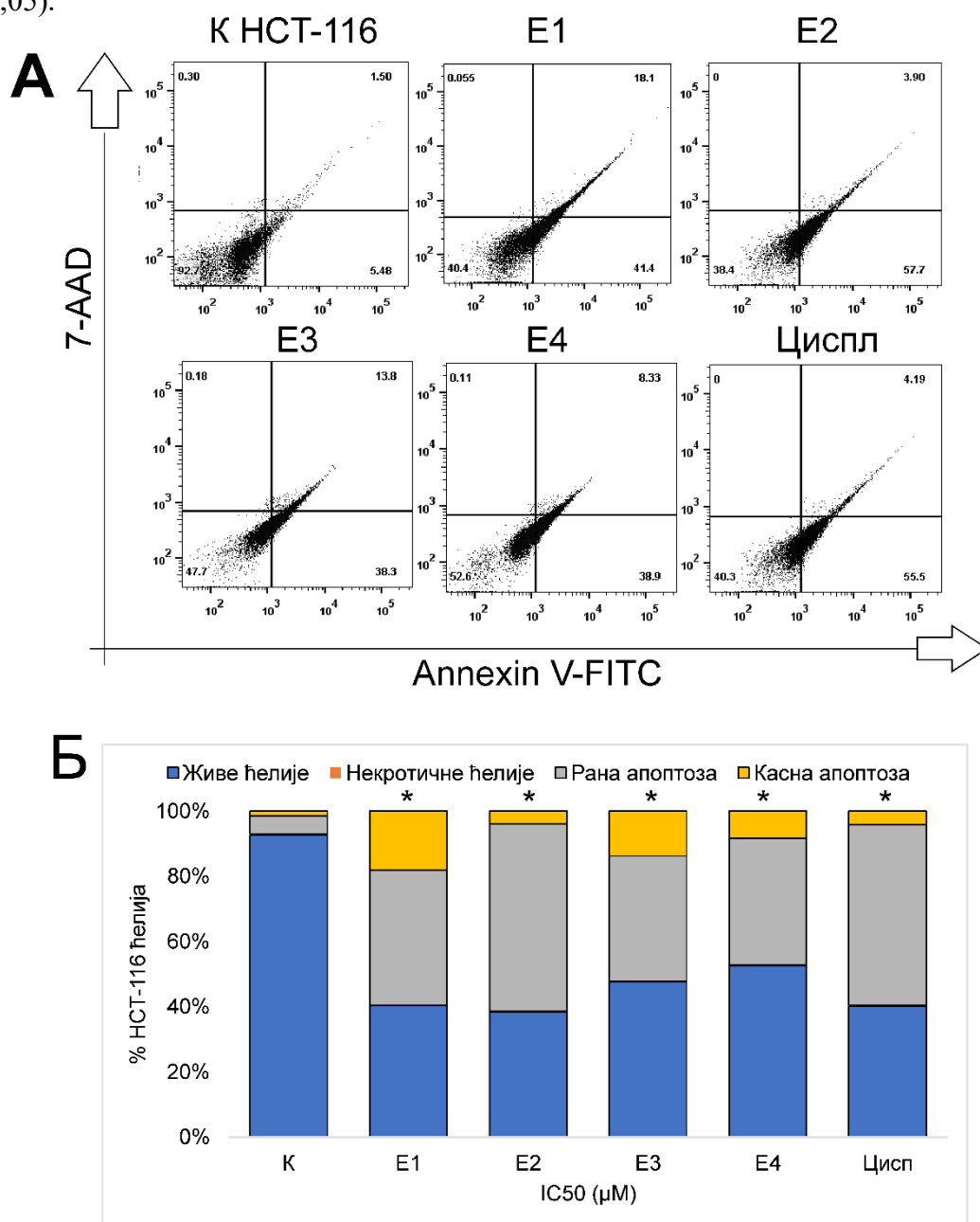
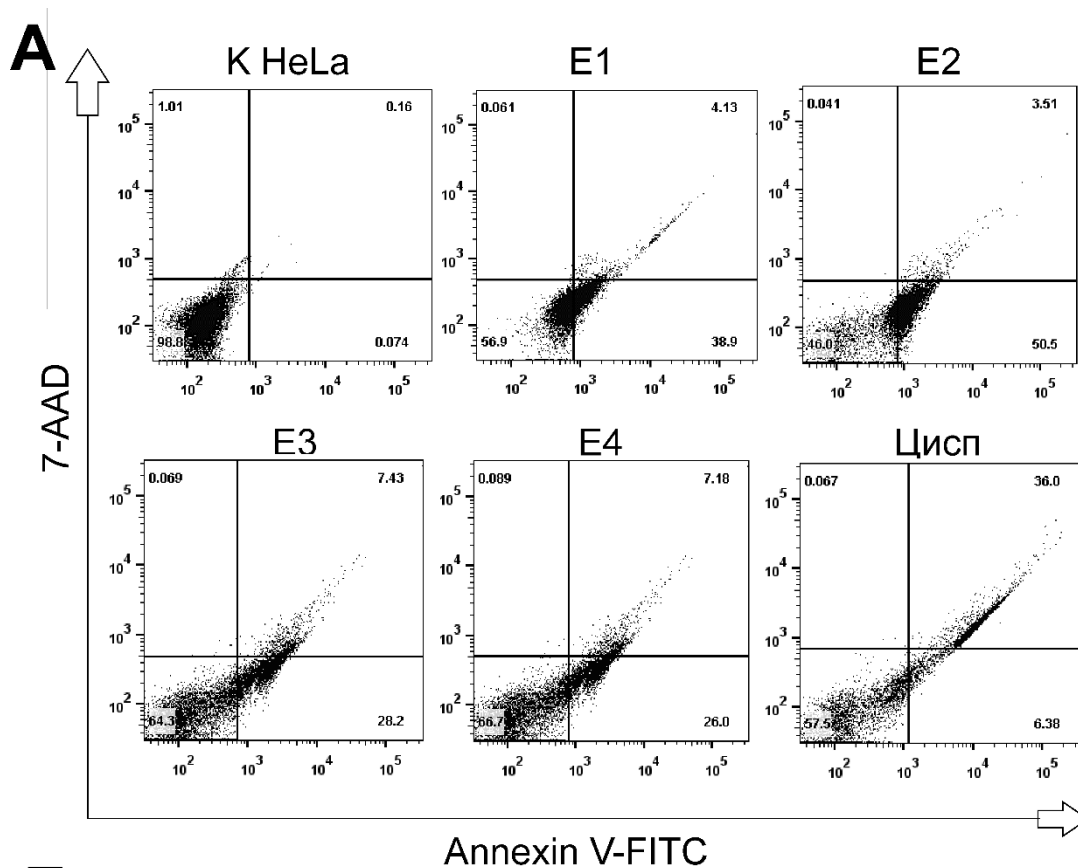


График 5. А. Тачкасти приказ дистрибуције *HCT-116* ћелија након третмана испитиваним IC₅₀ вредностима новосинтетисаних енона у периоду од 48 сати. **Б.** Стубичасти приказ дистрибуције ћелија у различитим фазама апоптозе индуковане новосинтетисаним енонима у поређењу са цисплатином и контролним ћелијама. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $< 0,05$ (*).



Б

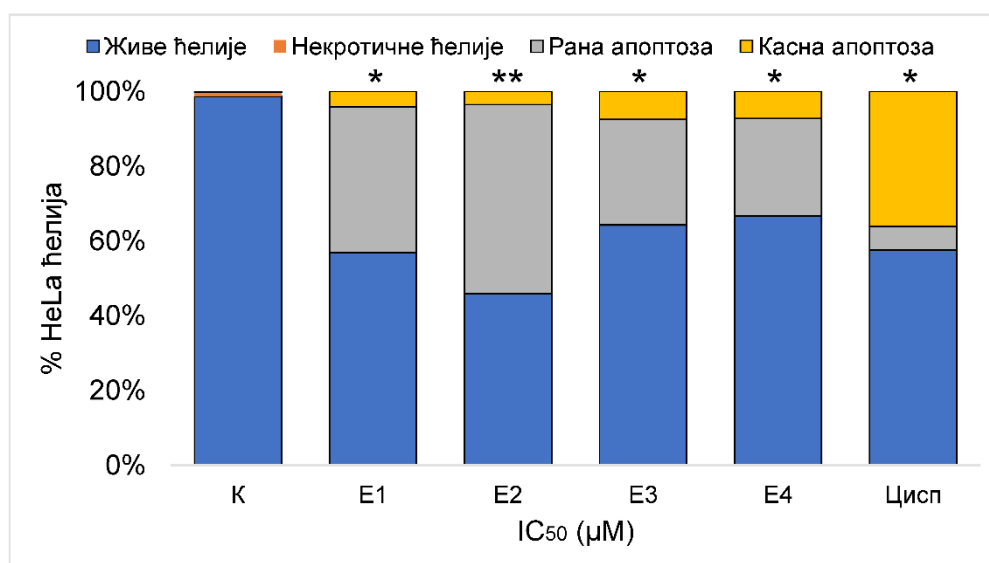


График 6. А. Тачкасти приказ дистрибуције *HeLa* ћелија након третмана испитиваним IC₅₀ вредностима новосинтетисаних енона у периоду од 48 сати. **Б.** Стубичасти приказ дистрибуције ћелија у различитим фазама апоптозе индуковане новосинтетисаним енонима у поређењу са цисплатином и контролним ћелијама. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Апоптотични ефекат новосинтетисаних енона статистички значајно је био мањи на *HeLa* у односу на *HCT-116* ћелије током третмана од 48 сати. Редослед апоптотичног

дејства новосинтетисаних енона за туморске *HeLa* ћелије био је исти (E2-E1-E3-E4) и одговарао је резултатима секвенце цитотоксичности који су добијени МТТ тестом.

Резултати анализе апоптотичног дејства новосинтетисаних енона на *HeLa* ћелијама показали су да су сви новосинтетисани енони статистички значајно (* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$) повећали проценат апоптотичних *HeLa* ћелија у односу на контролне ћелије (График 6Б). Контролне *HeLa* ћелије имале су 98,8% живих, 1,01% некротичних и 0,23% апоптотичних (од тога 0,16% ћелија је било у касној и 0,074% у раној фази апоптозе) ћелија.

Енон 1 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (43,03%) у односу на контролне ћелије (контрола-0,23%); смањено је проценат живих ћелија (56,9%) у односу на контролне (98,8%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,06%) у односу на контролне (1,01%) ћелије.

Енон 2 је статистички значајно повећао (** $p < 0,01$) проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (54,01%) у односу на контролне ћелије (контрола-0,23%); смањено је проценат живих ћелија (46%) у односу на контролне (98,8%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,04%) у односу на контролне (1,01%) ћелије.

Енон 3 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (35,63%) у односу на контролне ћелије (контрола-0,23%); смањено је проценат живих ћелија (64,3%) у односу на контролне (98,8%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,07%) у односу на контролне (1,01%) ћелије.

Енон 4 је статистички значајно повећао (* $p < 0,05$) проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (33,18%) у односу на контролне ћелије (контрола-0,23%); смањено је проценат живих ћелија (66,7%) у односу на контролне (98,8%) док је број некротичних ћелија био без статистички значајне разлике (0,1%) у односу на контролне (1,01%) ћелије.

Апоптотични ефекат цисплатине (42,38%) такође је био статистички значајно већи (* $p < 0,05$) у односу на контролне *HeLa* ћелије (0,23%), али није показивао статистички значајну разлику у односу на апоптотични ефекат новосинтетисаних енона. У случају цисплатине приметно је статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у фази касне апоптозе (36%) у односу на све тестиране еноне и контролне ћелије.

Резултати анализе апоптотичног дејства новосинтетисаних соли енона на *HCT-116* ћелијама показали су да су све новосинтетисане соли енона статистички значајно (** $p < 0,01$) повећале проценат апоптотичних и некротичних ћелија у односу на контролне ћелије (График 7Б).

Контролне *HCT-116* ћелије имале су 86,1% живих, 4,05% некротичних и 9,82% апоптотичних (од тога 0,8% ћелија је било у касној и 9,02% у раној фази апоптозе) ћелија.

Со Енона 1 статистички значајно ($p < 0,01$ **) је повећала проценат апоптотичних ћелија (69,4%) у односу на контролне ћелије (контрола-9,82%); смањила је проценат живих ћелија (27,8%) у односу на контролне (86,1%) уз смањење процента некротичних ћелија (2,92%) у односу на контролне (4,05%) ћелије.

Со Енона 2 је статистички значајно ($p < 0,01$ **) повећала проценат апоптотичних ћелија (70,4%) у односу на контролне ћелије (контрола-9,82%); смањила је проценат живих ћелија (28,8%) у односу на контролне (86,1%) уз смањење процента некротичних ћелија (2,89%) у односу на контролне (4,05%) ћелије.

Со Енона 3 је значајно повећала ($p < 0,01$ **) проценат апоптотичних ћелија (65,4%) у односу на контролне ћелије (контрола-9,82%); смањила је проценат живих ћелија (31,5%) у односу на контролне (86,1%) уз смањење процента некротичних ћелија (3,15%) у односу на контролне (4,05%) ћелије.

Со Енона 4 је повећала проценат апоптотичних ћелија (49,1%) у односу на контролне ћелије (контрола-9,82%); смањила је проценат живих ћелија (48,5%) у односу

на контролне (86,1%) уз смањење процента некротичних ћелија (2,36%) у односу на контролне (4,05%) ћелије.

Апоптотични ефекат цисплатине (70,7%) је био статистички значајно повећан ($p < 0,01^{**}$) у односу на контролне ћелије (9,82%), уз статистички значајну разлику у односу на апоптотични ефекат новосинтетисаних соли енона.

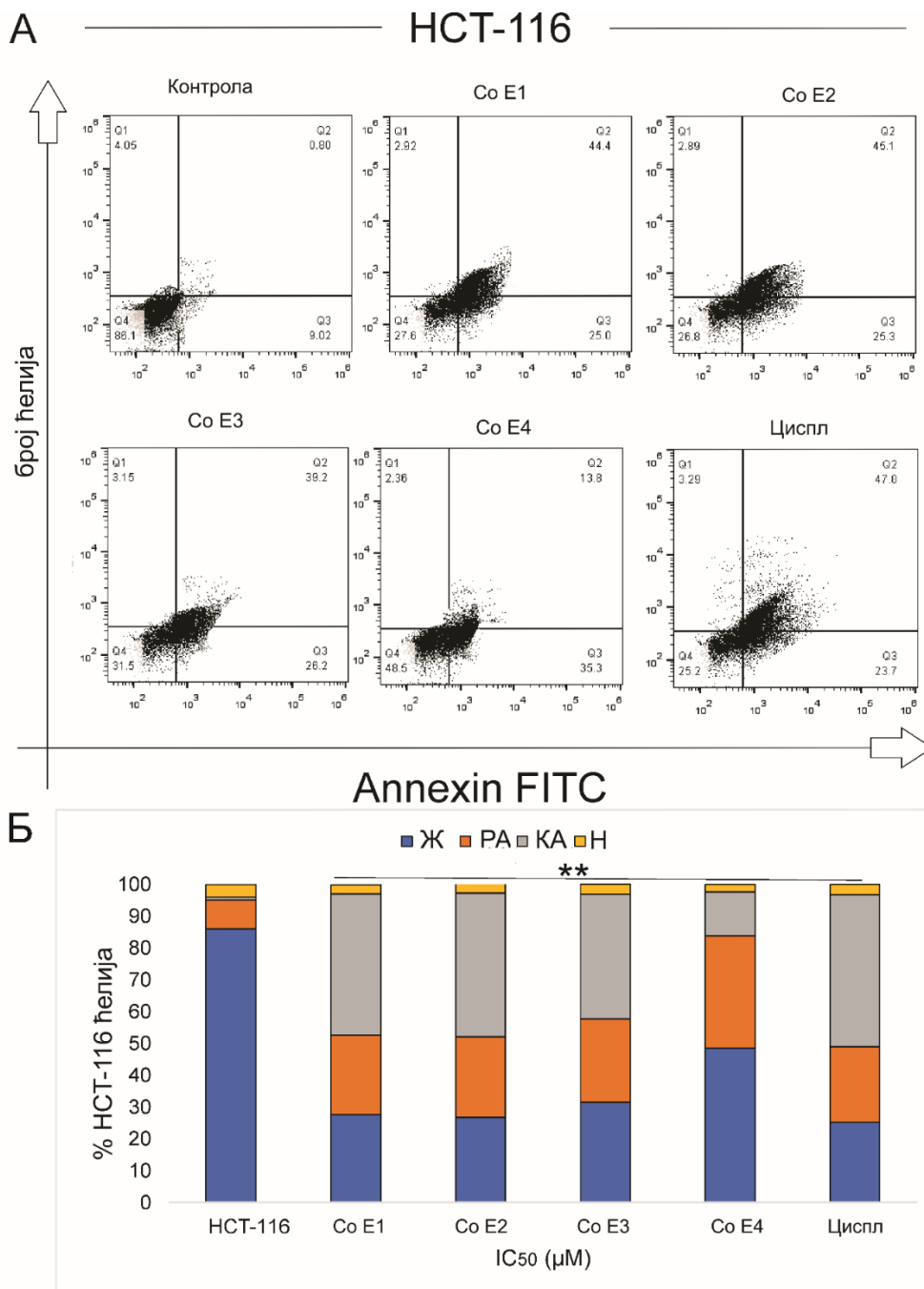


График 7. А. Тачкасти приказ дистрибуције *HCT-116* ћелија након третмана испитиваним IC₅₀ вредностима новосинтетисаних соли енона у периоду од 48 сати. **Б.** Стубичасти приказ дистрибуције ћелија у различитим фазама апоптозе индуковане новосинтетисаним солима енона у поређењу са цисплатином и контролним ћелијама. Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $< 0,01^{**}$.

Резултати анализе апоптотичног дејства новосинтетисаних соли енона на *HeLa* ћелијама показали су да су све новосинтетисане соли енона повећале проценат апоптотичних ћелија у односу на контролне *HeLa* ћелије (График 8). Контролне *HeLa* ћелије имале су 63,7% живих, 4,53% некротичних и 31,8% апоптотичних (од тога 12,4% ћелија је било у касној и 19,4% у раној фази апоптозе) ћелија.

Со Енона 1 је повећала проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (38,7%) у односу на контролне *HeLa* ћелије (31,8%); смањила је проценат живих ћелија (57,2%) у односу на контролне (63,7%) уз смањење процента некротичних *HeLa* ћелија (4,09%) у односу на контролне (4,53%) ћелије.

Со Енона 2 је повећала проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (40%) у односу на контролне *HeLa* ћелије (31,8%); смањила је проценат живих ћелија (56,1%) у односу на контролне (63,7%) уз смањење процента некротичних *HeLa* ћелија (3,99%) у односу на контролне (4,53%) ћелије.

Со Енона 3 је повећала проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (40%) у односу на контролне *HeLa* ћелије (31,8%); смањила је проценат живих ћелија (57,9%) у односу на контролне (63,7%) док је број некротичних *HeLa* ћелија био нижи (4,11%) у односу на контролне (4,53%) ћелије али ови ефекти нису имали статистичку значајност.

Со Енона 4 је повећала проценат апоптотичних *HeLa* ћелија (36,6%) у односу на контролне *HeLa* ћелије (31,8%); смањила је проценат живих ћелија (59,2%) у односу на контролне (63,7%) док је број некротичних *HeLa* ћелија био нижи (4,16%) у односу на контролне (4,53%) ћелије али ови ефекти нису имали статистичку значајност.

Апоптотични ефекат цисплатине (37,5%) такође је био повећан у односу на контролне ћелије (31,8%).

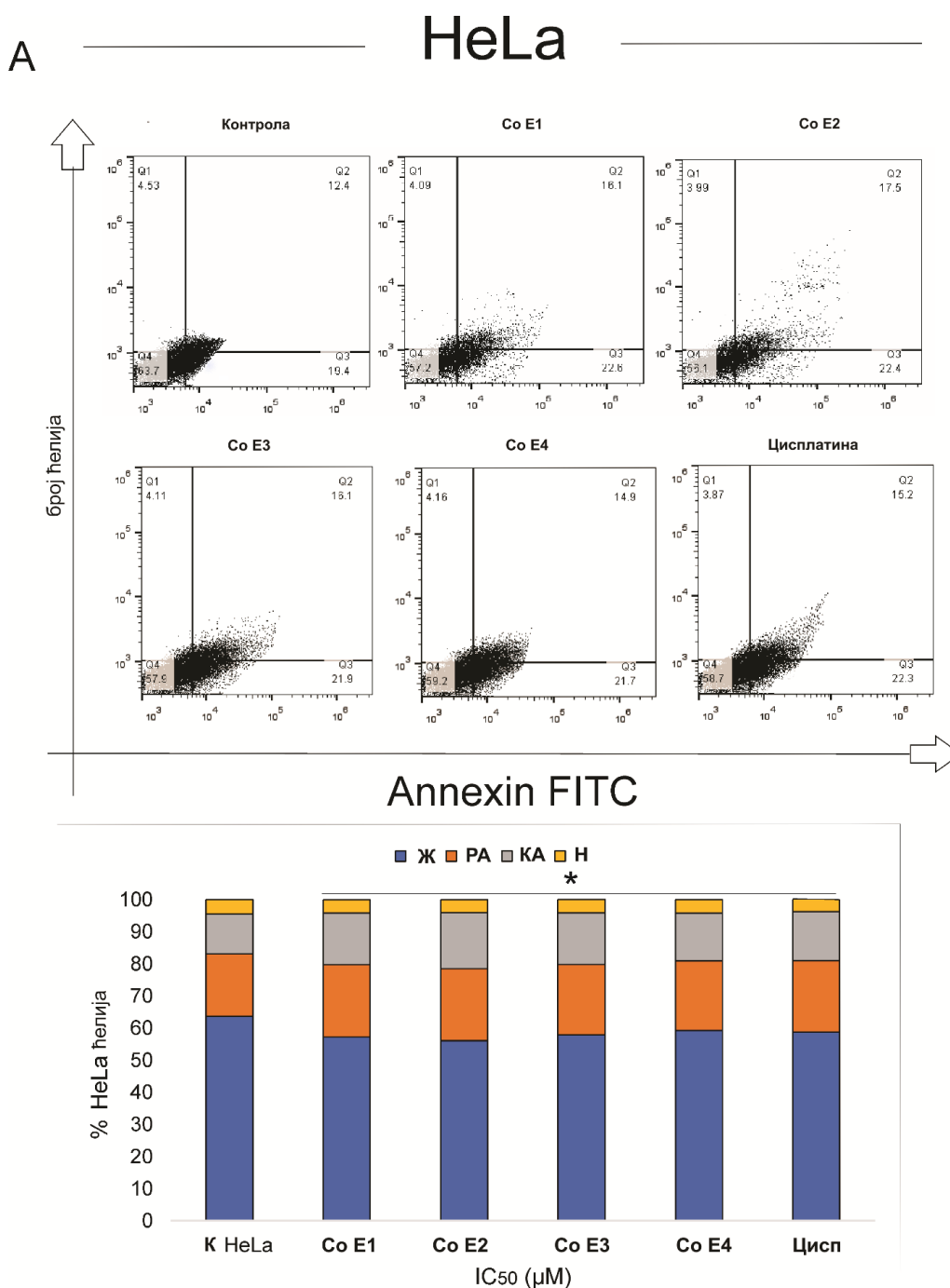


График 8 . А. Тачкасти приказ дистрибуције *HeLa* ћелија након третмана испитиваним IC_{50} вредностима новосинтетисаних соли енона у периоду од 48 сати. **Б.** Стубичасти приказ дистрибуције ћелија у различитим фазама апоптозе индуковане новосинтетисаним солима енона у поређењу са цисплатином и контролним ћелијама. У односу на новосинтетисане еноне, соли енона су имале статистички значајно смањено апоптотично дејство на испитиваним туморским ћелијама. Соли енона су статистички значајно повећале проценат некротичних ћелија у односу на еноне. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $<0,05$ (*).

4.6 Утицај енона и соли енона на протеине *Bax* и *Bcl-2* у туморским ћелијама

Након идентификације типа ћелијске смрти, у следећем кораку одређивана је експресија анти-апоптотичног протеина *Bcl-2* и про-апоптотичног протеина *Bax* у туморским ћелијама (График 9 и 10). Након достизања конфлуентности и третмана IC_{50} вредностима испитиваним новосинтетисаним енонима и њиховим солима (у периоду од 48 сати), употребом специфичних антитела и проточне цитометрије одређивана је експресија регулаторних протеина апоптозе (видети одељак Материјал и методе).

Резултати су показали да је третман новосинтетисаним енонима статистички значајно ($p < 0,05^*$ и $p < 0,01^{**}$) променио регулацију, експресију и однос регулаторних протеина *Bax* и *Bcl-2* у туморским *HCT-116* (График 9А, Б и В) у односу на контролне, нетретирание ћелије.

Експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина статистички значајно ($p < 0,05^*$) је била нижа у туморским *HCT-116* ћелијама које су третиране свим новосинтетисаним енонима (Е1-0,52; Е2-0,48; Е3-0,59 и Е4-0,60) у односу на контролне (1); уз статистички значајно повећану ($p < 0,01^{**}$) експресију про-апоптотичног *Bax* протеина у туморским ћелијама *HCT-116* и у случају свих испитиваних новосинтетисаних енона (Е1-2; Е2-2,03; Е3-1,95 и Е4-1,79) у односу на контролне ћелије (1) (График 9Б).

Повећање експресије *Bax* протеина у туморским третираним ћелијама *HCT-116* било је од 1,8-2 пута веће у односу на контролне ћелије (График 9Б). Још један од параметара који може да укаже на промену равнотеже ћелије према апоптотичној смрти јесте однос *Bax/Bcl-2* (График 9В). Повећање овог односа преко 1 указује немогућност преваге преживљавајућих механизма чиме смрт ћелије наступа као неминовни и финални корак. Резултати на туморским ћелијама *HCT-116* третираним свим енонима, показали су да се *Bax/Bcl-2* однос статистички значајно повећава ($p < 0,01^{**}$) у односу на контролне ћелије. Е1 је повећао *Bax/Bcl-2* однос 3,8 пута у односу на контролне ћелије (1,84/0,48) Е2 је повећао *Bax/Bcl-2* однос 4,4 пута у односу на контролне ћелије (1,99/0,48); потом Е3 3,3 пута у односу на контролне ћелије (1,58/0,48) и финално Е4 је 2,9 пута повећао овај однос у поређењу са контролним ћелијама (1,42/0,48).

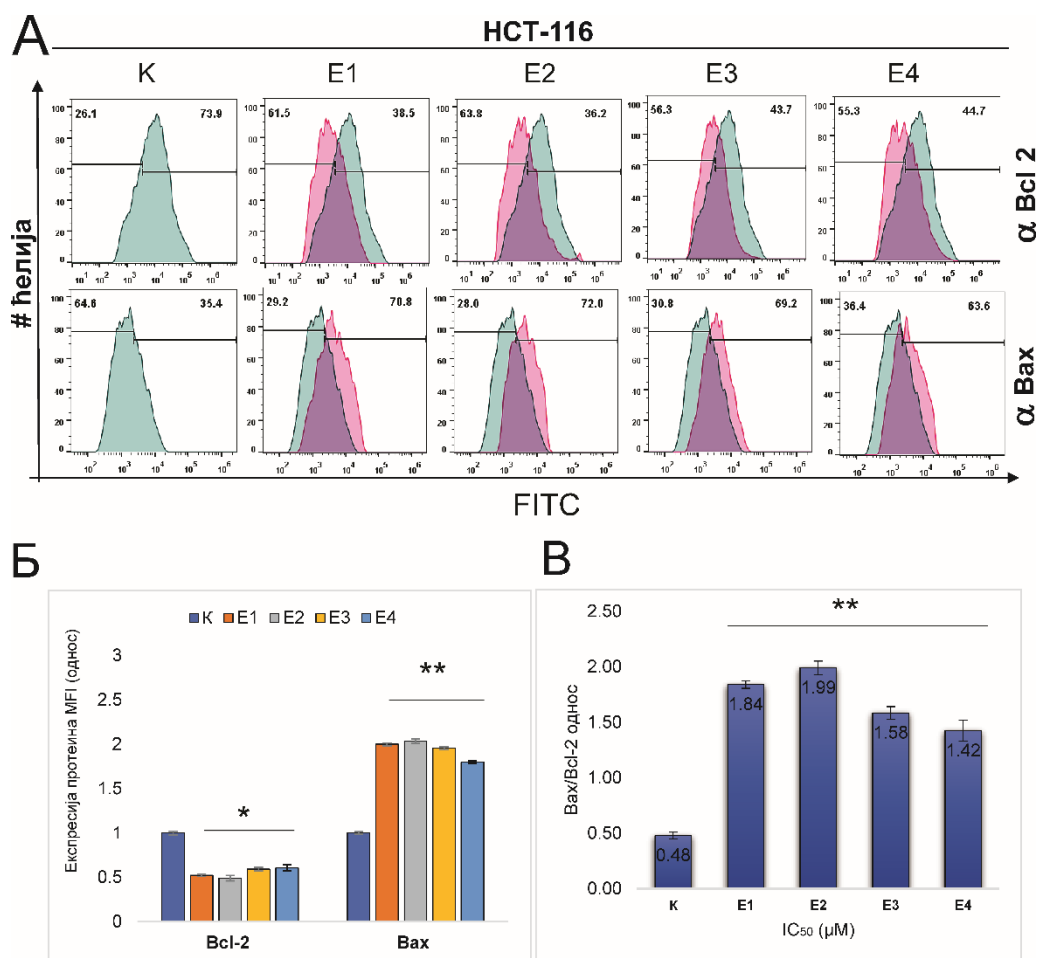


График 9. А. Хистограмски приказ нисходне *Bcl-2* и усходне регулације *Bax* протеина у туморским *HCT-116* ћелијама третираним новосинтетисаним енонима коришћењем специфичних антитела и уз употребу проточне цитометрије. Стубичасти приказ нивоа протеина (MFI) *Bcl-2* и *Bax* анализирани су проточном цитометријом док су експресија протеина (однос) (**Б**) као и *Bax/Bcl-2* однос (**В**) анализирани коришћењем програмског софтвера *FlowJo*. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $<0,05$ (*) и $<0,01$ (**) у односу на контролну групу (К).

Резултати третмана новосинтетисаним енонима на *HeLa* ћелијама показали су статистички значајну промену ($p<0,05^*$ и $p<0,01^{**}$) у регулацији, експресији и односу регулаторних протеина *Bax* и *Bcl-2* (График 10А, Б и В) у односу на контролне, нетретиране ћелије.

Експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина статистички значајно је била нижа ($p<0,05^*$) у туморским *HeLa* ћелијама које су третиране енонима Е1 и Е2 (0,7 и 0,6) у односу на контролне (1) (График 10Б); док је експресија про-апоптотичног протеина *Bax* била статистички значајно већа ($p<0,01^{**}$) у туморским *HeLa* ћелијама у случају свих испитиваних новосинтетисаних енона (Е1-2,52; Е2-2,74; Е3-2,28 и Е4-2,42) у односу на контролне ћелије (1) (График 10Б). Повећање експресије *Bax* протеина у туморским третираним *HeLa* ћелијама било је од 2-2,5 пута веће у односу на контролне ћелије. Резултати на туморским *HeLa* ћелијама третираним Е1 и Е2 показују статистички високу разлику у односу на контролне ћелије ($p<0,01^{**}$), Е4 показује $p<0,05^*$ док Е3 није показао

статистичку значајност у промени односа *Bax/Bcl-2* у односу на контролне ћелије (График 10B). Енон 1 је статистички значајно ($p<0,01^{**}$) повећао *Bax/Bcl-2* однос за 3,4 пута у третираним *HeLa* ћелијама у односу на контролне ћелије (1,13/0,33); Е2 који је статистички значајно ($p<0,01^{**}$) повећао *Bax/Bcl-2* однос 4,09 пута у третираним *HeLa* ћелијама у односу на контролне ћелије (1,35/0,33); следећи је био Е3 који је за 2,6 пута повећао овај однос у поређењу са контролним ћелијама (0,88/0,33) и Е4 који је у третираним *HeLa* ћелијама статистички значајно ($p<0,05^*$) повећао овај однос за 3,06 пута у поређењу са контролним ћелијама (1,01/0,33).

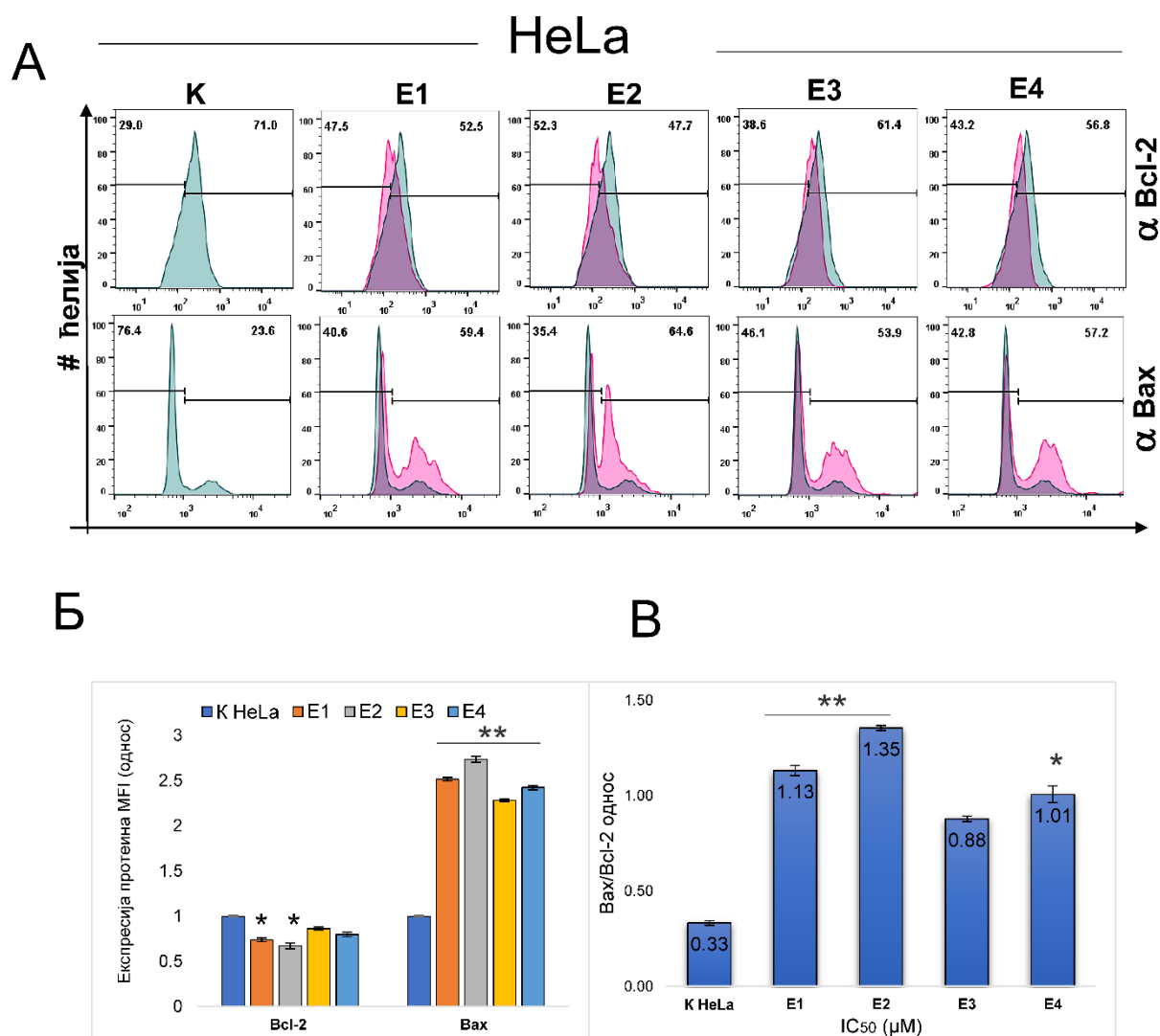


График 10. А. Хистограмски приказ нисходне *Bcl-2* и усходне регулације *Bax* протеина у туморским *HeLa* ћелијама третираним новосинтетисаним енонима коришћењем специфичних антитела и уз употребу проточне цитометрије. Стубичасти приказ нивоа протеина (MFI) *Bcl-2* и *Bax* анализирани су проточном цитометријом док су експресија протеина (однос) (**Б**) као и *Bax/Bcl-2* однос (**В**) анализирани коришћењем програмског софтвера *Flow-Jo*. Резултати представљају серију од три поновљена експеримента при чему се као статистички значајном разликом узимала вредност $p<0,05^*$ и $p<0,01^{**}$ у односу на контролну групу (К).

Резултати су показали да је третман новосинтетисаним солима енона статистички значајно променио регулацију, експресију и однос регулаторних протеина *Bax* и *Bcl-2* у туморским *HCT-116* (График 11А, Б и В) у односу на контролне, нетретиране ћелије. Експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина је била нижа ($p < 0,05^*$) у туморским *HCT-116* ћелијама које су третиране свим новосинтетисаним солима енонима (Со Е1-0,43, Со Е2-0,38, Со Е3-0,45 и Со Е4-0,54) у односу на контролне ћелије (1); уз статистички значајно повећану ($p < 0,05^*$) експресију про-апоптотичног *Bax* протеина у туморским *HCT-116* ћелијама и у случају Со Е1-(2,39), Со Е2-(2,83) у односу на контролне ћелије (1) и Со Е3-(1,74) и Со Е4-(1,43) у односу на контролне ћелије (1) (График 11Б). Повећање експресије протеина *Bax* у третираним туморским ћелијама *HCT-116* било је од 1,43-2,83 пута веће у односу на контролне ћелије (График 11Б).

Још један од параметара који може да укаже на промену равнотеже ћелије према апоптотичној смрти јесте однос *Bax/Bcl-2* (График 11В). Повећање овог односа преко 1 указује немогућност преваге преживљавајућих механизма чиме смрт ћелије наступа као неминовни и финални корак. Резултати на туморским *HCT-116* ћелијама третираним свим солима енона, показали су да се *Bax/Bcl-2* однос за со Енона 1 износи 0,68, со Енона 2 0,86, со Енона 3, 0,64 и со Енона 4, 0,46.

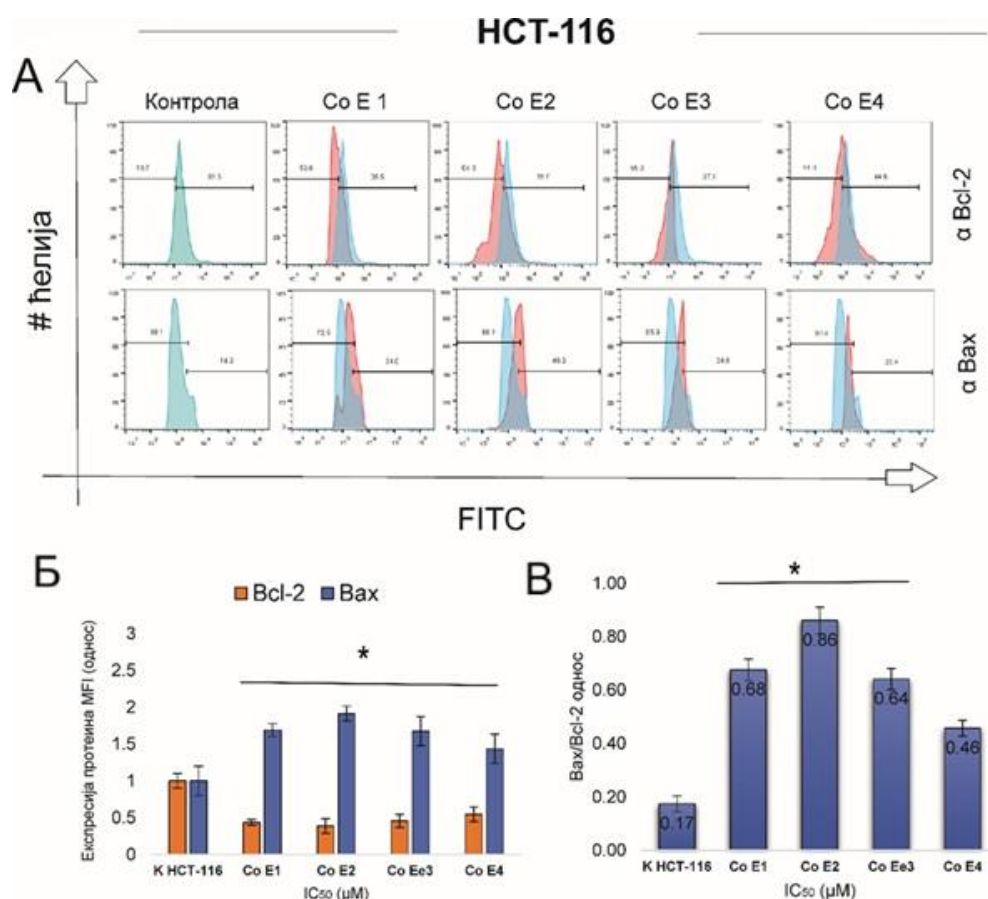


График 11. А. Хистограмски приказ нисходне регулације *Bcl-2* и усходне регулације *Bax* протеина у туморским *HCT-116* ћелијама третираним новосинтетисаним солима енона коришћењем специфичних антитела и уз употребу проточне цитометрије. Стубичасти приказ нивоа протеина (MFI) *Bcl-2* и *Bax* анализирани су проточном цитометријом док су експресија протеина (однос) (Б) као и *Bax/Bcl-2* однос (В) анализирани коришћењем програмског софтвера *Flow-Jo*. Резултати представљају серију од три поновљена експеримента при чему се као статистички значајном разликом узимала вредност ($p < 0,05^*$) и у односу на контролну групу (К).

Овим може да се закључи да су све новосинтетисане соли енона узроковале нисходну регулацију *Bcl-2* протеина, усходну регулацију *Bax* протеина и повећале су *Bax/Bcl-2* однос у туморским (*HCT-116*) ћелијама у односу на њихове репрезентативне контроле.

Резултати третмана новосинтетисаним солима енона на *HeLa* ћелијама нису имале статистички значајну промену у регулацији, експресији и односу регулаторних протеина *Bax* и *Bcl-2* (График 12А, Б и В) у односу на контролне, нетретиране ћелије.

Експресија анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина била је нижа у туморским *HeLa* ћелијама које су третиране солима енонима у односу на контролне (1); док је експресија про-апоптотичног *Bax* протеина била већа у туморским *HeLa* ћелијама у односу на контролне ћелије (График 12Б). Повећање експресије *Bax* протеина у туморским третираним *HeLa* ћелијама било је веће у односу на контролне ћелије, али ово повећање није имало статистичку значајност. Резултати на *HeLa* ћелијама третираним свим новосинтетисаним солима енона, показали су да се *Bax/Bcl-2* однос повећава у односу на контролне ћелије али овај однос није имао статистичку значајност и његова вредност није била већа од 1 (График 12В).

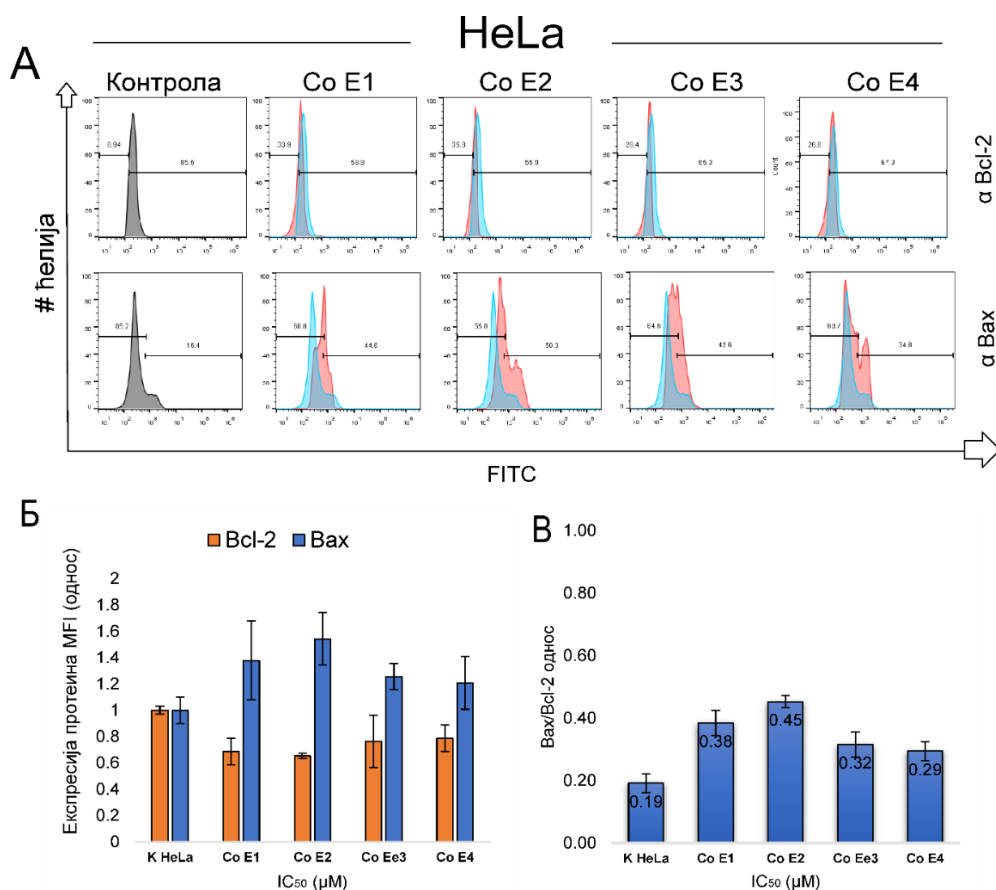


График 12. А. Хистограмски приказ нисходне *Bcl-2* и усходне регулације *Bax* протеина у туморским *HeLa* ћелијама третираним новосинтетисаним солима енона коришћењем специфичних антитела и уз употребу проточне цитометрије. Стубичасти приказ нивоа протеина (MFI) *Bcl-2* и *Bax* анализирани су проточном цитометријом док су експресија протеина (однос) (**Б**) као и *Bax/Bcl-2* однос (**В**) анализирани коришћењем програмског софтвера *Flow-Jo*. Резултати представљају серију од три поновљена експеримента при чему се као статистички значајном разликом узимала вредност ($p < 0,05^*$) и у односу на контролну групу (К).

Овим се може закључити да новосинтетисане соли енона нису статистички значајно узроковале поремећаје у регулацији *Bcl-2* и *Bax* протеина и нису повећале *Bax/Bcl-2* однос у туморским *HeLa* ћелијама, док је у *HCT-116* ћелијама било статистички значајне разлике. У односу на еноне, соли енона су имале мањи ефекат на туморским ћелијама.

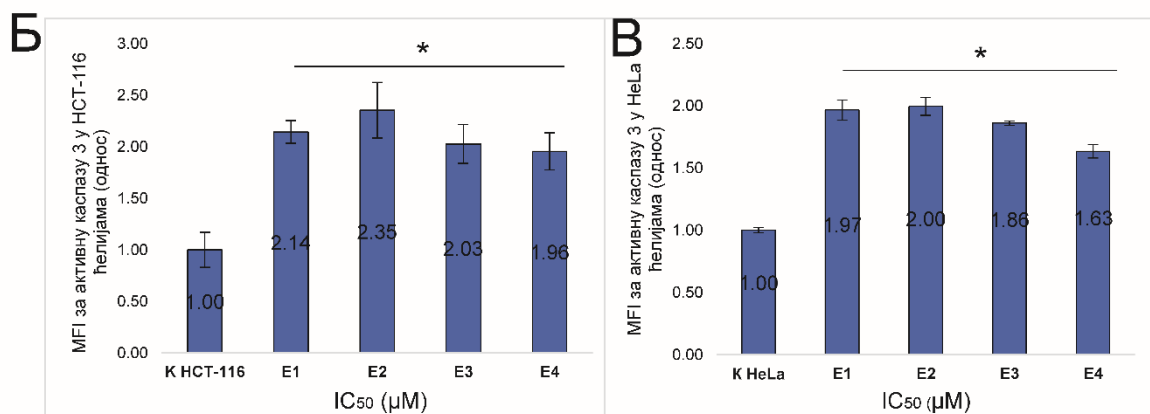
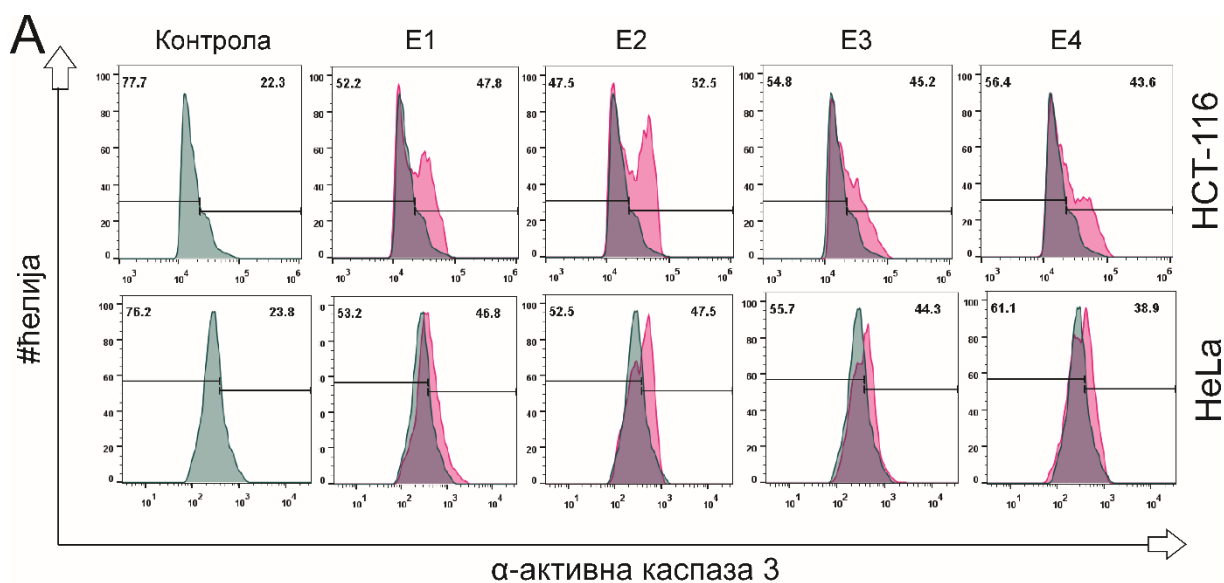
4.7. Ефекат енона на каспазе у ћелијама *HCT-116* и *HeLa*

Егзекуторна, извршилачка каспаза-3 представља једну у низу каспаза које се синтетишу у ћелијама као инактивни ензими про-каспазе. Процес активације каспаза је иреверзибилан аутокаталитички процес у току ког долази до цепања одређеног дела протеина и његове следствене активације. У здравим ћелијама про-каспазе су инактивне захваљујући протеинима који се називају инхибитори апоптозе. Цепањем про-каспазе долази до стварања егзекуторне, активне каспазе-3 која делује на сигналне протеине, цепа их, активира и омогућава фрагментацију ДНК молекула. Употребом *FACS* анализе одређивана је експресија активне каспазе-3 у туморским ћелијама *HCT-116* и *HeLa* које су третиране IC_{50} вредностима новосинтетисаних енона (Е1-Е4) током 48 сати (График 13). Након култивације и третмана новосинтетисаним енонима, бојење ћелија специфичним антителом за активну каспазу-3 је спроведено уз читавање на проточном цитометру.

Резултати одређивања експресије активне каспазе-3 у туморским ћелијама *HCT-116* и *HeLa* показали су да сви новосинтетисани енони узрокују статистички значајну ($p < 0,05^*$) активацију каспазе-3 (График 13). У случају туморских *HCT-116* ћелија, ефикасност активације каспазе-3 је поново била највећа у случају Е2 и то 2.35 пута већа у односу на контролу. Енон 1, 3 и 4 су такође узроковали статистички значајно већу активацију каспазе-3 и то за 2.14; 2.03 и 1.96 пута у односу на контролне ћелије.

Статистички значајну повећану ($p < 0,05^*$) активацију каспазе-3 показале су и *HeLa* ћелије након третмана испитиваним енонима у односу на контролне ћелије. За *HeLa* ћелије, највећу активацију каспазе-3 такође је изазвао Е2 (2 пута већу) у односу на контролне ћелије. Енон 1 је узроковао пораст активације каспазе-3 за 1,97, Е3 за 1,86 и Е4 за 1,63 пута у односу на контролне ћелије (1).

Добијени резултати указују да новосинтетисани енони узрокују јачу активацију каспазе-3 у *HCT-116* у односу на *HeLa* ћелије.



Гарфик 13. А. Хистограмски приказ активне каспазе-3 у туморским третираним ћелијама. Стубичасти приказ нивоа протеина (*MFI*) активне каспазе-3 у *HCT-116* (**Б**) и *HeLa* (**В**) ћелијама анализирани су проточном цитометријом док је однос активне каспазе-3 анализиран коришћењем програмског софтвера *Flow-Jo*. Резултати представљају серију од три поновљена експеримента при чему се као статистички значајном разликом узимала вредност ($p < 0,05^*$) и у односу на контролну групу (К).

Резултати одређивања експресије и нивоа активне каспазе-3 у туморским ћелијама *HCT-116* и *HeLa* показали су да све новосинтетисане соли енона узрокују статистички значајну ($*p < 0,05$) активацију каспазе-3 (График 14Б). У случају туморских ћелија *HCT-116*, ефикасност активације каспазе-3 је била највећа у случају соли Е2 и то 2,07 пута већа у односу на контролу. Соли Енона 1, 3 и 4 су такође узроковали статистички значајно већу активацију каспазе-3 и то за 1,95, 1,89 и 1,86 пута у односу на контролне ћелије.

Повећану активацију каспазе-3 показале су и *HeLa* ћелије након третмана испитиваним солима енона у односу на контролне ћелије уз статистички значајну разлику ($*p < 0,05$) (График 14В). За *HeLa* ћелије, највећу активацију каспазе-3 такође је изазвала со Е2 (1,95 пута већу) у односу на контролне ћелије. Со енона 1 је узроковала пораст активације каспазе-3 за 1,86, со Е3 за 1,63 и со Е4 за 1,60 пута у односу на контролне ћелије. Добијени резултати указују да новосинтетисане соли енона узрокују јачу активацију каспазе-3 у *HCT-116* у односу на *HeLa* ћелије.

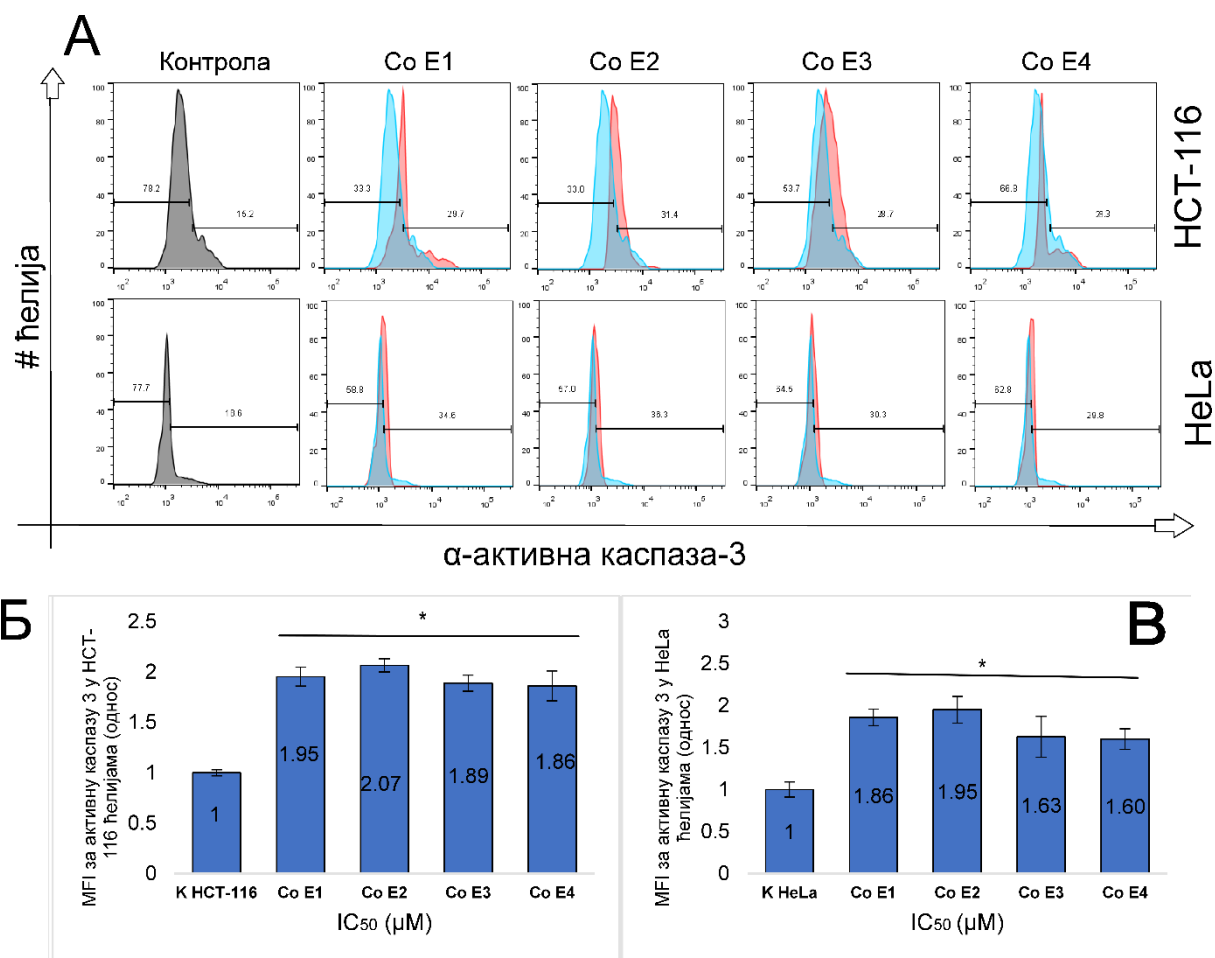


График 14. А. Хистограмски приказ активне каспазе-3 у туморским третираним ћелијама. Стубичасти приказ нивоа протеина (*MFI*) активне каспазе-3 у *HCT-116* (**Б**) и *HeLa* (**В**) ћелијама анализирани су проточном цитометријом док је однос активне каспазе-3 анализиран коришћењем програмског софтвера *Flow-Jo*. Резултати представљају серију од три поновљена експеримента при чему се као статистички значајном разликом узимала вредност $*p < 0,05$ и у односу на контролну групу (К).

У односу на еноне, соли енона су статистички значајно слабије утицале на активацију каспазе-3 у туморским ћелијама.

4.8. Утицај енона и соли енона на потенцијал митохондријалне мембране

Након утврђивања промена у експресији и активацији кључних апоптотичних протеина, у следећем кораку испитиван је ефекат новосинтетисаних енона на потенцијал митохондријалне мембране. Пермеабилност и потенцијал митохондријалне мембране представљају кључне факторе за преживљавање и смрт сваке ћелије. Нарушавање интегритета и пермеабилности митохондријалне мембране узрокује дислокацију и транспозицију молекула из митохондрија или њеног интермембранозног простора у средину у којој се они нормално налазе у врло ниској концентрацији. Пример овога је и молекул цитохрома *c* (описан у даљим резултатима) који услед поремећаја потенцијала и пермеабилности митохондријалне мембране бива транслоциран у цитоплазму ћелије где са осталим молекулима учествује у формирању *APAF-1* (видети одељак Увод).

У циљу одређивања ефекта новосинтетисаних енона на потенцијал митохондријалне мембране (График 15 и 16) туморских *HCT-116* и *HeLa* ћелија коришћена је метода имунофлуоросценције уз коришћење боје *JC10* (видети одељак Материјал и методе). Резултати су показали да у туморским *HCT-116* ћелијама сви испитивани новосинтетисани енони узрокују статистички значајно повећање интензитета зеленог мономера уз истовремено смањење црвеног агрегата указујући да испитиване супстанце значајно мењају пермеабилност митохондријалних мембрана туморских *HCT-116* у односу на контролне ћелије (График 15А). Проценат ћелија са највећим уделом зеленог мономера био је присутан у *HCT-116* ћелијама третираним Е2, потом Е1, Е3 и Е4 (График 15Б). Одређивање *JC* зелено-*JC* црвеног односа (График 15В) на *HCT-116* ћелијама, показао је да су сви енони статистички значајно повећали ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) овај однос у поређењу са контролним ћелијама. Енон 1 је узроковао пораст од 2,18 (1,62/0,74); Е2-2,9 (2,15/0,74); Е3-1,9 (1,43/0,74) и Е4 -1,9 пута у односу на контролне ћелије (1,44/0,76). Слични резултати су добијени и за *HeLa* туморске ћелије (График 16, 16В). Новосинтетисани енони су такође узроковали статистички ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) значајну промену митохондријалног мембранског потенцијала и то: Е1 за 2,4 (1,45/0,6); Е2 за 3,3 (1,98/0,6); Е3 за 2,2 (1,33/0,6) и Е4 за 2 пута у односу на контролне, нетретиране *HeLa* туморске ћелије (1,24/0,6).

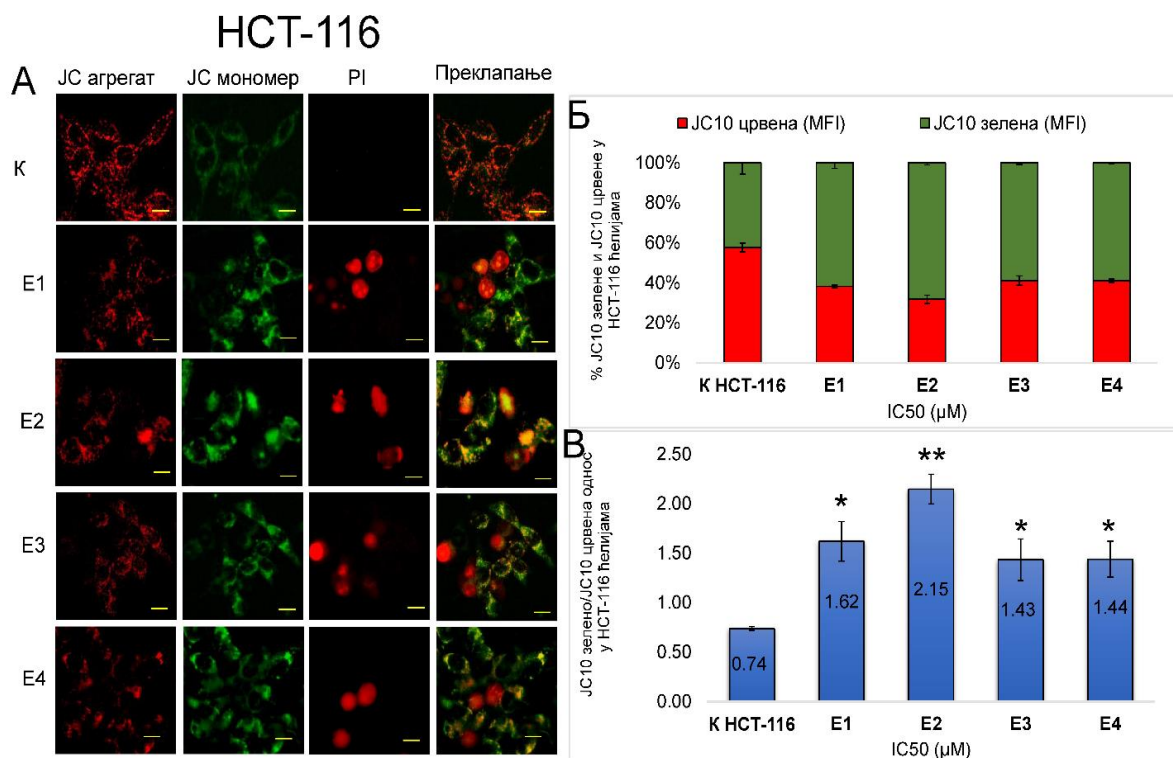


График 15. А. Имунофлуоресценти приказ *HCT-116* ћелија третираних енонима и обојених *JC10* бојом. У третираним туморским *HCT-116* ћелијама јасно су видљиве промене интензитета зелене боје које директно указују на дисфункцију митохондријалног мембранског потенцијала. **Б.** Процентуални приказ односа интензитета зелене и црвене флуоресценције третираних *HCT-116* ћелија у односу на контролне *HCT-116* ћелије. **В.** Промена у *JC* зелено - *JC* црвеном односу третираних у односу на нетретиране туморске ћелије. На сликама је дат граничник који представља величину од 20 μ m. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $< 0,05$ (*) и $< 0,01$ (**).

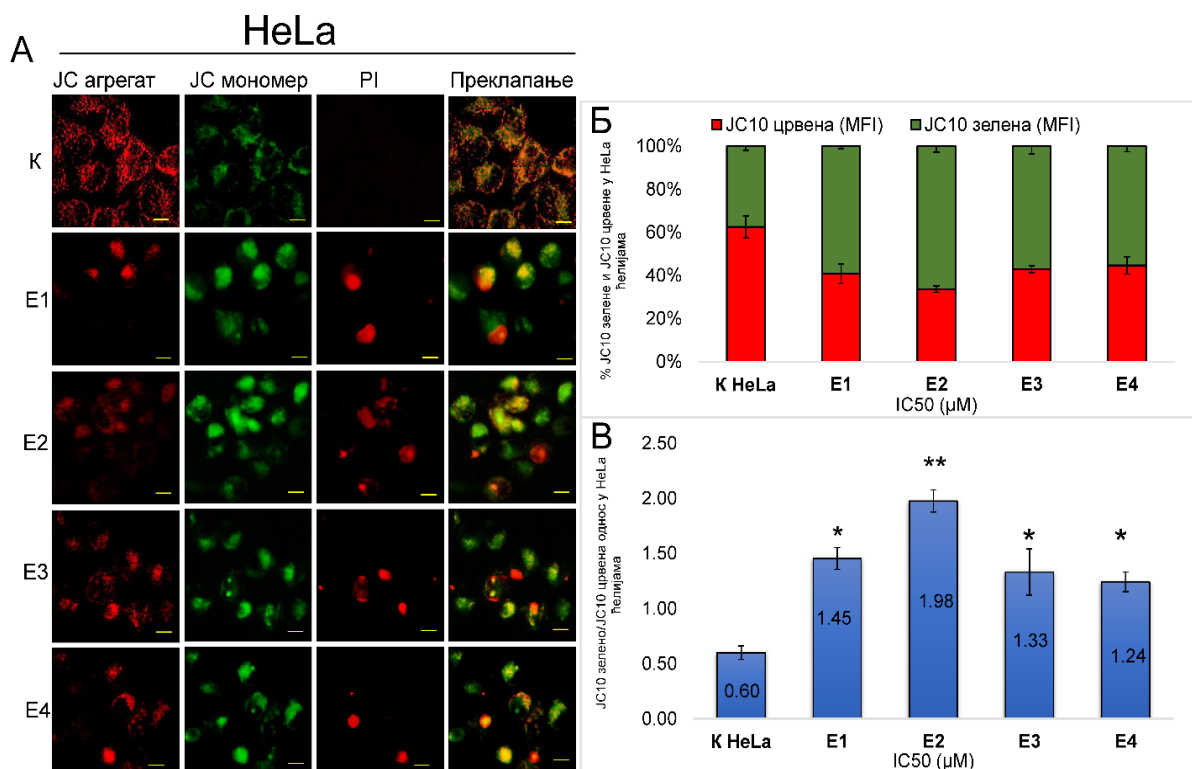


График 16. А. Имунофлуоресцентни приказ *HeLa* ћелија третираних енонима и обојених *JC10* бојом. У третираним туморским *HeLa* ћелијама јасно су видљиве промене интензитета зелене боје које директно указују на дисфункцију митохондријалног мембранског потенцијала. **Б.** Процентуални приказ односа интензитета зелене и црвене флуоресценције третираних *HeLa* ћелија у односу на контролне *HeLa* ћелије. **В.** Промена у *JC* зелено - *JC* црвеном односу третираних у односу на нетретиране туморске ћелије. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Резултати су показали да у туморским *HCT-116* ћелијама све испитиване новосинтетисане соли енона узрокују статистички значајно повећање интензитета зеленог мономера уз истовремено смањење црвеног агрегата указујући да испитиване супстанце такође као и енони, значајно мењају пермеабилност митохондријалних мембрана туморских *HCT-116* у односу на контролне ћелије (График 17А). Проценат ћелија са највећим уделом зеленог мономера био је присутан у *HCT-116* ћелијама третираним солима Е2, потом солима (Е1, Е3 и Е4) (График 17Б). Одређивање *JC* зелено-*JC* црвеног односа (График 17В) на *HCT-116* ћелијама, показао је да су све соли енона статистички значајно повећале ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) овај однос у поређењу са контролним ћелијама. Со енона 1 је узроковала пораст од 2,1; со Е2 за 2,3; со Е3 за 1,8 док је со Е4 смањила однос у поређењу са на контролним ћелијама.

Слични резултати су добијени на третираним *HeLa* туморским ћелијама (График 18), с тим што је *JC* зелено - *JC* црвени однос био мањи у односу на *HCT-116* ћелије. Новосинтетисане соли енона су готово све узроковале статистички ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) значајну промену митохондријалног мембранског потенцијала на третираним *HeLa* туморским ћелијама и то: со Е1 за 2; со Е2 за 2,4; со Е3 за 1,5 и со Е4 за 1,25 пута у односу на контролне, нетретиране *HeLa* туморске ћелије.

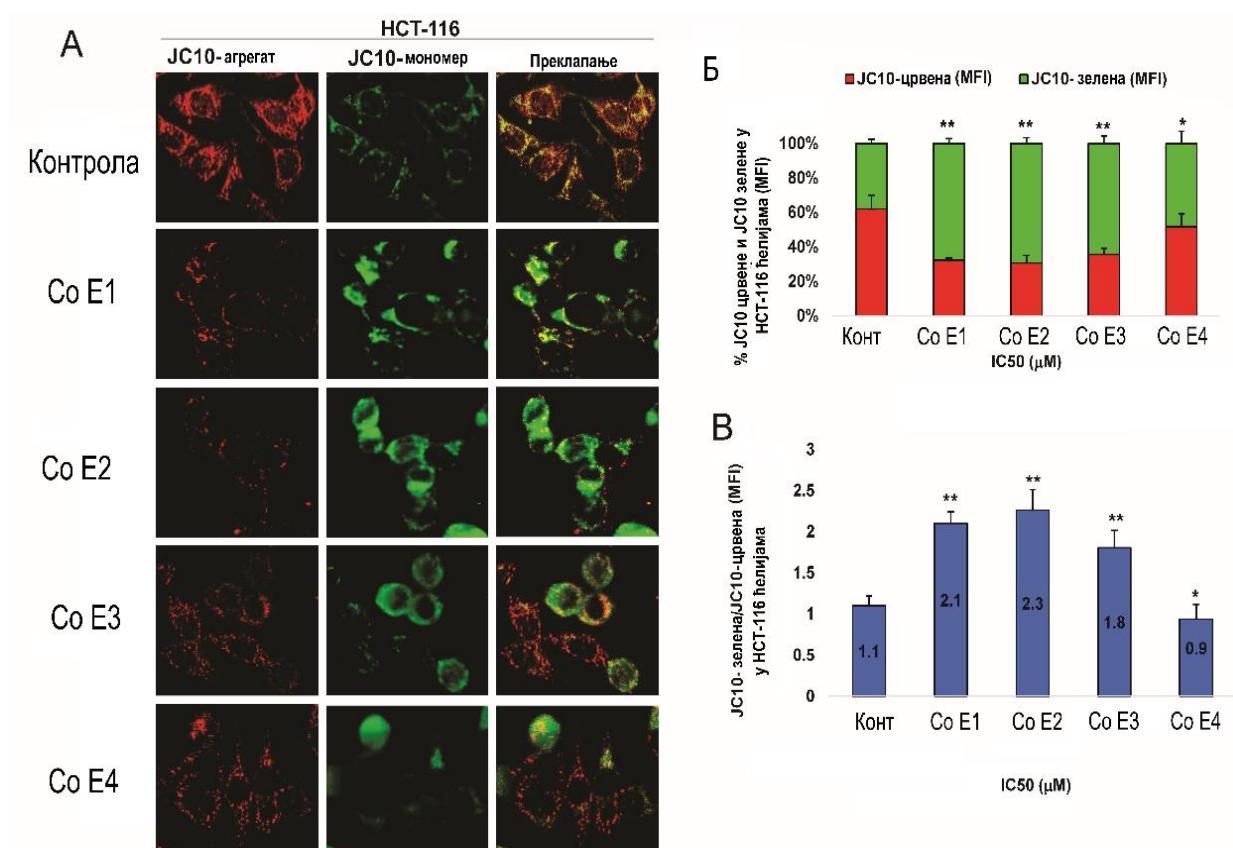
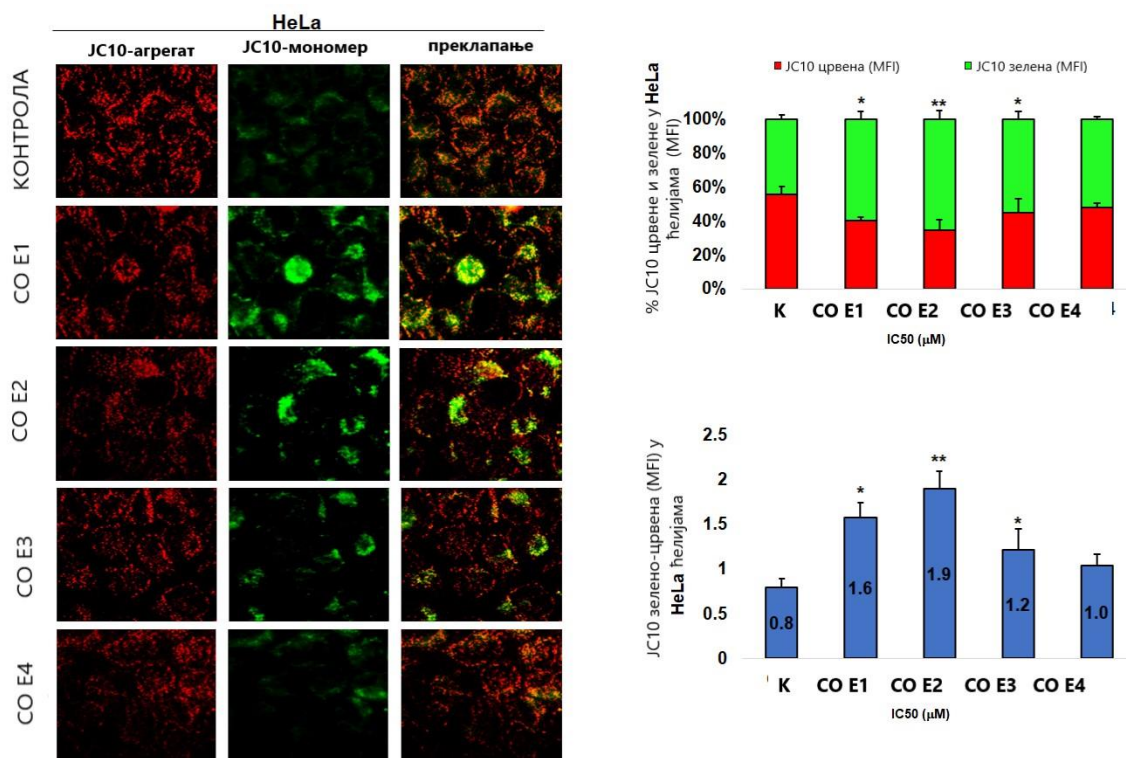


График 17. А. Имунофлуоресценти приказ *HCT-116* ћелија третираних солима енона и обојених *JC10* бојом. У третираним туморским *HCT-116* ћелијама јасно су видљиве промене интензитета зелене боје које директно указују на дисфункцију митохондријалног мембранског потенцијала. **Б.** Процентуални приказ односа интензитета зелене и црвене флуоресценције третираних *HCT-116* ћелија у односу на контролне *HCT-116* ћелије. **В.** Промена у *JC* зелено - *JC* црвеном односу третираних у односу на нетретиране туморске ћелије. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).



Гарфик 18. А. Имунофлуоресценти приказ *HeLa* ћелија третираних солима енона и обојених *JC10* бојом. У третираним туморским *HeLa* ћелијама јасно су видљиве промене интензитета зелене боје које директно указују на дисфункцију митохондријалног мембранског потенцијала. **Б.** Процентуални приказ односа интензитета зелене и црвене флуоресценције третираних *HeLa* ћелија у односу на контролне *HeLa* ћелије. **В.** Промена у *JC* зелено - *JC* црвеном односу третираних у односу на нетретиране туморске ћелије. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Добијени резултати испитивања ефеката енона и њихових соли на туморским ћелијама показали су да деловањем ових молекула долази до смањења пермеабилности митохондријалних мембрана третираних ћелија. Такође резултати су показали да је ефекат смањења пермеабилности митохондријалних мембрана најинтензивнији у случају енона у односу на соли енона, али такође и ефикаснији на ћелијама карцинома колоне у односу на карцином цервикса.

4.9. Утицај енона и соли енона на ослобађање цитохрома *c* из интермембранозног простора у цитоплазму туморских ћелија

У циљу финалног утврђивања и потврде активације унутрашњег митохондријалног апоптотског пута од стране новосинтетисаних енона и њихових соли коришћена је метода интрацелуларне локализације и експресије цитохрома *c* у туморским ћелијама третираним у односу на контролне ћелије (График 19 и 20).

Резултати су показали да сви новосинтетисани енони статистички значајно повећавају ($p < 0,01^{**}$) експресију цитохрома *c* као и да узрокују транслокацију истог из митохондрија у цитоплазму *HCT-116* туморских ћелија у односу на контролне туморске

ћелије. Највеће статистички значајно повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* било је присутно у случају третмана еноном 2, чак 60% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 19Б) што је резултовало 8,8 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,5/0,17) (График 19В). У случају енона 1, ово повећање је било такође статистички значајно ($p < 0,01^{**}$) и резултовало је да је 55% експримираног цитохрома *c* било локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 19Б), што је резултовало 7,17 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,22/0,17); за енон 3, 52,5 % експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 19Б), што је резултовало 6,4 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,10/0,17) и на крају енон 4 је имао најмање, али ипак статистички значајно ($p < 0,01^{**}$) повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* у односу на контролне ћелије са 48% и 5,14 пута већим односом у поређењу са контролом (0,92/0,17).

Слични резултати су добијени и за *HeLa* ћелије и показали су да сви новосинтетисани енони статистички значајно повећавају ($p < 0,01^{**}$) експресију цитохрома *c* у *HeLa* туморским ћелијама у односу на контролне туморске ћелије (График 20). Највеће статистички значајно ($p < 0,01^{**}$) повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* било је присутно у случају третмана еноном 2 када је 57% експримираног цитохрома *c* било локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 20Б) што је резултовало 5,28 пута већим односом (График 20В) цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,32/0,25).

У случају енона 1, ово повећање је било такође статистички значајно ($p < 0,01^{**}$) и резултовало је да је 53% експримираног цитохрома *c* било локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 20Б), што је резултовало 4,48 пута већим односом (График 20В) цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,12/0,25); за енон 3, 49% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 20Б), што је резултовало 3,84 пута већим односом (График 20В) цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (0,96/0,25) и на крају енон 4 је резултовао са повећањем експресије цитоплазматског цитохрома *c* у односу на контролне ћелије са 45% и 3,28 пута већим односом у поређењу са контролом (0,82/0,25).

На основу добијених резултата може се закључити да сви новосинтетисани енони узрокују статистички значајно повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* код *HCT-116* у односу на третиране *HeLa* ћелије.

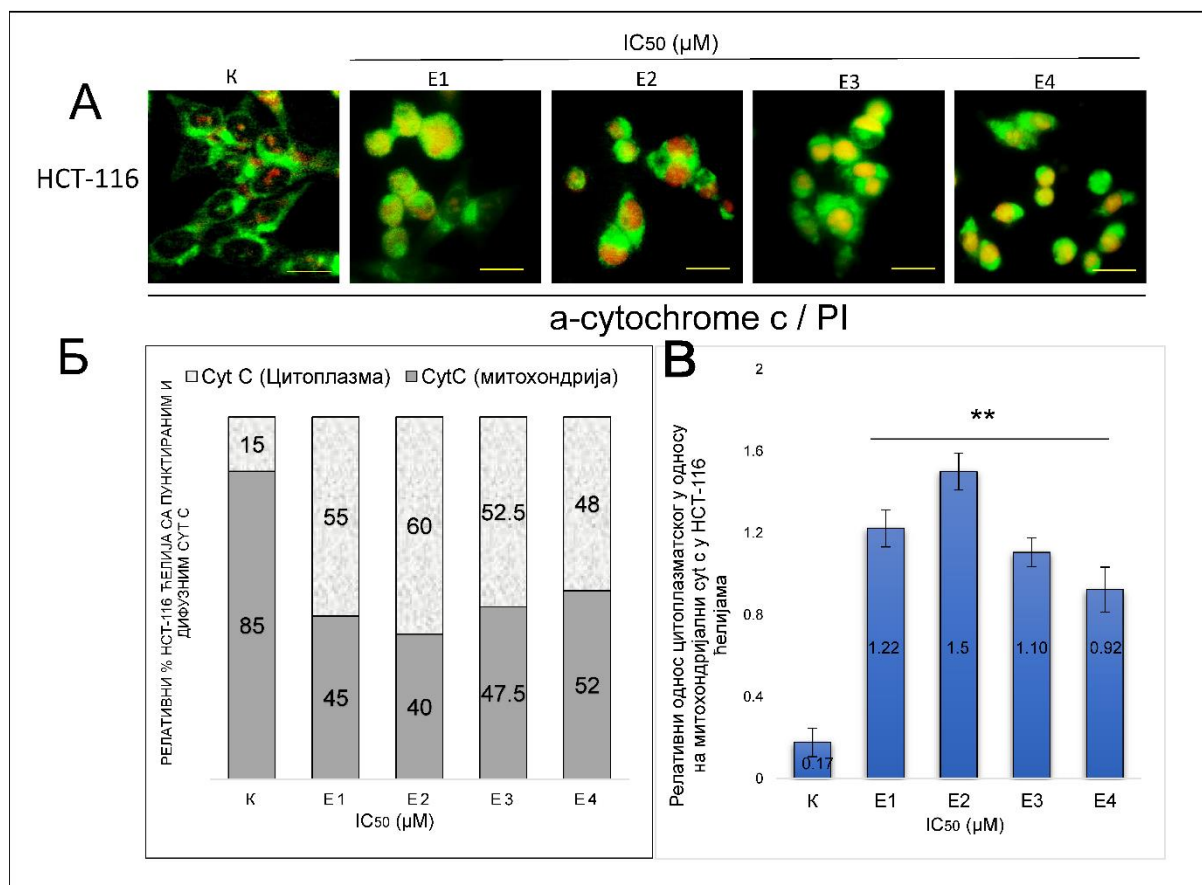


График 19. А. Имунофлуоресценти приказ *HCT-116* ћелија третираних енонима и означених специфичним антителом за цитохром *c*. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* у третиралим *HCT-116* ћелијама у односу на њихову контролу. **В.** Стубичасти приказ релативног односа цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* након третмана испитиваним енонима. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,01 (**).

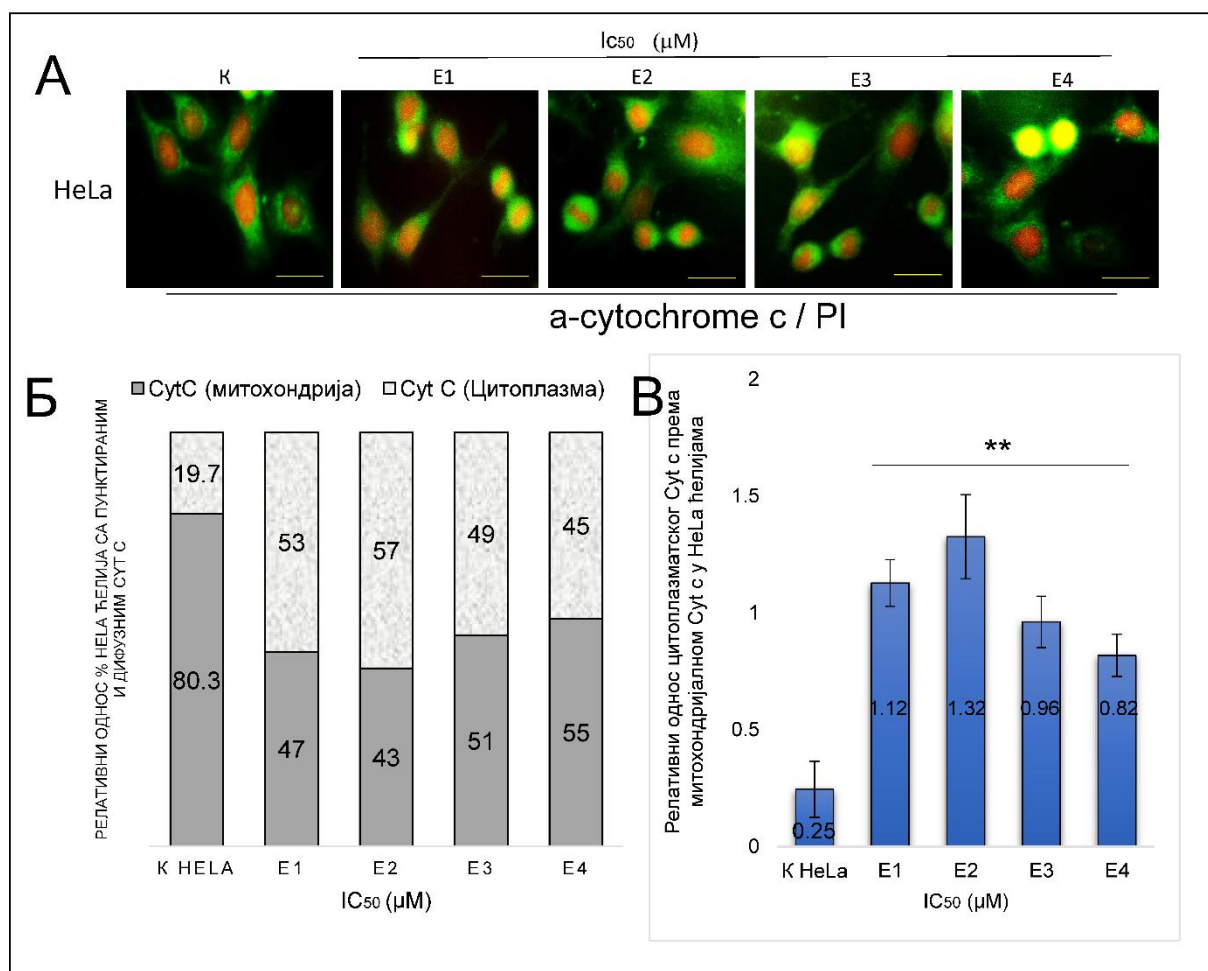


График 20. А. Имунофлуоресценти приказ *HeLa* ћелија третирањем енонима и означених специфичним антителом за цитохром *c*. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* у третирањем *HeLa* ћелијама у односу на њихову контролу. **В.** Стубичасти приказ релативног односа цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* након третмана испитиваним енонима. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,01 (**).

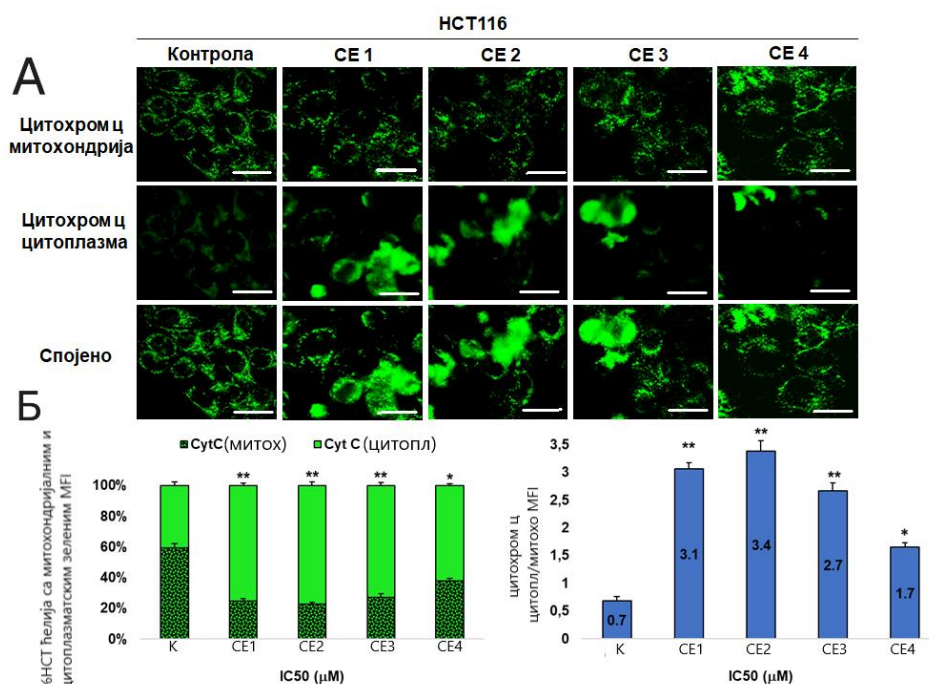


График 21. А. Имунфлуоресцентни приказ *HCT-116* ћелија третираних солима енона и означених специфичним антителом за цитохром *c*. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* у третираним *HCT-116* ћелијама у односу на њихову контролу. **В.** Стубичасти приказ релативног односа цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* након третмана солима енона. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $<0,05$ (*) и $<0,01$ (**).

Резултати су показали да све новосинтетисане соли енона статистички значајно повећавају ($p<0,05^*$ и $0,01^{**}$) експресију цитохрома *c* као и да узрокују његову транслокацију из митохондрија у цитоплазму туморских ћелија *HCT-116* у односу на контролне ћелије. Највеће статистички значајно повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* било је присутно у случају третмана соли енона 1, чак 80% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 21Б) што је резултовало 4,4 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (3,1/0,7) (График 21В). У случају соли енона 2, ово повећање је било такође статистички значајно ($p<0,01^{**}$) и резултовало је да је 78% експримираног цитохрома *c* било локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 21Б), што је резултовало 4,85 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (3,4/0,7); за со енона 3, 75% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 21Б), што је резултовало 3,8 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (2,7/0,7) и на крају со енона 4 је имала најмање, али ипак статистички значајно ($p<0,05^*$) повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* у односу на контролне ћелије са 61% и 2,4 пута већим односом у поређењу са контролом (1,7/0,7).

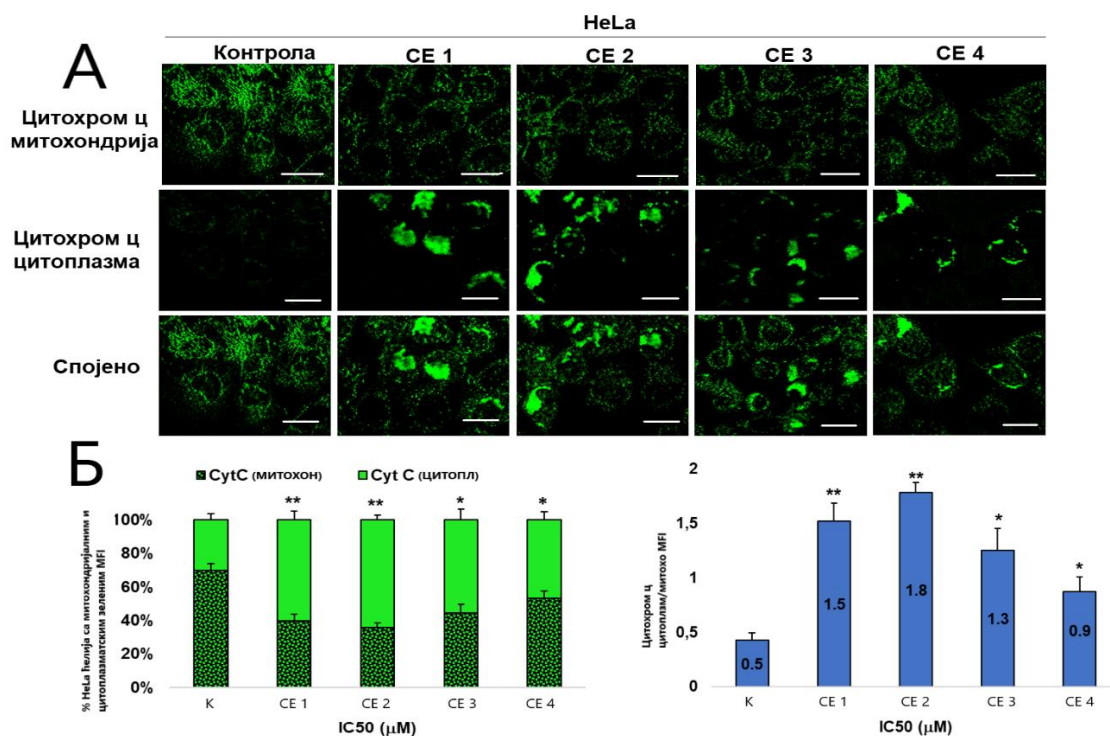


График 22. А. Имунофлуоресцентни приказ *HeLa* ћелија третираних солима енона и означених специфичним антителом за цитохром *c*. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* у третираним *HeLa* ћелијама у односу на њихову контролу. **В.** Стубичасти приказ релативног односа цитоплазматског и митохондријалног цитохрома *c* након третмана солима енона. На сликама је дат граничник који представља величину од 20μm. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату ± стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су р вредности <0,05 (*) и <0,01 (**).

Резултати испитиваних соли енона на *HeLa* ћелијама су показали да све новосинтетисане соли енона статистички значајно повећавају ($p < 0,05^*$ и $0,01^{**}$) експресију цитохрома *c* као и да узрокују његову транслокацију из митохондрија у цитоплазму.

Највеће статистички значајно повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* било је присутно у случају третмана соли енона 2 ($p < 0,01^{**}$), чак 62% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 22Б) што је резултовало 3,6 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,8/0,5) (График 22В). У случају соли енона 1, ово повећање је било такође статистички значајно ($p < 0,01^{**}$) и резултовало је да је 60% експримираног цитохрома *c* било локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 22Б), што је резултовало 3,0 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,5/0,5); за со енона 3, 57% експримираног цитохрома *c* било је локализовано у цитоплазми третираних ћелија (График 21Б), што је резултовало 2,6 пута већим односом цитохрома *c* у поређењу са контролним ћелијама (1,3/0,5) и на крају со енона 4 је имала најмање, али ипак статистички значајно ($p < 0,05^*$) повећање експресије цитоплазматског цитохрома *c* у односу на контролне ћелије са 43% и 1,8 пута већим односом у поређењу са контролом (0,9/0,5).

Резултати испитивања ефеката соли енона на локализацију цитохрома *c*, показали су да соли енона испољавају снажнији ефекат на туморским ћелијама колона у односу на ћелије карцинома цервикса. Тачније, транслокација цитохрома *c* из матрикса митохондрија у цитоплазму туморских ћелија након третмана испитиваним солима најефикаснија је на ћелијама канцера колона.

4.10. Утицај енона и соли енона на ћелијски циклус

Последњи корак у потврди апоптотичног ефекта новосинтетисаних енона и њихових соли на туморским ћелијама приказан је и одређен је ефектом испитиваних супстанци на ћелијски циклус. Овај процес је високо и строго регулисан различитим механизмима (видети одељак Увод). Било какав поремећај у ћелијском циклусу од стране одређене супстанце или молекула, узрокује прекомерну акумулацију ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

Резултати следећег експеримента показали су да сви новосинтетисани енони утичу на ћелијски циклус туморских ћелија тако што узрокују прекомерно и статистички значајно ($p < 0,05^*$) накупљање ћелија у *G2/M* фази (График 23 и 24).

За *HCT-116* ћелије (График 23) резултати су показали да је енон 1 узроковао акумулацију 50,4% третираних ћелија у *G2/M* фази; енон 2 - 56,1%, енон 3 - 54,1% и енон 4 - 41,4% у односу на контролу у којој је било 27,4% ћелија у датој фази.

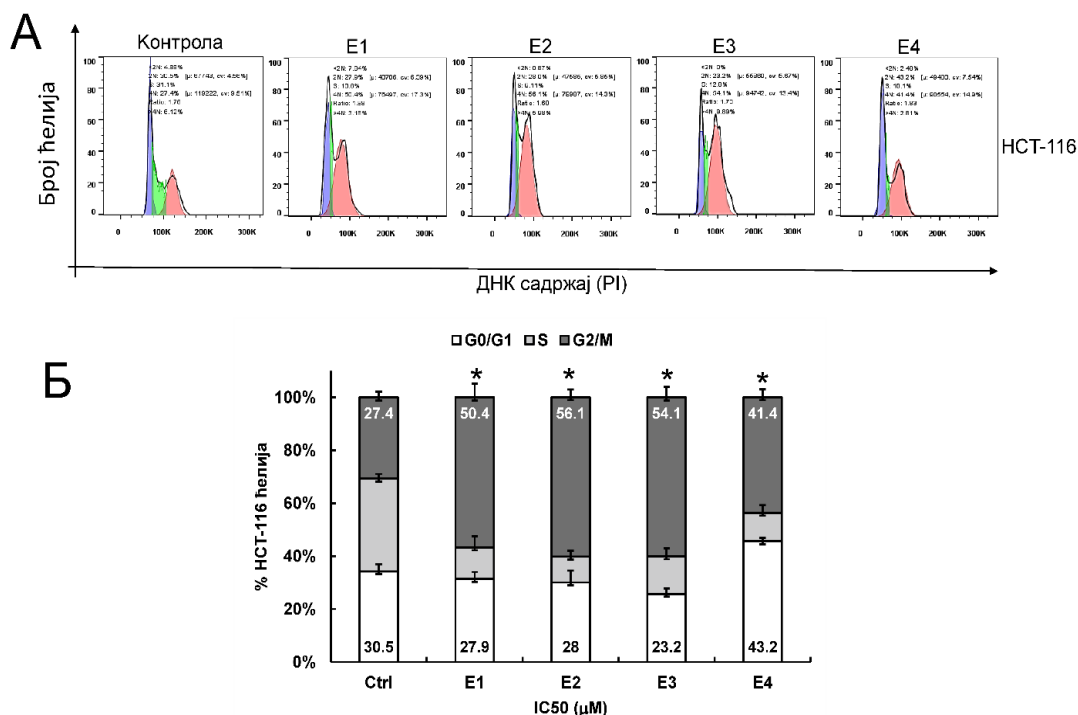


График 23. А. Хистограмски приказ профила ћелијског циклуса у *HCT-116* ћелијама третираним енонима. Резултати су анализирани употребом проточног цитометра. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције туморских *HCT-116* ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса био је израчунат применом програма *Flow-Jo*. Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента постављена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $< 0,05$ (*).

За *HeLa* ћелије (График 24), заустављање у *G2/M* фази је такође било статистички значајно ($p < 0,05^*$) у односу на контролне ћелије (29,9%). За енон 1 - 66,9%, енон 2 - 66%, енон 3 - 58,3% и енон 4 - 61,9%.

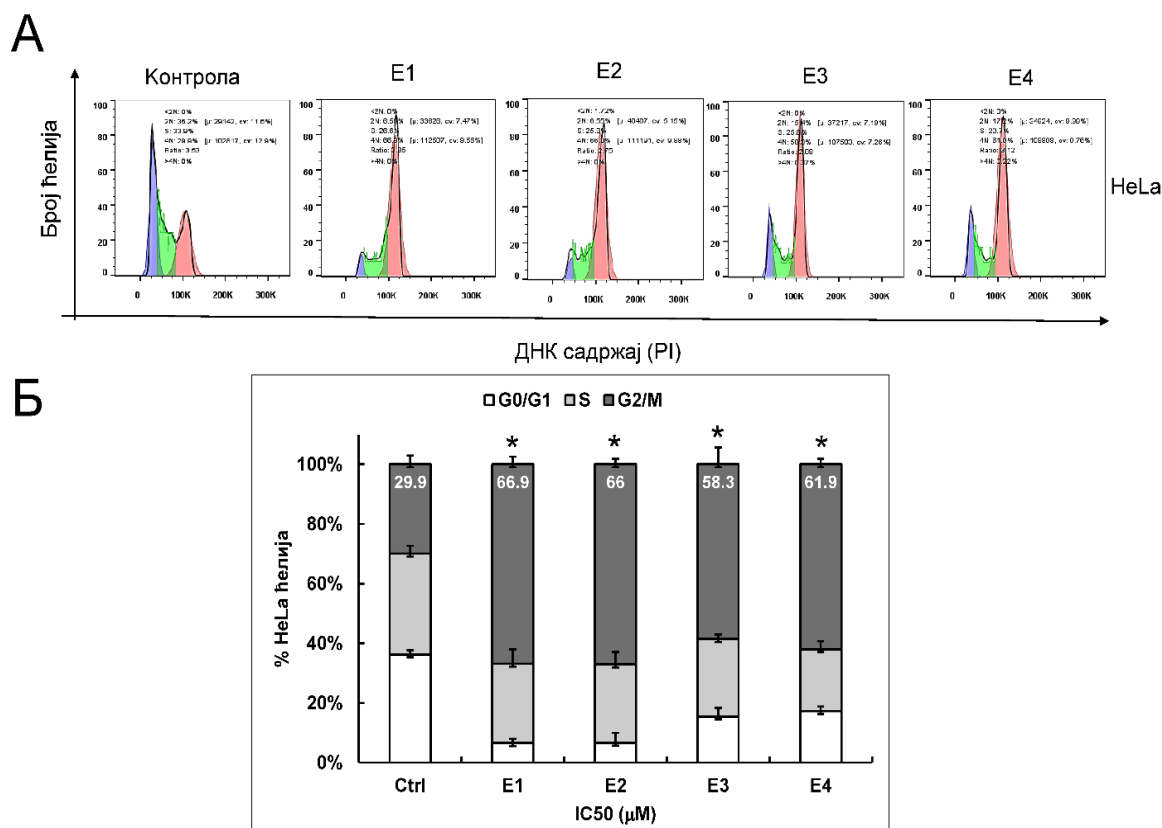


График 24. А. Хистограмски приказ профила ћелијског циклуса у *HeLa* ћелијама третираним енонима. Резултати су анализирани употребом проточног цитометра. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције туморских *HeLa* ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса био је израчунат применом програма *Flow-Jo*. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $< 0,05^*$.

Резултати следећег експеримента показали су да све новосинтетисане соли енона утичу на ћелијски циклус третираних туморских ћелија тако што узрокују прекомерно и статистички значајно ($p < 0,05^*$) накупљање ћелија у *G2/M* фази (График 25).

За *HCT-116* ћелије (График 25Б) резултати су показали да је со енона 1 узроковала акумулацију 37,8% третираних ћелија у *G2/M* фази; со енона 2 - 44,6%, со енона 3 - 34,8% и со енона 4 - 33,9% у односу на контролу у којој је било 28% ћелија у датој фази. Соли енона, такође су испољиле значајан ефекат на ћелијски циклус, али је овај ефекат у односу на њихове одговарајуће еноне био мањи. За *HeLa* ћелије (График 25Б) резултати су показали да је со енона 1 узроковала акумулацију 42,9% третираних ћелија у *G2/M* фази; со енона 2 - 43,7%, со енона 3 - 25,8% и со енона 4 - 25,5% у односу на контролу у којој је било 22% ћелија у тој фази. Соли енона, такође су испољиле значајан ефекат на ћелијски циклус *HeLa* ћелија, али је овај ефекат у односу на њихове одговарајуће еноне био мањи.

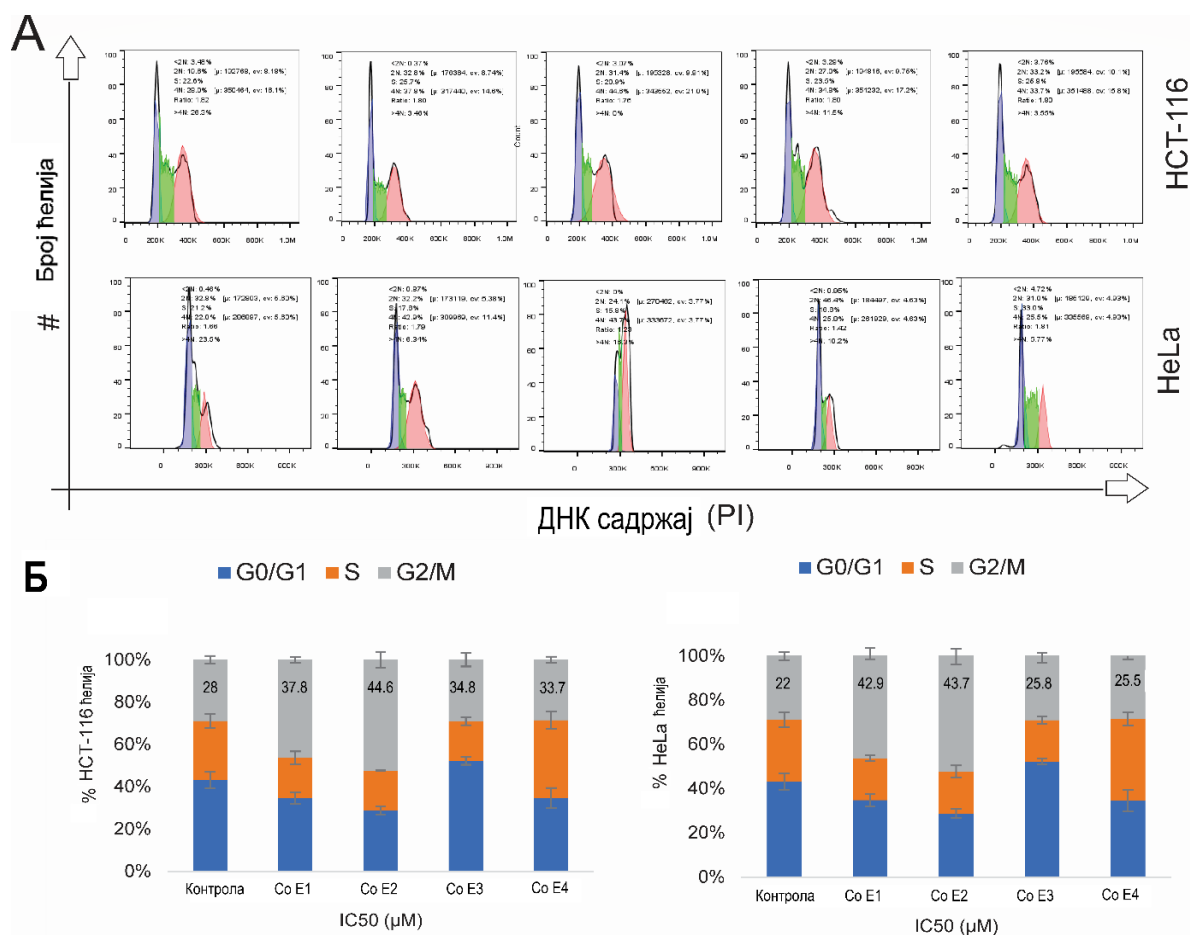


График 25. А. Хистограмски приказ профила ћелијског циклуса у туморским ћелијама третираним солима енона. Резултати су анализирани употребом проточног цитометра. **Б.** Стубичасти приказ процентуалне дистрибуције туморских *HeLa* и *HCT-116* ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса био је израчунат применом програма *Flow-Jo*. Приказани резултати представљају средњу вредност три независна експеримента урађена у трипликату $\pm$ стандардна грешка. Статистички значајном разликом у цитотоксичном дејству сматране су p вредности $<0,05$ (*).

5. ДИСКУСИЈА

У савременом свету кога прате убрзани економски као и индустријско-технички напредак, последње две деценије дошло је до интензивног развоја и пораста инциденце савремених болести у које убрајамо гојазност, дијабетес и малигне болести. Малигне болести као савремена обољења су у највећој експанзији у последње две деценије. Овим болестима подједнако су захваћена оба пола. Према објављеним статистичким подацима Светске здравствене организације (*World Health Organization- WHO*) за 2020. годину, број нових малигних болести у Србији је у порасту. Код мушкараца, број новооткривених колоректалних карцинома је у порасту за 15%, док код жена број новооткривених цервикалних карцинома је повећан за 5% (43,69).

На основу података регистра за рак Републике Србије, у 2020. години од малигних тумора оболела је 41.419 особа (22.110 мушкараца и 19.309 жена), а 20.767 особа (11.611 особа мушког пола и 9.156 особа женског пола) умрле су од рака.

Колоректални карцином је трећи водећи малигни тумор по обољевању у свету, одмах после карцинома дојке и плућа, и други водећи малигни тумор према броју умрлих, иза рака плућа (288).

У патогенези карцинома, заједнички чинилац представљен је поремећајем у структури молекула ДНК (различити типови мутација) који резултују поремећајима метаболизма измењене ћелије и поремећајима у ћелијском циклусу. Све то доводи до неконтролисане деобе, бесмртности ћелије и способности инфилтрације околних ћелија и ткива. Молекуларна основа настанка ћелије канцера представљена је поремећајима у процесу апоптозе (146,147,289–291) као и поремећајима у равнотежи између протоонкогена и онкогена.

Терапијски приступи у лечењу малигнитета зависе од врсте тумора (малигни или бенигни), стадијума у коме се тумор налази, распрострањености, постојања метастаза као и врсте захваћеног органа и локализације тумора. Генерални терапијски приступ у лечењу ових обољења представљен је медикаментозним (имунотерапија, хормонска терапија, моноклонска антитела, хемиотерапије, биолошке терапије, зрачења...) и хируршким приступом (292).

Медикаментозна терапија, иако је савремена и прилично селективна за неке врсте тумора, и даље даје велики број нежељених дејстава од којих су најзначајнија резистентност туморских ћелија на примењену терапију и деловање терапије на здраве ћелије. Поље истраживања у проналажењу нових терапијских приступа за лечење карцинома се рапидно проширило, тако да су пацијентима данас на располагању новији терапијски приступи као што су: циљана, аблациона, хемодинамска, сонодинамска терапија као употреба нано честица и анти-оксидантна терапија (293–295).

Коришћење природних молекула у терапији карцинома раније се сматрало класичним традиционалним лечењем. Међутим, савремена медицина и истраживања у терапији различитих карцинома су показала и отклонила све недоумице везане за примену природних молекула у терапији ових болести (296–298). Истраживања су показала да употреба природних једињења и екстракта из различитих биљака може наћи своје место у примени ових супстанци као анти-канцерогених, превентивних, са високим степеном ефикасности и знатно ређом учесталостју нежељених ефеката који су присутни код медикаментозне терапије (296,299–308).

У овом истраживању, први пут су приказани резултати ефеката новосинтетисаних енона и њихових соли на туморске ћелије карцинома дебелог црева и цервикса.

Почетни природни молекул који је коришћен за синтезу енона и њихових соли био је ванилин. За разлику од ванилина који је коришћен као основно једињење за синтезу

ових молекула, енони имају различите супституенте везане за карбонилну групу енонског система - Енон 1 - (Е)-2- (2-метокси-4- (3-оксобут-1-ен-1-ил) фенокси) сирћетна киселина ($M_r = 250,25\text{g/mol}$) (поседује метил групу), Енон 2 – (Е)-2- (2-метокси-4- (4-метил-3-оксопент-1-ен-1-ил) фенокси) сирћетна киселина ($M_r = 278,30\text{g/mol}$) (изопропил), Енон 3 - (Е)-2- (2-метокси-4- (5-метил-3-оксхекс-1-ен-1-ил) фенокси) сирћетна киселина ($M_r = 292,33\text{g/mol}$) (изобутил) и Енон 4 - (Е)-2- (3-циклопропил-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-метоксифенокси) сирћетна киселина ($M_r = 276,29\text{g/mol}$) (циклопропил групу) и соли енона - Со Е1 - натријум (Е)-2- (2-метокси-4- (3-оксобут-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 272,23\text{g/mol}$), Со Е2 - натријум (Е)-2- (2-метокси-4- (4-метил-3-оксопент-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 300,29\text{g/mol}$), Со Е3 - натријум (Е)-2- (2-метокси-4- (5-метил-3-оксхекс-1-ен-1-ил) фенокси) ацетат ($M_r = 314,31\text{g/mol}$) и Со Е 4 - натријум (Е)-2- (3-циклопропил-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-2-метоксифенокси) ацетат ($M_r = 298,27\text{g/mol}$).

Ванилин је представник класе бензалдехида, фенола који у својој структури, на положајима 3 и 4 поседује метокси и хидрокси субституенте. У људској исхрани се користи у виду ваниле као појачивач укуса који се добија сушењем или ферментисањем орхидеје. Захваљујући присуству ароматичног језгра, алдехидне групе и фенол хидроксилне групе, ванилин испољава различита биолошка дејства као што су анти-оксидантно, анти-канцерогено, анти-мутагено, анти-инвазивно, анти-ангиогенетско, анти-пролиферативно и апоптотично (309–312). Изузетни потенцијал ванилина, његових деривата, аналога или новосинтетисаних молекула који воде порекло од њега описан је у великом броју истраживања. *Yan* и сарадници (313) описали су у свом истраживању апоптотичне ефекте ванилинског деривата, бромованина (6-бромин-5-хидрокси-4-метоксибензалдехид) у *HepG2* туморским ћелијама. Такође аутори наводе и резултат који описује анти-пролиферативни ефекат бромованина али и његову способност индукције аутофагије као другог типа ћелијске смрти у туморским ћелијама. *Tai* и сарадници (314), у свом истраживању су приказали да ванилински деривати имају анти-оксидативна дејства. Такође исте резултате анти-оксидативног дејства ванилина добили су *Fayeulle* и сарадници (315) и *Zhao* и сарадници (316) који су испитивали ефекте ванилина на хуманим фибробластима коже и *HepG2* ћелијама. *Sinsuebpol* и сарадници (317) објавили су резултате истраживања у којима је приказано да ванилин поседује цитокомпатибилна и цитопротективна дејства која неутралишу деловање слободних кисеоничних радикала на фибробластима (*HaCaT*) чиме се потврђује позитивна улога ванилина у лакшем зарастању рана.

Најновије истраживање чији су резултати објављени 2023. године показују да ванилин комбинован са цинк-гвожђе наночестицама испољава хепатопротективно дејство (318). Поменута студија је приказала на животињском моделу да ванилин комбинован са цинком и гвожђем у виду наночестица штити јетру животиња од оштећења која су узрокована кадмијумом. Аутори су такође доказали да ванилин комбинован са поменутим атомима у наночестицама, интерреагује са рецепторима (*TLR 8*, *AKT 1* и *Bcl-2*) посредством аминокиселинских остатака серина, пролина, изолеуцина и аспарагина које су локализоване у њиховом каталитичком месту. Иако подаци из литературе не нуде информације о ефектима соли ванилина или његових деривата, студија коју су спровели *Fujii* и сарадници (319) наводе да додавање различитих соли ванилину смањује његову растворљивост у води. Услед присуства различитих активних група, ванилин и његови деривати могу бити коришћени у синтези молекула којима се обезбеђује боље и ефикасније преузимање од стране различитих ћелија.

Први задатак ове дисертације и истраживања било је испитивање и упоређивање цитотоксичних ефеката четири новосинтетисана енона и њихове четири соли на туморским ћелијама али и на здравим.

Сврха и задатак сваког истраживања биолошког ефекта неког једињења јесте у ствари његова селективност. Најпре је било потребно да се испита да ли енони и њихове соли испољавају цитотоксични ефекат на туморским ћелијама, при чему тај цитотоксични ефекат не би имао статистичку значајност на здравим, контролним ћелијама. У сврху тестирања и испитивања цитотоксичног ефекта енона и њихових соли, рађен је МТТ тест цитотоксичности на туморским *HeLa* (карцином цервикса) и *HCT-116* (карцином колона) ћелијама и ефекти су упоређивани са здравим, контролним ћелијама *MRC-5* (здрави фибробласти плућа).

Резултати МТТ теста цитотоксичности (48 и 72 сата) су показали да енони и њихове соли имају статистички значајан цитотоксични ефекат према туморским ћелијама, док на здраве ћелије не делују цитотоксично. У истраживању које је спровео *Doroudi et al.*, (320) показано је да синтетисани енони испољавају цитотоксично дејство према туморским *HCT-116* и *HT29* ћелијама колона, не шкодећи здравим ћелијама, са просечним IC_{50} вредностима које су се кретале од 3-75 μ М. У истом истраживању аутори наводе податак да су друге супстанце из испитиване групе показивале статистички значајан цитотоксични ефекат према испитиваним туморским ћелијама уз ниже IC_{50} вредности у односу на комерцијалне цитостатике 5-флуороурацил и 2-меркаптоетанол, које су користили као позитивне контроле. Такође аутори истичу статистички значајан индекс селективности већине испитиваних супстанци. *Ho* и сарадници (321) наводе резултате своје студије у којој су показали да ванилин испољава апоптотично дејство и узрокује застој у ћелијском циклусу *HT-29* туморских ћелија колона. Аутори такође истичу да ванилин и његови деривати могу да буду коришћени као превентивна једињења у заустављању развоја канцера колона.

У истраживању које је испитивало цитотоксични ефекат халкона, деривата ванилина, *Луковић* и сарадници (312) су потврдили цитотоксични ефекат њихових једињења на туморским ћелијама колона *HCT-116* који је био већи у односу на цитотоксичне ефекте референтних супстанци. Израчунате просечне IC_{50} вредности за халконе износиле су од 6,8-7 μ М. *Riafrecha et al.*, (322) у свом истраживању испитивали су ефекте ванилинских енона као инхибитора карбоанхидраза на четири врсте хуманих ензима и изоензима присутних у туморима. Резултати њиховог испитивања показали су да неки од ванилинских енона могу да се идентификују као селективни инхибитори тумор повезаних изоензима, хуманих карбоанхидраза *hCA IX* и *XII* који представљају биомаркере за дијагнозу, лечење (стварањем инхибитора *hCA IX* и *XII*) тумора. *Dimmock et al.*, (323) у свом истраживању испитивали су ефекте серије синтетисаних енона на мишијим ћелијама (*P388* и *L1210* ћелијске линије) као и на хуманим *Molt 4/C8* и *CEM T*-лимфоцитима и упоређивали са цитотоксичним ефектима Мелфалана. Њихови резултати показали су да је већина испитиваних молекула показала значајан цитотоксични ефекат у односу на Мелфалан, као и то да су испитивана једињења показивала селективност према ћелијама леукемије и канцера колона.

Резултати испитивања цитотоксичних ефеката новосинтетисаних енона и њихових соли на туморским ћелијама канцера цервикса и колона у складу су са резултатима осталих истраживача. Индекси селективности су већи у односу на остала истраживања, обзиром да испитиване супстанце не показују статистички значајан цитотоксични ефекат на здравим ћелијама. IC_{50} вредности испитиваних енона и њихових соли показују усклађеност са осталим истраживањима, уз статистички значајан цитотоксични ефекат и значајно ниже IC_{50} вредности које су израчунате за *HCT-116* ћелије. По ефикасности, тачније по IC_{50} вредностима испитиваних супстанци, најбољи цитотоксични ефекат је био испољен на туморским ћелијама колона, потом цервикалним туморским ћелијама. Индекс селективности за све испитиване супстанце (еноне и њихове соли), статистички су значајано били већи у односу на вредности доступних

литературних података. Ова чињеница и ови резултати директно су у корелацији са изузетно високим IC_{50} вредностима које испитиване супстанце показују на здравим ћелијама. У односу на референтну супстанцу, позитивну контролу која је коришћена у виду цисплатине, IC_{50} вредности су показале да енони и њихове соли испољавају јачи цитотоксични ефекат уз ниже IC_{50} вредности најпре за *HCT-116*, а потом и за *HeLa* ћелије. Индекс селективности који је израчунат за испитиване еноне и њихове соли у позитивној је корелацији са литературним подацима других истраживача. Висок индекс селективности је најзначајнији у случају енона и то најпре на *HCT-116* ћелијама, потом на ћелијама канцера цервикса; док за соли енона индекс селективности је такође значајан али не колико је селективност енона.

Поред утврђивања цитотоксичних ефеката енона и њихових соли, у даљем току истраживања посматран је ефекат испитиваних супстанци на морфологију туморских и здравих ћелија. Морфологија контролних, здравих туморских ћелија у односу на туморске ћелије којима је индукована ћелијска смрт показивала је јасне разлике. Апоптоза као програмирана ћелијска смрт, одговорна је за низ физиолошких (ембриолошки развој, активност и ефикасност имунског система) али и патолошких процеса (различите болести).

Морфолошке промене апоптотичне ћелије су карактеристичне за фазу апоптозе али може се рећи и за органеле. На основу овога за рану апоптозу карактеристичне су морфолошке промене које захватају цитоплазму и плазма мембрану ћелије; за средњу фазу апоптозе карактеристичне су морфолошке промене на митохондријама и за касну фазу апоптозе карактеристичне су промене на једру (324–327). Наиме, у раним фазама, почетним фазама апоптозе долази до протрузије фосфатидил серинских остатака ка спољашњости; потом следи губитак адхерентности и контакта захваћене ћелије са околним ћелијама. Овај губитак адхеренције је у директној корелацији са губитком микровила и протрузије плазма мембране.

Промене на митохондријама најпре се односе на измену митохондријалног мембранског потенцијала, стварање пора на митохондријалној мембрани са последичним ослобађањем интермембранозних протеина у цитосол. Једарне морфолошке промене које су карактеристичне за финалну фазу апоптозе означене су фрагментацијом једра и кондензацијом хроматина. У зависности од јачине апоптотичног стимулуса, дужине његовог трајања и фазе ћелијског циклуса, дефинитивне морфолошке промене карактеристичне за апоптозу могу да настану за само неколико сати (328). Истраживања су показала да је цитотоксични ефекат супстанци на туморским ћелијама праћен променама у њиховој морфологији које градијски и на основу промена могу бити класификоване на различите врсте типа ћелијских смрти (апоптоза, пикноза, некроптоза, некроза, итд.) (160,329–331).

У истраживању које је спроведено од стране *Ramadoss et al.*, (332) аутори приказују резултате у којима ванилин делује цитотоксично и мења морфологију ћелија тумора дојке *MCF-7*. Аутори такође наводе податак да су морфолошке промене туморских ћелија индуковане ванилином у директној корелацији са морфолошким карактеристикама апоптотичних ћелија. Сличне резултате је у свом истраживању показао *Qian Li* и сарадници (333), који наводе да су ванилин и његови деривати утицали анти-фунгално на *Aspergillus flavus* мењајући интегритет ћелијске мембране. Такође истраживања спроведена од *Bender* и сарадника (334), *Surya* и сарадника (335) и *Sarkar* и сарадника (336), су показала да су деривати ванилина и сам ванилин испољавали анти-туморско дејство на *MCF-7*, *PaCa2* и *Jurkat* ћелије уз цитотоксичне морфолошке промене које су одговарале апоптотичним променама. *Zhou* и сарадници (337) показали су да су њихови новосинтетисани деривати ванилина (*IPM711* и *IPM712*) узроковали

морфолошке промене на нивоу зида бактерија и *HCT-116* ћелије јаче у односу на сам ванилин.

Луковић и сарадници (312) су у свом истраживању испитивали деловање ванилинских деривата, халкона на туморским *HCT-116* ћелијама. Промене морфологије *HCT-116* ћелија након третмана халконима, одговарале су променама карактеристичним за апоптотичне ћелије. Новосинтетисани енони и њихове соли показале су цитотоксични ефекат на испитиваним туморским ћелијама.

Резултати морфолошке анализе туморских ћелија које су третиране енонима и њиховим солима испитивани су употребом микроскопа. Наши резултати су у позитивној корелацији са резултатима који су приказали остали аутори. Наиме у оба временска интервала која су испитивана, енони и њихове соли су узроковале морфолошке промене туморских ћелија које су временски и дозно биле зависне и одговарале су променама карактеристичним за апоптотичне ћелије. Наиме, најниже дозе енона и њихових соли узроковале су губитак адхеренције и контакт са околним ћелијама, уз очуван интегритет и облик ћелија. Веће дозе али и дужи временски интервал третмана поменутих супстанцама узроковао је промене морфологије третираних ћелија које су карактеристичне за касну фазу апоптозе. Ћелије су биле округле, мртве, без контакта са околним ћелијама и са последичном фрагментацијом једра која је била видљива на већем увећању.

Индукција ћелијске смрти туморских ћелија може бити остварена једним или удруженим деловањем различитих типова ћелијске смрти. У литературним подацима, наводи се да постоје два главна типа ћелијске смрти: 1. програмирана ћелијска смрт (ту се убрајају лизозомална ћелијска смрт, аутофагија, некроза и апоптоза), 2. инфламаторна ћелијска смрт (некроптоза, нетоза, пироптоза) и новије откривене у које убрајамо ентозу, еребозу, фероптозу, аутозу (167,338–344). Дефинитивна потврда као и одређивање типа ћелијске смрти које је индуковано од стране неког агенса може бити спроведено употребом специфичног бојења *Annexin V/7AAD* употребом проточне цитометрије. За *Annexin* је карактеристично да се везује за фосфатидил серинске остатке, који су код апоптотичних ћелија орјентисани ка спољашњости, док се *7AAD* боја везује за интактну ДНК и њоме се приказују здраве ћелије. Управо ова екстернализација фосфатидил серинских остатака апоптотичне ћелије користи се као маркер ране фазе апоптозе (343,345,346).

У истраживању које је спроведено од стране *Yan* и сарадника (313), показано је да дериват ванилина, бромованин успешно индуковао апоптозу код туморских *HeLa* и *HepG2*, као и хуманих *Jurkat* леукемијских ћелија при дозама од 10 до 40 μ M. Истраживања која су обухватила туморске ћелије хепатичног карцинома и неуробластома, *Naz* и сарадници (347) су показали да је тип ћелијске смрти који је индукован ванилином код *HepG2* и *SH-SY5Y* ћелија, посредован апоптозом. У ћелијама карцинома колона *HT-29*, *Guoli* и сарадници (348) су такође показали апоптотични ефекат ванилина и смањење активност *N*-метилтрансферазе (ензима чија је активност повишена код карцинома и повезана је са резистенцијом на 5-флуороурацил). Поред апоптотичног ефекта на различитим типовима туморских ћелија, у истраживањима су приказани резултати у којима је ванилин ефикасно индуковао апоптотичну ћелијску смрт у хуманим ендометријским епителијалним ћелијама-*IIZ* (349), *MCF-7*, *HeLa* ћелијама (312,350) као и ћелијама карцинома колона *HCT-116*.

Узимајући у обзир да су енони и њихове соли новосинтетисани, до сада неиспитивани деривати ванилина, у литературним подацима у сврху поређења ефеката наших супстанци са резултатима других истраживача, упоређивали смо деривате ванилина који су имали различите субституенте. *Ahmed* и сарадници (351) су показали у свом истраживању да су новосинтетисани ванилин изатин хибриди (који садрже

различите функционалне субституенте) снажни индуктори ћелијске смрти хуманих *HCC* ћелија, *SNU-475* и *C3A* ћелија хепатоцелуларног карцинома. *Song* и сарадници (352) показали су да је молекул изолован из биљке *Selaginella moellendorffii*, који као активни део садржи изопропил групу, инхибирао пролиферацију и индуковао је апоптозу *U2OS* туморских ћелија остеосаркома.

Marton и сарадници (353) у свом истраживању приказали су резултате у којима су новосинтетисани аналози ванилина и 2,4,6-трихидроксибензалдехида ефикасно инхибирали раст ћелија меланома *A375*. *Berk* и сарадници (354) користили су о-ванилински дериват у циљу синтезе компоненти (Е)-4-((4-хидрокси-3-метокси-5-нитробензилиден)амино)-N-(пиридин-2-ил) бензенсулфонамид, (Е)-2-метокси-4-(((4-(N-(пиридин-2-ил)сулфамоил)фенил)имино)метил)фенил ацетат (355) и (Е)-2-метокси-4-(((4-(N-(пиридин-2-ил) сулфамоил)фенил)имино)метил)фенил изобутират (356). Резултати студије ових аутора показали су да различити супституенти ванилинских деривата испољавају различите биолошке активности, међу којима је најважнија апоптотична тј. анти-туморска активност против ћелија канцера колона *HT29* и *HCT-116* ћелија (357).

Даља истраживања указују на то да компоненте ванилинских деривата које су у својој структури садржале сулфамоил и фенил карбоксилатни систем испољавале су снажну анти-канцерогену активност против ћелија тумора дојке *MCF-7* ћелија (358,359). *Oliveira* и сарадници (360) у свом истраживању синтетисали су једињење ванилин и 1,10-фенантролин-5,6-дион и испитивали су његово антимикубно и анти-канцерогено дејство. Резултати њиховог истраживања показали су да њихов дериват ванилина показује обећавајуће анти-канцерогено дејство према *HT29* и *HCT-116* ћелијама канцера колона.

Резултати ове студије показали су да сви новосинтетисани енони као и њихове соли узрокују ћелијску смрт испитиваних туморских ћелија, која је посредована апоптозом и да испољавају анти-канцерогено дејство. На ћелијама карцинома колона енони су статистички значајно узроковали повећање процента ћелија које се налазе у раној фази апоптозе у односу на контролне, туморске, нетретирание ћелије али и у односу на ћелије карцинома цервикса. Енон који је најефикасније индуковао апоптозу на туморским ћелијама био је енон који је садржао изопропил групу (потом метил, изобутил и на крају циклопропил групу).

Процес апоптозе је строго регулисан великим бројем протеина (анти и про-апоптотичних протеина). Након доказивања да енони и њихове соли узрокују апоптозу у туморским ћелијама, у следећем кораку одређивана је експресија и локализација кључних, регулаторних апоптотичних протеина (*Bcl-2*, *Bax*, и егзекуторне, извршилачке каспазе 3). За дериват ванилина, ванилин оксиде истраживања су показала ефикасну индукцију апоптозе у *A549* и *NCI-H2170* ћелијама карцинома плућа уз смањење експресије анти-апоптотичног протеина *Bcl-2*, повећање експресије про-апоптотичног протеина *Bax* и повећање активности активне каспазе 3 (311). Резултати истраживања *Sarkar* и сарадника (295) показали су да је ванилински третман *Jurkat* ћелија узроковао смањење *Bcl-2*, повећање експресије *Bax*, и активацију егзекуторне, извршилачке каспазе 3. Сличне резултате представили су и аутори у чијим су истраживањима ванилински деривати повећали експресију *Bax* и активирали про-каспазу 9 у туморским *MCF-7*, *HT-29* и *PC12* ћелијама (321,357).

Резултати нашег истраживања су у корелацији са подацима из литературе. Резултати указују на то да су сви испитивани енони статистички значајно смањили експресију анти-апоптотичног *Bcl-2* протеина, повећали су експресију про-апоптотичног *Bax* и активирали су каспазу 3 у *HCT-116* и *HeLa* ћелијама. Најефикаснији ефекти испитиваних енона на експресију и активацију кључних апоптотичних протеина били су

испољени на *HCT-116* туморским ћелијама. Такође однос *Bax/Bcl-2* је статистички значајно био повишен у туморским *HCT-116* у поређењу са адекватном контролом и у поређењу са *HeLa* ћелијама. Соли енона такође су узроковале промену експресије регулаторних протеина у испитиваним туморским ћелијама, али у поређењу са ефектима енона, ефекат соли је био статистички значајно умањен. Један од јасних индикатора активације митохондријалног апоптотичног пута јесте управо усходна регулација *Bax* уз нисходну регулацију *Bcl-2* протеина.

Још једно од круцијалних дешавања током процеса апоптозе јесте измена митохондријалног мембранског потенцијала. Наиме у здравим ћелијама код којих није активиран процес апоптозе, митохондријални мембрански потенцијал је у равнотежи и одржава функционалност митохондрије (361–363). Током процеса апоптозе, долази до пада митохондријалног мембранског потенцијала, који је узрокован формирањем пора на митохондријалној мембрани од стране *Bax* протеина. Као резултат нарушеног интегритета митохондријалне мемbrane, долази до смањења њеног потенцијала, дисфункције и ослобађања интермембранозних митохондријалних протеина, од којих је најважнији цитохром *c* (363–365). У различитим истраживањима показано је да различити ванилински деривати и њихови аналози узрокују дисфункцију митохондрија и ћелијског дисања код *Cryptococcus neoformans* (366), ћелија аденокарцинома *T43* (367), карцинома колона *HT29* (368), *SW480/NC* и *SW480/NNMT* ћелијама колоректалног карцинома (369), *HepG2* ћелијама хепатоцелуларног карцинома (370).

У резултатима нашег истраживања испитивање функционалности митохондријалног мембранског потенцијала спроведено је коришћењем *JC-10* боје и употребом флуоросцентног микроскопа. Резултати су показали да сви новосинтетисани енони смањују митохондријални мембрански потенцијал третираних туморских ћелија, што је у складу са подацима из литературе (371–375). Смањење митохондријалног мембранског потенцијала узрокује пропуштање интермембранозног протеина, цитохрома *c* у цитоплазму ћелије, где учествује активно у формирању апоптозома. Као и у претходним експериментима, најефикасније дејство новосинтетисани енони су испољили на ћелијама карцинома колона. Ефекат енона на ћелије карцинома цервикса је нижи али није занемарљив. Соли енона такође су индуковале смањење митохондријалног мембранског потенцијала третираних туморских ћелија. Као и у претходним експериментима, интензитет смањења митохондријалног мембранског потенцијала био је израженији у случају енона у односу на соли енона.

Цитохром *c* представља протеин који је локализован у интермембранозном простору митохондрија (376,377). У митохондријама у физиолошким условима, цитохром *c* испољава своју функцију у респираторном ланцу (где служи као мобилни транспортер електрона), у хватању слободних кисеоничних радикала и у редокс повезаном протеинском уласку посредством *Erv1-Mia40* (58,378,379) и индукцији ћелијске диференцијације (380,381).

Друга, битна улога цитохрома *c* је у процесу апоптозе, пероксидацији кардиолипина и продукцији слободних кисеоничних радикала која је посредована *p66^{shc}* (381–385). Процес ослобађања цитохрома *c* из интермембранозног простора у цитоплазму ћелија приликом деловања ванилинских деривата и њима сличних молекула добро је документован. У истраживању које је испитивало ефекте ових молекула на туморске ћелије колона *HT-29*, ћелије карцинома дојке *MCF-7* и *MDA-MB-231* (350), туморским ћелијама неуробластома, *SKNAS*, леукемије *K-562*, меланома *MEL-2* (334,347,353), и карцинома колона *HT-29* дошло је до поремећаја пермеабилности митохондријалне мемbrane, нарушавања њеног интегритета и ослобађања цитохрома *c* у цитоплазму ћелије. Сви ови догађаји доводе до формирања *APAF-1*, апоптозома, сечења каспаза и финализације процеса апоптозе. Резултати овог истраживања у складу су са

доступним литературним подацима и показали су да новосинтетисани енони и њихове соли индукују ослобађање цитохрома *c* у цитоплазму третираних туморских ћелија. Новосинтетисани енони су још једном показали статистички значајно ослобађање цитохрома *c* у цитоплазму туморских *HCT-116* ћелија у односу на туморске ћелије карцинома цервикса. Овим је потврђен још један корак у испитивању механизма деловања новосинтетисаних енона као и њихове јаче селективности према ћелијама карцинома колона у односу на ћелије карцинома цервикса.

Финални корак одређивања ефекта и механизма деловања новосинтетисаних енона приказан је на примеру ћелијског циклуса. Ћелијски циклус представља стриктно регулисан процес у животу, развоју и диференцијацији сваке ћелије. За разлику од здравих ћелија, туморске ћелије поседују измењен ћелијски циклус чиме им је омогућена бржа деоба, бесмртност и могућност стварања нових, абнормалних ћелија (120,126,132,139,321,332). Различита истраживања су показала да ванилин, његови деривати и једињења изведена из ванилина узрокују заустављање ћелијског циклуса у одређеним фазама различитих типова туморских ћелија као што су- *MCF-7* заустављање у *G0/G1* фази (332,386), *HepG2* и *SH-SY5Y* у *G2/M* (387), *MCF-7* и *MDA-MB-231* у *S* и *G2/M* фази (334). Литературни подаци о ефектима ванилина и једињења изведених из њега говоре управо о широком спектру дејства ових молекула. Резултати испитивања ефекта новосинтетисаних енона и њихових соли на туморским ћелијама показали су да новосинтетисани молекули узрокују заустављање ћелијског циклуса туморских ћелија у *G2/M* фази. Као и у претходним експериментима, ефекат енона био је значајнији на туморским ћелијама карцинома колона у односу на карцином цервикса. Такође, ефекат соли енона је био слабији у односу на ефекат који су енони имали на туморским ћелијама.

6. ЗАКЉУЧАК

Новосинтетисани енони и њихове соли испољавају значајан цитотоксични ефекат на испитиваним туморским ћелијама. Цитотоксични ефекат новосинтетисаних супстанци на здравим ћелијама у односу на туморске је занемарљив. Овим је потврђена туморска селективност новосинтетисаних молекула. Резултати су такође показали да новосинтетисани молекули индукују јачу апоптозу у туморским ћелијама колона у односу на туморске ћелије цервикса.

Дејство новосинтетисаних молекула на туморским ћелијама довело је до смањења митохондријалног мембранског потенцијала, нисходне експресије *Bcl-2*, усходне регулације *Bax*, активације каспазе 3 и ослобађања цитохрома *c* у цитоплазму ћелија. Овим је први пут показано да новосинтетисани молекули индукују смрт туморских ћелија која је индукована активацијом унутрашњег, митохондријалног пута.

Резултати овог истраживања показали су велики број резултата који говоре у прилог даљег испитивања енона у примени лечења карцинома колона.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Dehghanian F, Ghahnavieh LE, Nilchi AN, Khalilian S, Joonbakhsh R. Breast cancer drug resistance: Decoding the roles of Hippo pathway crosstalk. *Gene*. 2024 Jul;916:148424.
2. Blanchard CE, Gomeiz AT, Avery K, Gazzah EE, Alsubaie AM, Sikaroodi M, et al. Signaling dynamics in coexisting monoclonal cell subpopulations unveil mechanisms of resistance to anti-cancer compounds. *Cell Commun Signal*. 2024 Jul 26;22(1):377.
3. Ostios-Garcia L, Pérez DM, Castelo B, Herradón NH, Zamora P, Feliu J, et al. Classification of anticancer drugs: an update with FDA- and EMA-approved drugs. *Cancer Metastasis Rev*. 2024 Dec;43(4):1561-1571.
4. Banerjee J, Tiwari AK, Banerjee S. Drug repurposing for cancer. *Progress in molecular biology and translational science*. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2024;207:123-150.
5. Brodermann MH, Henderson EK, Sellar RS. The emerging role of targeted protein degradation to treat and study cancer. *J Pathol*. 2024 Aug;263(4-5):403-417.
6. Song Y, Chen M, Wei Y, Ma X, Shi H. Signaling pathways in colorectal cancer: implications for the target therapies. *Mol Biomed*. 2024 Jun 7;5(1):21.
7. Blagov AV, Summerhill VI, Sukhorukov VN, Zhigmitova EB, Postnov AY, Orekhov AN. Potential use of antioxidants for the treatment of chronic inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2024 May 16;15:1378335.
8. Nicholls SJ, Nelson AJ. New targets and mechanisms of action for lipid-lowering and anti-inflammatory therapies in atherosclerosis: where does the field stand? *Expert Opin Ther Targets*. 2024 May;28(5):375-384.
9. Martínez-Rizo AB, Fosado-Rodríguez R, Torres-Romero JC, Lara-Riegos JC, Ramírez-Camacho MA, Herrera ALA, et al. Models in vivo and in vitro for the study of acute and chronic inflammatory activity: A comprehensive review. *Int Immunopharmacol*. 2024 Jun;135:112292.
10. Dong H, Xu Y, Zhang Q, Li H, Chen L. Activity and safety evaluation of natural preservatives. *Food Res Int*. 2024 Aug;190:114548.
11. Guo J, Yan W, Duan H, Wang D, Zhou Y, Feng D, et al. Therapeutic Effects of Natural Products on Liver Cancer and Their Potential Mechanisms. *Nutrients* 2024, Vol 16, Page 1642. 2024 May;16(11):1642.
12. Liu H, Huang M, Xin D, Wang H, Yu H, Pu W. Natural products with anti-tumorigenesis potential targeting macrophage. *Phytomedicine*. 2024 Aug;131:155794.
13. Shuvalov O, Kirdeeva Y, Daks A, Fedorova O, Parfenyev S, Simon HU, et al. Phytochemicals Target Multiple Metabolic Pathways in Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Nov 17;12(11):2012.
14. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*. 2012 Mar 23;75(3):311-35.

15. Pandey P, Lakhanpal S, Mahmood D, Baldaniya L, Kang HN, Hwang S, Kang S, Choi M, Moon S, Pandey S, Chaudhary K, Khan F, Kim B. Recent Update of Natural Compounds as HIF-1 α Inhibitors in Colorectal Carcinoma. *Drug Des Devel Ther.* 2025 Mar 18;19:2017-2034.
16. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.* 2008 Sep;25(9):2097-116.
17. Key TJ, Bradbury KE, Perez-Cornago A, Sinha R, Tsilidis KK, Tsugane S. Diet, nutrition, and cancer risk: what do we know and what is the way forward? *BMJ.* 2020 Mar 5;368:m511.
18. Mubarik S, Luo L, Naeem S, Mubarak R, Iqbal M, Hak E, et al. Epidemiology and demographic patterns of cardiovascular diseases and neoplasms deaths in Western Europe: a 1990-2019 analysis. *Public health.* 2024 Jun;231:187–197.
19. von Itzstein MS, Liu J, Mu-Mosley H, Fattah F, Park JY, SoRelle JA et al. Racial Differences in Systemic Immune Parameters in Individuals With Lung Cancer. *JTO Clin Res Rep.* 2024 Oct 19;6(1):100751
20. Bhinder B, Gilvary C, Madhukar NS, Elemento O. Artificial Intelligence in Cancer Research and Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2021 Apr;11(4):900-915.
21. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clin Oncol.* 2017 Nov;15(2):81–94.
22. Ding S, Chen X, Shen K. Single-cell RNA sequencing in breast cancer: Understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy. *Cancer Commun (Lond).* 2020 Aug;40(8):329-344.
23. Jaitin DA, Adlung L, Thaïss CA, Weiner A, Li B, Descamps H, et al. Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell.* 2019 Jul;178(3):686-698.e14.
24. Zhang Y, Patel RP, Kim KH, Cho H, Jo JC, Jeong SH, et al. Safety and efficacy of a novel anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell product targeting a membrane-proximal domain of CD19 with fast on- and off-rates against non-Hodgkin lymphoma: a first-in-human study. *Mol Cancer.* 2023 Dec 9;22(1):200.
25. Savage KJ, Leval L de. Introduction to the peripheral T-cell lymphoma review series: advances in molecular characterization, classification refinement and treatment optimization. *Haematologica.* 2023 Dec;108(12):3204-3210.
26. Lai Q, Zhao Y, Yan H, Peng H. Advances in diagnosis, treatment and prognostic factors of gastrointestinal DLBCL. *Leuk Res.* 2023 Dec;135:107406.
27. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2025 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2024 Dec;99(12):2367–78.

28. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998 Aug;16(8):2780–95.
29. Kumar V, Stewart JH. Obesity, bone marrow adiposity, and leukemia: Time to act. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. *Obes Rev*. 2024 Mar;25(3):e13674.
30. Shang CY, Bei LY, Wu JZ, Sheng HR, Yin H, Liang JH, Wang L, Li JY, Li Y, Xu W. NOTCH pathway mutation contributes to inferior prognosis in HBV-infected chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol*. 2024 Mar;103(3):833-841.
31. Tetens MM, Omland LH, Dessau R, Ellermann-Eriksen S, Andersen NS, Jørgensen CS, et al. Risk of haematologic cancers among individuals tested for *Borrelia burgdorferi* antibodies, and *Borrelia burgdorferi* seropositive individuals: a nationwide population-based matched cohort study. *Clin Microbiol Infect*. 2024 Feb;30(2):231-239.
32. László T, Kotmayer L, Fésüs V, Hegyi L, Gróf S, Nagy Á, et al. Low-burden TP53 mutations represent frequent genetic events in CLL with an increased risk for treatment initiation. *J Pathol Clin Res*. 2024 Jan;10(1):e351.
33. Xiong ZY, Shen YJ, Zhang SZ, Zhu HH. A review of immunotargeted therapy for Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia: making progress in chemotherapy-free regimens. *Hematology*. 2024 Dec;29(1):2335856.
34. Ma J, Wang Y. Myeloid neoplasms post cytotoxic therapy: epidemiology, pathogenesis outcomes, prognostic factors, and treatment options. *Ann Med*. 2024 Dec;56(1):2329132.
35. Szuber N, Orazi A, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: 2024 update on diagnosis, genetics, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2024 Jul;99(7):1360-1387.
36. Banks LB, D'Angelo SP. The Role of Immunotherapy in the Management of Soft Tissue Sarcomas: Current Landscape and Future Outlook. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022 Jul;20(7):834-844.
37. Crago AM, Cardona K, Kosela-Paterczyk H, Rutkowski P. Management of Myxofibrosarcoma and Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2022 Jul;31(3):419-430.
38. Thirasastr P, Brahmi M, Dufresne A, Somaiah N, Blay JY. New Drug Approvals for Sarcoma in the Last 5 Years. *Surg Oncol Clin N Am*. 2022 Jul;31(3):361-380.
39. Pini GM, Colecchia M. Mediastinal germ cell tumors: A narrative review of their traits and aggressiveness features. *Mediastinum*. 2022 Mar 25;6:5.
40. Kostov S, Kornovski Y, Ivanova V, Dzhenkov D, Metodiev D, Watrowski R, et al. New Aspects of Sarcomas of Uterine Corpus-A Brief Narrative Review. *Clin Pract*. 2021 Nov 22;11(4):878-900.

41. Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis TA. Molecular and Cellular Modelling of Salivary Gland Tumors Open New Landscapes in Diagnosis and Treatment. *Cancers*. 2020 Nov;12(11):1–24.
42. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May-Jun;74(3):229-263.
43. Stoffel EM, Murphy CC. Epidemiology and Mechanisms of the Increasing Incidence of Colon and Rectal Cancers in Young Adults. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):341-353.
44. Colorectal cancer [Internet]. [cited 2025 May 2]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
45. Maligni Tumori u Republici Srbije 2022.pdf [Internet]. [cited 2025 May 2]. Available from: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/MaligniTumoriURepubliciSrbiji2022.pdf>
46. Yang Y, Han Z, Li X, Huang A, Shi J, Gu J. Epidemiology and risk factors of colorectal cancer in China. . *Chin J Cancer Res*. 2020 Dec 31;32(6):729-741.
47. Ciepiela I, Szczepaniak M, Ciepiela P, Hińcza-Nowak K, Kopczyński J, Macek P, et al. Tumor location matters, next generation sequencing mutation profiling of left-sided, rectal, and right-sided colorectal tumors in 552 patients. *Sci Rep*. 2024 Feb 26;14(1):4619.
48. Xiao JB, Leng AM, Zhang YQ, Wen Z, He J, Ye GN. CUEDC2: multifunctional roles in carcinogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019 Mar 1;24(5):935-946.
49. Ilie-Petrov AC, Cristian DA, Diaconescu AS, Chitul A, Blajin A, Popa A, et al. Molecular Deciphering of Colorectal Cancer: Exploring Molecular Classifications and Analyzing the Interplay among Molecular Biomarkers MMR/MSI, KRAS, NRAS, BRAF and CDX2 - A Comprehensive Literature Review. *Chirurgia (Bucur)*. 2024 Apr;119(2):136-155.
50. Sahin IH, Goyal S, Pumpalova Y, Sonbol MB, Das S, Haraldsdottir S, et al. Mismatch Repair (MMR) Gene Alteration and BRAF V600E Mutation Are Potential Predictive Biomarkers of Immune Checkpoint Inhibitors in MMR-Deficient Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2021 Aug;26(8):668-675.
51. Davidson KW, Barry MJ, Mangione CM, Cabana M, Caughey AB, Davis EM, et al. Screening for Colorectal Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*. 2021 May;325(19):1965–1977.
52. Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer screening in the United States, 2019: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2019 May;69(3):184–210.
53. Fard AA, Mahmoodzadeh A. Unraveling the Progression of Colon Cancer Pathogenesis Through Epigenetic Alterations and Genetic Pathways. *Cureus*. 2024 May 2;16(5):e59503.

54. Jiang C, Zhou Q, Yi K, Yuan Y, Xie X. Colorectal cancer initiation: Understanding early-stage disease for intervention. *Cancer Lett.* 2024 May 1;589:216831.
55. Maida M, Macaluso FS, Ianiro G, Mangiola F, Sinagra E, Hold G, et al. Screening of colorectal cancer: present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017 Dec;17(12):1131-1146.
56. Huang CK, Shih CH, Kao YS. Elderly Rectal Cancer: An Updated Review. *Curr Oncol Rep.* 2024 Feb;26(2):181-190.
57. Johnson D, Chee CE, Wong W, Lam RCT, Tan IBH, Ma BBY. Current advances in targeted therapy for metastatic colorectal cancer – Clinical translation and future directions. *Cancer Treat Rev.* 2024 Apr;125:102700.
58. Allen J, Sears CL. Impact of the gut microbiome on the genome and epigenome of colon epithelial cells: Contributions to colorectal cancer development. *Genome Med.* 2019 Feb 25;11(1):11.
59. Kastrinos F, Kupfer SS, Gupta S. Colorectal Cancer Risk Assessment and Precision Approaches to Screening: Brave New World or Worlds Apart? *Gastroenterology.* 2023 Apr;164(5):812–827.
60. Snyder C, Hampel H. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Semin Oncol Nurs.* 2019 Feb;35(1):58-78.
61. Arora A, McDonald C, Guizzetti L, Iansavichene A, Brahmania M, Khanna N, et al. Endoscopy Unit Level Interventions to Improve Adenoma Detection Rate: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2023 Dec;21(13):3238-3257.
62. Walsh M, Rahman S, Gologorsky R, Tsikitis VL. Colorectal Neoplasia in the Setting of Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am.* 2024 Jun;104(3):673-684.
63. Scotti GB, Iannone I, Padua C de, Crocetti D, Fiori G, Sapienza P, et al. Occurrence of Colorectal Cancer After a Negative Colonoscopy in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *In Vivo.* 2024 Mar;38(2):523–30.
64. Sato Y, Tsujinaka S, Miura T, Kitamura Y, Suzuki H, Shibata C. Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: Epidemiology, Etiology, Surveillance, and Management. *Cancers (Basel).* 2023 Aug 17;15(16):4154.
65. Lu L, Mullins CS, Schafmayer C, Zeißig S, Linnebacher M. A global assessment of recent trends in gastrointestinal cancer and lifestyle-associated risk factors. *Cancer Commun (Lond).* 2021 Nov;41(11):1137-1151.
66. Loh NY, Wang W, Noordam R, Christodoulides C. Obesity, Fat Distribution and Risk of Cancer in Women and Men: A Mendelian Randomisation Study. *Nutrients.* 2022 Dec 9;14(24):5259.
67. Vernia F, Longo S, Stefanelli G, Viscido A, Latella G. Dietary Factors Modulating Colorectal Carcinogenesis. *Nutrients.* 2021 Jan;13(1):1–13.

68. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal Cancer: Molecular Features and Clinical Opportunities. *Clin Biochem Rev.* 2010 May;31(2):31-8.
69. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 19;18(1):197.
70. Silva FCD, Wernhoff P, Dominguez-Barrera C, Dominguez-Valentin M. Update on Hereditary Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2016 Sep;36(9):4399-405.
71. Wu Y, Zhuang J, Qu Z, Yang X, Han S. Advances in immunotyping of colorectal cancer. *Front Immunol.* 2023 Oct 9;14:1259461.
72. Clerick J, Oosterwyck AV, Carton S. Transforming the landscape of colorectal cancer treatment with immunotherapy: Evolution and future horizons. *Cancer Treat Res Commun.* 2024;39:100807.
73. Huang J, Soupir AC, Schlick BD, Teng M, Sahin IH, Permuth JB, et al. Cancer Detection and Classification by CpG Island Hypermethylation Signatures in Plasma Cell-Free DNA. *Cancers (Basel).* 2021 Nov 9;13(22):5611.
74. Tang Y, Fan Y. Combined KRAS and TP53 mutation in patients with colorectal cancer enhance chemoresistance to promote postoperative recurrence and metastasis. *BMC Cancer.* 2024 Sep 17;24(1):1155.
75. Salem ME, Bodor JN, Puccini A, Xiu J, Goldberg RM, Grothey A, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer.* 2020 Nov 15;147(10):2948–56.
76. Flecchia C, Zaanani A, Lahlou W, Basile D, Broudin C, Gallois C, et al. MSI colorectal cancer, all you need to know. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2022 Nov;46(9):101983.
77. Xynos E, Tekkis P, Gouvas N, Vini L, Chrysou E, Tzardi M, et al. Clinical practice guidelines for the surgical treatment of rectal cancer: a consensus statement of the Hellenic Society of Medical Oncologists (HeSMO). *Ann Gastroenterol.* 2016 Apr-Jun;29(2):103-26.
78. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2025 Feb 12. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002–. PMID: 26389297. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26389297/>
79. Zhang J, Raju GS, Chang DW, Lin SH, Chen Z, Wu X. Global and targeted circulating microRNA profiling of colorectal adenoma and colorectal cancer. *Cancer.* 2018 Feb;124(4):785–96.
80. Koh WJ, Abu-Rustum NR, Bean S, Bradley K, Campos SM, Cho KR, et al. Cervical Cancer, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019 Jan;17(1):64-84.

81. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017. PMID: 33689255. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568392/>
82. Singh D, Vignat J, Lorenzoni V, Eslahi M, Ginsburg O, Lauby-Secretan B, et al. Global estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2020: a baseline analysis of the WHO Global Cervical Cancer Elimination Initiative. *Lancet Glob Health*. 2023 Feb;11(2):e197-e206.
83. Институт за јавно здравље Србије “Др Милан Јовановић Батут” Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut” Одељење за превенцију и контролу незаразних болести Department for Prevention and Control of Noncommunicable Diseases Регистар за рак у републици србији serbian cancer registry малигни тумори у републици србији malignant tumours in Republic of Serbia. Available from: <https://www.batut.org.rs/download/publikacije/MaligniTumoriURepubliciSrbiji2021.pdf>
84. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Khalil AI, Baussano I, Shah ASV, et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *The Lancet Glob Health*. 2021 Feb;9(2):e161–9.
85. Guida F, Kidman R, Ferlay J, Schüz J, Soerjomataram I, Kithaka B, et al. Global and regional estimates of orphans attributed to maternal cancer mortality in 2020. *Nat Med*. 2022 Dec;28(12):2563-2572.
86. Molina MA, Steenbergen RDM, Pompe A, Kenyon AN, Melchers WJG. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. *Trends Mol Med*. 2024 Sep;30(9):890-902.
87. Nikmanesh N, Hosseini SZ, Mirbagheri F, Asadsangabi K, Fattahi MR, Safarpour AR, et al. Knowledge on Human Papillomavirus Infections, Cancer Biology, Immune Interactions, Vaccination Coverage and Common Treatments: A Comprehensive Review. *Viral Immunol*. 2024 Jun;37(5):221-239.
88. Bruni L, Albero G, Rowley J, Alemany L, Arbyn M, Giuliano AR, et al. Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Glob health*. 2023 Sep;11(9):e1345–62.
89. Fact Sheet World [Internet]. Available from: <https://www.hpvworld.com/articles/fact-sheet-world/>
90. Ghosh I, Mandal R, Kundu P, Biswas J. Association of Genital Infections Other Than Human Papillomavirus with Pre-Invasive and Invasive Cervical Neoplasia. *J J Clin Diagn Res*. 2016 Feb;10(2):XE01-XE06.
91. Manini I, Montomoli E. Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig*. 2018 Jul-Aug;30(4 Suppl 1):28-32.
92. Romero-Masters JC, Lambert PF, Munger K. Molecular Mechanisms of MmuPV1 E6 and E7 and Implications for Human Disease. *Viruses*. 2022 Sep 28;14(10):2138.

93. Ojha PS, Maste MM, Tubachi S, Patil VS. Human papillomavirus and cervical cancer: an insight highlighting pathogenesis and targeting strategies. *Virusdisease*. 2022 Jun;33(2):132–54.
94. Cruz-Gregorio A, Aranda-Rivera AK, Ortega-Lozano AJ, Pedraza-Chaverri J, Mendoza-Hoffmann F. Lipid metabolism and oxidative stress in HPV-related cancers. *Free Radic Biol Med*. 2021 Aug 20;172:226–236.
95. Cruz-Gregorio A, Aranda-Rivera AK. Redox-sensitive signalling pathways regulated by human papillomavirus in HPV-related cancers. *Rev Med Virol*. 2021 Nov;31(6):e2230.
96. Bogani G, Maggiore ULR, Signorelli M, Martinelli F, Ditto A, Sabatucci I, et al. The role of human papillomavirus vaccines in cervical cancer: Prevention and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Feb;122:92–97.
97. Kash N, Lee MA, Kollipara R, Downing C, Guidry J, Tyring SK. Safety and Efficacy Data on Vaccines and Immunization to Human Papillomavirus. *J Clin Med*. 2015 Apr;4(4):614.
98. HPV Vaccine Safety and Effectiveness | CDC [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/vpd/hpv/hcp/safety-effectiveness.html>
99. Ayesha N, Aboulaghras S, Jahangeer M, Riasat A, Ramzan R, Fatima R, et al. Physiopathology and effectiveness of therapeutic vaccines against human papillomavirus. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Sep;28(35):47752–47772.
100. Zhang Z, Zhang J, Xia N, Zhao Q. Expanded strain coverage for a highly successful public health tool: Prophylactic 9-valent human papillomavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Oct 3;13(10):2280–2291.
101. Gonçalves CA, Pereira-da-Silva G, Silveira RCCP, Mayer PCM, Zilly A, Lopes-Júnior LC. Safety, Efficacy, and Immunogenicity of Therapeutic Vaccines for Patients with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2/3) Associated with Human Papillomavirus: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 5;16(3):672.
102. Erickson BK, Slomovitz B, Powell M, Eskander RN. Top advances of the year: Uterine cancer. *Cancer*. 2024 Jul;130(14):2409–12.
103. Rosen VM, Guerra I, McCormack M, Nogueira-Rodrigues A, Sasse A, Munk VC, et al. Systematic Review and Network Meta-Analysis of Bevacizumab Plus First-Line Topotecan-Paclitaxel or Cisplatin-Paclitaxel Versus Non-Bevacizumab-Containing Therapies in Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer. *Int J Gyn Cancer*. 2017 Jul;27(6):1237–46.
104. Balan L, Cimpean AM, Nandarge PS, Sorop B, Balan C, Balica MA, et al. Clinical Outcomes and Molecular Predictors of Pembrolizumab (Keytruda) as a PD-1 Immune Checkpoint Inhibitor in Advanced and Metastatic Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines*. 2024 May;12(5):1109.
105. Schafer KA. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol*. 1998 Nov;35(6):461–78.

106. Vermeulen K, Bockstaele DRV, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49.
107. Alessio N, Aprile D, Cappabianca S, Peluso G, Bernardo GD, Galderisi U. Different Stages of Quiescence, Senescence, and Cell Stress Identified by Molecular Algorithm Based on the Expression of Ki67, RPS6, and Beta-Galactosidase Activity. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar;22(6):1–13.
108. Niehans GA, Kratzke RA, Froberg MK, Aeppli DM, Nguyen PL, Geradts J. G1 checkpoint protein and p53 abnormalities occur in most invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Br J Cancer.* 1999 Jun;80(8):1175-84.
109. Cavalu S, Abdelhamid AM, Saber S, Elmorsy EA, Hamad RS, Abdel-Reheim MA, et al. Cell cycle machinery in oncology: A comprehensive review of therapeutic targets. *FASEB J.* 2024 Jun 15;38(11):e23734.
110. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 13;21(6):1960.
111. Yeh KH, Kondo T, Zheng J, Tsvetkov LM, Blair J, Zhang H. The F-box protein SKP2 binds to the phosphorylated threonine 380 in cyclin E and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Mar 9;281(4):884-90.
112. Engel BE, Cress WD, Santiago-Cardona PG. The retinoblastoma protein: a master tumor suppressor acts as a link between cell cycle and cell adhesion. *Cell Health Cytoskelet.* 2015;7:1-10.
113. Dimaras H, Gallie BL. Retinoblastoma Protein, Biological and Clinical Functions. *Encyclopedia of Cancer.* 2011;4046-4050 Available from; https://www.researchgate.net/publication/318171835_Retinoblastoma_Protein_Biological_and_Clinical_Functions
114. Desvoves B, Gutierrez C. Roles of plant retinoblastoma protein: cell cycle and beyond. *EMBO J.* 2020 Oct 1;39(19):e105802.
115. Montalto FI, Amicis FD. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells.* 2020 Dec;9(12):1–15.
116. Selvaraj C. Therapeutic targets in cancer treatment: Cell cycle proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2023;135:313-342.
117. Ogasawara T. Cell cycle control factors and skeletal development. *Japanese Dental Science Review.* 2013 May;49(2):79–87.
118. Creff J, Besson A. Functional Versatility of the CDK Inhibitor p57Kip2. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Oct 7;8:584590.
119. Qi J, Ouyang Z. Targeting CDK4/6 for Anticancer Therapy. *Biomedicines* 2022, Vol 10, Page 685. 2022 Mar;10(3):685.

120. Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol.* 2018 Nov;28(11):911-925.
121. Wang X, Zhao S, Xin Q, Zhang Y, Wang K, Li M. Recent progress of CDK4/6 inhibitors' current practice in breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 2024 Sep;31(9):1283-1291.
122. Fassl A, Geng Y, Sicinski P. CDK4 and CDK6 kinases: from basic science to cancer therapy. *Science.* 2022 Jan 14;375(6577):eabc1495.
123. Saleban M, Harris EL, Poulter JA. D-Type Cyclins in Development and Disease. *Genes (Basel).* 2023 Jul 14;14(7):1445.
124. Sullivan KD, Galbraith MD, Andrysk Z, Espinosa JM. Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):133-143.
125. Gala K, Jain M, Shah P, Pandey A, Garg M, Khattar E. Role of p53 transcription factor in determining the efficacy of telomerase inhibitors in cancer treatment. *Life Sci.* 2024 Feb;339:122416.
126. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022 Mar;29(5):946–60.
127. Wang L, Han H, Dong L, Wang Z, Qin Y. Function of p21 and its therapeutic effects in esophageal cancer (Review). *Oncol Lett.* 2021 Feb;21(2):136.
128. Ho T, Tan BX, Lane D. How the Other Half Lives: What p53 Does When It Is Not Being a Transcription Factor. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 18;21(1):13.
129. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018 Jan;25(1):104-113.
130. Wei H, Qu L, Dai S, Li Y, Wang H, Feng Y, et al. Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nat Commun.* 2021 Apr 16;12(1):2280.
131. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol.* 2023 Mar 29;14(10):mjac074.
132. Cooper GM. *The Eukaryotic Cell Cycle.* 2000; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
133. Gooijer MC de, Top A van den, Bockaj I, Beijnen JH, Würdinger T, Tellingen O van. The G2 checkpoint—a node-based molecular switch. *FEBS Open Bio.* 2017 Mar 4;7(4):439-455.
134. Mattola S, Mäntylä E, Aho V, Salminen S, Leclerc S, Oittinen M, et al. G2/M checkpoint regulation and apoptosis facilitate the nuclear egress of parvoviral capsids. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Dec 8;10:1070599.

135. Jung Y, Kraikivski P, Shafiekhani S, Terhune SS, Dash RK. Crosstalk between Plk1, p53, cell cycle, and G2/M DNA damage checkpoint regulation in cancer: computational modeling and analysis. *NPJ Syst Biol Appl*. 2021 Dec 9;7(1):46.
136. Barford D. Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011 Dec 27;366(1584):3605-24.
137. Vangenderen C, Harkness TAA, Arnason TG. The role of Anaphase Promoting Complex activation, inhibition and substrates in cancer development and progression. *Aging (Albany NY)*. 2020 Aug 15;12(15):15818-15855.
138. Hu X, Jin X, Cao X, Liu B. The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Is a Cellular Ageing Regulator. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 5;23(23):15327.
139. Barbiero M, Cirillo L, Veerapathiran S, Coates C, Ruffilli C, Pines J. Cell cycle-dependent binding between Cyclin B1 and Cdk1 revealed by time-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *Open Biol*. 2022 Jun;12(6):220057.
140. Maryu AG, Correspondence QY. Nuclear-cytoplasmic compartmentalization of cyclin B1-Cdk1 promotes robust timing of mitotic events. *Cell Rep*. 2022 Dec 27;41(13):111870.
141. Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Oct;3(10):779-87.
142. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
143. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res*. 2020 Feb 26;9:F1000 Faculty Rev-148.
144. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 2;19(2):448.
145. Farghadani R, Naidu R. The Role of Apoptosis as a Double-Edge Sword in Cancer [Internet]. *Regulation and Dysfunction of Apoptosis*. IntechOpen; 2022. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97844>
146. Nur İ, Atay G, Gezer AH, Kasap E. The Importance of Apoptosis in Cancer Development and Treatment. *Turk J Oncol* 2021;36(3):381–88.
147. Neophytou CM, Trougakos IP, Erin N, Papageorgis P. Apoptosis Dereglulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 28;13(17):4363.
148. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(6):2129-44.
149. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jul;17(7):395-417.
150. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Nov;1(2):120-9.

151. Erekat NS. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin Anat.* 2022 Jan;35(1):65-78.
152. Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 9;19(10):3082.
153. Dailah HG. Potential of Therapeutic Small Molecules in Apoptosis Regulation in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: An Updated Review. *Molecules.* 2022 Oct 25;27(21):7207.
154. Friedlander RM. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med.* 2003 Apr 3;348(14):1365-75.
155. Goyal R, Wilson K, Saharan A, Gautam RK, Chopra H, Gupta S, et al. Insights on aspects of apoptosis in neurodegenerative disorders: a comprehensive review. *Explor Med.* 2024;5:89–100.
156. Sankari SL, Babu NA, Rajesh E, Kasthuri M. Apoptosis in immune-mediated diseases. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Apr;7(Suppl 1):S200-2.
157. Prasad KV, Prabhakar BS. Apoptosis and Autoimmune Disorders. *Autoimmunity.* 2003 Sep-Nov;36(6-7):323-30.
158. Sun L, Ding F, Zhou L, Wang J, Li M, Zhou P, et al. Apoptosis of Dendritic Cells and Autoimmune Disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2024 Apr 22;29(4):157.
159. Mahajan A, Sharma G, Thakur K, Raza K, Singh G, Katore OP. Autoimmune diseases and apoptosis: Targets, challenges, and innovations. *Clinical Perspectives and Targeted Therapies in Apoptosis: Drug Discovery, Drug Delivery, and Disease Prevention.* 2021 Jan;285–327.
160. Shen S, Shao Y, Li C. Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discov.* 2023 Aug 4;9(1):284.
161. Jung S, Jeong H, Yu SW. Autophagy as a decisive process for cell death. *Exp Mol Med.* 2020 Jun;52(6):921-930.
162. Schwartz LM. Autophagic Cell Death During Development – Ancient and Mysterious. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Apr 9;9:656370.
163. Chen D, Yu J, Zhang L. Necroptosis: An alternative cell death program defending against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Apr;1865(2):228-36.
164. Cho SJ, Pronko A, Stout-Delgado H. Crosstalk between necroptosis and the inflammasome. *Inflammasome Biology.* 2023;499–510.
165. Ye K, Chen Z, Xu Y. The double-edged functions of necroptosis. *Cell Death Dis.* 2023 Feb 27;14(2):163.
166. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021 May;18(5):1106-1121.

167. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Mar 29;6(1):128.
168. Tan Y, Chen Q, Li X, Zeng Z, Xiong W, Li G, et al. Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021 May 3;40(1):153.
169. Wei S, Feng M, Zhang S. Molecular Characteristics of Cell Pyroptosis and Its Inhibitors: A Review of Activation, Regulation, and Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 17;23(24):16115.
170. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516.
171. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol.* 2021 Oct-Dec;81(4):1133-1143.
172. Abaza A, Vasavada AM, Sadhu A, Valencia C, Fatima H, Nwankwo I, et al. A Systematic Review of Apoptosis in Correlation With Cancer: Should Apoptosis Be the Ultimate Target for Cancer Treatment? *Cureus.* 2022 Aug 28;14(8):e28496.
173. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-Da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, et al. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 24;20(17):4133.
174. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel).* 2020 Jan 20;9(1):21.
175. Yu L, Zhu G, Zhang Z, Yu Y, Zeng L, Xu Z, et al. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials. *J Nanobiotechnology.* 2023 Jul 12;21(1):218.
176. Chitti SV, Gummadi S, Kang T, Shahi S, Marzan AL, Nedeva C, et al. Vesiclepedia 2024: an extracellular vesicles and extracellular particles repository. *Nucleic Acids Res.* 2024 Jan 5;52(D1):D1694-D1698.
177. Nössing C, Ryan KM. 50 years on and still very much alive: 'Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.' *Br J Cancer.* 2023 Feb;128(3):426-431.
178. Santavanond JP, Rutter SF, Atkin-Smith GK, Poon IKH. Apoptotic Bodies: Mechanism of Formation, Isolation and Functional Relevance. *Subcell Biochem.* 2021;97:61-88.
179. Zou X, Lei Q, Luo X, Yin J, chen S, Hao C, et al. Advances in biological functions and applications of apoptotic vesicles. *Cell Commun Signal.* 2023 Sep 25;21(1):260.
180. Miao X, Wu X, You W, He K, Chen C, Pathak JL, et al. Tailoring of apoptotic bodies for diagnostic and therapeutic applications: advances, challenges, and prospects. *J Transl Med.* 2024 Sep 1;22(1):810.
181. Bibo-Verdugo B, Salvesen G. Evolution of Caspases and the Invention of Pyroptosis. *Int J Mol Sci.* 2024 May 12;25(10):5270.

182. Baena-Lopez LA, Wang L, Wendler F. Cellular stress management by caspases. *Curr Opin Cell Biol.* 2024 Feb;86:102314.
183. Green DR. Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 Mar 1;14(3):a041012.
184. Svandova E, Lesot H, Sharpe P, Matalova E. Making the head: Caspases in life and death. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jan 13;10:1075751.
185. Carrington EM, Zhan Y, Brady JL, Zhang JG, Sutherland RM, Anstee NS, et al. Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ.* 2017 May;24(5):878-888.
186. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan;15(1):49-63.
187. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol.* 2022 Oct 12;12:985363.
188. Fitzgerald MC, O'Halloran PJ, Kerrane SA, Chonghaile TN, Connolly NMC, Murphy BM. The identification of BCL-XL and MCL-1 as key anti-apoptotic proteins in medulloblastoma that mediate distinct roles in chemotherapy resistance. *Cell Death Dis.* 2023 Oct 28;14(10):705.
189. Sancho M, Leiva D, Lucendo E, Orzáez M. Understanding MCL1: from cellular function and regulation to pharmacological inhibition. *FEBS J.* 2022 Oct;289(20):6209-6234.
190. Widden H, Placzek WJ. The multiple mechanisms of MCL1 in the regulation of cell fate. *Commun Biol.* 2021 Sep 2;4(1):1029.
191. Wang G, Diepstraten ST, Herold MJ. Last but not least: BFL-1 as an emerging target for anti-cancer therapies. *Biochem Soc Trans.* 2022 Aug 31;50(4):1119-1128.
192. Flores-Romero H, Landeta O, Ugarte-Urbe B, Cosentino K, García-Porras M, García-Sáez AJ, et al. BFL1 modulates apoptosis at the membrane level through a bifunctional and multimodal mechanism showing key differences with BCLXL. *Cell Death Differ.* 2019 Oct;26(10):1880-1894.
193. Adams CM, Kim AS, Mitra R, Choi JK, Gong JZ, Eischen CM. BCL-W has a fundamental role in B cell survival and lymphomagenesis. *J Clin Invest.* 2017 Feb 1;127(2):635-650.
194. Saddam M, Paul SK, Habib MA, Fahim MA, Mimi A, Islam S, et al. Emerging biomarkers and potential therapeutics of the BCL-2 protein family: the apoptotic and anti-apoptotic context. *Egypt J Med Hum Genet.* 2024 Jan;25(1):1–28.
195. Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Apr;1813(4):508-20.

196. Roufayel R, Younes K, Al-Sabi A, Murshid N. BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life (Basel)*. 2022 Feb 9;12(2):256.
197. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018 Feb;285(3):416-431.
198. Huang K. Mechanism of Bax/Bak Activation in Apoptotic Signaling. Theses & Dissertations.. 2019 Dec; Available from: <https://digitalcommons.unmc.edu/etd/404>
199. Singh G, Guibao CD, Seetharaman J, Aggarwal A, Grace CR, McNamara DE, et al. Structural basis of BAK activation in mitochondrial apoptosis initiation. *Nat Commun*. 2022 Jan 11;13(1):250.
200. Lim D, Choe SH, Jin S, Lee S, Kim Y, Shin HC, et al. Structural basis for proapoptotic activation of Bak by the noncanonical BH3-only protein Pxt1. . *PLoS Biol*. 2023 Jun 14;21(6):e3002156.
201. Naim S, Kaufmann T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Sep 15;8:574338.
202. Carpio MA, Means RE, Brill AL, Sainz A, Ehrlich BE, Katz SG. BOK controls apoptosis by Ca²⁺ transfer through ER-mitochondrial contact sites. *Cell Rep*. 2021 Mar 9;34(10):108827.
203. Bonzerato CG, Wojcikiewicz RJH. Bok: real killer or bystander with non-apoptotic roles? *Front Cell Dev Biol*. 2023 Apr 12;11:1161910.
204. D'Aguanno S, Del Bufalo D. Inhibition of Anti-Apoptotic Bcl-2 Proteins in Preclinical and Clinical Studies: Current Overview in Cancer. *Cells*. 2020 May 21;9(5):1287.
205. Sarkar A, Paul A, Banerjee T, Maji A, Saha S, Bishayee A, et al. Therapeutic advancements in targeting BCL-2 family proteins by epigenetic regulators, natural, and synthetic agents in cancer. *Eur J Pharmacol*. 2023 Apr 5;944:175588.
206. Yilmaz D, Gürsoy M, Gürsoy UK. Anti-Apoptotic and Pro-Apoptotic Bcl-2 Family Proteins in Peri-Implant Diseases. *Clin Oral Implants Res*. 2023 Jun;34(6):582-590.
207. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Berghe TV, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):44-55.
208. Eskandari E, Eaves CJ. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis.
209. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ*. 2007 Jan;14(1):10-22.
210. Loppnow H, Guzik K, Pryjma J. The Role of Caspases in Modulation of Cytokines and Other Molecules in Apoptosis and Inflammation. 2013; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6184/>

211. Orning P, Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2021 Jan;109(1):121-141.
212. Nguyen TTM, Gillet G, Popgeorgiev N. Caspases in the Developing Central Nervous System: Apoptosis and Beyond. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 16;9:702404.
213. Dehkordi MH, Munn RGK, Fearnhead HO. Non-Canonical Roles of Apoptotic Caspases in the Nervous System. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 23;10:840023.
214. McArthur K, Kile BT. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol.* 2018 Jun;28(6):475-493.
215. Initiator Caspase - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/initiator-caspase>
216. Shi Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol Cell.* 2002 Mar;9(3):459-70.
217. Thomsen ND, Koerber JT, Wells JA. Structural snapshots reveal distinct mechanisms of procaspase-3 and -7 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 21;110(21):8477-82.
218. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem.* 2009 Aug 14;284(33):21777-21781.
219. O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2008 Dec;18(6):572–85.
220. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017 Aug;24(8):1380-1389.
221. Muramoto M, Hanawa N, Okumura M, Chihara T, Miura M, Shinoda N. Executioner caspase is proximal to Fasciclin 3 which facilitates non-lethal activation in *Drosophila* olfactory receptor neurons. *Elife.* 2025 Jun 17;13:RP99650.
222. Yang CY, Lien CI, Tseng YC, Tu YF, Kulczyk AW, Lu YC, et al. Deciphering DED assembly mechanisms in FADD-procaspase-8-cFLIP complexes regulating apoptosis. *Nat Commun.* 2024 May 6;15(1):3791.
223. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14250-5.
224. Shen C, Pei J, Guo X, Zhou L, Li Q, Quan J. Structural basis for dimerization of the death effector domain of the F122A mutant of Caspase-8. *Sci Rep.* 2018 Nov 13;8(1):16723.
225. Tian X, Srinivasan PR, Tajiknia V, Uruchurtu AFSS, Seyhan AA, Carneiro BA, et al. Targeting apoptotic pathways for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2024 Jul 15;134(14):e179570.

226. Zubair M, Bokhari SRA. Apoptosis. [Updated 2025 Apr 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499821/>
227. Green DR. The Death Receptor Pathway of Apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022 Feb 1;14(2):a041053.228.
229. Ren X, Lin Z, Yuan W. A Structural and Functional Perspective of Death Receptor 6. *Front Pharmacol.* 2022 Mar 24;13:836614.
230. Ukrainskaya VM, Stepanov AV, Glagoleva IS, Knorre VD, Belogurov AA, Gabibov AG. Death Receptors: New Opportunities in Cancer Therapy. *Acta Naturae.* 2017;(9):55-63.
231. Gao M, Song Y, Liu Y, Miao Y, Guo Y, Chai H. TNF- α /TNFR1 activated astrocytes exacerbate depression-like behavior in CUMS mice. *Cell Death Discov.* 2024 May 6;10(1):220.
232. Mollinedo F, Gajate C. FasL-Independent Activation of Fas. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6345/>
233. Chen Q, Ray S, Hussein MA, Srkalovic G, Almasan A. Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family Proteins in Apoptosis of Multiple Myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2003 Jul;44(7):1209-14.
234. Wang ECY. On death receptor 3 and its ligands.... *Immunology.* 2012 Sep;137(1):114-6.
235. Khaleque MA, Kim JH, Lee HH, Kim GH, You WY, Lee WJ, et al. Comparative Analysis of Autophagy and Apoptosis in Disc Degeneration: Understanding the Dynamics of Temporary-Compression-Induced Early Autophagy and Sustained-Compression-Triggered Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 16;25(4):2352.
236. Yarikipati P, Bergmann A. Caspases promote cell proliferation after necrosis. *Elife.* 2024 Nov 4;13:e103786.
237. Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2019 Nov 5;862:172655.
238. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 2003 Jan;10(1):26–35.
239. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000 Dec;7(12):1166–73.
240. Gong XM, Choi J, Franzin CM, Zhai D, Reed JC, Marassi FM. Conformation of Membrane-associated Proapoptotic tBid. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):28954–60.
241. Shivakumar S, Kurylowicz M, Hirmiz N, Manan Y, Friaa O, Shamas-Din A, et al. The Proapoptotic Protein tBid Forms Both Superficially Bound and Membrane-Inserted Oligomers. *Biophys J.* 2014 May 20;106(10):2085-95.

242. Cristofanon S, Fulda S. ABT-737 promotes tBid mitochondrial accumulation to enhance TRAIL-induced apoptosis in glioblastoma cells. *Cell Death Dis.* 2012 Nov;3(11):e432.
243. Debernardi J, Hollville E, Lipinski M, Wiels J, Robert A. Differential role of FL-BID and t-BID during verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene.* 2018 May;37(18):2410–21.
244. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell.* 2009 Nov 13;36(3):487-99.
245. Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis N, Reuveny E, et al. tBID Homooligomerizes in the Mitochondrial Membrane to Induce Apoptosis *. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):12237-45.
246. Saunders TL, Windley SP, Gervinskias G, Balka KR, Rowe C, Lane R, et al. Exposure of the inner mitochondrial membrane triggers apoptotic mitophagy. *Cell Death Differ.* 2024 Mar;31(3):335-347.
247. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018 Oct;25(1):46–55.
248. Kim R, Kin T, Beck WT. Impact of Complex Apoptotic Signaling Pathways on Cancer Cell Sensitivity to Therapy. *Cancers (Basel).* 2024 Feb 28;16(5):984.
249. Dadsena S, Arenas RC, Vieira G, Brodesser S, Melo MN, García-Sáez AJ. Lipid unsaturation promotes BAX and BAK pore activity during apoptosis. *Nat Commun.* 2024 Jun 3;15(1):4700.
250. Zhang J, Huang K, O'Neill KL, Pang X, Luo X. Bax/Bak activation in the absence of Bid, Bim, Puma, and p53. *Cell Death Dis.* 2016 Jun 16;7(6):e2266.
251. Ren D, Tu HC, Kim H, Wang GX, Bean GR, Takeuchi O, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1390-3.
252. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* 2017 Apr;135:111-125.
253. Riedl SJ, Li W, Chao Y, Schwarzenbacher R, Shi Y. Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):926-33.
254. Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai XC, Huang W, Yan C, et al. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes Dev.* 2015 Nov 15;29(22):2349-61.
255. Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, Vakili O, Taheri-Anganeh M, Tahamtan M, et al. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem.* 2022 Aug;69(4):1633-1645.

256. Nadendla EK, Tweedell RE, Kasof G, Kanneganti TD. Caspases: structural and molecular mechanisms and functions in cell death, innate immunity, and disease. *Cell Discov.* 2025 May 5;11(1):42.
257. Kaesbach S, Hintze A, Engelbrecht S, Wartenberg M, Templeton AJ. ER+ HER2-Invasive Breast Cancer: Tumor Remission following Viscum Album Extract/Influenza Vaccine Treatment - A Report of 2 Cases. *Complement Med Res.* 2025;32(2):176-181.
258. Gupta G, Kazmi I, Afzal M, Rahman M, Saleem S, Ashraf MS, et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Viscum album* L. (Loranthaceae) in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* 2012 Jun 14;141(3):810-6.
259. Schad F, Thronicke A, Hofheinz RD, Matthes H, Grah C. Patients with Advanced or Metastasised Non-Small-Cell Lung Cancer with *Viscum album* L. Therapy in Addition to PD-1/PD-L1 Blockade: A Real-World Data Study. *Cancers (Basel).* 2024 Apr 22;16(8):1609.
260. Khot VS, Kumbhar ST. Investigating the Role of *Beta vulgaris* L Extract in Treating Anemia and Enhancing Muscle Coordination in Experimental Models. *Research Journal of Pharmacy and Technology.* 2024 Aug 26;17(8):3593–8.
261. Coimbra PPS, Teixeira AC, Trindade MEF, Brito GO, Antonio ADS, Souza L, Silva-E-Silva ACAGD, Pereira HMG, Veiga-Junior VFD, Felzenszwalb I, Teodoro AJ, Araujo-Lima CF. Beetroot peel flour: Characterization, betalains profile, in silico ADMET properties and in vitro biological activity. *Food Chem.* 2025 Jun 1;476:143402.
262. Ojo OA, Adeyemo TR, Iyobhebhe M, Adams MD, Asaleye RM, Evbuomwan IO, et al. *Beta vulgaris* L. beetroot protects against iron-induced liver injury by restoring antioxidant pathways and regulating cellular functions. *Sci Rep.* 2024 Oct 24;14(1):25205.
263. Coimbra PPS, Silva-e-Silva ACAG da, Antonio A da S, Pereira HMG, Veiga-Junior VF da, Felzenszwalb I, et al. Antioxidant Capacity, Antitumor Activity and Metabolomic Profile of a Beetroot Peel Flour. *Metabolites.* 2023 Feb;13(2):277.
264. Ahmadi F. Phytochemistry, Mechanisms, and Preclinical Studies of Echinacea Extracts in Modulating Immune Responses to Bacterial and Viral Infections: A Comprehensive Review. *Antibiotics.* 2024 Oct;13(10):947.
265. Vieira SF, Gonçalves SM, Gonçalves VMF, Tiritan ME, Cunha C, Carvalho A, et al. Evaluation of Echinacea purpurea Extracts as Immunostimulants: Impact on Macrophage Activation. *Planta Med.* 2024 Dec;90(15):1143–55.
266. Kakouri E, Talebi M, Tarantilis PA. *Echinacea* spp.: The cold-fighter herbal remedy? Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 2024 Mar 1;10:100397.
267. Noce A, Marrone G, Di Lauro M, Vita C, Montalto G, Giorgino G, et al. Potential Anti-Inflammatory and Anti-Fatigue Effects of an Oral Food Supplement in Long COVID Patients. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024 Apr 5;17(4):463.
268. El-Daly MM, Bajrai LH, Alandijany TA, Alsaady IM, Gattan HS, Alhamdan MM, et al. Exploring Echinacea angustifolia for anti-viral compounds against Zika virus RNA-dependent RNA polymerase: a computational study. *Sci Rep.* 2025 Feb 3;15(1):4060.

269. Penna SC, Medeiros MV, Aimbire FSC, Faria-Neto HCC, Sertié JAA, Lopes-Martins RAB. Anti-inflammatory effect of the hydralcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on rat paw and skin edema. *Phytomedicine*. 2003 Jan 1;10(5):381–5.
270. Kim HJ, Shin JA, Lee YG, Jin B, Lee WW, Lee Y, et al. *Zingiber officinale* promotes autophagy and apoptosis in human oral cancer through the C/EBP homologous protein. *Cancer Sci*. 2024 Aug;115(8):2701–17.
271. Matin M, Wysocki K, Horbańczuk JO, Rossi L, Atanasov AG. Ginger (*Zingiber officinale*) dietary supplementation in mice regulates liver antioxidant defense systems in a dose- and age-dependent. *Front Pharmacol*. 2025 May 15;16:1597599.
272. de Lima RMT, Dos Reis AC, de Menezes APM, Santos JVO, Filho JWGO, Ferreira JRO, de Alencar MVOB, da Mata AMOF, Khan IN, Islam A, Uddin SJ, Ali ES, Islam MT, Tripathi S, Mishra SK, Mubarak MS, Melo-Cavalcante AAC. Protective and therapeutic potential of ginger (*Zingiber officinale*) extract and [6]-gingerol in cancer: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018 Oct;32(10):1885-1907.
273. Ali LS, Mohamed ,Gamal, Akeel ,Mohammed, ElBayoumi ,Khaled S., El-Beltagy ,Abd El-Fattah B.M., and El-Sayed HM. *Zingiber officinale* ethanolic extract improved organs function in lipopolysaccharides-induced organ toxicity by modulating inflammation and oxidative stress in male rats. *Egypt. J. Basic Appl. Sci*. 2024;(1), 213–231.
274. Manirakiza A, Irakoze L, Manirakiza S. Aloe and its Effects on Cancer: A Narrative Literature Review. *East Afr Health Res J*. 2021;5(1):1–16.
275. Sudhimon S, Mukesh Kumar M, Yamini S, Anjana Devi T, Sumathi S, Sudagar J. Bio prospecting of *Aloe barbadensis* miller (*Aloe vera*) for silver nanoparticles against breast cancer: A review. *Journal of King Saud University - Science*. 2024 Sep 1;36(8):103317.
276. Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Mar;33(3):232-7.
277. Tatsumi Y, Masuda T, Watanabe T, Utomo RY, Zulfin UM, Meiyanto E, et al. Antitumor effect of curcumin analog on osteosarcoma through the inhibition of p300-mediated histone acetylation. *Oncol Rep*. 2025 Apr;53(4):47.
278. Papavassiliou KA, Sofianidi AA, Gogou VA, Papavassiliou AG. The Prospects of Curcumin in Non-Small Cell Lung Cancer Therapeutics. *Cancers (Basel)*. 2025 Jan 27;17(3):438.
279. Hao M, Zhang C. Pre-clinical study of curcumin in the treatment of gastric Cancer. *Journal of Functional Foods*. 2025 Feb 1;125:106677.
280. Cozmin M, Lungu II, Gutu C, Stefanache A, Duceac LD, Şoltuzu BD, et al. Turmeric: from spice to cure. A review of the anti-cancer, radioprotective and anti-inflammatory effects of turmeric sourced compounds. *Front Nutr*. 2024 May 28;11:1399888.
281. Ameer SF, Mohamed MY, Elzubair QA, Sharif EAM, Ibrahim WN. Curcumin as a novel therapeutic candidate for cancer: can this natural compound revolutionize cancer treatment? *Front Oncol*. 2024 Oct 23;14:1438040.

282. Raj A, Vidya L, Reji A, Neelima S, Aparna VM, Sudarsanakumar C. Piperonal-coated silver nanoparticles: A study on cytotoxicity and protein binding. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2025 Jun 5;334:125890.
283. Meriga B, Parim B, Chunduri VR, Naik RR, Nemani H, Suresh P, Ganapathy S, Sathibabu Uddandrao VV. Antiobesity potential of Piperonal: promising modulation of body composition, lipid profiles and obesogenic marker expression in HFD-induced obese rats. *Nutr Metab (Lond).* 2017 Nov 16;14:72. doi: 10.1186/s12986-017-0228-9. Erratum in: *Nutr Metab (Lond).* 2017 Dec 6;14:76.
284. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo MK, Saitoh Y, Aozuka Y, et al. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci.* 2005 May;25(1):57-65.
285. Malebari AM, Nazreen, Syed, Elbehairi, Serag Eldin I, Elhenawy, Ahmed A, Abdelhamid, Antar A, Alfarsi A et al. Synthesis, Characterization, Anticancer, Pharmacokinetic, and Docking Studies of Vanillin-Benzimidazole Derivatives as Aromatase Inhibitors. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 2024 Nov 25;44(10):6845–61.
286. Śliwiński T, Kowalczyk T, Sitarek P, Kolanowska M. Orchidaceae-Derived Anticancer Agents: A Review. *Cancers.* 2022 Jan;14(3):754.
287. Shukla MK, Monika, Thakur A, Verma R, Lalhlenmawia H, Bhattacharyya S, et al. Unravelling the therapeutic potential of orchid plant against cancer. *South African Journal of Botany.* 2022 Nov 1;150:69–79.
288. Nikolić A, Mitrašinović P, Mićanović D, Grujičić S. Kretanje obolevanja i umiranja od kolorektalnog karcinoma kod muškaraca i žena centralne srbije za period 1999-2020. godine. *Zdravstvena zaštita.* 2023;52(2):46-63.
289. Sarosiek KA, Wood KC. Endogenous and imposed determinants of apoptotic vulnerabilities in cancer. *Trends Cancer.* 2023 Feb;9(2):96-110.
290. Mirzayans R. When Therapy-Induced Cancer Cell Apoptosis Fuels Tumor Relapse. *Onco.* 2024; 4(1):37-45.
291. Gerl R, Vaux DL. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Feb 1;26(2):263–70.
292. Debela DT, Muzazu SGY, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021 Aug 12;9:20503121211034366.
293. Ali MS, Gupta G, Alsayari A, Wahab S, Kesharwani P. Biotinylated nanoparticles: A new frontier in nanomedicine and targeted cancer therapy. *Biomater Adv.* 2025 Nov;176:214366.
294. Al-Thani AN, Jan AG, Abbas M, Geetha M, Sadasivuni KK. Nanoparticles in cancer theragnostic and drug delivery: A comprehensive review. *Life Sci.* 2024 Sep 1;352:122899.
295. Wang, B., Hu, S., Teng, Y. *et al.* Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors. *Sig Transduct Target Ther.* 2024;(9)200.

296. Asma ST, Acaroz U, Imre K, Morar A, Shah SRA, Hussain SZ, et al. Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 15;14(24):6203.
297. Hashem S, Ali TA, Akhtar S, Nisar S, Sageena G, Ali S, et al. Targeting cancer signaling pathways by natural products: Exploring promising anti-cancer agents. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jun;150:113054.
298. Olayiwola Y, Gollahon L. Natural Compounds and Breast Cancer: Chemo-Preventive and Therapeutic Capabilities of Chlorogenic Acid and Cinnamaldehyde. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024 Mar 11;17(3):361.
299. Kowalski S, Karska J, Tota M, Skinderowicz K, Kulbacka J, Drag-Zalesińska M. Natural Compounds in Non-Melanoma Skin Cancer: Prevention and Treatment. *Molecules*. 2024 Feb 4;29(3):728.
300. Mali SB. Cancer treatment: Role of natural products. Time to have a serious rethink. *Oral Oncol Rep*. 2023 Jun;6:100040.
301. Zhang Y, Liu K, Yan C, Yin Y, He S, Qiu L, et al. Natural Polyphenols for Treatment of Colorectal Cancer. *Molecules*. 2022 Dec 12;27(24):8810.
302. Guo S, Chen M, Li S, Geng Z, Jin Y, Liu D. Natural Products Treat Colorectal Cancer by Regulating miRNA. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Aug 9;16(8):1122.
303. Alibakhshi A, Malekzadeh R, Hosseini SA, Yaghoobi H. Investigation of the therapeutic role of native plant compounds against colorectal cancer based on system biology and virtual screening. *Sci Rep*. 2023 Jul 15;13(1):11451.
304. Nan Y, Su H, Zhou B, Liu S. The function of natural compounds in important anticancer mechanisms. *Front Oncol*. 2023 Jan 4;12:1049888.
305. Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, et al. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. *Br J Pharmacol*. 2020 Mar;177(6):1409-1423.
306. Naeem A, Hu P, Yang M, Zhang J, Liu Y, Zhu W, et al. Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*. 2022 Nov 30;27(23):8367.
307. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Mar;20(3):200-216.
308. Chunarkar-Patil P, Kaleem M, Mishra R, Ray S, Ahmad A, Verma D, et al. Anticancer Drug Discovery Based on Natural Products: From Computational Approaches to Clinical Studies. *Biomedicines*. 2024 Jan 16;12(1):201.
309. Bezerra DP, Soares AKN, Sousa DPD. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:9734816.

310. Shakeel F, Haq N, Raish M, Siddiqui NA, Alanazi FK, Alsarra IA. Antioxidant and cytotoxic effects of vanillin via eucalyptus oil containing self-nanoemulsifying drug delivery system. *J Mol Liq.* 2016 Jun;218:233–9.
311. Shen J, Su Z. Vanillin oxime inhibits lung cancer cell proliferation and activates apoptosis through JNK/ERK-CHOP pathway. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2021 Jul 1;25(4):273-280.
312. Luković J, Mitrović M, Popović S, Milosavljević Z, Stanojević-Pirković M, An-Elković M, et al. Antitumor effects of vanillin based chalcone analogs in vitro. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2020;77(1):57–67.
313. Yan YQ, Zhang B, Wang L, Xie YH, Peng T, Bai B, et al. Induction of apoptosis and autophagic cell death by the vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c-Myc oncoprotein in HepG2 cells. *Cancer Lett.* 2007 Jul 18;252(2):280-9.
314. Tai A, Sawano T, Yazama F, Ito H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Feb;1810(2):170-7.
315. Fayeulle A, Trudel E, Damiens A, Josse A, Ben N, Youssef H, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of amines derived from vanillin as potential preservatives: Impact of the substituent chain length and polarity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy.* 2021 Sep;(22):100471.
316. Zhao D, Sun J, Sun B, Zhao M, Zheng F, Huang M, et al. Intracellular antioxidant effect of vanillin, 4-methylguaiaicol and 4-ethylguaiaicol: three components in Chinese Baijiu. *RSC Adv.* 2018 Oct 16;8(62):35474-35484.
317. Sinsuebpol C, Burapapadh K, Chowjaroen V, Changsan N. The radical scavenging activity of vanillin and its impact on the healing properties of wounds. *J Adv Pharm Technol Res.* 2023 Apr-Jun;14(2):99-104.
318. Otuechere CA, Adewuyi A, Neupane NP, Eromosele SO, Ibekwe OM, Ekozin A, et al. Action of vanillin-spiked zinc ferrite nanoparticles against cadmium-induced liver damage: Computational insights with AKT 1, BCL-2 and TLR 8 proteins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2023 Feb;80:104139.
319. Fujii T, Kawasaki S ichiro. Salting-out effects on vanillin extraction by supercritical carbon dioxide from aqueous vanillin solution containing salts. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2019 Oct;152:104550.
320. Doroudi A, Roayapalley PK, Das S, Das U, Dimmock JR, Roayapalley PK. Are the cytotoxic properties of conjugated unsaturated ketones inactivated by thiols? *Pharmazie.* 2023 Jul 1;78(6):82-85.
321. Ho KL, Yazan LS, Ismail N, Ismail M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiol.* 2009 Aug;33(2):155-60.

322. Riafrecha LE, Pors MSL, Lavecchia MJ, Bua S, Supuran CT, Colinas PA. Vanillin enones as selective inhibitors of the cancer associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII. The out of the active site pocket for the design of selective inhibitors? *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2021 Dec;36(1):2118-2127.
323. Dimmock JR, Padmanilyam MP, Zello GA, Quail JW, Oloo EO, Prisciak JS, et al. Cytotoxic 1,3-diarylidene-2-tetralones and related compounds. *Eur J Med Chem*. 2002 Oct;37(10):813–24.
324. Wu P, Zhang X, Duan D, Zhao L. Organelle-Specific Mechanisms in Crosstalk between Apoptosis and Ferroptosis. *Oxid Med and Cell Long*. 2023(1):3400147.
325. Bottone MG, Santin G, Aredia F, Bernocchi G, Pellicciari C, Scovassi AI. Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. *Cells*. 2013 May;2(2):294.
326. Santos Vergilio C, de Melo EJT. Autophagy, apoptosis and organelle features during cell exposure to cadmium. *Biocell*. 2013;37(2):45-54.
327. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37.
328. Shao Q, Ndzie Noah ML, Golubnitschaja O, Zhan X. Mitochondrial medicine: "from bench to bedside" 3PM-guided concept. *EPMA J*. 2025 Apr 15;16(2):239-264.
329. Joshi A, Haque N, Lateef A, Patel A, Patel P. Apoptosis and Its Role in Physiology. *Int J Lives Res*. 2017;1.
330. Park W, Wei S, Kim BS, Kim B, Bae SJ, Chae YC, et al. Diversity and complexity of cell death: a historical review. *Exp Mol Med*. 2023 Aug;55(8):1573.
331. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005 Nov;12 Suppl 2:1463-7.
332. Ramadoss D, Sivalingam N. Vanillin extracted from proso and barnyard millets induces cell cycle inhibition and apoptotic cell death in MCF-7 cell line. *J Cancer Res Ther*. 2021 Oct-Dec;17(6):1425-1433.
333. Li Q, Zhu X. Vanillin and its derivatives, potential promising antifungal agents, inhibit *Aspergillus flavus* spores via destroying the integrity of cell membrane rather than cell wall. *Grain Oil Sci Tech*. 2021 Jun;4(2):54–61.
334. Bender O, Celik I, Dogan R, Atalay A, Shoman ME, Ali TFS, et al. Vanillin-Based Indolin-2-one Derivative Bearing a Pyridyl Moiety as a Promising Anti-Breast Cancer Agent via Anti-Estrogenic Activity. *ACS Omega*. 2023 Feb;8(7):6968–81.
335. Surya S, Sampathkumar P, Sivasankaran SM, Pethanasamy M, Elanchezhian C, Deepa B, et al. Vanillic acid exhibits potent antiproliferative and free radical scavenging effects under in vitro conditions. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*. 2023 Sep;13(3):188–98.

336. Sarkar MK, Kar A, Jayaraman A, Mahapatra SK, Vadivel V. Pharmacokinetic properties and anti-proliferative mechanisms of vanillin against acute lymphoblastic leukemia (Jurkat) cells. *South African Journal of Botany*. 2021 Nov;142:82–87.
337. Zhou Z, Wang Y, Ji R, Zhang D, Ma C, Ma W, et al. Vanillin Derivatives Reverse *Fusobacterium nucleatum*-Induced Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Through E-Cadherin/ β -Catenin Pathway. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 4;13:841918.
338. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Law F, Jong DD, et al. Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. *Biomed J*. 2017 Jun;40(3):133–40.
339. Ciesielski HM, Nishida H, Takano T, Fukuhara A, Otani T, Ikegawa Y, et al. Erebosis, a new cell death mechanism during homeostatic turnover of gut enterocytes. *PLOS Biol*. 2022 Apr;20(4):e3001586.
340. Wei Y, Yang L, Pandeya A, Cui J, Zhang Y, Li Z. Pyroptosis-Induced Inflammation and Tissue Damage. *J Mol Biol*. 2022 Feb;434(4).
341. Vasudevan SO, Behl B, Rathinam VA. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage. *Semin Immunol*. 2023 Sep;69:101781.
342. Mamun AA, Wu Y, Jia C, Munir F, Sathy KJ, Sarker T, et al. Role of pyroptosis in liver diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106489
343. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:489-517.
344. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020 Feb 3;11(2):88.
345. Zhang G, Wang J, Zhao Z, Xin T, Fan X, Shen Q, et al. Regulated necrosis, a proinflammatory cell death, potentially counteracts pathogenic infections. *Cell Death Dis*. 2022 Jul 22;13(7):637.
346. Bata N, Cosford NDP. Cell Survival and Cell Death at the Intersection of Autophagy and Apoptosis: Implications for Current and Future Cancer Therapeutics. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2021 Nov 3;4(6):1728-1746.
347. Naz H, Tarique M, Khan P, Luqman S, Ahamad S, Islam A, et al. Evidence of vanillin binding to CAMKIV explains the anti-cancer mechanism in human hepatic carcinoma and neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2018 Jan;438(1-2):35-45.
348. Guoli LI, Kong B, Tong Q, Yeji LI, Chen L, Zeng J, et al. Vanillin downregulates NNMT and attenuates NNMT-related resistance to 5-fluorouracil via ROS-induced cell apoptosis in colorectal cancer cells. *Oncol Rep*. 2021 Jun;45(6):110.
349. Liu YN, Kang JW, Zhang Y, Song SS, Xu QX, Zhang H, et al. Vanillin prevents the growth of endometriotic lesions through anti-inflammatory and antioxidant pathways in a mouse model. *Food Funct*. 2023 Jul 17;14(14):6730-6744.

350. Khan P, Rahman S, Queen A, Manzoor S, Naz F, Hasan GM, et al. Elucidation of Dietary Polyphenolics as Potential Inhibitor of Microtubule Affinity Regulating Kinase 4: In silico and In vitro Studies. *Sci Rep*. 2017 Aug 25;7(1):9470.
351. Ahmed S, Queen A, Irfan I, Siddiqui MN, Almuqdad HTA, Setia N, et al. Vanillin-Isatin Hybrid-Induced MARK4 Inhibition As a Promising Therapeutic Strategy against Hepatocellular Carcinoma. *ACS Omega*. 2024 Jun 5;9(24):25945-25959.
352. Song MZ, Zhang FL, Lin LJ. (3R)-5,6,7-trihydroxy-3-isopropyl-3-methylisochroman-1-one inhibited osteosarcoma growth by inducing apoptosis. *Exp Ther Med*. 2019 Aug;18(2):1107-1114.
353. Marton A, Kúsz E, Kolozsi C, Tubak V, Zagotto G, Buzás K, et al. Vanillin Analogues o-Vanillin and 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde Inhibit NFκB Activation and Suppress Growth of A375 Human Melanoma. *Anticancer Res*. 2016 Nov;36(11):5743-5750.
354. Berk B, Ertaş M, Biltekin SN. Synthesis, Antimicrobial Activity Studies and Molecular Property Predictions of Schiff Bases Derived from ortho-Vanillin. *ACTA Pharm Sci*. 2017;55(1):83–96.
355. Dua T, Mangal S, Akshita G, Harshdeep, Atri AK, Sharma P, et al. Novel Vanillin-based hybrids inhibit quorum sensing and silences phenotypical expressions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Dev Res*. 2023 Feb;84(1):45-61-
356. Thorat, Bapu. Synthesis , SAR Study , Molecular Docking , HPLC Method Development and Anti-TB Study of Novel 3-Chloro-N- { [7-Mehtoxy-2-(4-Methoxyphenyl)-1-Benzofuran-5-Yl] Methyl } Aniline. 2016
357. Ma W, Li X, Song P, Zhang Q, Wu Z, Wang J, Li X, Xu R, Zhao W, Liu Y, Liu H, Yao X, Tang X, Chen P. A vanillin derivative suppresses the growth of HT29 cells through the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2019 Apr 15;849:43-49.
358. Sahoo CR, Paidesetty SK, Sarathbabu S, Dehury B, Kumar NS, Padhy RN. Molecular dynamics simulation, synthesis and topoisomerase inhibitory actions of vanillin derivatives: a systematic computational structural integument. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(22):11653-11663.
359. Senthil Kumar R, Naveena S, Praveen S, Yogadharshini N. Therapeutic aspects of biologically potent vanillin derivatives: A critical review. *J. Drug Delivery Ther*. 2023 Jul;13(7):177-89.
360. Singh AA, Khan F, Song M. Alleviation of Neurological Disorders by Targeting Neurodegenerative-Associated Enzymes: Natural and Synthetic Molecules. *Int J Mol Sci*. 2025 May 14;26(10):4707.
361. Lin H, Chen Z, Yang W, Wang X. Thymol suppressed tumor growth in vitro and in vivo through inducing calcium overload in colorectal cancer. *J Pharm Pharmacol*. 2025 Jun 6:rgaf040.
362. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018 Jul 1;552:50-59.

363. Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003 Jun;10(6):709-17.
364. Ricci JE, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell.* 2004 Jun;117(6):773–86.
365. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* 2003 Mar;8(2):115–28.
366. Kim JH, Lee HO, Cho YJ, Kim J, Chun J, Choi J, et al. A vanillin derivative causes mitochondrial dysfunction and triggers oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE.* 2014 Feb;9(2).
367. Cordano G, Pezoa J, Muoz S, Rivera E, Medina J, Núez-Vergara LJ, et al. Inhibitory effect of vanillin-like compounds on respiration and growth of adenocarcinoma TA3 and its multiresistant variant TA3-MTX-R. *Eur J Pharm Scie.* 2002 Sep;16(4–5):255–63.
368. Xie Y, Zhang J, Wang C, Fan Q, Zhang Y. Vanillin an active constituent from Vanilla bean induces apoptosis and inhibits proliferation in human colorectal adenocarcinoma cell line. *Pharmacognosy Magazine.* 2020;16(67):197-200.
369. Li G, Kong B, Tong Q, Li Y, Chen L, Zeng J, Yu H, Xie X, Zhang J. Vanillin downregulates NNMT and attenuates NNMT-related resistance to 5-fluorouracil via ROS-induced cell apoptosis in colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2021;45:10.
370. Turtoi M, Anghelache M, Patrascu AA, Deleanu M, Voicu G, Raduca M, et al. Antitumor Properties of a New Macrocyclic Tetranuclear Oxidovanadium(V) Complex with 3-Methoxysalicylidenvalline Ligand. *Biomed.* 2022 Jun;10(6):1217.
371. Cheng YS, Linetsky M, Li H, Ayyash N, Gardella A, Salomon RG. 4-Hydroxy-7-oxo-5-heptenoic acid lactone can induce mitochondrial dysfunction in retinal pigmented epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2020 Nov 20;160:719–33.
372. Tan G, Qin Z, Jiang S, Zhang L, Zhang G, Huang M, Huang Z, Jin J. MitoQ alleviates triptolide-induced cardiotoxicity via activation of p62/Nrf2 axis in H9c2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2023 Feb;86:105487.
373. Akter R, Uddin SJ, Tiralongo J, Grice ID, Tiralongo E. A New Cytotoxic Steroidal Glycoalkaloid from the Methanol Extract of *Blumea lacera* Leaves. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(4):616-33. doi: 10.18433/j3161q.
374. Zhang X, Li Y, Feng Z, Zhang Y, Gong Y, Song H, et al. Multifloroside Suppressing Proliferation and Colony Formation, Inducing S Cell Cycle Arrest, ROS Production, and Increasing MMP in Human Epidermoid Carcinoma Cell Lines A431. *Molecules.* 2019 Dec 18;25(1):7.
375. Younes N, Alsahan BS, Al-Mesaifri AJ, Da'as SI, Pintus G, Majdalawieh AF, et al. JC-10 probe as a novel method for analyzing the mitochondrial membrane potential and cell stress in whole zebrafish embryos. *Toxicol Res (Camb).* 2021 Dec 21;11(1):77–87.

376. Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jul;9(7):532-42.
377. Guerra-Castellano A, Márquez I, Pérez-Mejías G, Díaz-Quintana A, Rosa MAD la, Díaz-Moreno I. Post-Translational Modifications of Cytochrome c in Cell Life and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 11;21(22):8483.
378. Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J mol biol.* 2005 Nov;353(5):937-44.
379. Allen S, Balabanidou V, Sideris DP, Lisowsky T, Tokatlidis K. Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol.* 2005 Nov 11;353(5):937-44.
380. Hüttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: from respiration to apoptosis. *Mitochondrion.* 2011 May;11(3):369-381.
381. Guerra-Castellano A, Márquez I, Pérez-Mejías G, Díaz-Quintana A, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. Post-Translational Modifications of Cytochrome c in Cell Life and Disease. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 11;21(22):8483.
382. José A. Sánchez-Alcázar, Khodjakov A, Schneider E. Anticancer Drugs Induce Increased Mitochondrial Cytochrome c Expression That Precedes Cell Death. *Cancer Res.* 2001;61(3):1038-1044.
383. Abramczyk H, Brozek-Pluska B, Kopeć M. Double face of cytochrome c in cancers by Raman imaging. *Sci Rep.* 2022 Feb;12(1):1-11.
384. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Ann rev biochem.* 2004;73:87-106.
385. Garland JM, Rudin C. Cytochrome c Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Intact Hematopoietic Cells and Overrides Apoptosis Suppression Mediated by bcl-2, Growth Factor Signaling, MAP-Kinase-Kinase, and Malignant Change. *Blood.* 1998 Aug;92(4):1235-46.
386. Li H, Dang C, Tai X, Xue L, Meng Y, Ma S, et al. VALD-3, a Schiff base ligand synthesized from o-vanillin derivatives, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *Sci Rep.* 2021 Jul;11(1):1-14.
387. Naz H, Tarique M, Khan P, Luqman S, Ahamad S, Islam A, Ahmad F, Hassan MI. Evidence of vanillin binding to CAMKIV explains the anti-cancer mechanism in human hepatic carcinoma and neuroblastoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2018 Jan;438(1-2):35-45.
388. Narode H, Gayke M, Bhosale RS, Eppa G, Gohil N, Bhattacharjee G, et al. Vanillin containing 9H-fluoren sulfone scaffolds: Synthesis, biological evaluation and molecular docking study. *Results Chem.* 2022;4:100269.

Биографија

Марија Булић рођена је 16.06.1981. у Пожеги. Основну школу „Петар Лековић“ у Пожеги завршила је као носилац Вукове дипломе. Гимазију „Свети Сава“ у Пожеги завршила је 2000. године са одличном успехом. Фармацеутски факултет Уневрзитета у Београду, смер медицински биохемичар завршила је 2009. Запослена је на радном месту медицинског биохемичара у Центру за медицинску биохемију Универзитетског клиничког центра Србије. Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је 2021. године. Здравствену специјализацију Медицинска биохемија уписала је 2024. године и тренутно је на другој години специјалистичких студија. Говори енглески језик.

Библиографија

1. Bulic M, Nikolic I, Mitrovic M, Muskinja J, Todorovic T, Anđelkovic M. Four newly synthesized enones induce mitochondrial-mediated apoptosis and G2/M cell cycle arrest in colorectal and cervical cancer cells. *RSC Adv*; 2024,14, 33987-34005. doi: 10.1039/d4ra06529h.
2. Bulic M, Andjelkovic M, Mitrovic M, Stanojevic Pirkovic M, Kostic M, Jankovic S, Lukovic J, Mladenovic V, Nikolic I. Diagnostic Agreement of Presepsin, Procalcitonin, C-Reactive Protein and White Blood Cell Count in Patients with Suspected Sepsis. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2024; 41(2):214-222. doi: 10.5937/afmnai41-46406
3. Nikolic I, Luković J, Marković T, Ristić T, Bulić M, Anđelković M, Šorak M, Milinković M, Muškinja J, Čanović P, Mitrović M. New O-alkyl Chalcone Derivative Exhibits Antiproliferative Potential in Colorectal and Cervical Cancer Cells by Inducing G0/G1 Cell Cycle Arrest and Mitochondrial-mediated Apoptosis. *Curr Med Chem*. 2025 Mar 6. doi: 10.2174/0109298673317485240827093121.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама *in vitro*“

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 19.06.2015 године,

Bolić Marij

потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:
„Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним
ћелијама *in vitro*“

истоветне.

У Крагујевцу, 19.06.2025 године,

Belić Marko

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија Булић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

„Испитивање антитуморских ефеката енона и њихових соли на хуманим малигним ћелијама *in vitro*“

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

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам¹

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

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

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

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

☒ 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 19.06.2025 године,

Bolir Mokrić

потпис аутора

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