

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
УНИВЕРЗИТЕТА У КРАГУЈЕВЦУ



THE MEDICAL FACULTY
UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

Милена Дељанин

**АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКТА
*CHELIDONIUM MAJUS IN VITRO***

докторска дисертација

Крагујевац, 2016. године

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Употреба биљака у терапији тумора	1
1.2. Малигне болести.....	5
1.2.1. Епидемиологија.....	5
1.2.2. Карактеристике малигнух ћелија	5
1.2.2.1. Одржавање пролиферативне сигнализације	7
1.2.2.2. Неосетљивост на сигнале инхибиције раста.....	8
1.2.2.3. Избегавање програмиране ћелијске смрти (апоптозе).....	9
1.2.2.4. Неограничени репликативни потенцијал	9
1.2.2.5. Индукција ангиогенезе.....	11
1.2.2.6. Инвазија ткива и метастазирање	11
1.2.2.7. Репрограмирање енергетског метаболизма	12
1.2.2.8. Избегавање имунског одговора.....	14
1.2.2.9. Карактеристике које омогућавају преживљавање малигнух ћелија („enabling characteristics”).....	15
1.3. Антинеопластици	17
1.4. Ћелијски циклус	23
1.4.1. G1/S фаза ћелијског циклуса.....	24
1.4.2. G2/M фаза ћелијског циклуса	26
1.5. Механизми ћелијске смрти.....	27
1.5.1. Некроза.....	28

1.5.2. Апоптоза	31
1.5.2.1. Морфолошке карактеристике апоптозе.....	32
1.5.2.2. Биохемијске карактеристике апоптозе	32
1.5.2.3. Механизми апоптозе	33
1.5.2.4. Регулација процеса апоптозе.....	35
1.5.2.5. Патолошка апоптоза.....	37
1.6. <i>Chelidonium majus</i>	38
1.6.1. Географска распрострањеност и таксономске карактеристике.....	38
1.6.2. Активни принципи.....	39
1.6.3. Употреба у традиционалној медицини	43
1.6.4. Фармаколошка активност	43
1.6.4.1. Антимикробна, антивирусна и антипаразитарна активност	45
1.6.4.2. Имуномодулаторно деловање	45
1.6.4.3. Хепатопротективни ефекти	46
1.6.4.4. Антиоксидативна активност.....	47
1.6.4.5. Антиинфламаторни ефекти	48
1.6.4.6. Аналгетичко и спазмолитичко деловање	48
1.6.4.7. Остала дејства биљке <i>Chelidonium majus</i>	49
1.6.4.8. Антитуморско деловање	50
2. ЦИЉ РАДА	54
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	55
3.1. Екстракција биљног материјала.....	55

3.2. Ћелијске линије	55
3.3. Тестови за испитивање цитотоксичности	56
3.3.1. Третман ћелијских линија	57
3.3.2. МТТ тест	57
3.3.3. SRB тест	58
3.4. Детерминација апоптозе/некрозе проточном цитометријом	59
3.5. Анализа протеина апоптозе проточном цитометријом	60
3.6. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти	60
3.7. Анализа ћелијског циклуса.....	61
3.8. Утицај екстракта на инхибицију миграције- <i>In vitro "scratch" assay</i>	62
3.9. Ефекат комбиновања екстракта и доксорубицина	63
3.10. Утицај екстракта на ефекте γ -зрачења	63
3.10.1. МТТ тест	64
3.10.2. Клоногени тест	65
3.11. Статистичка обрада података.....	66
4. РЕЗУЛТАТИ.....	67
4.1. Екстракт <i>C. majus</i> је цитотоксичан за туморске ћелијске линије	67
4.2. Екстракт <i>C. majus</i> индукује апоптозу	69
4.3. Екстракт <i>C. majus</i> доводи до застоја у ћелијском циклусу	73
4.4. Екстракт <i>C. majus</i> инхибира миграцију ћелија <i>in vitro</i>	74
4.5. Екстракт <i>C. majus</i> потенцира цитотоксичност доксорубицина	75
4.6. Екстракт <i>C. majus</i> појачава осетљивост малигних ћелија на зрачење	76

5. ДИСКУСИЈА.....	81
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	91
7. ЛИТЕРАТУРА	93

1. УВОД

1.1. Употреба биљака у терапији тумора

Проналажење нових антитуморских агенаса је императив у савременој онкологији. Цитостатици који се користе у терапији канцера нису селективни, оштећују и нормалне ћелије, доводе до системске токсичности и развоја резистенције на ове лекове. Зато се намеће потреба за проналажењем агенаса који ће деловати на циљне молекуле који су значајни за настанак, прогресију и метастазирање тумора, а уједно и смањити трошкове лечења. Веома значајан извор нових лекова представљају биоактивне компоненте природних производа. Данас се зна да су биљке нарочито богат извор једињења са антиканцерским потенцијалом који се заснива на њиховој способности редукције слободних радикала, могућности да супримирају активност инфламаторних цитокина, као и могућности да доведу до промена циљних молекула сигналних путева, који контролишу ћелијски раст, пролиферацију, апоптозу, али и ангиогенезу, инвазију и метастазу (1,2), због чега су предмет многих истраживања. Потенцијал природних продуката као антиканцерских агенаса препознат је 1950. године од стране истраживача Националног института за рак (*U.S. National Cancer Institute, NCI*), који су успоставили програм скрининга великих размера на мишјим туморским моделима (3). 35 година касније, развили су панел за *in vitro* скрининг који је садржао више од 60 различитих туморских ћелијских линија (4). Временом, овај панел за скрининг пролазио је кроз промене, тако да се у данашње време приликом испитивања супстанце користи одређени алгоритам. Уколико *in vitro* испитивања покажу да супстанца поседује антитуморско деловање, следећи корак је испитивање исте активности супстанце у *in vivo* систему. Ако су добијени резултати обећавајући, супстанца може бити одобрена за клиничка испитивања.

Велики број природних и синтетских агенаса одобрен је, и тренутно се клинички примењује (5). Међу првим агенсима који су одобрени за употребу у терапији канцера налазе се таксани, винка алкалоиди, етопозид и кампотецин (6).

Паклитаксел је најстарији таксан изолован седамдесетих година прошлог века из коре и иглица пацифичке тисе (*Taxus brevifolia*). Како би прекомерна екстракција паклитаксела довела до истребљења овог четинара, трагало се за одговарајућим начином синтезе. На челу са Робертом Холтоном, група истраживача успела је да синтетише паклитаксел из прекурсора 10-деацетилбакатина, који је изолован из иглица европске тисе (*Taxus baccata*), из кога је касније синтетисан још један таксан, доцетаксел (7). Механизам деловања таксана заснива се на стабилизацији микротубула, чиме успоравају или потпуно инхибирају митозу и на тај начин доводе до апоптозе малигних ћелија. Данас су у употреби у терапији карцинома јајника, дојке, карцинома врата и главе, као и неситноћелијског карцинома плућа (8).

Из екстракта лишћа биљке *Vinca rosea* изолована су два винка алкалоида, винкрестин и винбластин, који су данас у употреби у терапији бројних малигнитета, попут карцинома тестиса, Хоџкиновог лимфома, карцинома дојке и Капошијевог синдрома (9). Делују као антимиотски хемиотерапеутици који узрокују деполимеризацију микротубула и на тај начин доводе до застоја у митози канцерских ћелија и њихове апоптозе (10).

У народној медицини више од 1000 година у употреби су америчка мандагора (*Podophyllum peltatum*) и њој сродна врста, која је присутна на Хималајима, *Podophyllum emodi*. Захваљујући бројним лековитим својствима, екстракти добијени од ризома и корена (богати лигнанима и њиховим гликозидима) коришћени су као антиеметици, пургативи, експекторанси, антихелминтици, а забележена је и њихова употреба у терапији карцинома (11,12). Подофилотоксин је најзначајнији биоактивни састојак са антитуморским својствима, изолован из екстракта *Podophyllum-a* (12), који поседује и

значајну токсичност потврђену клиничким испитивањима, због чега је његова системска употреба ограничена (13). Оптимизацијом подофилотоксина добијени су антитуморски агенси, етопозид и тенипозид, који су нашли широку примену у терапији, а још неколико добијених деривата (TOP53, GL331, NK611, F11782) тренутно представљају предмет клиничких испитивања (14,15). Етопозид и тенипозид узрокују бројне двоструке прекиде ланца ДНК, инхибицијом топоизомеразе II, што ћелију неминовно води у смрт процесом апоптозе (16,17). Етопозид се примењује у терапији карцинома јајника, ситноћелијског и неситноћелијског карцинома плућа, затим у терапији лимфома, неуробластома и леукемија, док се тенипозид примењује у терапији малигних тумора централног нервног система, леукемија и лимфома, као и неситноћелијског карцинома плућа (18-21).

Кампотецин је пентациклични хинолински алкалоид, изолован 1966.године из екстракта коре кинеског дрвета *Camptotheca acuminata* (22). Обећавајућа антитуморска својства показао је у претклиничким, као и у почетним фазама клиничких испитивања. Међутим, врло брзо је уочено да изазива неприхватљив ниво мијелосупресије, као и да је у физиолошким условима слабо растворљив и подложен хидролизи, те је његова примена у клиничкој пракси била онемогућена. Након неког времена, када је установљено да делује као селективни инхибитор топоизомеразе I, интересовање за овај алкалоид је обновљено (23). Стога су, како би се превазишла лоша својства кампотецина, синтетисани деривати одобрени за клиничку употребу, иринотекан и топотекан (24). Кампотецини су специфични за S фазу ћелијског циклуса. Везују се за комплекс топоизомеразе I и ДНК, узрокују стабилизацију овог комплекса и спречавају поновну лигацију, чиме доводе до појаве једноланчаних прекида ДНК. Када наиђе на овај комплекс (кампотецин/ДНК/топоизомераза I), репликациона виљушка узрокује двоструке прекиде ланца ДНК, који су иреверзибилни и воде ка апоптози (25). Иринотекан је нашао употребу у терапији метастатског колоректалног карцинома, а топотекан у терапији карцинома јајника и грлића материце, као и ситноћелијског карцинома плућа (26-28). Развијени су

бројни синтетски деривати са циљем да се повећа стабилност, растворљивост, антитуморска активност, а уједно минимизују токсични ефекти. Ови деривати, попут рубитекана, каренитекана и силетекана налазе се у фази клиничких истраживања (29-31). Уједно, развијени су и бројни макромолекули, како нековалентни (наночестице, липозоми, хидрогелови), тако и ковалентни (протеини, мицеле, полимери), како би се лек селективно испоручио до места деловања, избегавајући на тај начин деградацију у организму, чиме се постиже смањење токсичности и ефикаснија терапија, уз примену ниже дозе лека (32,33).

Поред поменутих, у народу је од давнина заступљена употреба и других биљака у превенцији и терапији бројних болести и стања, укључујући и малигнитете. Традиционална медицина се као алтернативна терапија користи за одржавање здравља, побољшање функције имунског система, превенцију, терапију и ремисију канцера.

Hyangyakjipseongbang, *Uibangruchue* и *Donguibogam* представљају традиционалне медицинске књиге источне Азије, при чему је *Donguibogam* књига која је стара више од 1600. година. У традиционалној књизи јужне Кореје описано је лечење карцинома природним супстанцама, укључујући биљке које расту у дивљини, и користи се као смерница за ефективно лечење карцинома 17 векова уназад (34). Још увек није у потпуности одређен тачан механизам дејства свих биљака које се користе у превенцији и терапији неоплазми. Потребна су детаљнија испитивања како би се могле сврстати у антиканцерске агенсе, али је њихова употреба несумњиво све учесталија, посебно као додатак терапије цитостатицима за постизање боље прогнозе болести али и смањење нежељених ефеката хемиотерапије, попут мучнине, повраћања, као и периферне неуропатије (35).

1.2. Малигне болести

Малигне болести представљају групу оболења у којима у телу оболелог долази до неконтролисаног раста и ширења абнормалних ћелија и могу захватити било који део тела. Термини канцер, малигна неоплазма и малигни тумор су синоними и од бенигнух тумора разликују се по дедиференцијацији, инвазивности и способности да метастазирају. Метастазе су уобичајени узрок смрти као последице рака (36,37).

1.2.1. Епидемиологија

Упркос значајном напретку у дијагностици и терапији, рак као узрок смрти и даље се налази на другом месту, одмах након кардиоваскуларних болести, са сталном тенденцијом раста (38). Одговоран је за 8.2 милиона смрти током 2012.године, за разлику од 7.6 милиона умрлих од ове болести током 2008.године. За 25% је већа инциденца оболелих мушкараца у односу на жене (од 100 000 људи оболи 205 мушкараца и 165 жена). Укупна инциденца оболелих у свету током 2014.године износи преко 14 милиона, а процена је да ће инциденца оболелих 2030.године износити чак преко 21 милион.

Главни типови канцера су: карцином плућа (1.589.925 умрлих), јетре (745.533 умрлих), желуца (723.073 умрлих), колоректални карцином (693.933 умрлих) и карцином дојке (521.907 умрлих) (39).

1.2.2. Карактеристике малигнух ћелија

Постоји преко 100 типова карцинома, при чему се различити подтипови могу пронаћи унутар специфичних органа и ткива. До настанка тумора може доћи услед

инактивације тумор супресорских гена или услед трансформације прото-онкогена у онкогене. Тумор супресорски гени, како назив каже, супримирају малигну трансформацију ћелије, па се мутације ових гена налазе у основи многих канцера. Прото-онкогени су гени који контролишу деобу ћелије, диференцијацију или апоптозу, те њиховом мутацијом долази до лоше регулације ових процеса. Промене прото-онкогена и тумор супресорских гена узрокују поремећаје у факторима раста и њиховим рецепторима, сигналним путевима фактора раста, механизмима апоптозе, трансдјусер има ћелијског циклуса и експресији теломеразе, што води ка неконтролисаој деоби ћелија (37).

Hanahan и *Weinberg* су 2000.године предложили шест карактеристика канцера које заједно чине организациони принцип, а он представља логичан оквир за разумевање изузетне разноликост неопластичних болести (40):

- Одржавање пролиферативне сигнализације
- Неосетљивост на супресоре раста
- Избегавање програмиране ћелијске смрти (апоптозе)
- Неограничени репликативни потенцијал
- Индукција ангиогенезе
- Инвазија ткива и метастазирање

Међутим, на основу нових сазнања протекле деценије, *Hanahan* и *Weinberg* су 2011.године овој листи додали још две карактеристике малигнућ ћелија (Слика 1.) (41):

- Репрограмирање енергетског метаболизма
- Избегавање деструкције од стране имунског одговора



Слика 1. Основне карактеристике малигнух ћелија (41).

1.2.2.1. Одржавање пролиферативне сигнализације

Вероватно најбитнија особина малигне ћелије јесте способност да одржава константну пролиферацију. У нормалним ткивима продукција и ослобађање фактора раста је строго контролисана, док је процес пролиферације под контролом одговарајућих регулаторних механизма, чиме се постиже хомеостаза и функционалност ткива. Када се фактори раста вежу за трансмембранске рецепторе, долази до преноса митогених сигнала раста (*growth signals, GS*), чиме се покрећу процеси унутар ћелије, попут ћелијског

циклуса и раста ћелије. Према досадашњим сазнањима, ниједан тип здравих ћелија не пролиферише у одсуству ових сигнала раста

Туморска ћелија може стећи способност да одржава константну пролиферацију на неколико алтернативних начина. Може самостално продуковати факторе раста на које одговара путем експресије сродних рецептора, што резултује аутокрином пролиферативном стимулацијом (42). Такође, туморске ћелије могу слати сигнале нормалним ћелијама унутар строме како би их стимулисали да их обезбеде различитим факторима раста (43). Сигнализација путем рецептора за факторе раста такође може бити дерегулисана повећањем експресије рецепторских протеина на површини туморске ћелије, што ове ћелије чини хиперреактивним.

1.2.2.2. Неосетљивост на сигнале инхибиције раста

Компоненте инхибиторних сигнала раста налазе се као солубилни молекули, али и као везани, мембрански молекули. Код здравих ћелија делују као антипролиферативни сигнали у циљу одржавања нормалне ткивне хомеостазе. Како би туморске ћелије наставиле несметано да расту, морају заобићи механизме који негативно регулишу ћелијску пролиферацију. Многи од ових механизма зависе од активности тумор супресорских гена, нпр. оних које кодирају протеин Ретинобластом (pRB) и p53 протеин. Ови протеини делују као централни контролни чворови унутар два комплементарна, кључна регулаторна круга у којима се доноси одлука о томе да ли ће ћелија наставити ка пролиферацији или ће доћи до програмиране ћелијске смрти (44). Уколико постоји дефект у функцији pRB-а, недостаје адекватна контрола, па туморска ћелија наставља са пролиферацијом. Док pRB преноси инхибиторне сигнале раста углавном екстрацелуларног порекла, p53 протеин прима податке о стресу и абнормалностима које се јављају унутар ћелије. На основу степена оштећења генома, нивоа глукозе и сигнала

који промовишу раст, p53 може зауставити ћелијски циклус док се не изврши поправка. Уколико су оштећења непоправљива, p53 покреће процес апоптозе. У случају дефекта овог протеина код туморске ћелије, изостаје контрола ћелијског циклуса упркос абнормалностима, па ћелија наставља са пролиферацијом.

1.2.2.3. Избегавање програмиране ћелијске смрти (апоптозе)

Концепт да програмирана ћелијска смрт апоптозом представља природну баријеру од развоја канцера установљен је од стране студија спроведених пре више од две деценије (45). Међутим, познато је да је избегавање апоптозе једна од битнијих карактеристика малигних ћелија, које су развиле бројне стратегије како би заобишле апоптозу. Најчешћи је губитак p53 тумор супресорске функције. Алтернативно, туморске ћелије могу повећати експресију антиапоптотских (Bcl-2, Bcl-x1), или смањити експресију проапоптотских (Bax, Bim, Puma) регулаторних молекула (41). Мноштво механизма за избегавање апоптозе по свој прилици одражава разноликост сигнала који индукују апоптозу, на које су популације канцерских ћелија наилазиле током развоја малигнитета.

1.2.2.4. Неограничени репликативни потенцијал

До 2000.године било је широко прихваћено да канцерске ћелије захтевају неограничени репликативни потенцијал како би могле да формирају тумор макроскопских димензија. Ова могућност канцерску ћелију увелико разликује од нормалне ћелије, која у свом животном веку може да прође кроз ограничени број успешних ћелијских циклуса и ћелијских деоба, што је показао Хајфлик на ћелијама у култури (46). Када ћелија прође кроз коначан број репликација, она улази у сенесценцу, стање у коме је ћелија вијабилна

али нема способност пролиферације, или у стање које се назива криза, у коме долази до масовне смрти ћелија. У ретким случајевима, појављују се ћелије које испољавају неограничени репликативни потенцијал. Ова појава назива се имортализација, а ћелије које поседују ову особину у култури пролиферишу без доказа о претходној сенесценци или кризи (41).

Постоји више доказа који указују да теломере на крајевима хромозома имају централну улогу у неограниченој пролиферацији. Теломере се састоје од неколико хиљада хексануклеотидних поновака који штите крајеве хромозома од оштећења и спречавају фузију крајева суседних хромозома. Скраћују се приликом сваког ћелијског циклуса, па временом губе способност заштите ДНК, када долази до спајања ДНК крајева (*end-to-end* фузија) и формирања нестабилног дицентричног хромозома, што ћелију води у апоптозу посредством p53 протеина (47). Дужина теломерне ДНК одређује колико репликација ће ћелија имати, пре него што теломере изгубе заштитну улогу и ћелија уђе у фазу кризе, што неминовно резултира ћелијском смрћу. Теломераза је ДНК полимераза која на крајеве теломерне ДНК додаје хексануклеотидне поновке и препозната је као заједнички фактор у свим малигним ћелијама, док у већини соматских ћелија одрасле јединке није експримирана (48,49). Повећање теломеразне активности директно је повезано са неконтролисаним растом и присутно је код 85-90% туморских ћелија, што овај ензим чини широко прихваћеним тумор маркером и потенцијалним циљним местом за деловање нових антитуморских агенаса (50). Показано је да TERT субјединица чак и у одсуству активности теломеразе подстиче пролиферацију, делујући као кофактор за NF- κ B и на Wnt и β -катенин сигнални пут, што га чини подесним циљним местом за канцерску терапију (51).

1.2.2.5. Индукција ангиогенезе

Попут здравог ткива, туморском ткиву су неопходни хранљиви састојци и кисеоник, као и могућност елиминације угљен-диоксида и метаболичког отпада. Током ембриогенезе, развој крвних судова подразумева стварање ендотелних ћелија и њихово склапање у крвне судове (васкулогенеза), а потом и формирање нових од већ постојећих (ангиогенеза). У почетку раста тумору нису неопходни нови крвни судови, међутим како туморско ткиво расте, потреба за нутријентима се повећава, а доступност капилара који те нутријенте обезбеђују се смањује. Неоваскуларизација тумора настала ангиогенезом, задовољиће ове потребе. Процес ангиогенезе започиње када канцерске ћелије почну да ослобађају васкуларни ендотелни фактор раста (енг. VEGF), сигнални молекул који активира ендотелне ћелије да формирају нови крвни суд (52). Ангиогенеза игра централну улогу у ширењу канцерских ћелија на остала ткива и формирање метастаза. На бројним анималним моделима доказано је да антитело специфично за VEGF спречава ангиогенезу тумора, његову прогресију и појаву метастаза (53).

1.2.2.6. Инвазија ткива и метастазирање

Веома битна карактеристика малигно трансформисаних ћелија јесте њихова способност инвазије у околно ткиво и метастазирање. Метастазе су секундарни тумори који настају од ћелија примарног тумора које су се одвојиле, а потом лимфогеним или хематогеним путем доспеле до различитих делова тела. Малигни тумори имају способност метастазирања, а вероватноћа појаве ових секундарних имплантата је већа уколико је иницијални тумор већих димензија и бржег раста.

До скоро је механизам којима канцерске ћелије продиру у околно ткиво и метастазирају представљао енигму. За разлику од нормалних ћелија, код којих постоји

контактна инхибиција, код трансформисаних ћелија то није случај. (41). Код ових ћелија уочена је смањена експресија E-кадхерина, протеина који игра кључну улогу у *cell-to-cell* адхезији. Овај протеин омогућава адхезију ћелија, које формирају монослој у коме се ћелије налазе у мировању, без миграције у околно ткиво. На туморским ћелијама експресија E-кадхерина је смањена, па се повећање његове експресије може употребити као стратегија за инхибицију инвазије и метастазе (54). Са друге стране, туморске ћелије су се адаптирале да луче ензиме металопротеиназе које разлажу екстрацелуларни матрикс околног здравог ткива, те тако омогућавају пролазак ових ћелија у суседно ткиво. Металопротеиназе могу бити обезбеђене и од стране макрофага које се налазе на периферији тумора, а које су стимулисане од стране канцерских ћелија (55). У једном експерименталном моделу метастазе карцинома дојке, макрофаге које су удружене са тумором продуковале су епидермални фактор раста (*epidermal growth factor*, EGF), чиме су стимулисале канцерске ћелије, док су канцерске ћелије продуковале фактор стимулације колонија 1 (*colony-stimulating factor-1*, CSF-1), који промовише диференцијацију макрофага. Ова усклађена интеракција омогућила је и олакшала интравазацију (продор) туморских ћелија у циркулаторни систем и њихово хематогено ширење са последичном дисеминованом метастазом (56).

Иако су последњих година откривени неки од механизма инвазије и дисеминованог ширења канцерских ћелија, метастазе су у 90% случајева одговорне за морталитет канцерских пацијената, те управо због тога представљају највећи проблем у терапији (36,57).

1.2.2.7. Репрограмирање енергетског метаболизма

Хронична и неконтролисана пролиферација канцерских ћелија захтева одговарајућу корекцију (прилагођавање) енергетског метаболизма, како би се обезбедио

несметани раст и деоба ћелија. Под аеробним условима, нормалне ћелије прерађују глюкозу: најпре до пирувата гликолизом у цитозолу, а потом до угљен-диоксида у митохондријама. Када су услови аеробни, главни процес обраде је гликолиза, док се обрада пирувата у митохондријама не одвија, будући да је у питању процес који захтева присуство кисеоника. Далеке 1930.године *Otto Warburg* је приметио абнормалности у енергетском метаболизму канцерских ћелија. Чак и у присуству кисеоника, ове ћелије су у стању да репрограмирају метаболизам глюкозе и ограниче га искључиво на гликолизу, што води ка стању које је названо "аеробна гликолиза" или "Варбургов ефекат" (58). Обзиром да се метаболизмом у митохондријама производи и до 18 пута већа количина енергије, канцерске ћелије овај недостатак компензују тако што повећавају ниво транспортера за глюкозу, првенствено GLUT1, који повећава унос глюкозе у цитоплазму (59). Значајно повећање преузимања и искоришћавања глюкозе документовано је у многим туморским линијама, визуализацијом преузимања путем позитронске емисионе томографије, са радиообележеним аналогом глюкозе (^{18}F -флуорордеоксиглукоза) као маркером. Показало се да је гликолитичка производња енергије удружена са активацијом онкогена (Ras и Мус) и мутираним тумор супресором p53 (59). Ослањање на гликолизу посебно је наглашено под хипоксичним условима, који делују плејотропно на усходну регулацију транспортера глюкозе, као и бројних ензима који учествују у овом процесу, и омогућавају да се процес гликолизе одвија под анаеробним условима (60). Тако, и хипоксија и Ras онкопротеин могу независно повећати нивое транскрипционих фактора HIF1 α и HIF2 α (*hypoxia-inducible factor 1a* и *2a*), који воде ка усходној регулацији гликолизе (60,61). Унутар многих тумора услови су хипоксични, па се управо путем анаеробне гликолизе добија довољна количина енергије, као и довољна количина интермедијера који се користе за синтезу нпр. нуклеозида и аминокиселина, а потом и биосинтезу макромолекула и органела у новим ћелијама, приликом пролиферације. Хипоксија тумора такође доводи до генетске нестабилности, што узрокује настанак агресивнијих тумора (62). Показано је да

је Варбургов ефекат присутан је у многим брзорастућим ембрионалним ткивима, у којима је присутна интензивна пролиферација (41).

1.2.2.8. *Избегавање имунског одговора*

Последња у низу карактеристика туморских ћелија коју су описали *Hanahan* и *Weinberg* односи се на способност ових ћелија да избегну имунски систем у организму. Како су ћелије и ткива у организму под сталним надзором имунског система, чија је функција између осталог да препозна и елиминиса тумор који је почео да се ствара, очигледно је да су малигне ћелије способне да избегну имунски одговор домаћина (63).

Један од механизма којим туморске ћелије избегавају имунски одговор је селекција оних малигнућих ћелија које су мање имуногене, односно имају смањену експресију или потпуно одсуство туморских антигена. Трансплантациони експерименти на мишевима су показали да канцерске ћелије изоловане из тумора индукованих код имунодефицијентних мишева и инплантиране у сингене имунокомпетентне домаћине немају способност индукције тумора, док су ћелије канцера из тумора имунокомпетентних мишева биле једнако способне да иницирају тумор након трансплантације у обе врсте домаћина. Закључак је да су клонови високо имуногених канцерских ћелија рутински елиминисани од стране имунског система имунокомпетентног домаћина, док су слабо имуногене варијанте канцерских ћелија опстале, наставиле да расту и формирају солидне туморе, а овако слабо имуногене туморске ћелије могу колонизовати и имунодефицијентне и имунокомпетентне домаћине. (64).

Осим овог, постоје и други механизми којима туморске ћелије избегавају имунски одговор. Обзиром да је за презентацију туморских антигена CD8⁺ лимфоцитима неопходно да ови антигени буду презентовани у склопу МНС молекула I класе, управо

смањењем експресије овог молекула трансформисане ћелије избегавају деструкцију (65). Такође, код појединих тумора установљена је прекомерна експресија CTLA-4 антигена (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4), који делује као кључни негативни регулатор CD28-зависне активације Т лимфоцита, те се експресијом овог антигена, активирани Т ћелије супримирају (66,67).

Поред тога, туморске ћелије могу избећи имунски одговор продукцијом блокирајућих фактора. Њихово присуство је доказано у серуму појединих пацијената у свим фазама раста неоплазме. Ови блокатори, попут антитела која не везују комплемент IgA и IgG4 класе, делују на тај начин што се везују за антигене на површини туморских ћелија и на тај начин спречавају везивање и цитолитичку активност ефекторских Т ћелија, а преко свог Fc фрагмента ангажују инхибиторне FcγRIIb рецепторе који су експримирани на површини моноцит/макрофага, дендритских ћелија и неутрофила (68).

Имуносупресивни цитокини (TGF-beta, IL-10) које продукују туморске ћелије инхибирају имунски одговор и индукују развој регулаторних Т лимфоцита који, директним ћелијским контактом и секрецијом цитокина, инхибирају тумор-специфичне Т лимфоците (69).

1.2.2.9. Карактеристике које омогућавају преживљавање малигних ћелија („enabling characteristics”)

Претходно дефинисане карактеристике малигних ћелија представљају стечене функционалне способности које овим ћелијама омогућавају преживљавање, пролиферацију и ширење, при чему су ове функције стечене у различитим типовима тумора, различитим механизмима и у различитим временским тачкама током вишестепене туморогенезе. Њихов развој омогућен је путем две карактеристике (енг. *enabling characteristics*): геномске нестабилности и инфламације (41).

Колико ће карактеристика туморска ћелија стећи, у великој мери зависи од сукцесивних измена у геному неопластичне ћелије. Једноставно речено, одређене генетске мутације доприносе селективној предности одређених субклонова ћелија, омогућавајући им адекватан раст и доминацију у локалном ткивном окружењу, у односу на субклонове ћелија осталих генотипова. Сходно томе, прогресија тумора се може посматрати као сукцесивна клонска експанзија, при чему је свака покренута са шансом да се развије одговарајућа мутација генотипа која ће омогућити доминантност и раст. За ћелије канцера је карактеристичан раст стопе мутација, па ћелија стиче одговарајући спектар мутираних гена, који су неопходни за туморогенезу. Овај раст постиже се путем повећања осетљивости на мутагене агенсе, путем оштећења механизма који поправљају оштећења генома, или оба. Поред тога, акумулација мутација може бити убрзана компромитовањем система надзора, тумор супресора p53, који у нормалним условима прати интегритет генома, те у генетички оштећеним ћелијама индукује процес апоптозе или сенесценце.

Од 2000. године јављају се докази који указују да инфламаторни одговор усмерен против тумора, има неочекивани, парадоксални ефекат на напредовање туморогенезе и прогресију тумора. Инфламација може допринети развоју вишеструких карактеристика малигнућ ћелија испоручивањем биоактивних молекула у микросредину тумора, укључујући факторе раста који одржавају пролиферативну сигнализацију, факторе преживљавања који ограничавају ћелијску смрт, проангиогенетске факторе, и екстрацелуларне ензиме који модификују матрикс и на тај начин олакшавају ангиогенезу, инвазију и метастазу. Додатно, инфламаторне ћелије су способне да ослободе хемикалије, попут реактивних кисеоничних врста, које су мутагене за околне ћелије, што убрзава њихову генетичку еволуцију ка малигнућ стању (70).

1.3. Антинеопластици

Антинеопластици су лекови који се користе у терапији примарних тумора али и за контролу дисеминованих болести. Деценијама је цитотоксична хемиотерапија коришћена у комбинацији са зрачењем, као стандардна терапија у третману широког опсега неоплазми. Код пацијената са локализованим карциномом ова терапија коришћена је као неoadјувантна (пре хирушке инцизије туморског ткива), као адјувантна (након хирушке инцизије) или као дефинитивна (без хирушког одстрањења тумора) (71). Сваки вид терапије показао се као прилично ефикасан када су у питању локализовани тумори. Дефинитивна терапија, комбинација хемиотерапије и зрачења показала је ефикасност у ерадикацији примарног тумора карцинома врата, главе и почетног стадијума карцинома плућа (72,73). Међутим, када су у питању пацијенти са метастазама, хемиотерапија и зрачење се користе како би се успорила прогресија болести и/или за палијативно збрињавање пацијента.

Већина лекова који су данас у употреби делује антипролиферативно, на процес ћелијске деобе, док не поседује специфично инхибиторно деловање на губитак диференцијације, на инвазивност и могућност метастазирања. Обзиром да је главни ефекат ових лекова усмерен на деобу ћелије, они инхибирају и раст нормалних ћелија које се брзо деле, услед чега се јављају бројни нежељени ефекти:

- Мијелосупресија- токсични ефекти на костну срж, при чему долази до смањеног стварања леукоцита, самим тим је и отпорност на инфекције смањена;
- Мучнина и повраћање;
- Алопеција-губитак косе;
- Отежано зарастање рана;
- Стерилност;
- Тератогеност.

Основни антиканцерски лекови могу се поделити у неколико група, у зависности од механизма деловања (74):

1. Цитотоксични лекови делују различитим механизмима и у њих спадају:

▪ Алкилирајући агенси садрже алкилну групу која ствара ковалентне везе са нуклеотидима у ДНК. Долази до стварања карбонијум јона који је веома реактиван и може реаговати са амино-, хидроксилним- или сулфхидрилним групама. Већина алкилирајућих агенаса су бифункционални, у стању су да реагују са две групе, доводећи до стварања веза унутар ланца или између два ДНК ланца. Као крајњи ефекат долази до поремећаја у транскрипцији и репликацији, што представља основу антиканцерског деловања алкилирајућих агенаса. У ову групу лекова спадају азотни пливаци (циклофосфамид, естрамустин, мелфалан, хлорамбуцил), деривати нитрозоуреје (ломустин, кармустин, бисулфан), цисплатин, карбоплатин и дакарбазин.

▪ Антиметаболити су антинеопластици који утичу на биосинтезу нуклеинских киселина. Могу деловати тако што се компететивно везују за везујуће место на ензимима који учествују у есенцијалним биосинтетским процесима. Такође, могу се инкорпорирати у нуклеинске киселине, што инхибира нормалну функцију нуклеинских киселина и покреће процес апоптозе. У ову групу спадају антифолати (метотрексат), аналози пиримидина (флуороурацил, цитарабин, гемцитабин) и аналози пурина (флударабин, митоксантрон).

▪ Цитотоксични антибиотици свој ефекат постижу директним деловањем на ДНК. У ову групу спадају антациклини (доксорубицин, митоксантрон), који делују на ензим топоизомеразу II, што за последицу има заустављање читавог процеса репликације. Поред антациклина, овој групи припадају и дактиномицин, блеомицин, хидроксикарбамид.

- Деривати биљака попут винка алкалоида (винкрестин, винбластин), таксана (паклитаксел, доцетаксел) и кампотецина (иринотекан и топотекан), који делују стабилизацијом микротубула или деловањем на ензим топоизомеразу II, слично доксорубицину.

2. Хормони се као антинеопластици користе у терапији хормон-зависних тумора. Раст тих тумора може бити инхибиран хормонима супротног деловања, лековима који инхибирају синтезу хормона или одговарајућим антагонистима. Хормонски представници ове групе лекова су глукокортикоиди који се користе у терапији лимфома и леукемија, естрогени који се користе у терапији хормон-зависних тумора простате и дојке, као и прогестагени који су нашли примену у терапији карцинома ендометријума и бубрега. Од антагониста хормона у употреби су анти-естрогени и анти-андрогени (бикалутамид) (75), док се од инхибитора користе инхибитори синтезе хормона надбубрега који су показали ефикасност у терапији карцинома дојке код жена у менопаузи (37).

3. Имунотерапија налази све већу примену у третману малигнитета.

Концепт имунотерапије као модалитета за лечење рака препознат је пре више од сто година. Сазнања о основним антиканцерским одбамбреним механизмима, као и развој биотехнологије, допринели су развоју имунотерапије и њеној све већој примени. Овај вид терапије односи се на примену агенаса који поседују антитуморско деловање а представљају саставни део имунског система, или подстичу антитуморски одбамбрени механизам организма. Управо у зависности од начина на који се постиже промена имунског статуса у организму, имунотерапија се грубо може поделити на активну и пасивну.

Активна имунизација подразумева примену супстанци који подстичу имунски систем организма. Може се поделити на специфичну, која обухвата вакцине туморским

ћелијама или њиховим компонентама, док се неспецифична активна имунизација односи на употребу модулятора, односно фактора који на неспецифичан начин подстичу антитуморску имунску реакцију, попут *BCG* вакцине, неких вируса, хемикалија и индуктора интерферона. Вакцина која се користи за превенцију карцинома цервикса представља пример вакцине која се показала веома успешном, и у Великој Британији се у оквиру скрининг програма примењује код девојчица старости између 12 и 13 година. Велика ефикасност ове вакцине постиже се захваљујући способности да спречи инфекцију организма хуманим папилома вирусом типа 2, који је у 70% случајева узрочник ове врсте канцера, пре него директним антитуморским ефектом код већ оболелих пацијената (76).

Пасивна имунотерапија се заснива на употреби компоненти имунског система, које могу бити антиген-специфичне (моноклонска антитела) или неспецифичне (цитокини или ћелије). Имуни систем се, поред активне и пасивне имунизације, може искористити и за постизање индиректног антитуморског ефекта, инхибицијом есенцијалних фактора раста (*growth factor*, GF) као и ангиогенетских фактора.

Први пут је 1960.године примећено да туморске ћелије експримирају антигене, те би на основу ове карактеристике терапија антигенима могла бити ефикасна. Иницијални покушаји показали су ограничену ефективност, али је проналазак све већег броја тумор-специфичних антигена, као и технолошки развој, утицао на то да је данас број антитела који се користе у терапији канцера у порасту. Успешна терапија започета је употребом анти-CD20 моноклонског антитела ритуксимаба у терапији лимфома и леукемије (77). Након тога уследила је употреба транстузумаба, рекомбинантног анти-*erb2* моноклонског антитела, у терапији *HER2*-позитивног карцинома дојке (78,79), а потом и цетуксимаба, који представља антитело за рецептор епидермалног фактора раста, и примењује се у терапији колоректалног карцинома (80). Један од најзначајнијих стимулатора ангиогенезе је васкуларни ендотелни фактор раста, VEGF (*vascular endothelial growth factor*), познат и као васкуларни фактор пермеабилности. Рекомбинантно хуманизовано анти-VEGF

моноклонско антитело, бевацизумаб (*AvastinTM*) одобрено је од стране FDA (*Food and Drug Administration*) као прва линија терапије метастатског колоректалног карцинома у комбинацији са хемиотерапеутицима. Показано је да, у комбинацији са стандардном терапијом једињењима платине код пацијената оболелих од карцинома јајника и дојке повећава преживљавање без прогресије болести (81). Могућа комбинована употреба бевацизумаба и хемиотерапеутика првог избора у терапији неситноћелијској карцинома плућа тренутно је у фази клиничких испитивања, а досадашњи резултати су обећавајући, посебно код пацијената са метастазама на централном нервном систему (82,83).

Моноклонска антитела своје ефекте постижу различитим механизмима: директном индукцијом апоптозе у малигним ћелијама преко површинских рецептора, или деловањем на кључне елементе туморских ћелија, које су неопходне за њихов опстанак, попут васкуларних или ћелија строме. На крају, могу активирати ћелијску цитотоксичност посредовану антителима, или блокирати путеве којима је инхибиран имунски одговор, те на тај начин повећати убијање туморских ћелија посредовано имунским системом (84).

Интерлеукин 2 (IL-2) и интерферон алфа (INF α) користе се као антиген-независна, неспецифична терапија са циљем да побољшају имунски систем. IL-2 је протеин кога секретују углавном стимулисане CD4⁺ Т ћелије, али и CD8⁺ Т лимфоцити, НК и дендритске ћелије. Поред ефекта који испољава на пролиферацију и диференцијацију CD4⁺ и CD8⁺ ћелија, овај цитокин покреће, олакшава и појачава имунски одговор, те је широко проучаван у области туморске имунологије. Открића из ове области утицала су на то да IL-2 постане једна од главних компоненти садашње имунотерапије меланома и карцинома реналних ћелија (76,85).

Интерферон алфа (INF α) користи се у терапији хематолошких малигнитета, реналног канцера и узрапредовалог меланома. Поред директног антипролиферативног дејства које има, доводи до активације НК ћелија и макрофага и повећава експресију МНС молекула прве класе. Показао је активност и у терапији Капошијевог саркома, бројних

лимфома и леукемије власстих ћелија (86). Захваљујући свом утицају на диференцијацију, пролиферацију и имуномодулацију, у истраживањима се показао као потентан агенс у спречавају интравазације и екстравазације, самим тим и у превенцији дисеминованог ширења канцерских ћелија, односно у превенцији настанка метастаза (71,87). Одобрена је употреба INF α као адјувантне терапије која прати ресекцију код високо ризичног меланома стадијума 2 и 3, где је показано да смањује стопу рецидива, али није показао сличну доследност на побољшање преживљавања. Управо због недостатка убедљивих доказа о побољшању преживљавања, а значајних нежељених ефеката, његова употреба у Европи је ограничена (76).

Адоптивна ћелијска терапија представља експериментални терапијски приступ који се заснива на трансферу сопствених активираних имунских ћелија у организам оболелог. Из тумора оболеле особе врши се изолација TIL-а (*Tumour Infiltrating Lymphocytes*), након чега се лимфоцити култивишу у *in vitro* условима и врши се њихова експанзија помоћу IL-2, а потом се врши ре-инфилтрација ових лимфоцита натраг у пацијента, уз одговарајући третман којим се обара број лимфоцита оболелог (хемотерапијом или комбинацијом хемотерапије и радиотерапије). Стопа одговора на терапију је 50-70% код метастатског меланома, у зависности од тога која метода за снижавање лимфоцита је коришћена (76). TIL углавном чине Т ћелије са хетерогеним фенотипом, при чему већина ефекторских и меморијских ћелија поседује способност препознавања тумор-специфичног антигена. Први пут је инфузија Т ћелија спроведена од стране Розенберга 1986.године, у терапији саркома и аденокарцинома колона (88). Данас је овај вид терапије предмет бројних клиничких испитивања, и ради се на стратегијама којима би се повећао антитуморски ефекат и превазишле препреке, попут добијања довољно великог ткива тумора за изолацију инфилтрата. Генерално, употреба адоптивне Т ћелијске терапије дала је веома значајне клиничке резултате код пацијената са

метастатским меланомом, али шира примена овог приступа за сада је недостижна, услед сложености самог приступа (89).

Употреба хемиотерапеутика показала је ограничену ефикасност у терапији карцинома, јер осим бројних нежељених ефеката које узрокују, могу довести и до развоја резистенције на ове лекове (*multidrug resistance*, MDR). До резистенције најчешће долази услед развоја механизма којим туморске ћелије избегавају апоптозу, али и смањењем транспорта лека кроз мембрану, изменом циљног молекула или измењеном експресијом ензима који метаболишу лек, што доводи до смањене активације или убрзане деградације лека (90).

Истраживања су усмерена ка развоју једног лека за сваки тип карцинома, али је развој комбиноване терапије стратегија која обећава највећи степен преживљавања пацијената. Стога је највећи труд уложен у проналажење алтернативних путева који ће стимулисати индукцију апоптозе и смањити развој резистенције на ове лекове (91).

1.4. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус представља низ сложених биолошких, генетски програмираних процеса, који доводе до дупликације генетичког материјала и равномерне дистрибуције у ћелијама- потомцима. Обухвата све промене до којих долази приликом ћелијске деобе, као и период између две деобе. Период у коме долази до репликације ДНК назива се S фаза (S=синтеза), док се период деобе ћелије (митоза) назива М фаза. Између ових фаза налазе се фазе G1 и G2, током којих ћелија прима информације из унутрашње и спољашње средине о томе да ли постоје задовољавајући услови за пролазак кроз ћелијски циклус. Неке ћелије могу направити паузу током G1 фазе и тада се ова фаза означава као G0 фаза или фаза мировања, и у овој фази ћелија нормално функционише данима, месецима или годинама. У регулацији ћелијског циклуса важну улогу имају контролне тачке (енг.

"checkpoints") и координирана активност циклина, циклин зависних киназа и инхибитора циклин зависних киназа (92,93).

Циклини припадају групи структурно сличних протеина који се циклично синтетишу и деградирају током различитих фаза ћелијског циклуса, по чему су и добили назив. Након синтезе, формирају комплекс циклин-*Cdk* који фосфорилацијом циљних протеина индукује процесе у ћелијском циклусу. Циклин зависне киназе (*cyclin dependent kinases*, *Cdks*) припадају фамилији серин/треонин киназа, и њихова активност, попут циклина, расте и опада током ћелијског циклуса. Ови ензими фосфорилишу циљне молекуле, на тај начин узрокујући њихову активацију или инхибицију, чиме регулишу кључне догађаје у репликацији генетичког материјала и ћелијској деоби. Током ћелијског циклуса, активност *Cdk* модулишу инхибитори циклин зависних киназа (*cyclin dependent kinase inhibitors*, *CDIs*). Две различите фамилије ових инхибитора су присутне: *INK4* којој припадају *p15*, *p16*, *p18* и *p19* (инхибира *cdk4* и *cdk6*), и фамилија *CIP/Kip* којој припадају *p21*, *p27* и *p57* (инхибира *cdk*-циклин комплекс) (94).

Везивање фактора раста за рецепторе представља подстицај за почетак ћелијског циклуса. Ови фактори везују се за трансмембранске рецепторе (тирозин киназе или киназе везане за рецепторе), који сигнале преносе на цитоплазматске протеине, а то узрокује ослобађање транскрипционих фактора унутар једра и покретање ћелијског циклуса (95).

1.4.1. G1/S фаза ћелијског циклуса

G1 фаза ћелијског циклуса је најдужа фаза, током које је ћелија доступна на деловање сигнала из спољашње средине. Ову фазу карактерише интензивна синтеза свих протеина који ће имати градивну улогу, али и ензима, рецептора, регулаторних протеина. Током ове фазе долази до транскрипције структурних протеина, као и синтезе нуклеотида,

градивних јединица ДНК (96). Везивањем фактора раста за рецепторе преноси се сигнал за започињање ћелијског циклуса. Најпре долази до синтезе циклина D, који се синтетише све док постоји стимулација из спољашње средине. Како фаза G1 одмиче, тако расте ниво овог циклина који свој максимум достиже на крају G1 фазе. Циклин D са Cdk4 и Cdk6 гради комплексе, који узрокују фосфорилацију протеина ретинобластома (pRb) (97). У хипофосфорилисаном стању, pRb везује и инхибира E2F-1, транскрипциони фактор, чији су циљни гени регулатори ћелијског циклуса, циклин A и циклин E, као и ензими потребни за репликацију ДНК (98,99).

Хиперфосфорилацијом долази до конформационих промена протеина Rb и последичног ослобађања овог транскрипционог фактора. Циклин E се синтетише и формира комплекс са Cdk2, што доводи до додатне фосфорилације pRb, што представља рестрикциону тачку и одређује да ли ћелија прелази у S фазу (100). Уколико ћелија пређе ову тачку, прелази у S фазу у којој долази до репликације (синтезе) ДНК, као и хистона који улази у састав хромозома. За разлику од G1 фазе, S фаза траје кратко, јер су ланци ДНК расплетени (101).

Уколико нису испуњени сви услови за успешну деобу, доћи ће до заустављања циклуса и до активације контролних механизма (*G1 checkpoint*). Током G1 фазе може доћи до оштећења ДНК услед зрачења, деловања хемијских, физичких агенаса или оксидативног стреса (102).

Уколико је до оштећења ДНК дошло током G1 фазе, повећава се активност транскрипционог фактора p53. Активирани p53 повећава синтезу p21, који инхибира комплексе циклина и циклин зависних киназа формираних током G1 фазе, и на тај начин узрокује застој ове фазе ћелијског циклуса. Такође, под утицајем p53, активирају се репаративни механизми, који током застоја поправљају настало оштећење. Уколико је оштећење неповратно, p53 активира гене, који учествују у индукцију апоптозе. Апоптоза се може покренути путем Fas рецептора, као и преко Bcl-2 фамилије протеина (103-105).

1.4.2. G2/M фаза ћелијског циклуса

G2 фаза је постсинтетички период, у коме је број хромозома дуплиран, па у овој фази долази до дуплирања и осталих компоненти ћелија, како би се могле одвојити две ћерке ћелије. Синтетишу се такође и неопходни протеини, као и РНК. Комплекс циклина А и Cdk2, као и комплекс циклина В и Cdk1, који су активни током G2 фазе, узрокују кондензацију хромозома и распад мембране једра, па су значајни за прелазак друге рестрикционе тачке и улазак у М фазу (106). Повећањем активности ових комплекса циклина-Cdk, долази до формирања деобног вретена и причвршћивање центромера за нити деобног вретена. APC (*Anaphase-promoting complex*) је ензимски комплекс убиквитин лигазе, који узрокује раздвајање хроматида. Доводи до разградње циклина и инактивације циклин зависних киназа, што за последицу има дефосфорилацију циљних протеина, и завршетак митозе (107,108).

Уколико је дошло до дефекта у хромозомима, активира се G2 контролна тачка, која доводи до супресије активности циклин В/Cdk1. Серин/треонин киназе Chk1 и Chk2 активирају се уколико се јави геномска нестабилност (109). Активација Chk2 захтева двоструки прекид ланца ДНК, док је активност Chk1 ограничена на S и G2 фазу (110). Када се јави абнормалност хромозома, активира се Chk1, која фосфорилизује и на тај начин инактивира, фосфатазу Cdc25, чија је функција да дефосфорилизује Tyr15 резидуу на Cdk1. Као резултат ове интеракције, супримирана је активација Cdk1, самим тим и настанак комплекса циклин В/Cdk1 (111). Показано је да и протеин p53, путем транскрипције p21 протеина, учествује у заустављању ћелијског циклуса у G2 фази, заустављањем синтезе циклина В и Cdk1 (112).

Након поправке оштећења, окончава се G2 контролна тачка и ћелија наставља ка митози, а уколико оштећење није исправљено долази до активације апоптотских механизма, при чему ће ћелија завршити свој животни циклус (113).

1.5. Механизми ћелијске смрти

Ћелијска смрт је кључни процес током развоја, хомеостазе и имунске регулације организма, а поремећаји овог процеса налазе се у основи бројних патолошких поремећаја. Током развоја, апоптоза игра значајну улогу у процесу ремоделовања ткива, те је круцијална у одржавању хомеостазе организма. Дисрегулација овог процеса може резултовати развојем бројних поремећаја. Избегавање апоптозе од стране ћелија води ка развоју неопластичних и аутоимунских болести. Прекомерна или неодговарајућа апоптоза, са друге стране, доприноси развоју неколико болести попут сепсе, шлога, инфаркта миокарда, исхемија, неуродегенеративних болести и дијабетеса (114).

Kroemer и сарадници су 2009.године класификовали ћелијску смрт (115):

- На основу морфолошких промена;
- На основу ензимолошких карактеристика;
- На основу функционалних аспеката;
- На основу имунолошких карактеристика;

Најчешће коришћена подела је подела према променама у морфологији ћелије, на основу које се типови ћелијске смрти могу класификовати на апоптозу, некрозу, аутофагију и митотичку катастрофу.

Класификација ћелијске смрти на основу ензимолошких карактеристика, односи се на дефинисаност типа ћелијске смрти према ензимима који су укључени у овај процес (каспазе, калпани, катепсини или трансглутаминазе). Подела на основу функционалних аспеката извршена је на основу чињенице да ли је ћелијска смрт наступила случајно или је у питању програмирана ћелијска смрт, као и да ли је у питању патолошка или физиолошка

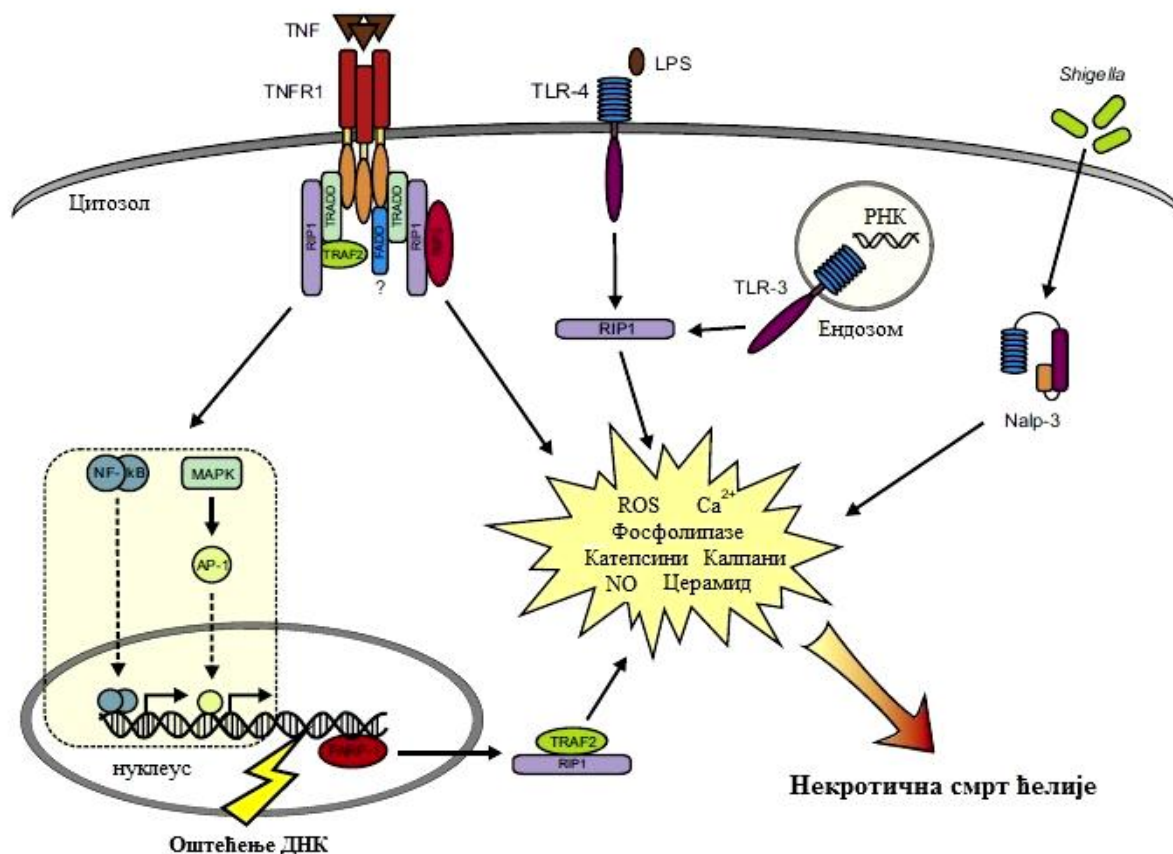
смрт ћелије. Када су у питању имунолошке карактеристике, смрт ћелије може бити имуногена или неимуногена, на основу чега је могуће извршити класификацију (116).

1.5.1. Некроза

Током веома дугог временског периода, сматрало се да је некроза вид ћелијске смрти који се јавља неконтролисано и случајно, најчешће у патолошким условима, попут исхемије која може довести до оштећења унутрашњих органа (117) или услед физичких оштећења, попут хипертермије (114). Међутим, последњих деценија, постало је евидентно да у одређеним стањима, некроза настаје као резултат стриктно регулисаних процеса, који су иницирани различитим стимулусима, а независни од деловања каспаза. Овај вид некрозе, који је на неки начин регулисан, попут апотозе, назива се некроптоза (118).

Бројни механизми могу покренути процес некрозе, попут активације рецептора смрти, препознавање патогених антигена или оштећења ДНК молекула. Код већине ћелија, везивањем лиганда за рецептор смрти (TNF-R1, Fas/CD95, DR3, DR4, DR5 и DR6) долази до покретања процеса апоптозе, који је посредован каспазама. Уколико је активација каспаза ометена, може доћи до покретања процеса некрозе који ће елиминисати оштећену ћелију (119). Везивање TNF лиганда за TNF-R1 води ка формирању RIP1-RIP3 про-некротичног комплекса, чија је стабилност и способност да индукују некрозу условљена киназном активношћу оба ова адаптерна протеина. Уколико је путем рецептора смрти покренут процес апоптозе, формирање комплекса је инхибирано од стране каспазе 8, самим тим је супримиран и процес некрозе. Поред рецептора смрти, рецептори који препознају патогене такође могу покренути процес некрозе. Ови рецептори припадају фамилији *Toll-like* рецептора (TLRs), *NOD-like* рецепторима цитозола и *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like* рецепторима (RLRs) (120). Они препознају антигене бактерија или вируса, попут LPS-а или флагелина и доводе до

покретања имунског одговора и/или ћелијске смрти процесом некрозе (121). Такође, интензивно оштећење ДНК доводи до хиперактивације ензима *PARP-1* (*poly-(ADP-ribose)polymerase-1*), који учествује у процесу поправке ДНК, а хиперактивација води ка иреверзибилном паду ћелијске енергије и последично ка некротичној смрти ћелије (122).



Слика 2. Шематски приказ сигнализације у некрози. Везивање лиганда за рецептор смрти TNFR1, води ка активацији адаптерног протеина RIP1, који индукује активацију транскрипционих фактора NF-κB и AP-1. Путем RIP1 киназне активности, активира се велики број медијатора некрозе (ROS, Ca²⁺, калпани, катепсини, церамид и фосфолипазе), који могу бити активирани и услед ДНК оштећења (114).

Након иницијалне сигнализације и покретања овог процеса, у ћелији долази до бројних промена, укључујући и промене у нивоима медијатора који су укључени у сам процес некрозе, попут реактивних медијатора кисеоника (ROS), калцијумових јона, калпана, катепсина, церамида и фосфолипаза (Слика 2.) (123). Оксидативни стрес

посредован реактивним медијаторима кисеоника доводи до деструкције макромолекула, укључујући ДНК, липиде и протеине, док деградација незасићених масних киселина нарушава интегритет мембране ендоплазматског ретикулума и лизозома па долази до цурења јона калцијума и лизозомалних протеаза у цитозол. Повећање интрацелуларне концентрације калцијума води ка стварању пора у мембрани митохондрија и нарушавања интегритета њене мембране, па се митохондријални матрикс такође излива у цитоплазму (124). Активирају се фосфолипазе и протеазе, које даље разграђују фосфолипиде и протеине, и тако додатно потенцирају некротичну смрт ћелије. На крају, оштећење плазма мембране доводи до изливања целокупног садржаја у околно ткиво, што у овом ткиву узрокује инфламаторну реакцију и оштећење.

Физиолошки значај некрозе је веома велики. Иако је апоптоза незаобилазна за ремоделовање ткива приликом ембриогенезе, некроза је у извесним условима може заменити, у циљу отклањања оштећених ћелија. Овај тип смрти ћелије укључен је у физиолошки значајне процесе, попут овулације, смрти хондроцита, што је у вези са уздужним растом костију, као и ремоделовање ћелија унутар танког и дебелог црева (125). Још једна значајна улога некрозе огледа се у улози приликом активације индуковане ћелијске смрти Т лимфоцита, до које долази након имунског одговора, како би се број ових ћелија редуковао (126). Такође, као вид ћелијске смрти, некроза је присутна и приликом инфекције различитим патогенима, попут ХИВ вируса, вируса Западног Нила, Коксаки Б вируса (127,128). Међутим, некроза која се јавља у физиолошким условима, посматра се заједно са апоптозом, и сматра се да овај тип ћелијске смрти у физиолошким условима представља подршку апоптози и никада није једини пут елиминације ћелија (129).

У поређењу са апоптозом, преузимање и уклањање некротичних ћелија спорије је и дешава се тек након ерупције плазма мембране. Као резултат, некротичне ћелије

изливањем садржаја у околно ткиво иницирају проинфламаторни одговор, попут секреције проинфламаторног цитокина IL-6 (130).

1.5.2. Апоптоза

Термин апоптоза је употребљен први пут 1972.године да опише вид ћелијске смрти коју прате карактеристичне морфолошке промене (131). Од тада је интензивно проучавана, тако да су путеви активације и механизми данас добро окарактерисани.

Као облик програмиране ћелијске смрти, апоптоза служи за елиминацију појединачних ћелија које су окружене нормалном ћелијском популацијом. Процес апоптозе је непрекидно присутан у организму, што омогућује нормалан раст, развој и одржавање хомеостазе, будући да је смрт индивидуалних ћелија неопходна за одржавање равнотеже у живим системима. Такође се јавља као механизам одбране у имунским реакцијама, или када су ћелије оштећене услед болести или деловања неког токсичног агенса (132). У питању је генетски контролисан процес, за који је неопходна активна синтеза макромолекула, и током кога ћелија активно учествује. Молекуларни механизми који регулишу процес апоптозе, функционално су повезани са механизмима који контролишу ћелијски циклус, пролиферацију ћелије и геномску стабилност. Под дејством различитих физичких и хемијских агенаса може доћи до оштећења ДНК молекула, што доводи до заустављања ћелијског циклуса и активације репаративних механизма. У зависности од врсте и степена оштећења, ћелија може наставити прогресију кроз ћелијски циклус, уколико дође до поправке ДНК, или покренути механизме који ћелију воде у апоптозу, уколико су настала оштећења неповратна. Поремећаји у контроли ћелијског циклуса или процеса апоптозе налазе се у основи бројних болести, укључујући и малигне болести.

1.5.2.1. Морфолошке карактеристике апоптозе

Током процеса апоптозе дешавају се различите морфолошке промене, које се јављају одређеним редоследом. Како је апоптоза процес који захвата појединачне ћелије, прва промена односи се на губитак међућелијских веза. Услед кондензације цитоплазматских протеина, смањује се волумен ћелије. Хроматин се најпре кондензује, па се јавља пикноза (скупљање једра), а потом деградира, услед чега једро добија изглед потковице (133). Молекул ДНК најпре бива фрагментисан на фрагменте дужине 50-300kb, услед деловања ендонуклеаза, а потом и на олигонуклеозоме дужине 180-200bp (134). Ову деградацију ДНК могуће је детектовати електрофоретском анализом, када на агарозном гелу ДНК показује карактеристичан лествичаст изглед (135). Цитохром Ц се ослобађа из митохондрија, а ендоплазматски ретикулум подлеже дилатацији. Јавља се балонирање (енг. *blebbing*) плазма мембране које је праћено цепањем једра и формирањем апоптотичних тела. Она представљају мале фрагменте, окружене мембраном, у чијој унутрашњости се налазе делови цитоплазме са морфолошки очуваним органелами и деловима нуклеуса. Ова апоптотична тела накнадно ће фагоцитовати суседне ћелије и професионални фагоцити (макрофаги и дендритске ћелије) и биће деградирана у фаголизозомима. Очуваност мембране у процесу апоптозе спречава изливање ћелијског садржаја, па не долази до имфламације интерстицијалног ткива, која је присутна код некрозе (136).

1.5.2.2. Биохемијске карактеристике апоптозе

Поред морфолошких промена, током процеса програмиране ћелијске смрти долази и до бројних биохемијских промена. Веома важна карактеристика је синтеза макромолекула који активно учествују у овом процесу, пре свега ензима. Они могу бити

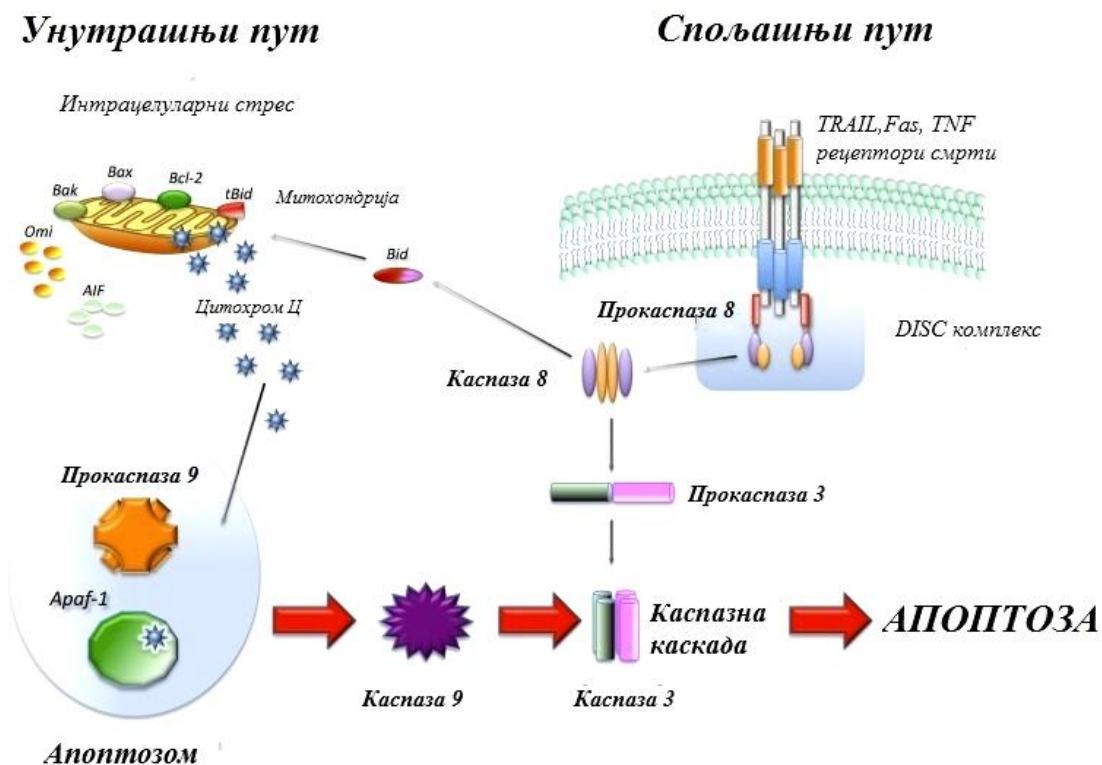
новосинтетисани, или активирани из проензимске форме, након што је ћелија примила сигнал за отпочињање апоптозе. Каспазе су ензими, високо специфичне протеазе, које у свом активном месту садрже цистеин и делују селективно иза аспартата у протеинима. Експримиране су у неактивној форми у виду проензима, а активирају се одвајањем мање од веће субјединице, које се након одвајања спајају у хетеродимере. Једном активирана каспаза може активирати остале каспазе, и на тај начин покренути протеазну каскаду, која је иреверзибилна. Каспазе које се прве активирају су иницијаторске (у неактивној форми прокаспазе 2, 8, 9 и 10), при чему оне активирају егзекуторске каспазе (прокаспазе 3, 6 и 7). Каспазе делују на кључне протеине ћелије, попут оних које регулишу апоптозу, као и на ензиме који регулишу ћелијски циклус или су укључени у поправку оштећења ДНК (106).

Један од првих догађаја у процесу апоптозе је инверзија фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну плазма мембране, што ће омогућити препознавање апоптотичних ћелија и апоптотичних тела од стране фагоцита (137). Анексин V је протеин који се снажно везује за фосфатидилсеринске остатке на површини ових ћелија, и користи се као маркер за детекцију апоптозе.

1.5.2.3. Механизми апоптозе

Досадашња истраживања показују да сигнали пореклом из спољашње средине могу да активирају један од два основна пута апоптозе: спољашњи пут, који се покреће активацијом рецептора смрти, и унутрашњи митохондријални пут (Слика 3.) (138,139). Крајњи резултат активације и спољашњег и унутрашњег пута је активација великог броја интрацелуларних протеаза (нарочито каспаза) и ендонуклеаза, које доводе до деградације целуларног садржаја.

Директним везивањем лиганда за рецепторе на спољашњој мембрани ћелије, рецепторе смрти (Fas, TNF и TRAIL рецептори), активира се спољашњи пут апоптозе. Спољашњи пут може се активирати и деловањем ензима као што су перфорин и гранзим Б. Интеракција лиганд/рецептор индукује регрутацију неколико адаптерних протеина и проензима (прокаспазу 8 и 10) на интрацелуларни домен рецептора, при чему се формира комплекс DISC (*death inducing signaling complex*). Комплекс активира каспазе 8 и 10 из проензимских форми, које покрећу протеолитичку каскаду активацијом егзекуторских каспаза 3, 6 и 7. Уколико сигнал који потиче са рецептора није довољно јак, покреће се митохондријални пут, чија је функција да амплификује почетни сигнал. Активација каспазе 8 и 10 узрокује активацију Bid протеина, који се транслоцира до спољашње стране митохондријске мембране, где са другим проапоптотичним члановима Bcl-2 фамилије, (Bak и Bax) узрокује ослобађање цитохрома Ц и других проапоптотичних протеина у цитозол. Цитохром Ц учествује у формирању апоптозома у цитоплазми, и активацији каспазе 9, која затим доводи до активације ефекторских каспаза, попут каспазе 3 (140).



Слика 3. Спољашњи и унутрашњи пут активације апоптозе

Поред тога што играју значајну улогу у појачању сигнала са рецептора, митохондрије имају централну улогу у ширењу апоптотичних сигнала који потичу из унутрашњости ћелије, услед оштећења ДНК, оксидативног стреса, недостатка фактора раста или деловања хемиотерапеутика (141,142). Ови сигнали доводе до повећавања пермеабилности мембране митохондја, па долази до отпуштања митохондијалних протеина у цитозол, укључујући проапоптотичке факторе попут цитохрома Ц, SMAC/DIABLO активатора каспаза, фактора индукције апоптозе (*apoptosis inducing factor*, AIF) и ендонуклеазе Г, који заједно узрокују активацију каспаза и деградацију хроматина. Цитохром Ц се везује за адаптерни протеин Araf-1 (*Apoptosis protease-activating factor*) и прокаспазу 9, при чему се ствара апоптозом, комплекс који активира каспазу 9 из неактивне форме. Активна каспаза 9 активира ефекторску каспазу 3, која даље активира нисходну каскаду каспаза, а резултат су описане морфолошке промене (143,144).

1.5.2.4. Регулација процеса апоптозе

У регулацију апоптозе је укључен велики број интрацелуларних протеина. Нарочито је значајна фамилија Bcl-2 протеина, која обухвата проапоптотске и антиапоптотске протеине. Протеини који покрећу процес апоптозе су проапоптотски протеини и овој групи припадају Bax и BH3-only протеини, док антиапоптотски протеини инхибирају процес апоптозе и овде се сврставају Bcl-2 и Bcl-xL (145). Сви антиапоптотични протеини поседују четири конзервираних секвенце (BH1-4 домени). Подгрупа проапоптотских протеина Bax (Bax, Bak i Bok) садржи BH1-3 домене, док BH3-only протеини (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad) имају само један домен (BH3). Протеини ове групе имају значајну улогу медијатора целуларног стреса, при чему имају два задатка:

1. Инактивацију антиапоптотских протеина

2. Активацију проапоптотских протеина

Ова два догађаја одвијају се паралелно, што резултује повећањем пермеабилности мембране митохондрија и ослобађањем цитохрома Ц у цитоплазму, активацијом каспаза и последичне апоптозе (146).

Антиапоптотски Bcl-2 протеини се налазе на спољашњој страни мембране митохондрија и остварују своју функцију тако што штите интегритет митохондријске мембране и тиме контролишу ослобађање митохондријских протеина у цитоплазму (147,148). Ови протеини инхибирају апоптозу тако што се везују за проапоптотске протеине Вах и Вак који се у облику мономера налазе на спољној страни митохондријалне мембране, и тиме спречавају њихову олигомеризацију/активацију. Стога међусобни однос ове две врсте протеина одређује да ли ће ћелија подлећи процесу апоптозе (149). Специфични апоптотични сигнал доводи до активације BH3-only протеина, који на спољној митохондријској мембрани интерагују са антиапоптотичним Bcl-2 молекулама и тако обустављају инхибицију Вах и њему сродних молекула. Измењени Вах и Вак молекули се интегришу у спољну мембрану митохондрија и олигомеризују, формирају транзиторне поре и тиме ремете интегритет мембране. Резултат је ослобађање проапоптотичних молекула из митохондрија у цитозол.

Поред Bcl-2 протеина, тумор супресорски протеин p53, као и прото-онкоген c-Myc, имају кључну улогу у апоптози (150-152). Оштећења ДНК молекула подстичу транскрипциону активност p53, који доводи до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази и покретања репаративних механизма. Уколико су оштећења непоправљива покрећу се апоптотски механизми, посредовани Fas рецепторима смрти, Bcl-2 проапоптотским протеинима и ослобађањем цитохрома Ц из митохондрија (153). Продукт прото-онкогена c-Myc је протеин c-Myc, чија повећана експресија изазива апоптозу, уколико није удружен

са мутацијама p53 гена. Прекомерна експресија c-Myc доводи до инхибиције Mdm2, главног негативног регулатора p53 гена (150). Повећана активност Mdm2 пронађена је код саркома, глиома, леукемије и канцера дојке, што имплицира да су ове ћелије успеле да заобиђу p53–зависну апоптозу, услед негативне регулације (154).

1.5.2.5. Патолошка апоптоза

Поремећаји у регулацији ћелијског циклуса и апоптозе, који доводе до прекомерне или до инхибиране апоптозе, налазе се у основи многих болести, попут канцера и неуродегенеративних болести као што су Паркинсонова болест, Алцхајмерова болест, Хантингтонова хореја и многе друге болести (155).

Туморске ћелије, у односу на нормалне ћелије, имају способност неконтролисане пролиферације и смањене апоптозе, услед поремећаја у механизмима који контролишу ове процесе. У основи ових поремећаја најчешће лежи мутација тумор супресорског гена p53, која се детектује код 50% оболелих од карцинома (156). Овај ген регулише експресију Вах i Bcl-2 протеина, па мутације доводе до експресије неактивног p53 протеина, који је изгубио способност да индукује апоптозу као одговор на настало ДНК оштећење.

Управо се због ових карактеристика, тумор супресорски p53 ген користи као прогностички фактор за канцерску терапију (157).

1.6. *Chelidonium majus*

1.6.1. Географска распрострањеност и таксономске карактеристике

Фамилија *Papaveraceae* је широко распрострањена у северној хемисфери, посебно у источној Азији и северозападној Америци (субфамилије *Hypseoideae* и *Papaveroideae*), као и у северној Африци (субфамилија *Fumarioideae*). Ова фамилија броји више од 800 врста, при чему је у западној Европи присутно свега 33, а само 7 од 42 родова, и подељена је на две субфамилије: *Papaveroideae* и *Fumarioideae*. *Chelidonium majus* је биљка која припада породици макова (*Papaveraceae*), субфамилији *Papaveroideae*, и широко је распрострањена широм света (158). Може се наћи у Европи, Азији, северозападној Африци и Северној Америци. Широко је распрострањена на територији Србије, где је позната под називима руса и росопас. Самоникла је биљка која се може наћи по двориштима, шумама или поред ограда. Коришћена је још у средњем веку, а назив је добила од грчке речи *Chelidon* (χελιδον), што значи ласта, јер биљка почиње да цвета када ласте почну да се враћају (159,160).

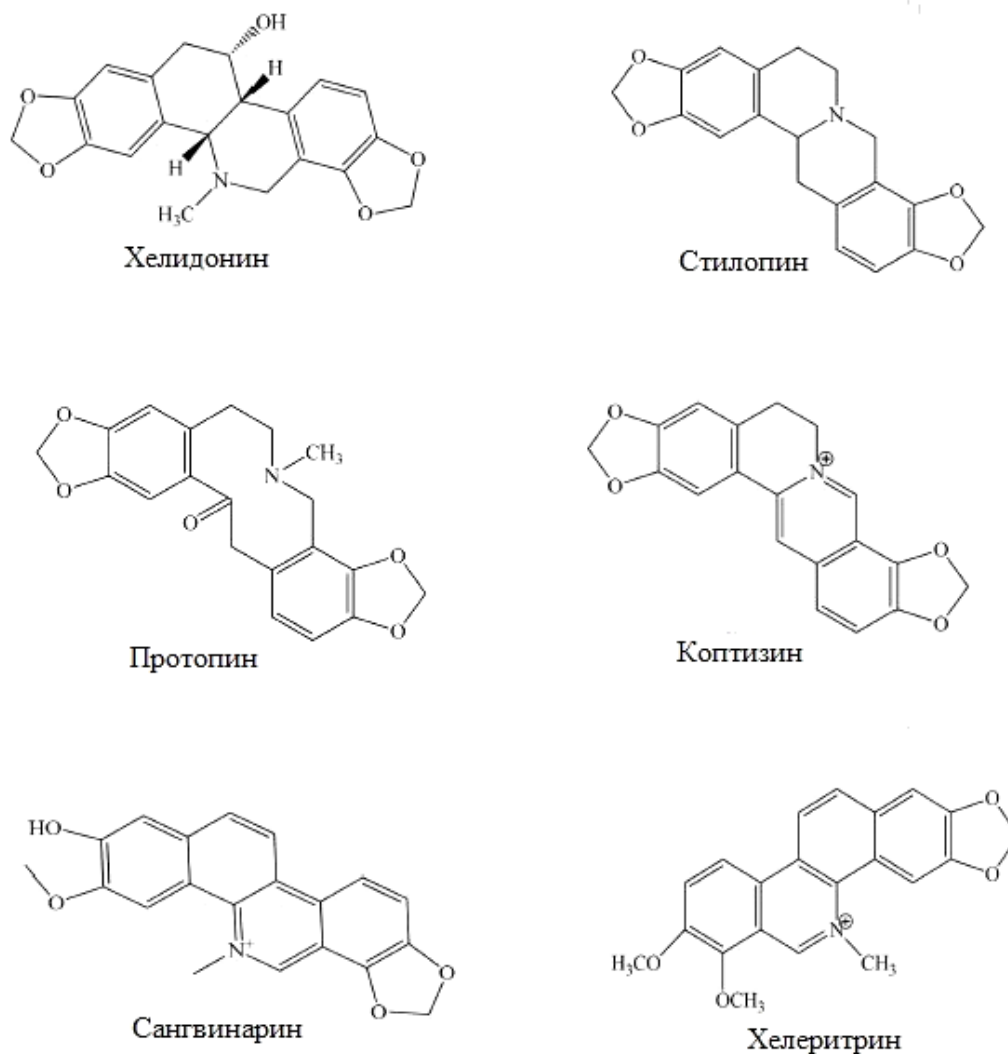


Слика 4. *Chelidonium majus*

Chelidonium majus је вишегодишња зељаста биљка усправног стабла, са листовима који су непарно перасто дељени, сиви и длакави на наличју. Доњи листови су са дршком док су горњи седећи. Цветови су сакупљени у штитасте цвасти жуте боје (Слика 4.). Биљка је препознатљива по млечно жутом соку који се налази у свим деловима биљке, укључујући и корен, и у коме се налази велики број алкалоида, захваљујући којима ова биљка поседује широки опсег фармаколошке активности (161).

1.6.2. Активни принципи

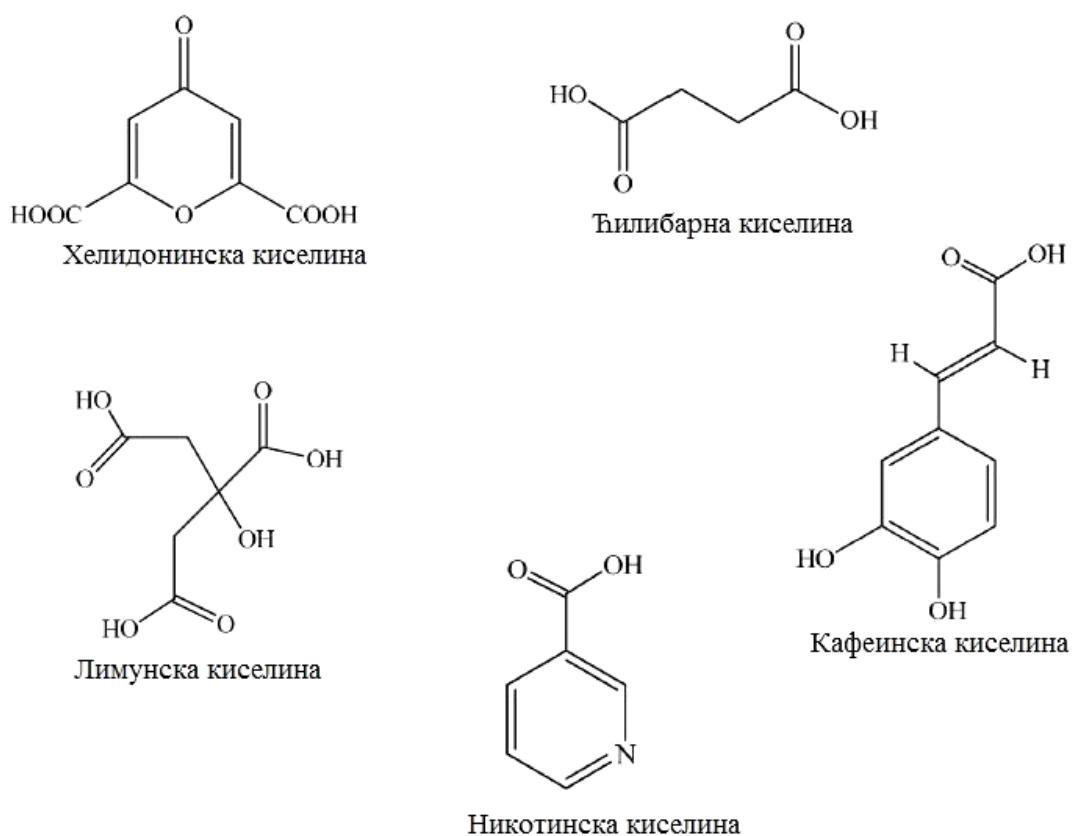
Биљни алкалоиди, једна од највећих група секундарних метаболита, представљају веома разноврсну групу хемијских ентитета. Процењено је да биљке продукују приближно 12000 различитих алкалоида са широким спектром фармаколошких активности. Без сумње спадају у најпотентније терапеутике природног порекла, и често показују значајне резултате у лечењу различитих болести и стања, како код човека, тако и код животиња (162). Класификују се на основу врсте хетероцикличног прстена у својој структури, на пирролидинске, пиперидинске, хинолинске, изохинолинске, пиридинске, деривате имидазола и индола, као и ацикличне алкалоиде (163). Изохинолински алкалоиди у свом хетероцикличном прстену поседују азот и до сада је идентификовано преко 400 различитих алкалоида ове врсте (164). Ови алкалоиди представљају главне секундарне метаболите у *Chelidonium majus*-у, где је идентификовано више од 30 врста. Могу се поделити на алкалоиде са протопинском (протопин и деривати), протоберберинском (берберин и коптизин) и бензофенатридинском структуром (хелидонин, хомохелидонин, хелеритрин, сангвинарин и њихови деривати) (Слика 5.) (165).



Слика 5. Хемијске структуре изохинолинских алкалоида

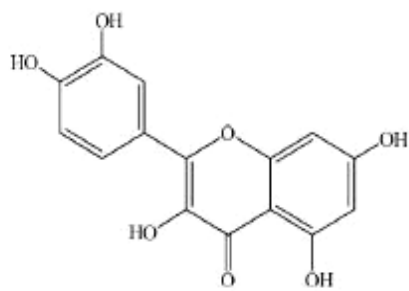
Хелидонин, берберин и коптизин су главни алкалоиди у надземном делу биљке, док су сангвинарин и хелеритрин доминантни у корену (159,161). Релативна концентрација и дистрибуција ових алкалоида зависи од више фактора, између осталог од поднебља у коме биљка расте, састава минерала и осталих нутријената у земљишту и годишњег доба. По неким ауторима типичан садржај алкалоида у надземном делу креће се од 0.5 до 1.5% (w/w) (166,167), док су *Suchomelová* и колеге (168) забележили и до 8% (w/w) алкалоида у метанолном раствору корена ове биљке. Током целокупног периода вегетације у биљци је константно присутан коптизин, док састав осталих компонената

варира током развоја биљке (169). Поред алкалоида, биљка садржи флавоноиде, сапонине, витамине (А и Ц), минералне елементе, стероле, киселине и њихове деривате (170). Од алифатичних и ароматичних киселина најзаступљеније су хелидонинска, кафеинска, лимунска киселина, ћилибарна и никотинска киселина (Слика 6.).

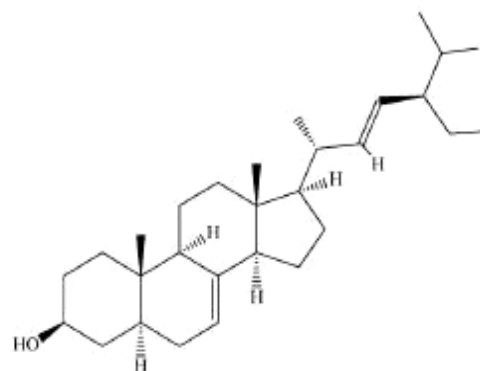


Слика 6. Структуре ароматичних и алифатичних киселина присутних у биљци *C. majus*

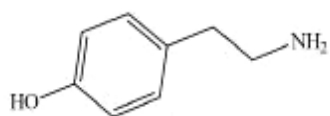
Присутне су мање количине фитостерола (спинастерол и ергостерол), полисахарида (*CM-Ala*), алкохола (1-хексакозанол, хелидониол, нонакозанол), флавоноида (рутин, кверцетин), холина, тирамина, хистамина и сапонозида (Слика 7.). У корену и биљци идентификовано је 24 есенцијалних микро- и макроелемената, укључујући *Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Ti, V* и *Zn* (171).



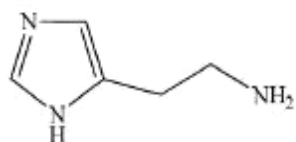
Кверцетин



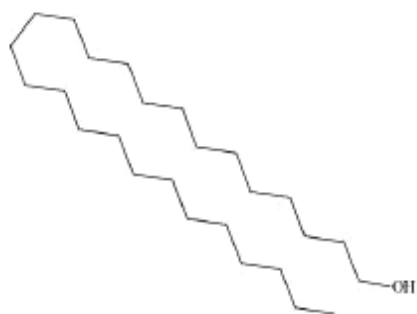
α -спинастерол



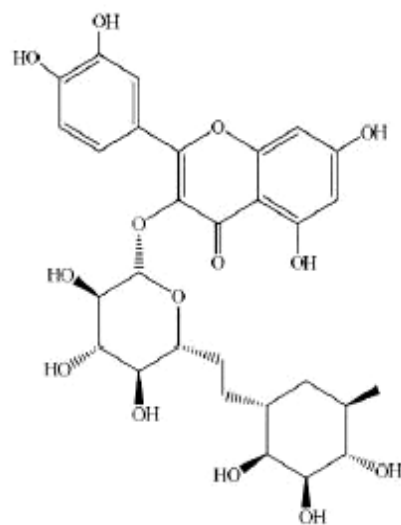
Тирамин



Хистамин



1-хексакозанол



Рутин

Слика 7. Хемијска структура осталих једињења у биљци *Chelidonium majus*

1.6.3. Употреба у традиционалној медицини

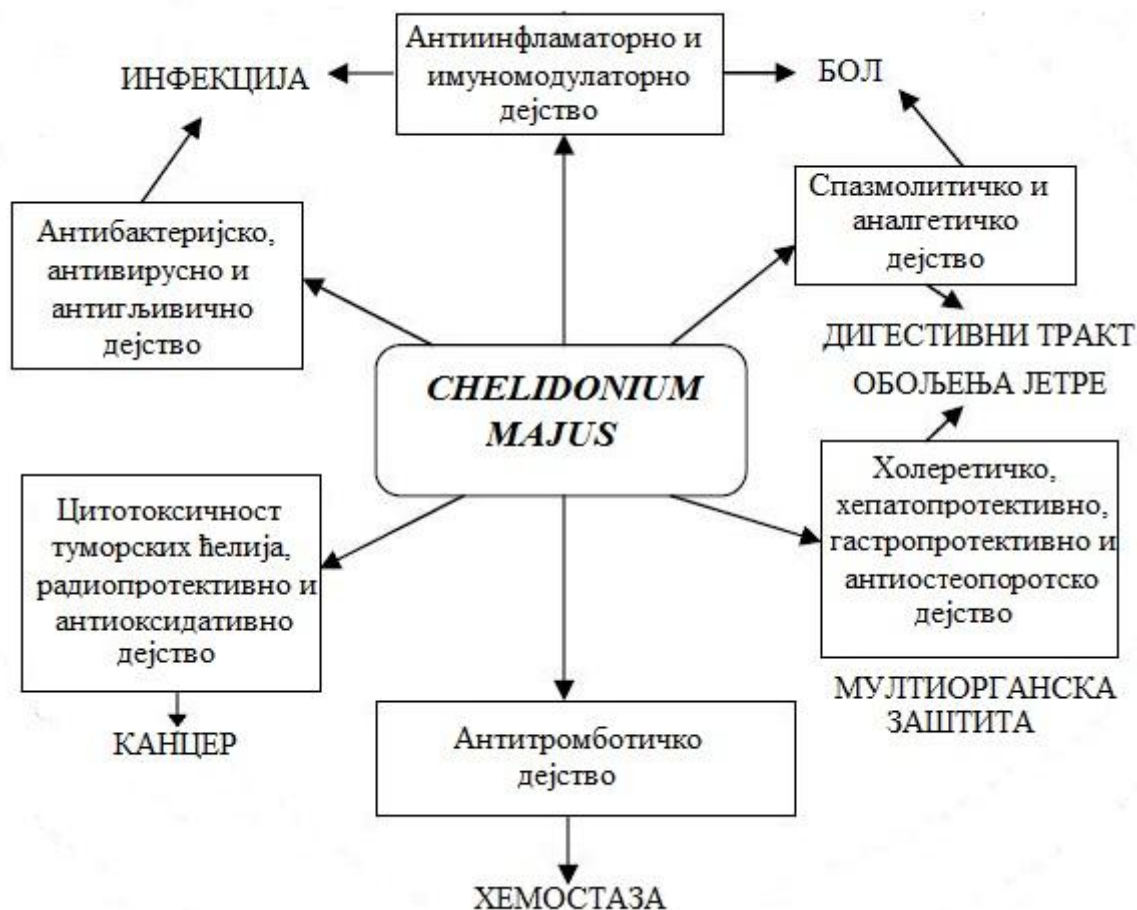
Chelidonium majus је због свог терапеутског потенцијала широко примењиван у европској и америчкој фитотерапији, традиционалној кинеској и иранској, као и у медицини на нашим просторима (172). Захваљујући богатом садржају алкалоида и бројним биолошким својствима, има примену у лечењу широког спектра болести.

Користи се за лечење болести желуца, јетре, слезине и црева, реуматских болести, плућних болести, срчаних тегоба, неуроza и депресије, инфекција уринарног тракта, за уклањање катаракте, као спазмолитик и за лечење туберкулозе (173). У Немачкој се налази у саставу неколико ОТЦ препарата, са холеретичким ефектом (174), док се у Србији етанолни екстракт надземног дела ове биљке налази као саставни део *Iberogast®* раствора за оралну употребу у терапији иритабилног колона и диспепсије (175). Свеж сок се користи локално за уклањање брадавица и лечење вирусних, бактеријских и гљивичних инфекција коже. Веома је значајна употреба чаја и тинктуре у третману различитих малигнитета (176).

1.6.4. Фармаколошка активност

Захваљујући великом броју активних принципа, пре свега изохинолинских алкалоида који су присутни у свим деловима биљке, *Chelidonium majus* поседује бројне фармаколошке активности, које су предмет бројних истраживања *in vitro* и *in vivo*, као и клиничких студија (Слика 8.). Показано је њено антимикуробно (177,178), антиинфламаторно (179), имуномодулаторно (180), гастропротективно (181), антиоксидативно (182), хепатопротективно (183), антитромботичко (184), аналгетичко (185), спазмолитичко (186) и антитуморско деловање (171,187,188). Откривени су и ефекти који изостају у традиционалној медицини, попут антиостеопоротских (189) и

радиопротективних (190), и за њих постоје научни докази. Са друге стране, у традиционалној медицини спомињу се још нека веома значајна својства биљке која још увек нису довољно испитана и поткрепљена доказима, попут диуретског ефекта који у народној медицини налази примену у терапији едема, затим антитусичног и експекторантског деловања, значајних у народној терапији хроничног бронхитиса и осталих пулмонарних обољења, као и ефекти на ремоделовање ока (191,192). Међутим, како би било који од ових ефеката изашао из оквира традиционалне медицине и нашао своју примену у модерној терапији, неопходна су детаљна претклиничка и клиничка испитивања, која би уједно проценила и потенцијалну токсичност ове биљке.



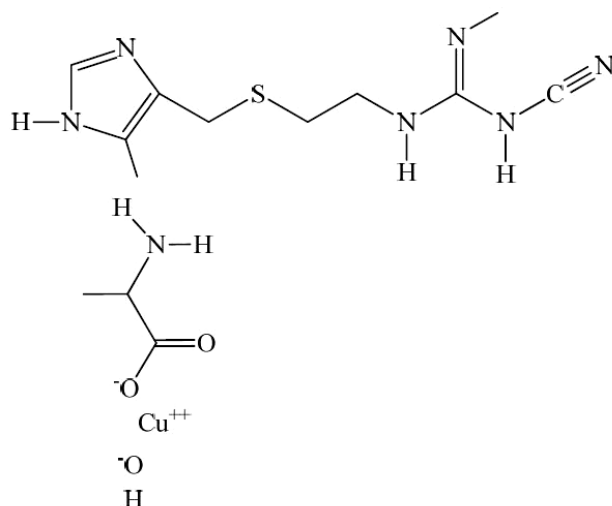
Слика 8. Фармаколошки ефекти *C. majus*

1.6.4.1. Антимикробна, антивирусна и антипаразитарна активност

Алкалоиди екстраховани из биљке показали су антимикробни, антивирусни и антипаразитарни ефекат (178,193,194). Доказани су антимикробни ефекти на грам позитивне бактерије, као и на *Candida albicans* (195). Експериментално је доказано да алкалоиди из надземног дела биљке (8-хидроксидихидро-сангвинарин, дихидро-сангвинарин, дихидро-хелеритрин и 8-хидроксидихидро-хелеритрин), имају антибактеријски ефекат према метицилин-резистентном *Staphylococcus aureus*-у (177), као и мултирезистентним ентерококама (196), док хелидонин, дихидро-хелеритрин и дихидро-сангвинарин изоловани из корена показују активност против *Cladosporium herbarum*, чак при врло ниској концентрацији од 4-10 μ g/ml (197). Антивирусна активност алкалоида показана је и према хуманим аденовирусима (тип 5 и 12), херпес симплекс вирусу, као и РНК полио вирусу (177). Нова супстанца изолована из *S. majus* могла би инхибирати вирус хумане имунодефицијенције 1 (HIV-1) (178).

1.6.4.2. Имуномодулаторно деловање

Имуномодулаторна својства *S. majus*-а испитали су Сонг и сарадници 2002.године, када су полисахаридну фракцију *SM-Ala* (Слика 9.) из воденог екстракта ове биљке инкубирали пет дана са ћелијама слезине у присуству туморских ћелија лимфома Yac-1, *in vitro*. Резултати су показали повећану активност лимфоцита, као и повећан број формираних колонија макрофага.



Слика 9. Хемијска структура полисахаридне фракције *CM-Ala* која поседује имуномодулаторна својства, изоловане из *C. majus-a*

Метанолни екстракт значајно супримира прогресију колагеном-индукованог артритиса, и инхибира продукцију TNF- α , IL-6, INF- γ , Б ћелија и $\gamma\delta$ Т ћелија у слезини и лимфним чворовима. Због ових својстава, ерозија хрскавице била је значајно смањена у колелу миша, након примене екстракта. Такође је уочено да екстракт повећава процентуалну заступљеност CD4⁺ CD25⁺ регулаторних Т ћелија, *in vivo* (198).

Клиничка студија је показала да тинктура побољшава целуларну и хуморалну имуност, као и неспецифичну резистенцију и доводи до смањења броја рецидива хроничног тонзилитиса код деце (199). Екстракт концентрације 1.25ml/kg у појединачној дози супримира имунски одговор локално, смањењем епидермалних Лангерхансових ћелија и контактне преосетљивости на UVA зрачење код мишева (196).

1.6.4.3. Хепатопротективни ефекти

Етанолни екстракт *Chelidonium majus-a* показао је значајан хепатопротективни ефекат у два студијама спроведеним на пацовима, где је оштећење јетре индуковано угљеник-тетрахлоридом (CCl₄) (200). Екстракт је код мишева којима је апликован

угљеник-тетрахлорид, довео до редукције броја некротичних хепатоцита, превенције фиброзних промена, као и смањења активности трансминаза и билирубина. Посебно се показао ефикасан у борби против р-диметиламинобензен-индуковане хепатокарциногенезе код мишева (201). Екстракт није изменио нормалне функције јетре, али је спречио ацетаминофеном-индуковано повећање тромбопластина, фокалну хепатоцелуларну некрозу, и повећање трансминаза и билирубина (171,183). Употреба различитих разблажења овог екстракта узроковала је смањење дисфункције јетре, смањењем повећаних нивоа неких маркера токсичности, попут киселе и алкалне фосфатазе, пероксидаза, аспартат аминотрансферазе, аланил трансминазе, глутамат оксалоацетата, холестерола и билирубина у јетри експерименталних животиња (202).

Новије студије указују на то да у *in vitro* условима мали пептиди (1200-11200 Da), изоловани из листова ове биљке показују хепатопротективни ефекат (203).

1.6.4.4. Антиоксидативна активност

Студије су показале су да екстракт *C. majus* има антиоксидативна својства *in vitro* (204). Фитохемијска анализа, открила је да овај ефекат увелико зависи од садржаја алкалоида у смеши (205). У студији *in vivo*, у којој су орално примењивани препарати изолованих полифенола из различитих делова биљке (цветова, лишћа, корена, стабљике и семена), примећено је да екстракт делује као хватач ("*scavenger*") слободних радикала, попут хидроксил ($\text{OH}\cdot$) и пероксил радикала ($\text{RCOO}\cdot$), хиперхлорита ($\text{ClO}\cdot$), супероксид анјона ($\text{O}_2\cdot^-$) и водоник-пероксида (H_2O_2) (206). Антиоксидативни ефекти *C. majus* посредовани су активацијом транскрипционог фактора, FOXO3a, која је праћена усходном регулацијом главних антиоксидативних ензима попут каталазе и манган-супероксид дисмутазе (MnSOD) (182).

1.6.4.5. Антиинфламаторни ефекти

Студије на мишевима са атопијским дерматитисом *in vivo*, демонстрирале су да екстракт *C. majus* смањује чешање, дебљину уха, и нивое серумског IgE, TNF- α и IL-4 код мишева код којих је индукован дерматитис (179). У другој *in vivo* студији на пацовима са индукованим едемом шапе, сангвинарин, хелеритрин и смеша бензофенатридинских алкалоида довела је до значајне редукције едема, при чему је сангвинарин испољио већи антиинфламаторни потенцијал од хелеритрина (195, 208). Неколико изолованих активних компоненти, попут стилопина, хелидонина, 8-хидроксидихидро-сангвинарина, хелеритрина и сангвинарина показало је јак инхибиторни ефекат на липополисахаридом (LPS-ом) посредовану продукцију азот-мооксида (NO), простагландина E2 (PGE2), фактора некрозе тумора- α (TNF- α), интерлеукина 1 β и 6 (IL-1 β , IL-6), индукцију циклооксигеназе-2 (COX-2), као и на експресију индуцибилне азот-оксид синтетазе (iNOS) mRNA у макрофагама (209).

1.6.4.6. Аналгетичко и спазмолитичко деловање

Shin и сарадници су показали да водени екстракт *C. majus* супримира ефекте глицина и GABA-е, што доводи до продужених ефеката глутамата, резултујући повећаном ексцитацијом сивих неурона у периакведукталној регији пацова. Последишно, долази до активације силазног система контроле бола, а овај механизам је предложен као један од аналгетских механизма ове биљке (185). Алкалоиди *Chelidonium majus*-а поседују такође аналгетски ефекат, који је сличан ефекту морфина и може трајати од 4 до 48 сати (191). Недавна студија на мишевима и пацовима, открила је да екстракт *C. majus* (200mg/kg) и хелидонин (5mg/kg) поседују јачи аналгетски ефекат од *аспирина* (210).

Додатно, целокупни екстракт, као и изоловани алкалоиди испољавају спазмолитички ефекат на нивоу абдоминалних и гастроинтестиналних мишића испитиваних животиња, што их чини специјално ефикасним у терапији абдоминалног бола (186).

У клиничкој студији пацијентима који су имали абдоминалне болове у виду колика, дат је екстракт *Chelidonium majus*-а и *Curcuma*-е, у трајању од три недеље. Током прве недеље, редукција бола била је бржа код пацијената који су користили екстракт у односу на контролну, плацебо групу (211).

1.6.4.7. Остала дејства биљке *Chelidonium majus*

Поред наведених дејстава, *Chelidonium majus* поседује и бројна друга деловања која би у будућности могла бити искоришћена у терапији бројних болести и стања.

Показано је да екстракт повећава број ћелија коштане сржи, слезине, тромбоцита и побољшава њихово преживљавање приликом примене леталних доза зрачења код експерименталних мишева (190). Такође, *Ukrain*TM минимизује последице зрачења на ендокрини систем експерименталних животиња, што указује на радиопротективно деловање ове биљке (212). Ово полу-синтетско једињење превентивно делује и на пад коштане густине када се примени код овариоектомизованих пацова, при чему се ови ефекти приписују утицајима на повећану продукцију естрогена (213).

Недавна *in vivo* студија, указала је на хиполипидемијски потенцијал етанолног екстракта код пацова. Орална примена дозе од 100-300mg/kg дозно-зависно доводила је до смањења серумских триглицерида, *LDL* и *HDL* холестерола код пацова са хиперлипидемијом (214).

Ацетилхолин (ACh) је кључни фактор у преносу нервних импулса међу неуронима у неуромишићној спојници. Главни је супстрат за хидролизу под дејством

ацетилхолинестеразе у Алцхајмеровој болести. Употреба етанолног екстракта надземних делова биљке снажно инхибира деловање ацетилхолинестеразе (215). У скорашњој студији *in vitro*, 8-хидроксидихидрохелеритрин, 8-хидроксидидихидро-сангвинарин, сангвинарин, хелеритрин и берберин снажно су инхибирали активност ацетилхолинестеразе, док су хелидонин, 6-етоксидихидро-хелеритрин и 6-етоксидихидро-сангвинарин инхибирали активност ацетилхолинестеразе и бутирилхолинестеразе (215,216). Због ових ефеката који доводе до смањене разградње Асh, услед инхибиције ензима, алкалоиди, као и екстракт надземних делова биљке, представљају потенцијалне агенсе у терапији ове тешке болести.

1.6.4.8. Антитуморско деловање

Бројни експерименти *in vitro* и *in vivo* потврдили су антитуморско деловање *Chelidonium majus-a*, које се постиже захваљујући великом броју алкалоида присутним у свим деловима биљке. Екстракт и различита једињења изолована из екстракта *C. majus-a* поседују својства која могу бити одговорна за директно и индиректно антитуморско деловање ове биљке.

Алкалоиди у *in vitro* условима индукују апоптозу малигних ћелија и на тај начин испољавају директно антитуморско дејство. Показано је да хелидонин испољава директно антитуморско дејство на аденокарциному цервикса (HELA ћелије) (165,187), карциному дојке (MCF7) (217), колона (Caco-2, HT-29), леукемије (CEM/ADR5000, CCRF-CEM) и карциному јетре (HEPG-2) (187), меланому (OCM-1) (218), као и карциному простате (DU-145) и плућа (A549) (219). Сангвинарин испољава антитуморски ефекат на аденокарциному цервикса (Hela) (165), леукемији (HL-60) и карциному јајника (A-2780) (220), као и меланому (OCM-1) (218). Установљена је ефикасност хелеритрина на

карциному простате (DU-145) (221), јетре (SMMC-7721) (222.) и леукемије (HL-60) (223), док је ефикасност у испољавању антитуморског ефекта у *in vitro* условима берберина доказана на аденокарциному цервикса (Hela) (165), а стилопин на тумору простате (DU-145), плућа (A549), дојке (MCF-7), јетре (HEPG-2) и колона (HT-29) (219).

Без обзира на сличност у структури, ова једињења делују на ћелије путем различитих механизма. Хелидонин узрокује застој у митози, инхибицијом теломеразне активности (224). Такође је познато да доводи до модулације активности тирозин киназа (225). Предложени механизам активности хелидонина, сличан механизму колхицина, заснива се на инхибицији полимеризације тубулина (226). Хелидонин и сангвинарин индукују апоптозу у ћелијама хумане лимфобластне леукемије, активацијом каспаза 3 и 9 и повећањем проапоптотичког Вах протеина (227). Метанолни екстракт и коптизин поседују снажну цитотоксичност према хуманом карциному колона (228). Сангвинарин, берберин и хелеритрин делују као снажни ДНК интеркалатори. Узрокују двоструки прекид ДНК ланца, чиме мењају физичка својства, те ремете репликацију (229).

Недавно је демонстрирано да хелидонин, хелеритрин, као и екстракт богат алкалоидима протоберберина и бензофенантридина, у комбинацији са хемиотерапеутицима, доводе до превазилажења резистентности на ове лекове (*multidrug resistance*, MDR) код различитих врста канцерских ћелија и на тај начин испољавају и индиректно антитуморско деловање (230,231).

Спроведене *in vivo* студије су такође указале на антитуморски потенцијал изолованих алкалоида и целокупног екстракта. Хелидонин и протопин тестирани су као потенцијална антитуморска терапија саркома 180 и Ерлиховог карцинома. Примена хелидонина у дози од 50µg/kg на оболелим мишевима током периода од 7 дана довела је до значајне регресије туморске масе, од 25% односно 22%. Са друге стране, перитонеална примена протопина у дози од 350µg/kg узроковала је регресију од 15%, односно 26%. (232). Екстракт *S. majus* показао је инхибиторну активност на glandularну стомачну

карциногенезу пацова, изазвану применом MNNG (*N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine*) и хипертоничним натријум хлоридом (233). Овај ефекат је потврђен и у *in vivo* студији на мишевима, у којој је екстракт инхибирао *p*-DAB-ом (*p-dimethylaminoazobenzene*) индуковану хепатокарциногенезу (201). Новија пилот студија спроведена од стране *Capistrano* и сарадника (234) показала је да екстракт *C. majus* доводи до редукције броја метастаза код мишева са карциномом панкреаса, у поређењу са контролном групом, што указује на значајни потенцијал ове биљке, који мора бити подвргнут додатним испитивањима, те евентуално нашао примену у терапији.

UkrainTM, полу-синтетски препарат хелидонина, поред поменутог радиопротективног дејства, показао се као веома ефективан антиканцерски агенс против карцинома плућа, панкреаса, простате, мокраћне бешике, дојке и Капошијевог саркома. Индиректно антитуморско деловање, *UkrainTM* остварује посредством модификације биолошког одговора. Током клиничких испитивања, интравенска примена овог лека сваког трећег дана, у периоду од месец дана резултирала је повећањем укупних Т лимфоцита (укључујући и помоћничке Т_h лимфоците), смањењем Т супресорских ћелија, као и нормализацијом односа између помоћничких и супресорских ћелија (235). Налази се у фази клиничких испитивања као потенцијални хемотерапеутик који ће имати мањи спектар нежељених дејстава и бољу ефикасност у односу на конвенционалну терапију, обзиром на добру подношљивост, нетоксичност према здравим ћелијама и за сада, повећаном преживљавању пацијената у оквиру испитивања (236-238).

Највећи број досадашњих истраживања, поготову истраживања антитуморског дејства, усмерен је на испитивање биолошке активности појединачних, изолованих алкалоида и флавоноида, док је мало радова који испитују дејство целокупног екстракта *C. majus*. Биљке садрже сложене мешавине једињења која могу бити моноспецифична (специфична за један циљни молекул), али већина има плејотропно дејство. Биоактивно дејство ових компоненти може бити и адитивно или синергистичко. Такође, у процесу

изоловања и пречишћавања појединачних компоненти њихова биолошка активност може бити смањена. Антитуморско дејство целокупног екстракта *C. majus* није довољно испитано. Иако су студије *in vitro* (188,230) и *in vivo* (234) малобројне, резултати су обећавајући и указују на оправданост даљих истраживања.

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљеви овог рада су да се испитају директно и индиректно антитуморско дејство екстракта *C. majus*. У складу са постављеним циљевима постављени су конкретни задаци:

1. Испитати потенцијалну цитотоксичност екстракта на по две туморске ћелијске линије различитог порекла и степена инвазивности (карцином дојке - MDA-MB 231, MCF7; карцином плућа – A549, H460; карцином колона - HCT116, SW480), као и селективност у његовом дејству у односу на здраве ћелије (фибробласти – MRC-5);
2. Одредити тип ћелијске смрти након излагања ћелија екстракту;
3. Утврдити да ли испитивани екстракт зауставља раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса;
4. Утврдити да ли испитивани екстракт показује адитивно или синергистичко дејство са цитостатицима;
5. Утврдити да ли испитивани екстракт утиче на миграцију малигних ћелија;
6. Утврдити да ли испитивани екстракт утиче на радиосензитивност малигних ћелија, приликом зрачења ћелија γ -зрацима;

Наша претпоставка је да ће резултати истраживања показати антитуморске ефекте испитиваног екстракта и тиме његову могућу примену као додатне терапије у лечењу канцера.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Екстракција биљног материјала

Биљка *Chelidonium majus*, са надземним и подземним деловима, сакупљена је из природне популације, током јуна 2015.године, на територији града Крагујевца. Узорковани примерак је потврђен и депонован у Хербаријуму Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Прикупљени биљни материјал осушен је на собној температури, на тамном месту, након чега је самлевен у млину. У тамно обојену боцу пренесено је 10 грама материјала, допуњено са 200ml етанола и чувано на собној температури. Након 24 сата, инфузија је филтрирана кроз Ватман N°1 филтер папир а остатак је реекстрахован са истом запремином растварача. Након 48 сати поступак је поновљен. Комбиновани супернатанти упарени су до сува, под вакуумом на 40°C. Добијени екстракт чуван је у стерилној туби на температури од 4°C до анализе. Шток раствор припреман је у DMSO-у, у концентрацији 100mg/ml и чуван на температури од 4°C.

3.2. Ћелијске линије

Потенцијално антитуморско дејство екстракта *Chelidonium majus* испитивано је на хуманим ћелијским линијама карцинома плућа (A549, H460), дојке (MDA-MB 231, MCF7) и дебелог црева (HCT116, SW480), док је његова селективност испитана у односу на здраве фибробласте (MRC-5) Ћелијске линије добијене су од *American Type Culture Collection* (ATCC).

Коришћене ћелијске линије су адхерентне и одржаване су у култури, у фласковима од 25ml, у виду монослоја. За одржавање ћелија коришћен је комплетан медијум,

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) или RPMI 1640, у који је додат 10% фетални говеђи серум (*fetal bovine serum*, FBS), 100 U/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина. FBS је претходно инактивисан термички, 30 минута на 56 °C. Све компоненте производи су компаније *Sigma* (Немачка).

Ћелијске културе су гајене у инкубатору на температури од 37°C, у атмосфери ваздуха засићеног воденом паром и обогаћеног 5% CO₂.

3.3. Тестови за испитивање цитотоксичности

Одређени цитотоксични агенс може индуковати ћелијску смрт, када доводи до апоптозе и/или некрозе, а са друге стране, може изазвати репродуктивну ћелијску смрт, при чему долази до инхибиције ћелијског раста и пролиферације, али ћелија остаје жива. Сходно томе, цитотоксична активност агенса одређује се на основу смањења ћелијске вијабилности или на основу броја мртвих ћелија. Цитотоксичност је представљена параметром C[%] и представља разлику између броја ћелија на почетку експеримента (N₀) и на крају (N), подељену са N₀ и помножену са 100, и изражена је као проценат:

$$C[\%] = (N_0 - N) \times 100 / N_0$$

Као мера цитотоксичне активности агенса, коришћен је параметар IC₅₀, који представља концентрацију агенса која инхибира преживљавање код 50% ћелија, у односу на контролни узорак.

3.3.1. Третман ћелијских линија

Ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 бунара, у густини од 5000 ћелија по бунару и инкубиране преко ноћи како би дошло до адхезије ћелија. Након 24 сата, супернатант је замењен медијумом који садржи распон концентрација екстракта: 16, 32, 62.5, 125, 250 и 500 µg/ml, док је као контрола коришћен свеж медијум. Ћелије су потом инкубиране 24 и 48 сати. Ћелијске суспензије, као и различите концентрације испитиваног екстракта припремљене су у свеже справљеном медијуму. Ћелије су засејане и трипликату, а сваки тест је поновљен минимум 3 пута.

3.3.2. МТТ тест

Колориметријски МТТ тест је коришћен за одређивање броја живих, метаболички активних ћелија. Ова тетразолијумска со (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум бромид) се у присуству ензима митохондијалне дехидрогеназе у метаболички активним ћелијама редукује до љубичастих кристала формазана. Додатком детерцента, кристали се растварају, а интензитет настале љубичасте боје одређује се спектрофотометријски.

Раствор МТТ колориметријског реагенса направљен је у PBS-у (*phosphate buffered saline*) при концентрацији од 5mg/ml, а потом разблажен у одговарајућем медијуму до финалне концентрације 0.5mg/ml.

Након инкубације ћелија, у периоду од 24 и 48 сати, на претходно описани начин, супернатант је замењен са 100µl радног раствора МТТ (0.5 mg/ml), а потом су ћелије поново инкубиране 4 сата. По истеку времена медијум је извађен и у сваки бунар је додато по 150µl детерцента диметилсулфоксида (DMSO), а потом је апсорбанца насталог

љубичастог раствора мерена на 550nm на читачу Zenith 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). Количина раствореног формазана, а самим тим и интензитет насталог љубичастог раствора и измерена апсорбанца, директно су пропорционални броју живих, метаболички активних ћелија (239).

3.3.3. SRB тест

Сулфородамин Б колориметријски тест развили су Скехан и сарадници, у циљу мерења леком изазване цитотоксичности, у оквиру програма Националног института за канцер (*National Cancer Institute*, NCI) (240). Заснива се на способности ове анјонске боје да са резидуама аминокиселина у протеинима фиксираних ћелија, под умерено киселим условима, формира електростатички комплекс (241). Потом се боја може, уз помоћ слабе базе (*Tris base*), квантитативно екстраховати из ћелија и растворити, након чега се врши спектрофотометријска анализа.

Након инкубације ћелија од 24 и 48 сати са различитим концентрацијама екстракта и медијумом као контролом, ћелије су фиксирание додатком 100µl хладне 15% трихлоросирћетне киселине (ТСА, Aldrich Chemical) и инкубацијом на 4°C у трајању од једног сата. Бунари у плочи испрани су пет пута са 200 µl хладне дестиловане воде, након чега су плоче остављене да се осуше на собној температури. По 100 µl боје Сулфородамин Б (SRB, Sigma, Aldrich) додато је у сваки бунар и инкубирано сат времена. По истеку времена, бунари су испирани са 1% сирћетном киселином, како би се уклонио вишак боје, све док не остане само боја везана за ћелије. *Tris base* (10mM unbuffered, pH 10.5, Sigma) додата је у сваки бунар, како би се растворила везана боја. Апсорбанца је мерена на 550 nm на апарату Zenith 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria).

3.4. Детерминација апоптозе/некрозе проточном цитометријом

Апоптоза је генетски регулисан процес, који се од некрозе разликује по карактеристичним морфолошким и биохемијским променама, укључујући кондензацију и фрагментацију хроматина, скупљање цитоплазме и губитак асиметричности мембране. У нормалним живим ћелијама, фосфатидилсерин налази се на унутрашњој страни плазма мембране. Рано током процеса апоптозе, долази до транслокације фосфатидилсерина са унутрашње на спољашњу страну плазма мембране, што представља маркер за препознавање апоптотичне ћелије од стране макрофага и других фагоцита.

Хумани антикоагулант Annexin V је Ca^{2+} -зависни протеин, масе 35-36 kDa, који се високим афинитетом везује за фосфатидилсерин. Коњугован са флуорохромом овај молекул омогућава детекцију апоптотичних ћелија методом имунофлуоресценције, имуноцитохемије или проточне цитометрије (242).

Ћелијске линије A549, HCT 116 и MDA-MB 231 третиране су екстрактом *S. majus* у концентрацији која одговара IC_{50} вредности за ове три ћелијске линије и медијумом као контролом, и инкубирани 24 h на 37°C , 5% CO_2 . Након третмана, апоптоза је детектована коришћењем Annexin V-FITC/7-AAD кита (Beckman Coulter, USA). Сакупљене су и залепљене и одлепљене ћелије, опране су PBS-ом, и ресуспендоване у 500 μl хладног пуфера (*Binding Buffer*). Сто микролитара ћелијске суспензије (5×10^5 ћелија) пребачено је у тубе за проточну цитометрију, па је 10 μl Annexin V-FITC и 20 μl 7-AAD додато. Након 15 минута инкубације у мраку, 400 μl Binding Buffer-а додато је у сваку тубу и узорци су анализирани на проточном цитометру Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Процент вијабилних (AnnVneg/7AADneg), рано апоптотичних (AnnVpos/7AADneg), касно апоптотичних (AnnVpos/7-AADpos) и некротичних (AnnVneg/7-AADpos) ћелија одређен је коришћењем *Flowing Software*-а (<http://www.flowingsoftware.com/>), а резултати су представљени помоћу *dot plot*-ова.

3.5. Анализа протеина апоптозе проточном цитометријом

Са циљем да се потврди апоптоза, анализирани су протеини карактеристични за овај процес. Након инкубације А549 ћелија током 24 сата са IC_{50} концентрацијом екстракта и медијумом као контролом, ћелије су покупљене, опране PBS-ом, фиксирани и пермеабелизоване коришћењем Fixation and Permeabilization Kit-a (eBioscience). Потом су узорци посебно третирани за анализу експресије Bcl-2, Вах и активирани каспазе 3. За одређивање Bcl-2 протеина, пермеабелизоване ћелије бојене су употребом анти-Bcl-2 моноклонског антитела (Life technologies) коњугованог FITC флуорохромом, 20 минута на собној температури. Остали протеини одређивани су инкубацијом са примарним анти-Вах антителом (Santa Cruz Biotech. Inc) и анти-активна каспаза 3 антителом (Cellsignaling Technology), током 30 минута на собној температури. Након тога су ћелије опране да би се уклонила неvezана антитела и инкубирани са секундарним антителом, коњугованим са FITC флуорохромом (ab6785, Abcam), током 20 минута. Ћелије су опране како би се уклонило неvezано антитело, а потом анализирани на проточном цитометру. Нивои Bcl-2 и Вах протеина, изражени као средњи интензитет флуоресценције (*mean fluorescence index*, MFI), као и проценат ћелија које садрже активирани каспазу 3, одређени су коришћењем *Flowing Software*-а, а резултати су приказани хистограмски.

3.6. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти

А549 ћелије су култивисане у DMEM медијуму са IC_{50} концентрацијом екстракта, 24h на 37°C у атмосфери са 5% CO_2 и апсолутном влажношћу. Након инкубације ћелије су покупљене и обојене са флуоресцентним бојама Акридин оранж (АО) и Етидијум бромид (ЕБ). Девет микролитара ћелијске суспензије помешано је са 1 μ l мешавине боја (100 mg/ml АО и 100 mg/ml ЕБ) и ћелијска морфологија је одмах анализирана помоћу

флуоресцентног микроскопа (Polywar, Reinhard Jyng) на увећању 400x. За фотографисање је коришћена Canon PC 1089 камера.

Акридин оранж је катјонска боја, која када интерагује са дволанчаним молекулом ДНК емитује зелену флуоресценцију, док црвену флуоресценцију емитује када интерагује са једноланчаним молекулом ДНК или РНК. Ћелијска мембрана је пермеабилна за ову боју, тако да АО улази и у вијабилне (живе) ћелије и у невијабилне ћелије (ћелије које су у апоптози и некрози). Етидијум бромид може да уђе само у ћелије чији је пермеабилитет плазма мембране нарушен, у невијабилне ћелије, и тада се везује за дволанчани молекул ДНК, након чега флуоресцира црвено.

На основу емисије флуоресценције, морфологије ћелије и изгледа једра могу се разликовати четири типа ћелија. Вијабилне ћелије имају нормалну морфологију и зелено једро са организованом структуром, док су рано апоптотичне ћелије мање, округле, хроматин је кондензован услед чега је једро униформно зелено, или је једро фрагментисано. Касно апоптотичне ћелије су округле и имају наранџасто/црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином. Некротичне ћелије имају наранџасто/црвено једро са организованом структуром (243).

3.7. Анализа ћелијског циклуса

За анализу процентуалне заступљености ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса коришћено је бојење са пропидијум-јодидом (PI) (244,245). PI се интеркалира у молекул нуклеинских киселина, а на основу интензитета флуоресценције може се одредити количина ДНК у анализираним ћелијама. Ћелије које се налазе у G₀/G₁ фази су диплоидне (2n), ћелије са хиподиплоидним садржајем ДНК (<2n) одговарају ћелијама које се налазе у процесу апоптозе, ћелије у S фази имају већи садржај ДНК од диплоидног

(између 2n и 4n), док ћелије у G2/M фази имају двоструко већи садржај од диплоидног (4n).

A549, HCT116 и MDA-MB 231 ћелије су култивисане са екстрактом *C. majus* у концентрацијама које одговарају IC₅₀ вредностима за сваку ћелијску линију, или са свежем медијумом као контролом, на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ и апсолутном влажношћу. Након 24h покупљене су и залепљене и одлепљене ћелије, опране у PBS-у и фиксиране у 70% хладном етанолу преко ноћи на +4°C. Фиксиране ћелије су ресуспендоване у 1ml PBS-а са RNA-зом А (500µg/ml) и инкубиране 30 минута на 37°C. RNA-за А се додаје како би се у испитиваном узорку разложила постојећа РНК, обзиром да се пропидијум јодид неселективно везује и за ДНК и за РНК. Након додатка 5µl раствора за бојење (10mg PI/ml PBS) ћелије су инкубиране 15 минута у мраку. Потом је извршена анализа помоћу проточног цитометра Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Садржај ДНК је одређен помоћу *Flowing Software*-а, а дистрибуција ћелијског циклуса приказана је хистограмски.

3.8. Утицај екстракта на инхибицију миграције- *In vitro "scratch" assay*

In vitro "scratch" тест коришћен је за испитивање утицаја екстракта на миграцију ћелија, и у извесној мери опонаша миграцију ћелија у *in vivo* условима те је познат и под називом "*wound healing" assay* (246). A549, HCT116 и MDA-MB 231 ћелије засејане су у плоче са 6 бунара у дупликату и култивисане до постизања конфлуентног монослоја. Формиран је ожиљак коришћењем стерилног наставка за микропипету. Одвојене ћелије и ћелијски остаци су уклоњени пажљивим испирањем PBS-ом. DMEM (за контролу) и 16µg/ml екстракта (нетоксична концентрација) додати су у бунаре, након чега је уследила инкубација на 37°C и 5% CO₂. Промене у ћелијском кретању су сликане у 0, 8 и 20 сату

након додатка медијума или екстракта помоћу фазно-контрастног микроскопа и Canon PC 1089 камере. Сlike су анализиране уз помоћ *ISCapture Software*-а (<http://iscapture.software.informer.com/download/>).

3.9. Ефекат комбиновања екстракта и доксорубицина

Како би се испитало да ли екстракт показује синергистички ефекат са доксорубицином, њихова интеракција анализирана је методом индекса комбинације (*combination index*, CI) коју су развили *Chou* и *Talalay* 1984 године (247). А549, НСТ 116 и MDA-MB 231 ћелијске линије засејане су у плоче са 96 бунара (5×10^3 ћелија по бунару) и инкубиране како би се залепиле преко ноћи. Ћелије су третиране са растућим концентрацијама доксорубицина (1, 2, 4 и $6 \mu\text{M}$), са концентрацијама екстракта 16, 32 и $62.5 \mu\text{g/ml}$, или са комбинацијом датих концентрација доксорубицина и екстракта. Након 24h инкубације изведен је МТТ тест, на претходно описани начин, и израчуната је цитотоксичност. Како би се проценила природа интеракције између доксорубицина и екстракта израчунат је индекс комбинације, CI, употребом *CompuSyn* софтвера. (ComboSyn, Inc., Paramys, NJ, USA).

3.10. Утицај екстракта на ефекте γ -зрачења

Радијациона терапија односи се на терапију карцинома и других болести јонизујућим зрачењем, попут зрачења X- и γ -зрацима. Зрачење доводи до депоновања енергије, која оштећује генетички материјал, и на тај начин може зауставити раст ћелије или је одвести у смрт, услед непоправљивих оштећења. Поред канцерских, оштећује и здраве ћелије које се налазе у третираној области, и чија судбина зависи од репаративних

механизма. Константно се трага за начинима који ће повећати ефективност радиотерапије, попут агенаса који делују као радиосензитизери (лекови који повећавају осетљивост туморских ћелија на зрачење), и радиопротектори (који се примењују пре зрачења са циљем да заштите нормалне ћелије од штетних ефеката радијационе терапије) (248). Стратегије којима би се повећала осетљивост радиорезистентних тумора подразумевале су употребу агенаса који узрокују оштећења ДНК, интерреагују са механизмима репарације ДНК, или сензитизују хипоксичне туморске ћелије. Ове стратегије, међутим, сусреле су се са ограниченим клиничким успехом (249).

У овом раду испитали смо утицај екстракта *S. majus* у нетоксичним концентрацијама на радиоосетљивост туморских ћелија дојке, колона и плућа, користећи γ -зраке у различитим дозама. Гама зраци представљају облик фотона који се користи у радиотерапији. Као извор γ -зрака користили смо ^{60}Co . Овај елемент зраке емитује спонтано, приликом распада или разградње, приликом чега се у минути ослобађа доза зрачења од 1Gu. Експеримент је изведен у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Београд.

3.10.1. МТТ тест

A549, MDA-MB 231 и HCT116 ћелије засејане су у плоче са 96 бунара у трипликату, и остављене преко ноћи да се залепе. У бунаре је додато по 100 μ l екстракта концентрација 10, 20 и 30 μ g/ml, док је као контрола коришћен свеж медијум. Након 24 сата, третман је уклоњен, након чега су ћелије зрачене γ -зрацима, у дозама 1, 2 и 4 Gu, при чему је извор γ -зрака био ^{60}Co . Након зрачења, у бунаре је враћен медијум, а по истеку 24 сата, спроведен је МТТ тест. Експеримент је поновљен три пута, а подаци су обрађени и приказани графички.

3.10.2. Клоногени тест

Клоногени есеј нам даје информације о утицају зрачења, као и комбинације зрачења и екстракта на преживљавање ћелија и њихову способност да након третмана формирају колоније (250).

A549, MDA-MB 231 и HCT116 ћелије засејане су у плоче са 6 бунара у трипликату и инкубиране преко ноћи како би се постигла адхеренца. Засејано је 200 ћелија по бунару за контролу, 500 ћелија за дозу зрачења од 0.5 Gy, 1000 за дозу зрачења од 1 Gy и 2000 ћелија за дозу зрачења од 2 Gy. Извор γ -зрака је био ^{60}Co , а јачина зрачења 1 Gy/мин. Након постигнуте адхеренце, медијум је замењен медијумом који садржи 10 $\mu\text{g/ml}$ екстракта, односно свежим медијумом, када је у питању контрола, а ћелије су инкубиране 24 сата. Медијум је уклоњен а плоче су зрачене. Потом је у све бунаре враћен свеж медијум а ћелије су инкубиране током периода од 10 дана, на претходно описани начин, у инкубатору. По истеку времена, медијум је уклоњен, док су ћелије пажљиво испране раствором PBS-а, након чега су фиксиране хладним метанолом (+4°C). Бојење је постигнуто свеже припремљеним 10%-им раствором Гимзе. Бројане су колоније које су имале 50 и више ћелија. Поређење је направљено између ћелија које се налазе у контроли, ћелија које су само зрачене, као и ћелија које су подвргнуте претретману а након тога зрачене. Однос између броја формираних колонија (N0) и броја засејаних ћелија (N) у нетретираној контроли, представља PE (*Plating efficiency*) вредност:

$$PE = \frac{N0}{N}$$

На основу израчунате PE вредности одређена је фракција преживљавања, SF (*surviving fraction*), вредност за сваку ћелијску линију и третман:

$$SF = \frac{N1}{N} \times PE$$

Где је N1 број формираних колонија након третмана. Резултати су приказани графички.

3.11. Статистичка обрада података

Резултати експеримента изражени су као средња вредност \pm стандардна девијација и приказани су табеларно и графички. За статистичку обраду података коришћен је пакет SPSS, верзија 20. За проверу нормалности расподеле података коришћен је *Shapiro-Wilk* тест. У зависности од добијених резултата, коришћен је параметарски студентов Т-тест, односно непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. За испитивање утицаја концентрације биоактивне супстанце на исход коришћен је тест регресије. Вредности добијених података сматране су статистички значајним уколико је $p < 0,05$, а статистички високо значајним ако је $p < 0,001$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Екстракт *C. majus* је цитотоксичан за туморске ћелијске линије

Екстракт *Chelidonium majus* је узроковао временски- и дозно-зависно повећање цитотоксичности код свих шест туморских ћелијских линија, што је утврђено МТТ тестом. Резултати показују да је проценат ћелијске вијабилности значајно смањен код ћелија које су биле изложене третману, са различитом осетљивошћу код појединачних ћелијских линија. Израчунате IC₅₀ вредности (Табела 1.) показују умерен до високи цитотоксични ефекат, зависно од туморске ћелијске линије, док је цитотоксичност значајно мања када су у питању нормалне ћелије, фибробласти (MRC-5).

Ћелијска линија	IC ₅₀ 24h	IC ₅₀ 48h
A549	213,35±3,74	59,27±2,01
H460	177,69±5,14	112,64±1,40
HCT116	186,31±8,47	134,66±9,63
SW480	174,58±2,81	143,55±5,10
MDA-MB 231	143,61±5,87	68,46±2,86
MCF-7	179,35±9,92	44,65±3,66
MRC-5	703,14±5,09	250,19±0,99

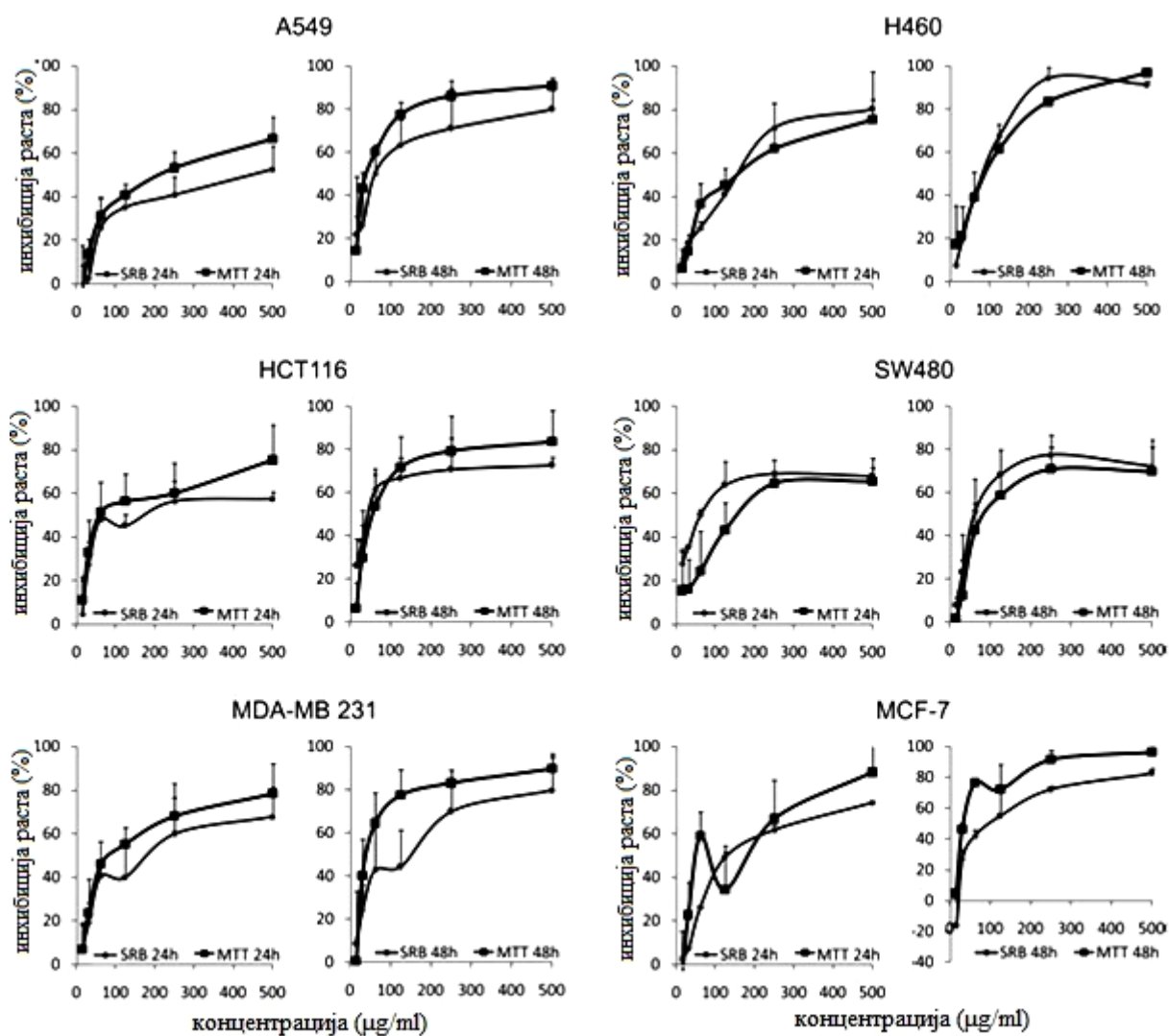
Табела 1. IC₅₀ - концентрација екстракта која инхибира преживљавање циљних ћелија за 50% (µg/ml) после 24 и 48-часовног третмана *in vitro*

Индекс селективности (*selectivity index*, SI) је вредност која показује селективност неке супстанце у антитуморској активности. Израчунава се као однос IC₅₀ вредности за здраве, не-туморске ћелије и IC₅₀ вредности за поједине туморске ћелијске линије. За супстанце које имају SI>3 сматра се да имају високу селективност. SI вредности приказане на Табели 2. показују да екстракт има добру селективност у односу на све испитиване ћелијске линије

ћелијска линија	SI
A549	3,30
H460	3,96
HCT116	3,77
SW480	4,03
MDA-MB 231	4,90
MCF-7	3,92

Табела 2. Индекс селективности (SI) екстракта *C. majus* изражен као однос IC₅₀ вредности за ћелијску линију MRC-5 (фибробласти) и IC₅₀ вредности за поједине туморске ћелијске линије након 24h инкубације са екстрактом

Слична цитотоксична активност екстракта показана је спроведеним SRB тестом, са мањим одступањима, а то је очекивано обзиром да МТТ тест детектује метаболички активне ћелије, а SRB тест укупни садржај протеина (Слика 10.).

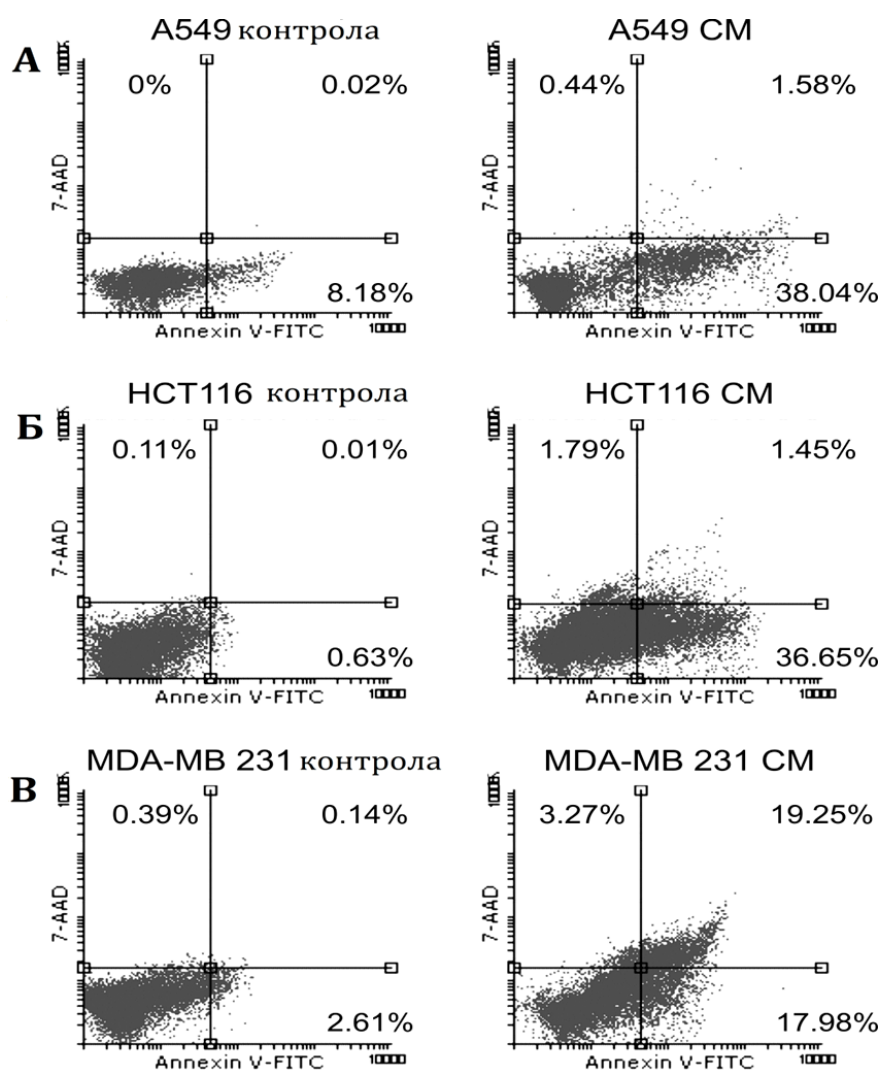


Слика 10. Поређење дозно-зависних кривих, добијених МТТ и SRB тестом након излагања ћелија третману различитим концентрацијама екстракта *C. majus* у трајању од 24 и 48 сати. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.2. Екстракт *C. majus* индукује апоптозу

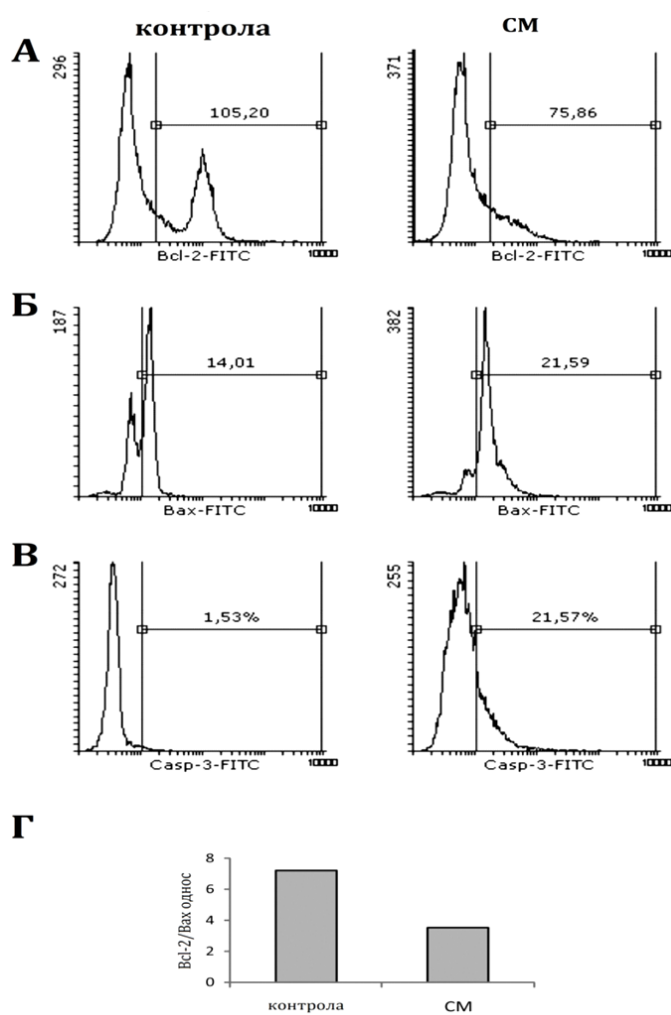
У складу са резултатима добијеним МТТ тестом за процену ћелијске вијабилности, Annexin V-FITC/7-AAD тест за детекцију апоптозе показао је да третман ћелија екстрактом концентрације које одговарају добијеним IC_{50} вредностима, индукују апоптозу

у високом проценту (A549 – 39,62%; HCT116 – 38,10%; MDA-MB 231 – 37,23%), док је проценат некротичних ћелија био занемарљиви. (Слика 11.)



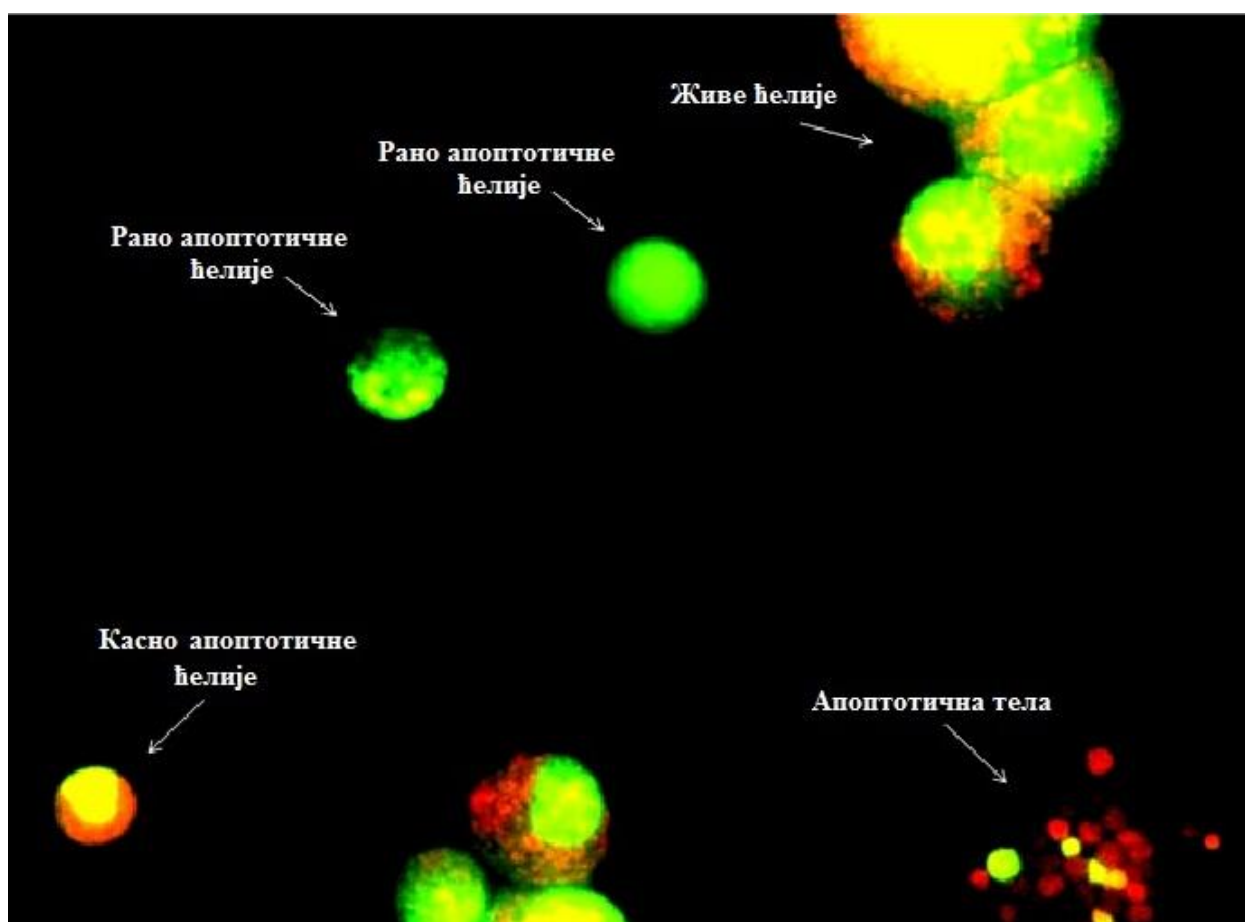
Слика 11. Анализа типа ћелијске смрти проточном цитометријом, употребом Annexin V-FITC/7-AAD. На слици је представљена дистрибуција ћелија по квадрантима, код нетретираних ћелија (лева страна слике) и код ћелија третираних концентрацијама екстракта које одговарају IC₅₀ вредностима за сваку ћелијску линију. У горњем левом квадранту су некротичне ћелије (AnnexinV⁺7-AAD⁺), у доњем живе ћелије (AnnexinV⁻7-AAD⁻); у доњем десном рано апоптотичне (AnnexinV⁺7-AAD⁻), док су у горњем десном квадранту дистрибуиране касно апоптотичне ћелије (AnnexinV⁻7-AAD⁺)

Апоптоза као тип ћелијске смрти коју узрокује екстракт доказана је и одређивањем протеина карактеристичних за овај процес, на примеру А549 ћелија. Код третираних ћелија опада експресија антиапоптотског протеина Bcl-2 протеина, док расте експресија проапоптотског протеина Вах. Bcl-2 / Вах однос последично опада. Осим тога, расте и проценат ћелија код којих долази до експресије активираних каспазе 3 (Слика 12.).



Слика 12. Експресија протеина карактеристичних за апоптозу у нетретираним (контрола - лево) и третираним (SM - десно) А549 ћелијама. Хистограми приказују средњи интензитет флуоресценције (MFI) Bcl-2 (А) и Вах (Б) бојења и проценат ћелија које експримирају активираних каспазу 3 (В) Однос Bcl-2/Вах код контролних и третираних ћелијама приказан је дијаграмом (Г)

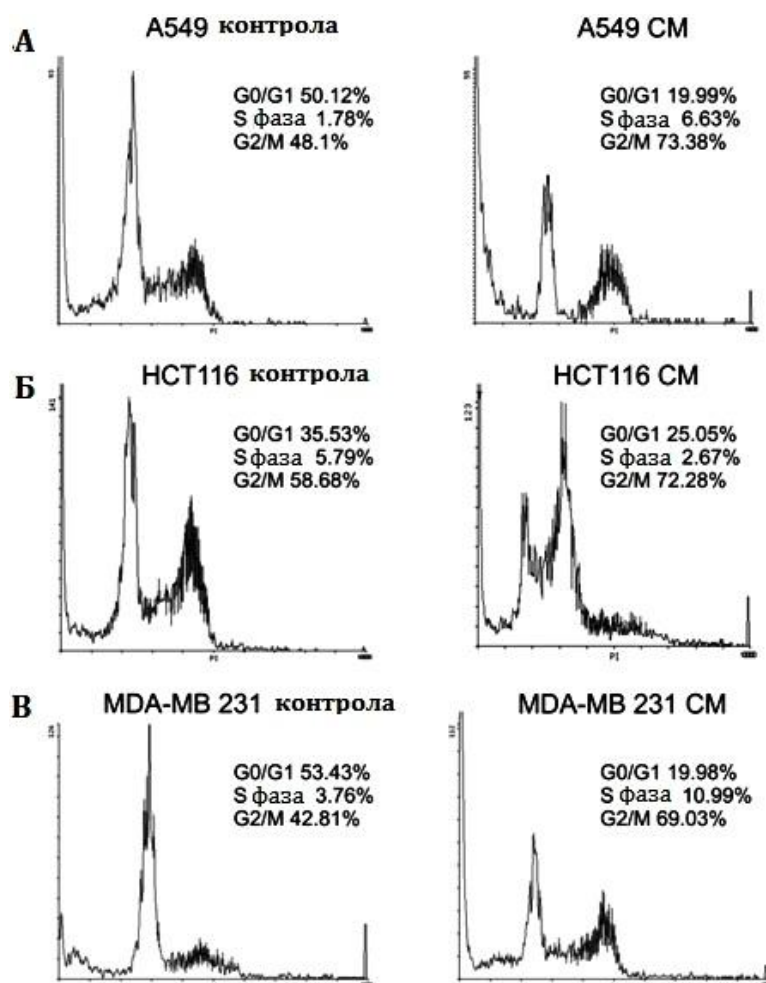
Флуоресцентна микроскопија након бојења ћелија смешом АО/ЕБ показала је да долази до промена ћелијске морфологије, које су типичне за апоптозу: ћелије су постале округле и скупљене, дошло је до кондензације и фрагментације нуклеуса и формирања апоптотичних тела (Слика 13.). Ово запажање представља додатну потврду да се ћелијска смрт индукована екстрактом одвија путем апоптозе.



Слика 13. Промене у ћелијској морфологији посматране под флуоресцентним микроскопом (увеличање 400x), код А549 ћелија третираних екстрактом концентрације 250 μ g/ml током периода од 24 сата. Живе ћелије имају зелени нуклеус са организованом структуром. Рано апоптотичне ћелије имају светло зелени, а касно апоптотичне светло наранџасти или црвени нуклеус, са кондензованим или фрагментисаним хроматином

4.3. Екстракт *C. majus* доводи до застоја у ћелијском циклусу

Код све три ћелијске линије, које су током 24 сата инкубиране са екстрактом, дошло је до акумулације ћелија у G2/M фази, са пратећим смањењем процента ћелија у G0/G1 фази (Слика 14.). Процент ћелија заустављених у G2/M фази након излагања екстракту повећао се са 48,10% (контрола) на 73,38% код A549, са 58,68% на 72,28% код HCT116 и са 42,81% на 69,03% код MDA-MB 231 ћелија.

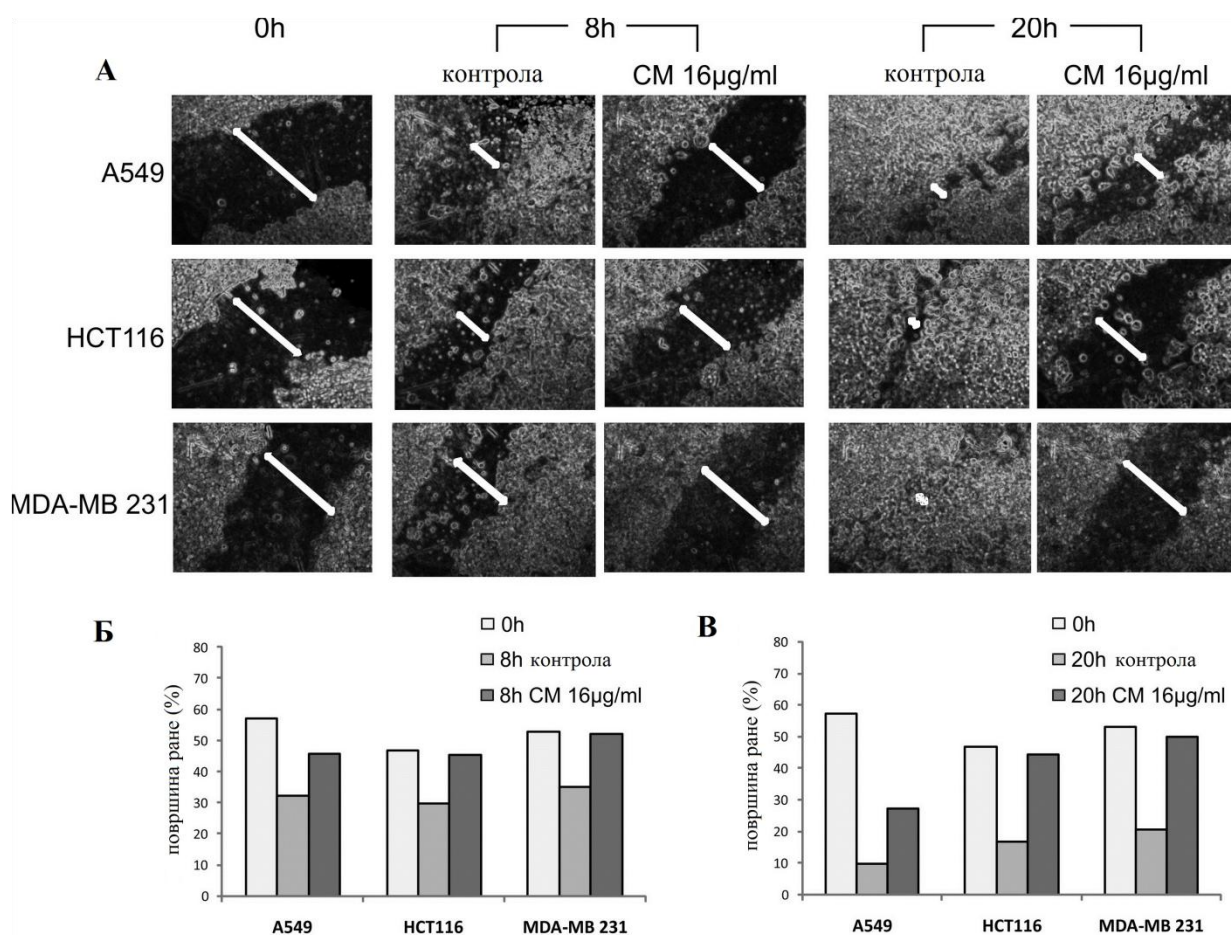


Слика 14. Ефекти екстракта *C. majus* на дистрибуцију ћелијског циклуса. Третман екстрактом је у два независна експеримента показао приближно исто повећање ћелија у G2/M фази. Хистограми су репрезентативни за два експеримента и представљају дистрибуцију ћелијског циклуса код нетретираних ћелија (контрола) и третираних (CM) A549 (A), HCT116 (Б) и MDA-MB 231 (В) ћелија

4.4. Екстракт *C. majus* инхибира миграцију ћелија *in vitro*

Ефекти екстракта *C. majus* на миграциони потенцијал А549, НСТ116 и МДА-МВ

231 ћелија одређен је *wound-healing* тестом (Слика 15.).



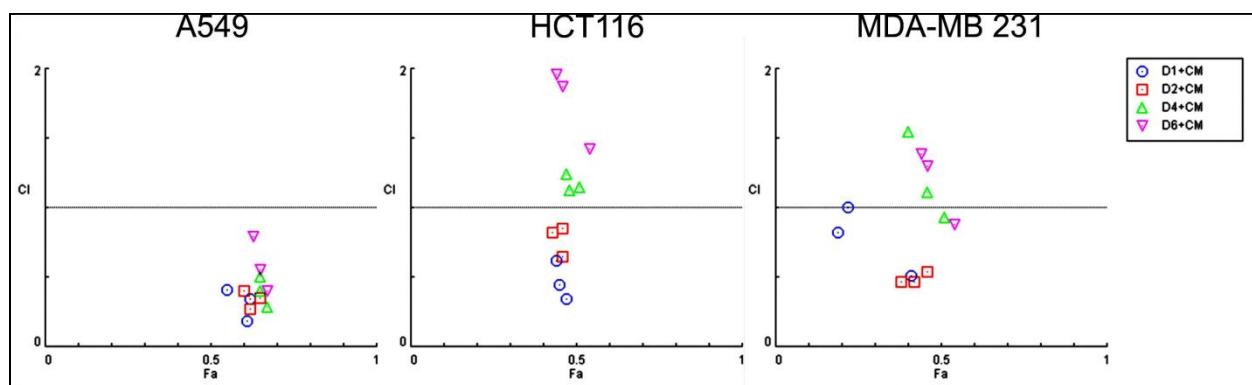
Слика 15. Ефекти екстракта на способност миграције ћелија, 8 и 20 сати након формирања ожиљка

У контролној групи (у одсуству екстракта), ћелије су мигрирале. Промена је видљива већ након 8 сати, док су ћелије након 20 сати скоро у потпуности прекриле претходно формирану ожиљку. За разлику од контроле, екстракт примењен у нетоксичној концентрацији инхибирао је миграцију ћелија. Степен инхибиције разликује се, у зависности од ћелијске линије. Након 20 сати инкубације са екстрактом, код НСТ116 и

MDA-MB 231 уочена је скоро потпуна инхибиција миграције ћелија, за разлику од непотпуне инхибиције код A549, обзиром да се 50% ожиљка попунило мигрирајућим ћелијама.

4.5. Екстракт *C. majus* потенцира цитотоксичност доксорубицина

Са циљем да се испита природа интеракције између екстракта *C. majus* и доксорубицина, ћелије су третиране комбинацијом четири дозе лека и три концентрације екстракта. Цитотоксични ефекти лека и екстракта примењених самостално, као и њихове комбинације, искоришћени су за рачунање индекса комбинације (*combination index*, CI). CI вредности веће од 1 указују на антагонизам, $CI < 1$ на синергизам, а уколико је $CI = 1$ у питању је адитивни ефекат. Запажен је синергистички цитотоксични ефекат екстракта са различитим концентрацијама доксорубицина, зависно од ћелијске линије (Слика 16.). Код карцинома дојке MDA-MB 231, екстракт је повећао цитотоксичност доксорубицина у свим тестираним концентрацијама. Међутим, код карцинома плућа A549 и колона HCT116, екстракт је деловао синергистички само са нижим концентрацијама доксорубицина (1 и 2 μM), док је у комбинацији са вишим концентрацијама доксорубицина њихов заједнички ефекат антагонистички. Ови резултати указују на то да синергистички цитотоксични ефекат екстракта и доксорубицина зависи од ћелијске линије на коју се примењују, као и од примењене концентрације доксорубицина.



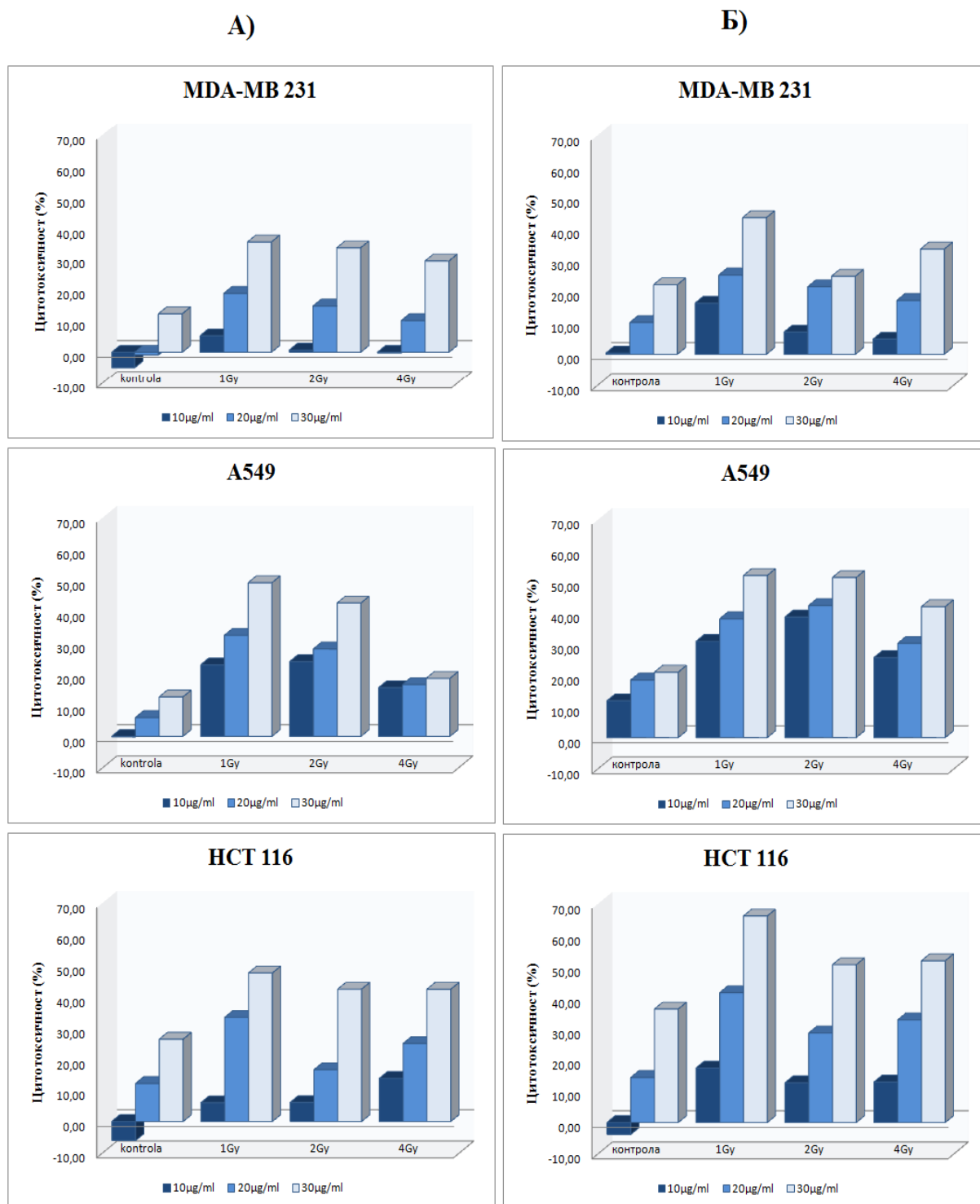
Слика 16. Комбиновани ефекти екстракта *C. majus* и доксорубицина на A549, HCT116 и MDA-MB 231 ћелије. Екстракт концентрација 16, 32 и 62.5µg/ml, комбинован је са различитим концентрацијама доксорубицина: 1 µM (D1+CM), 2 µM (D2+CM), 4 µM (D4+CM) и 6 µM (D6+CM).

4.6. Екстракт *C. majus* појачава осетљивост малигнућ ћелија на зрачење

Третман различитим концентрацијама екстракта *C. majus* (10, 20 и 30µg/ml) у трајању од 24 сата пре зрачења довео је до повећане осетљивости свих туморских ћелијских линија на зрачење (Слика 17.). Ефекти су посматрани 24 и 48 сата након зрачења, при чему је цитотоксичност утврђена МТТ колориметријским тестом. Како је осетљивост ћелијских линија према зрачењу, као и према екстракту различита, разликују се и ефекти комбинације ова два третмана. Код свих ћелијских линија третираних екстрактом, и при свим дозама зрачења, дошло је до повећања цитотоксичности у односу на монотретман ћелија зрачењем. Резултати су показали да чак и нетоксичне концентрације екстракта, 10 и 20µg/ml, примењене у комбинацији са зрачењем, доводе до значајног повећања осетљивости свих туморских ћелија на зрачење, у поређењу са нетретираним ћелијама које су зрачене. После 24 сата, код карцинома плућа А549, забележен је пораст цитотоксичности од чак 22.9% при комбинованој терапији (10µg/ml + 1Gy), у односу на монотерапију зрачењем од 1Gy. Међутим, када се у обзир узму све три концентрације екстракта, након 24 сата, највећи пораст цитотоксичности забележен је при

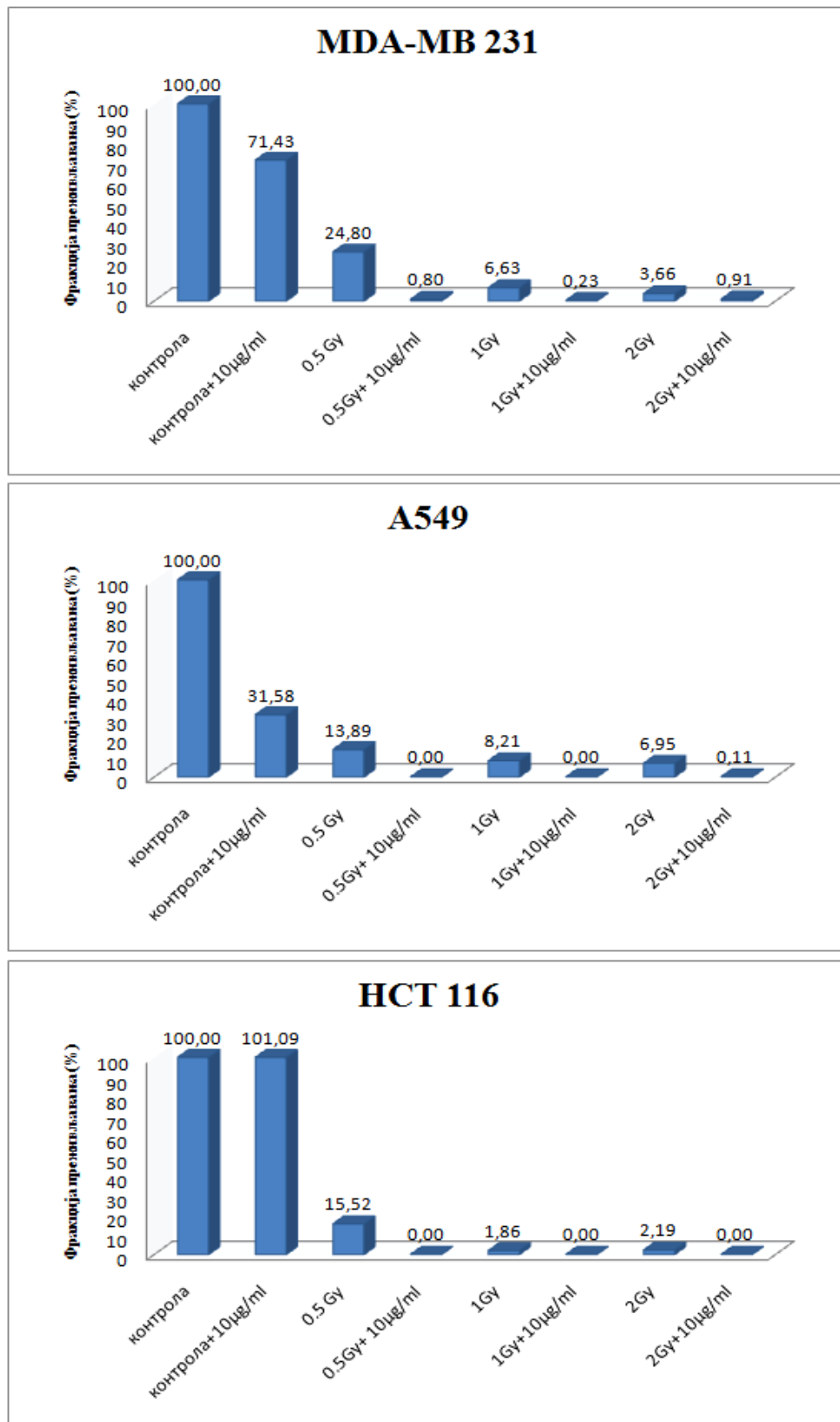
комбинованом третману ћелија екстрактом концентрације 30 μ g/ml и зрачењем од 1Gy, у односу на сам третман зрачењем од 1Gy, код A549 и HCT116 ћелија (49,18% и 47,53%), као и код MDA-MB 231 ћелија, код којих је осетљивост нешто мања, те повећање цитотоксичности износи 35 и 54%.

Након 48 сати, исти комбиновани третман (30 μ g/ml + 1 Gy) показао је најбоље ефекте, те је код A549 ћелија дошло до повећања цитотоксичности за 52,07%, код HCT116 ћелија за чак 66,08%, а код MDA-MB 231 ћелија за 43,74%, у односу на монотретман ћелија зрачењем у дози од 1Gy.



Слика 17. Утицај 24-часовног претретмана различитим концентрацијама екстракта *C. majus* (10, 20 и 30 µg/ml) на радиосензитивност туморских ћелијских линија А549, МДА-МВ 231 и НСТ 116 према γ-зрацима. Цитотоксичност је мерена 24 (А) и 48 (Б) сати након третмана.

Клоногеним тестом утврђен је ефекат двадесетчетворочасовног претретмана екстрактом концентрације 10 μ g/ml на способност ћелија да формирају колоније након зрачења од 0.5, 1 и 2Gy. На свим ћелијским линијама утврђено је да је способност ћелија да формирају колоније мања када се примени комбинација екстракта и зрачења, у односу на само зрачење (Слика 18.). Већу осетљивост према комбинацији екстракта и свих доза зрачења показале су ћелијске линије A549 и HCT 116, где је број колонија једнак нули, док се показало да су MDA-MB 231 за нијансу мање осетљиве, и добијена SF вредност износи приближно 1% (број колонија је 2 и 5, при дози зрачења од 1Gy, односно 2 Gy).



Слика 18. Утицај 24-часовног третмана са екстрактом *S. tajus* концентрације 10µg/ml на способност ћелија да 10 дана након зрачења γ -зрацима формирају колоније

5. ДИСКУСИЈА

Канцер је болест која угрожава живот, са сталном тенденцијом раста. Други је по реду узрочних смртности, одмах након кардиоваскуларних оболења. Упркос конвенционалној терапији, која се заснива на радиотерапији, хирургији и хемиотерапији, контрола малигнух болести је веома тешка. Ови терапеутски приступи показују слабу ефикасност услед неселективног деловања, високих нивоа токсичности, као и развоја резистенције на хемиотерапеутске лекове. Развојем високо ефикасних лекова, који ће селективно деловати искључиво на малигне ћелије, увелико ће бити унапређен квалитет живота и преживљавање пацијената. Стога је проналажење нових антитуморских агенаса, који ће спречити раст и прогресију неоплазми основни циљ савремене онкологије. Трага се за лековима који ће деловати на циљне молекуле сигналних путева који контролишу основне карактеристике неоплазми: одржавање пролиферативне сигнализације, неосетљивост на супресоре раста, избегавање апоптозе, неограничени репликативни потенцијал, индукцију ангиогенезе, инвазију ткива и метастазирање, репрограмирање метаболизма и избегавање антитуморског имунског одговора.

Још од античких времена, од друида, врачева, шамана, до данашњих дана, познато је лековито дејство биљака. Примена биљака у терапији различитих оболења забележена је у усменом предању и историјским књигама (251). Биљни свет је ризница мноштва биоактивних једињења која имају терапеутски потенцијал. Већ дуги низ година једињења изолована из биљака користе се у превенцији или терапији канцера. Више од 25% антитуморских лекова потичу директно из биљака, а 25% су синтетички аналози природних производа. Ипак, од приближно 250.000 виших биљака само 5-15% је испитано у *in vitro* и *in vivo* студијама, а свега тридесетак у клиничким студијама (252-254).

Предност коришћења биљака и њихових метаболита у третману канцера је њихова доступност и релативно ниска токсичности у поређењу са хемотерапијом.

Биљни метаболити имају различите механизме антитуморског дејства. Неки од ових молекула селективно убијају ћелије које се брзо деле, док други циљано делују на молекуле чија је експресија измењена у ћелијама канцера. Смрт ћелија канцера може бити индукована утицајем на ћелијски циклус (заустављање у одређеној фази циклуса) или на молекуле који су укључени у покретање апоптозе (активација каспаза, смањење експресије Bcl-2). Такође, неки биљни метаболити имају способност да инхибирају прекомерно експримиране факторе раста и да на тај начин спрече раст ћелија канцера. За потенцијалну примену у терапији неоплазми посебно је значајно истовремено инхибиторно деловање биоактивних једињења на више карактеристика малигно трансформисаних ћелија, односно деловање на више циљних молекула дерегулисаних сигналних путева у канцерским ћелијама.

Претходне студије показале су да алкалоиди изоловани из *C. majus* узрокују ћелијску смрт код великог броја различитих туморских ћелијских линија, те ова биљка представља значајан извор једињења са потенцијалним антитуморским дејством. Цитотоксични ефекти хелидонина и стилопина доказани су код канцера простате, дојке, плућа, јетре и колона (219,255). Сангуилутин и хелилутин делују антипролиферативно на ћелије леукемије, карцинома цервикса и јајника (220). Такође, Ukraintm, синтетски дериват алкалоида *C. majus*, у бројним *in vitro* и *in vivo* студијама, верификован је као врло потентан хемиотерапеутик. Резултат његове селективне токсичности према искључиво малигним ћелијама, јесте минимална појава нежељених ефеката, који прате примену конвенционалних хемиотерапеутика. Предмет је неколико клиничких испитивања, где је показао обећавајуће резултате. Код пацијената у терминалној фази болести довео је до побољшања преживљавања пацијената са колоректалним карциномом и карциномом панкреаса, до регресије тумора код оболелих од хематолошких малигнитета, као и

значајног побољшања симптома код пацијената оболелих од карцинома дојке (256-257). Са друге стране, водени екстракт биљке, повећава продукцију азот-моноксида (NO) и фактора некрозе тумора- β (TGF- β) активацијом транскрипционог нуклеарног фактора- κ B (NF- κ B) (180). Такође, *in vivo* истраживања су показала да екстракт супримира ефекте бројних карциногена и инхибира карциногеном-индуковану ангиогенезу (201,258).

Међутим, обзиром да је већина истраживања усмерена на ефекте изолованих алкалоида, циљ овог рада јесте да утврди антитуморске ефекте целокупног екстракта, имајући у виду могућу синергистичку или адитивну интеракцију биоактивних компоненти смеше. Штавише, употреба екстракта је доступнија и економски прихватљивија у поређењу са изолованим појединачним алкалоидима.

Са циљем да проценимо инхибицију раста ћелија индуковану екстрактом, спровели смо МТТ и SRB колориметријске тестове. МТТ тест се базира на редукцији МТТ боје до формазана, те стога детектује метаболички активне ћелије. SRB тестом се боје целокупни протеини, на основу чега се индиректно процењује број ћелија (240). Оба теста спроведена су како би утврдили да ли екстракт убија или зауставља метаболичку активност ћелије. Резултати су показали приближно исте вредности, док су добијена одступања очекивана, будући да ћелија пре него што буде убијена, постаје метаболички неактивна.

Резултати овог истраживања показали су да екстракт смањује вијабилност туморских ћелија, што је у складу са резултатима досадашњих истраживања (188,234,259,260). Третман ћелија екстрактом довео је до временски- и дозно-зависног повећања цитотоксичности код свих шест ћелијских линија. Највећу осетљивост након третмана од 24 сати показале су ћелијске линије карцинома дојке, MDA-MB 231 након третмана од 24 сата, и MCF7 након 48 сати. Најрезистентније на деловање екстракта биле су ћелијске линије карцинома плућа A549 и колона SW480, након 24, односно 48 сати. Цитотоксични ефекат на MCF7 ћелијама раније је забележен од стране *Fatemeh*-а и сарадника (261), са IC₅₀ вредношћу од 95,38 μ g/ml након двадесетчетворочасовног

третмана, што је два пута нижа вредност у односу на вредност од 179,35 μ g/ml, коју смо добили. Разлика између ових вредности може бити приписана различитим протоколима, условима у ћелијској култури или различитим саставом алкалоида у два испитивана екстракта. *Capistrano* и колеге су 2015.године након третмана од 48 сати над MDA-MB 231, добили IC₅₀ вредност која је приближна вредности коју смо ми добили (234).

Значајну улогу у идентификацији и развоју нових терапеутских агенаса који ће примену наћи у превенцији и терапији карцинома има њихова селективност у антитуморском дејству према малигно трансформисаним ћелијама, у односу на здраве ћелије, са посебним акцентом на ћелије са високом стопом пролиферације, попут матичних ћелија и фибробласта. Зато је један од циљева овог истраживања био управо да се испита да ли екстракт испољава селективност према туморским ћелијама дојке, плућа и колона у доносу на фибробласте, и у којој мери је та селективност изражена. Процентом индекса селективности (SI), показано је да испитивани екстракт показује веома добру селективност у антитуморском деловању према свим испитиваним ћелијским линијама у односу на здраве ћелије, при чему је селективност највише изражена према туморској ћелијској линији дојке MDA-MB 231, док је најнижа вредност уочена код карцинома плућа A549. Међутим, чак и код ове ћелијске линије где је вредност SI најнижа, показано је да је селективност веома добра, што указује на значајан антитуморски потенцијал овог екстракта.

Познато је да су избегавање апоптозе и неконтролисана прогресија ћелијског циклуса главне карактеристике малигнућ ћелија. Прекомерна пролиферација и поремећај њене регулације представљају основни узрок развоја канцера. Кључни регулатори ћелијског циклуса, попут контролних тачака, измењени су у многим туморима, што последично води ка неконтролисаој пролиферацији и акумулацији ткивне масе. Многи хемиотерапеутски агенси који су у употреби управо су дизајнирани како би искористили ове абнормалности, са циљем да зауставе раст тумора и изазову цитотоксичност

туморских ћелија у организму. Идеалан терапеутик би требао да селективно индукује апоптозу у трансформисаним ћелијама, без угрожавања функција нормалних ћелија.

Поред апоптозе, постоје и алтернативни механизми за елиминацију ћелија, укључујући некрозу. Познато је да је некроза облик ћелијске смрти, у коме долази до руптуре плазма мембране и последичне инфламације, која узрокује оштећење локалног, здравог ткива. Насупрот томе, апоптоза је контролисан процес који захвата појединачне ћелије, и не оставља штетне последице на остале ћелије. Повезана је са уклањањем апоптотичних ћелија и апоптотских тела фагоцитима, који на њиховој површини препознају тзв. „поједи ме“ (енгл. „eat me“) сигнале. Сам процес апоптозе је прецизно регулисан догађајима који су у трансформисаним ћелијама измењени, што пружа могућност за примену антитуморских агенаса који ће селективно деловати на ове ћелије. Сходно томе, агенси попут изохинолинских алкалоида, који индукују процес апоптозе, представљају најподеснију стратегију антиканцерске терапије. Због поменутих јасних разлика између апоптозе и некрозе, јасно је да је апоптоза жељени механизам за индукцију ћелијске смрти у туморским ћелијама.

За детекцију апоптозе користе се бројне методе, које могу имати својих предности и мана, те смо због тога спровели више метода у циљу потврде овог типа ћелијске смрти. Резултати добијени Annexin V-FITC/7-AAD тестом показали су да екстракт *C. majus* делује као снажан индуктор апоптозе, са високим процентом апоптотичних ћелија, док је проценат ћелија у некрози занемарљиво мали. Експресија Bcl-2 и Вах протеина, веома значајних регулатора апоптозе, промењена је код третираних ћелија. Што је још важније, равнотежа између ових протеина је нарушена, тако да је покретање механизма апоптозе фаворизовано. Међутим, морфолошки критеријум је и даље најспецифичнији метод којим се могу уочити промене специфичне за апоптозу (243). Управо због тога, резултати добијени проточном цитометријом потврђени су проценом морфолошких промена до којих је дошло код ћелија третираних екстрактом.

Смрт ћелија канцера може да буде индукована не само утицајем на молекуле који су укључени у покретање апоптозе, већ и ометањем ћелијског циклуса. Познато је да је апоптоза регулисана генима који су укључени и у ћелијски циклус (262,263). Деловањем на ћелијски циклус може се индуковати или спречити апоптоза. Познато је да неки лекови и агенси са антитуморским дејством могу бити фазно-специфични. Нпр.цитарабин, метотрексат и тиоурацил делују на S фазу ћелијског циклуса, док винка алкалоиди делују на M фазу ћелијског циклуса. Свака фаза ћелијског циклуса поседује контролне тачке, које могу довести до застоја у ћелијском циклусу и омогућити активацију механизма који ће извршити поправку насталог оштећења. Уколико је немогуће поправити оштећење, покреће се процес апоптозе. Испитивањем тока ћелијског циклуса у туморским ћелијским линијама третираним екстрактом *C. majus* добијени су резултати који показују да у овим ћелијама екстракт узрокује застој ћелијског циклуса у G2/M фази, па супримирање G2 контролне тачке може бити механизам којим екстракт узрокује инхибицију раста и индукцију апоптозе у ћелијама канцера. За разлику од нормалних ћелија, ћелије канцера имају дефектну G1 контролну тачку, па је поправка ДНК оштећења више зависна од G2 контролне тачке (264). Зато се сматра да би агенси који делују на овај део ћелијског циклуса могли да се употребе као селективни, специфични антитуморски терапеутици. Наши резултати су у складу са сазнањима да сангвинарин и хелидонин, алкалоиди изоловани из екстракта *C. majus*, инхибирају полимеризацију тубулина и иницирају митотички застој (265,266).

Важан корак у даљој процени антитуморског ефекта екстракта *C. majus* био је да се утврди да ли испитивани екстракт остварује инхибиторно дејство на миграцију ћелија, односно да ли поседује својство да инхибира ширење туморских ћелија. Метастаза тумора укључује одвајање туморских ћелија, инвазију у околно ткиво, интравазацију и дистрибуцију до удаљених органа путем крвних и лимфних судова, затим адхезију за ендотелне ћелије, екстравазацију, инвазију циљаних органа, и на крају пролиферацију.

Миграција канцерских ћелија у околно ткиво је главни процес који промовише метастазу тумора, која је главни узрок смрти пацијената оболелих од рака. Тест инхибиције миграције на туморским ћелијским линијама дојке (MDA-MB 231), колона (HCT116) и плућа (A549) показао је да екстракт у нетоксичним концентрацијама инхибира миграцију све три ћелијске линије. Недавна *in vivo* студија (234) показала је значајно смањење броја метастаза код мишева, носиоца тумора, након интраперитонеалне примене екстракта *C. majus*. Ови резултати подржавају могућу употребу екстракта у превенцији и терапији метастаза.

Стандардна процедура лечења малигнитета укључује примену хемиотерапеутика и зрачења. Зато је испитан ефекат удруженог деловања екстракта *C. majus* са конвенционалним начинима онколошког лечења.

Доксорубицин је потентан антинеопластик, који је у широкој употреби у лечењу бројних врста карцинома. Попут осталих цитостатика који се користе у терапији неоплазми, узрокује бројне нежељене ефекте, укључујући кардиомиопатију, алопедију, мучнину и повраћање, као и супресију коштане сржи. Ови нежељени ефекти и резистенција која се може развити, ограничавају његову употребу. *Safaa* и сарадници (239) показали су да одређени секундарни метаболити биљака, укључујући сангвинарин, могу бити корисни када се примењују са доксорубицином, јер на тај начин снижавају IC_{50} вредност овог лека. Резултати нашег истраживања показали су да је комбиновани третман екстрактом и доксорубицином ефикаснији од монотретмана доксорубицином, односно да се исти ефекат може постићи са мањим концентрацијама доксорубицина када се комбинује са екстрактом *C. majus*. Важно је напоменути да је синергистички ефекат код све три ћелијске линије постигнут при нижим концентрацијама доксорубицина. Овај налаз сугерише да екстракт *C. majus*, када се на одговарајући начин прилагоде концентрације екстракта и доксорубицина, може представљати корисну адјувантну терапију. Сходно

томе, за постизање истог ефекта, могла би бити смањена доза доксорубицина, самим тим и бројна нежељена дејства.

Поред хирургије и антинеопластика, у савременој медицинској пракси, радијација се користи као ефикасан модалитет у лечењу неоплазми, са крајњим циљем постизања најоптималнијег терапеутског ефекта. Током протеклих година, главни изазови у лечењу канцера су фокусирани на планирање одговарајућег третмана и циљану испоруку лека, како би се побољшали терапијски ефекти и минимизирали одговарајући ненамерни, споредни ефекти. Међутим, радијациона онкологија се суочава са ограничењима попут толеранције на зрачење, те је у циљу постизања бољих клиничких исхода, потребно интегрисати биолошке иновације у радијациону терапију. Молекуларно циљани лекови, попут радиосензитизера, добијају све већу пажњу последњих година. Новија истраживања указују на то да би неке од биљака које се користе у традиционалној кинеској медицини могле бити корисне уколико се примене у комбинацији са конвенционалном медицином, као ефективни хемосензитизери и радиосензитизери, као и у палијативној нези. Резултати мета-анализе из 2015.године показали су да инјекција *Shenqi Fuzheng*, направљена од биљака које су у употреби у кинеској медицини, може побољшати клиничку ефикасност и смањити радијациону токсичност (пнеумонију, езофагитис и супресију коштане сржи), код пацијената оболелих од неситноћелијског карцинома плућа (267).

У литератури не постоје подаци који указују на потенцијалну употребу целокупног екстракта *C. tajus* као радиосензитизера. Зато је један од циљева овог рада, био управо да се испита утицај екстракта на осетљивост туморских ћелијских линија карцинома плућа (A549), колона (HCT116) и дојке (MDA-MB 231), на зрачење γ -зрацима. Добијени резултати показали су да је код свих ћелијских линија дошло до значајног повећања осетљивости туморских ћелија на зрачење када се примени комбинација претретмана екстрактом веома ниских концентрација и зрачења, у поређењу са нетретираним ћелијама које су само озрачене. Поред тога, клоногеним тестом утврђено је да је код ћелија које су

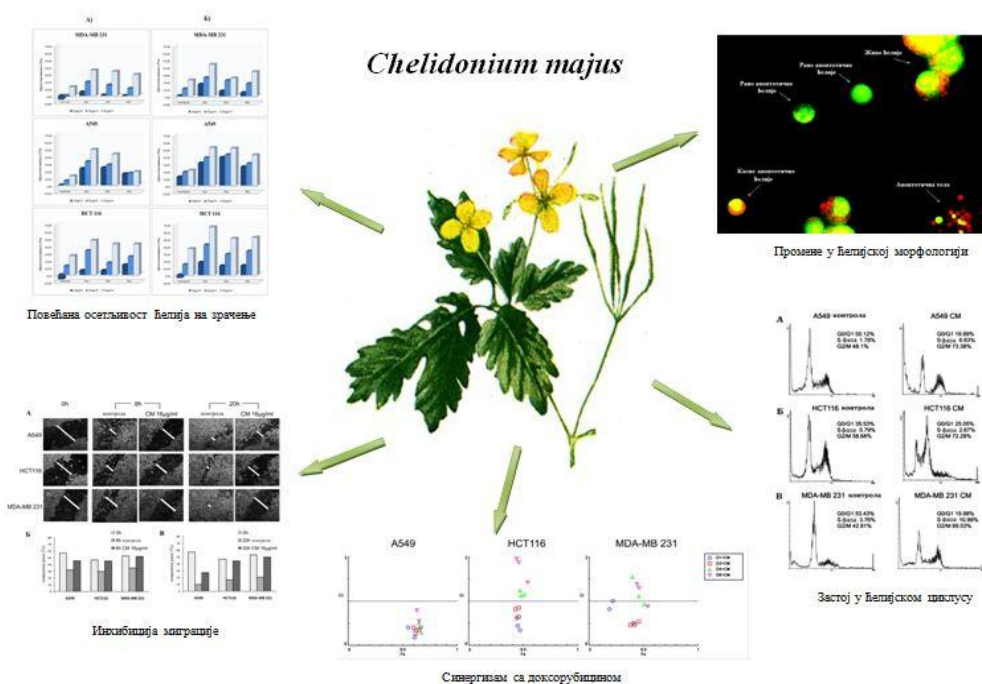
најпре подвргнуте претретману екстрактом у нетоксичној концентрацији, а потом озрачене, смањена или потпуно изгубљена способност ћелија да формирају колоније.

Радијација различитим механизмима доводи до смрти ћелије. Зрачење оштећује плазма мембрану и доводи до хидролизе сфингомијелина, што узрокује повећану продукцију интрацелуларног церамида. Тада долази до покретања апоптозе, путем церамидних сигналних путева, који укључују промену експресије антиапоптотских протеина и активацију каспаза (268). Студија из 1997. године показала је да хелеритрин инхибицијом протеин киназе C , која доводи до активације сфингомијелиназе (СМазе), смањује праг за апоптозу, те сходно томе повећава ниво ћелијске смрти индуковане зрачењем (269). Поред тога, инхибицијом транскрипционог фактора NF-κB повећава се осетљивост канцерских ћелија на покретање процеса апоптозе приликом радиотерапије, те сангвинарин у екстракту *C. majus*, као потентан инхибитор овог фактора, може бити делимично одговоран за повећану осетљивост ћелија на зрачење (270). Добијени резултати свакако указују на могућу примену екстракта *C. majus* као радиосензитизера, односно као агенса који ће повећањем осетљивости туморских ћелија на γ-зрачење, повећати ефикасност радијационе терапије, а са друге стране смањити резистентност и нежељене ефекте.

In vitro испитивање антитуморске активности екстракта *Chelidonium majus* указало је на антитуморски потенцијал овог екстракта, који је испољио цитотоксично дејство према испитиваним туморским ћелијама дојке, колона и плућа, као и значајну селективност у антитуморској активности према овим ћелијама, у односу на здраве ћелије фибробласта. Ова селективна цитотоксичност је итекако битна, обзиром да конвенционални хемиотерапеутици услед неселективности, поседују разарајуће последице на пролиферацију здравих ћелија у организму. Поред тога, показано је да екстракт у веома ниским концентрацијама може деловати синергистички са доксорубицином, те би као адјувантна терапија могао бити искоришћен уз

конвенционалну терапију, чиме би се повећала ефикасност терапије и смањили бројни и озбиљни нежељени ефекти који прате примену хемиотерапеутика. Утврђено је, такође, да екстракт у веома ниским, нетоксичним концентрацијама значајно повећава осетљивост трансформисаних ћелија на зрачење, што би у терапији могло бити искоришћено, те би се употребом екстракта као претретман зрачењу, могла смањити доза зрачења, а истовремено би и споредни ефекти као и резистентност малигнућ ћелија били увелико мањи. И на крају, али не мање битно, утврђено је да екстракт инхибира миграцију туморских ћелија, па би овај потенцијал екстракта могао бити искоришћен у превенцији појаве метастаза, главни узрок смрти код пацијената оболелих од карцинома.

Утврђени директни и индиректни антитуморски ефекти екстракта *C. majus*, постижу се захваљујући мноштву алкалоида и других биоактивних компоненти смеше, које могу испољити синергистички и/или плејотропни ефекат, те на тај начин испољити већу ефикасност у односу на примену појединачних компоненти смеше. Са друге стране, употреба целокупног екстракта је једноставнија и економски исплатљивија, и нема губитака биоактивних једињења приликом изолације. Резултати су показали да екстракт испољава антитуморске ефекте у *in vitro* условима, те би овај потенцијал требало испитати и у *in vivo* условима.



6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу комплетне анализе добијених резултата може се закључити следеће:

1. Екстракт испољава директно антитуморско дејство *in vitro*:

- Испитивани екстракт *Chelidonium majus* показује временски- и дозно-зависно повећање цитотоксичности свих испитиваних туморских ћелијских линија, уз добру селективност према овим малигним ћелијама у односу на здраве, нетрансформисане ћелије (фибробласте);

- У третираним туморским ћелијским линијама (A549, HCT116 и MDA-MB 231) екстракт у високом проценту индукује апоптозу, што је потврђено и одређивањем протеина карактеристичних за овај процес на A549 ћелијама;

- Третман A549 ћелија екстрактом, индукује морфолошке промене типичне за апоптозу

- У третираним ћелијама екстракт доводи до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса, са пратећим смањењем процента ћелија у G0/G1 фази.

- Дејство екстракта и доксорубицина је синергистичко, а овај ефекат зависи од ћелијске линије на коју се примењује, као и од примењене дозе доксорубицина.

2. Екстракт испољава индиректно антитуморско дејство *in vitro*:

• Екстракт *Chelidonium majus* инхибира миграцију А549, НСТ116 и МДА-МВ 231 ћелија.

• Екстракт *C. majus* у нетоксичним концентрацијама повећава осетљивост А549, НСТ116 и МДА-МВ 231 ћелија на γ -зрачење

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? *Pharm Res.* 2010; 27:950-961.
2. Neergheen VS, Bahorun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology.* 2010; 278:229-241.
3. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005; 100:72–79.
4. Boyd MR, Paull KD. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research.* 1995; 34:91–109.
5. Kumar D, Prakash O, Kumar A. Potential antifertility agents from plants: A comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2013; 140:1–32.
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012; 75:311-335.
7. Holton RA, Somoza C, Kim HB, Liang F, Biediger RJ, Boatman PD, Shindo M, Smith CC, Kim S. First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring. *J Am Chem Soc.* 1994; 116:1597-1598.
8. He Z, Wan X, Schulz A, Bludau H, Dobrovolskaia M A, Stern ST, Sokolsky M. A High Capacity Polymeric Micelle of Paclitaxel: Implication of High Dose Drug Therapy to Safety and In Vivo Anti-Cancer Activity. *Biomaterials.* 2016.
9. Bordbar MR, Bazrafshan A, Karimi M. Successful Management of Vinblastin Overdose with Exchange Transfusion: A Case Report. *Iranian journal of pediatric hematology and oncology.* 2015; 5(2):113.

10. Venghateri JB, Gupta TK, Verma PJ, Kunwar A, Panda D. Ansamitocin P3 depolymerizes microtubules and induces apoptosis by binding to tubulin at the vinblastine site. *PLoS one*. 2013; 8(10):e75182.
11. Imbert TF. Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie*. 1998; 80:207-222.
12. Damayanthi Y, Lown YW. Podophyllotoxins: current status and recent developments. *Curr Med Chem*. 1998; 5:205-252.
13. Greenspan EM, Leiter J, Shear MJ. Effect of alpha-peltatin, beta-peltatin, podophyllotoxin on lymphomas and other transplanted tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1950; 10:1295-1333.
14. Kamal A, Ali Hussaini SM, Rahim A, Riyaz S. Podophyllotoxin derivatives: a patent review (2012–2014). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2015; 25(9):1025-1034.
15. Liu YQ, Tian J, Qian K, Zhao XB, Morris-Natschke SL, Yang L, Lee KH. Recent Progress on C-4-Modified Podophyllotoxin Analogs as Potent Antitumor Agents. *Medicinal research reviews*. 2015; 35(1):1-62.
16. Ezoe S. Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *International journal of environmental research and public health*. 2012; 9(7):2444-2453.
17. Smith NA, Byl JAW, Mercer SL, Dewese JE, Osheroff N. Etoposide quinone is a covalent poison of human topoisomerase II β . *Biochemistry*. 2014; 53(19): 3229-3236.
18. Mappa S, Marturano E, Licata G, Frezzato M, Frungillo N, Ilariucci F, Baldini L. Salvage chemoimmunotherapy with rituximab, ifosfamide and etoposide (R-IE regimen) in patients with primary CNS lymphoma relapsed or refractory to high-dose methotrexate-based chemotherapy. *Hematological oncology*. 2013; 31(3):143-150.
19. Halpern AB, Estey EH, Othus M, Orlowski KF, Powell MA, Chen TL, Ranker EM. Mitoxantrone, etoposide, and cytarabine (MEC) following epigenetic priming with decitabine in adults with relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS): A phase 1 study. *Blood*. 2014; 124(21):3730-3730.

20. Santana-Davila R, Devisetty K, Szabo A, Sparapani R, Arce-Lara C, Gore EM, Whittle J. Cisplatin and etoposide versus carboplatin and paclitaxel with concurrent radiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer: An analysis of Veterans Health Administration data. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33(6):567-574.
21. Zimmermann S, Dziadziuszko R, Peters S. Indications and limitations of chemotherapy and targeted agents in non-small cell lung cancer brain metastases. *Cancer treatment reviews*. 2014; 40(6):716-722.
22. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc*. 1966; 88:3888-3890.
23. Cragg GM, Newman DJ. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *Journal of Natural Products*. 2004; 67:232-244.
24. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. *Mol Pharm*. 2010; 7:307-349.
25. Dev S, Dhaneshwar SR, Mathew B. Discovery of Camptothecin based Topoisomerase I Inhibitors: Identification Using an Atom based 3D-QSAR, Pharmacophore Modeling, Virtual Screening and Molecular Docking Approach. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2016.
26. Kukec RR, Grabnar I, Vovk T, Mrhar A, Kovac V, Cufer T. Febrile neutropenia in chemotherapy treated small-cell lung cancer patients. *Radiology and oncology*. 2015; 49(2):173-180.
27. Mandraveli E, Theodosopoulou E, Pistofidis A, Alexandratou K, Alexandratos A, Xatzopoulou A, Marinos E. The action of hyperthermia in metastatic colorectal cancer in combination with chemotherapy. *Progress in Health Sciences*. 2015; 5(1):69.

28. Previs RA, Armaiz-Pena GN, Lin YG, Davis AN, Pradeep S, Dalton HJ, Coleman RL. Dual Metronomic Chemotherapy with Nab-Paclitaxel and Topotecan Has Potent Antiangiogenic Activity in Ovarian Cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2015; 14(12): 2677-2686.
29. Hamilton G, Klameth L, Rath B, Thalhammer T. Synergism of cyclin-dependent kinase inhibitors with camptothecin derivatives in small cell lung cancer cell lines. *Molecules*. 2014; 19(2):2077-2088.
30. Rahma OE, Duffy A, Liewehr DJ, Steinberg SM, Greten TF. Second-line treatment in advanced pancreatic cancer: a comprehensive analysis of published clinical trials. *Annals of oncology*. 2013; 24(8):1972-1979.
31. Venditto VJ, Szoka FC. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs! *Advanced drug delivery reviews*. 2013; 65(1):80-88.
32. Martins S, Tho I, Reimold I, Fricker G, Souto E, Ferreira D, Brandl M. Brain delivery of camptothecin by means of solid lipid nanoparticles: formulation design, in vitro and in vivo studies. *International journal of pharmaceutics*. 2012; 439(1):49-62.
33. Cheng X, Qiu N, Yang J, Liu H, Wen J, Wang W, Chen L. Preparation, Characterization, and In Vivo Study of 7-Ethyl-14-Aminocamptothecin-Loaded Poly (Ethylene Glycol) 2000-Poly (Lactic Acid) 2000 Polymeric Micelles Against H460 Human Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015; 104(11):3934-3942.
34. Shetzer Y, Solomon H, Koifman G, Molchadsky A, Horesh S, Rotter V. The paradigm of mutant p53-expressing cancer stem cells and drug resistance. *Carcinogenesis*. 2014; 35(6):1196-1208.
35. Schroder S, Beckmann K, Franconi G, Meyer-Hamme G, Friedemann T, Greten HJ. Can medical herbs stimulate regeneration or neuroprotection and treat neuropathic pain in chemotherapy-induced peripheral neuropathy? *Evid-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

36. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559–1564.
37. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija. Data status, Beograd*. 2005; 5: 693-710.
38. World Health Organization, Global battle against cancer won't be won with treatment alone – effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis, *Cent. Eur. J. Public Health*. 2014; 22(1):23–28.
39. International Agency for Research of Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, <http://globocan.iarc.fr/>
40. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
41. Hanahan D, Weinberg A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011; 144:646-674.
42. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010; 25:85–101.
43. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res*. 2008; 6:1521–1533.
44. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002; 2:103–112.
45. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26:1324–1337.
46. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Moscow)*. 1997; 62(11):1180-90.
47. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 9–18.

48. Chen Y, Zhang Y. Functional and mechanistic analysis of telomerase: An antitumor drug target. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 163:24–47.
49. Terali K, Yilmazer A. New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. *Biochimie*. 2016; 121:170-178.
50. Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev*. 2013; 39: 444–456.
51. Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, Chang W, Meng Z, Cheung P, Ji H. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009; 460:66–72.
52. Wang ZA, Xiang Z, Yu P. Asymptotic dynamics on a singular chemotaxis system modeling onset of tumor angiogenesis. *J. Differential Equations*. 2016; 260:2225–2258.
53. Li D, Xie K, Zhang L, Yao X, Li H, Xu Q, Wang X, Jiang J, Fang J. Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Letters*. 2016; 377:164–173.
54. Berx G, Van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2009; 1:a003129.
55. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141:52–67.
56. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141:39–51.
57. Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin–integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci*. 2013; 126: 393–401.
58. Warburg OH. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: ArnoldConstable),1930.
59. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism:a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009; 23:537–548.

60. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010a; 20:51–56.
61. Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene.* 2010b; 29:625–634.
62. Barberis BHL, West ACM, Buffa FM. Gene Expression Signatures as Biomarkers of Tumour Hypoxia. *Clinical Oncology.* 2015; 27(10):547-560.
63. Prendergast GC, Jaffee EM. *Cancer immunotherapy: immune suppression and tumor growth.* Academic Press, 2013.
64. DuPage M., Mazumdar C, Schmidt LM., Cheung AF, Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature.* 2012; 482(7385):405-409.
65. Bukur J, Jasinski S, Seliger B. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. In *Seminars in cancer biology* ,Academic Press. 2012; 22(4):350-358)
66. Matheu MP, Othy S, Greenberg ML, Dong TX, Schuijs M., Deswarte K, Cahalan MD. Imaging regulatory T cell dynamics and CTLA4-mediated suppression of T cell priming. *Nature communications*, 2015.
67. De la Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernández E, Vallejo Benítez A, Brugal Molina J, Sánchez-Margalet V. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
68. Crescioli S, Correa I, Karagiannis P, Davies AM, SuttonBJ, Nestle FO, Karagiannis SN. IgG4 Characteristics and Functions in Cancer Immunity. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016; 16:7.
69. Beyer M, Schultze J. Immunoregulatory T cells: role and potential as a target in malignancy. *Curr Oncol Rep.* 2008; 10:130–136.
70. Eiró N, Vizoso FJ. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg.* 2012; 4(3): 62-72.

71. Minn AJ. Interferons and the Immunogenic Effects of Cancer Therapy. *Trends in immunology*. 2015; 36(11):725-737.
72. Rusthoven CG et al. Improved survival with stereotactic ablative radiotherapy (SABR) over lobectomy for early stage nonsmall cell lung cancer (NSCLC): addressing the fallout of disruptive randomized data. *Ann. Transl. Med.* 2015; 3:149.
73. Yom SS. Radiation treatment of head and neck cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2015; 24:423–436.
74. Avendanoj C, Menéndez C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. 2015; 2:23-241.
75. Thomsen FB, Brasso K, Christensen I J, Johansson JE, Angelsen A, Tammela TL, Iversen P. Survival benefit of early androgen receptor inhibitor therapy in locally advanced prostate cancer: Long-term follow-up of the SPCG-6 study. *European Journal of Cancer*. 2015;51(10):1283-1292.
76. Fernando J, Kumar S. *Principles of cancer treatment by immunotherapy*. Surgery (Oxford). 2015; 33(3):117-121.
77. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, Hess U. Addition of rituximab improves the outcome of adult patients with CD20-positive, Ph-negative, B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): results of the randomized Graall-R 2005 study. *Blood*. 2015; 126(23): 1-1.
78. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, D'Amico R. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *The Cochrane Library*, 2012.
79. Maximiano S, Magalhães P, Guerreiro MP, Morgado M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs*. 2016; 30(2):75-86.
80. Santoro V, Jia R, Thompson H, Nijhuis A, Jeffery R, Kiakos K, Hochhauser D. Role of Reactive Oxygen Species in the Abrogation of Oxaliplatin Activity by Cetuximab in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015; 108(6):394.

81. Lee JY, Kim K, Lee YS, Kim HY, Nam EJ, Kim S, Kim YT. Treatment preferences of advanced ovarian cancer patients for adding bevacizumab to first-line therapy. *Gynecologic Oncology*, 2016.
82. Sakata Y, Kawamura K, Shingu N, Ichikado K. Erlotinib plus bevacizumab as an effective treatment for leptomeningeal metastases from EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016; 99:120-122.
83. Gautschi O, Mach N, Rothschild SI, Li Q, Stahel RA, Zippelius A, Rauch D. Bevacizumab, Pemetrexed, and Cisplatin, or Bevacizumab and Erlotinib for Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer Stratified by Epidermal Growth Factor Receptor Mutation: Phase II Trial SAKK19/09. *Clinical lung cancer*. 2015;16(5):358-365.
84. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nature*. 2012;12: 278-287.
85. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J.Immunol*. 2014; 192(12):5451–5458.
86. Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist*. 2001; 6:35-55.
87. Ortiz A, Fuchs SY. Anti-metastatic functions of type 1 interferons: Foundation for the adjuvant therapy of cancer. *Cytokine*, 2016.
88. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science*. 1986; 233(4770):1318–1321.
89. Koller KM, Wang W, Schell TD, Cozza EM, Kokolus KM, Neves RI, Mallon CA. Malignant Melanoma—The Cradle of Anti-Neoplastic Immunotherapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2016.
90. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston, PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13(10):714-726.
91. Huang Y, Tang Q, Hou JQ, Zhang XY, Zhang PLZ, Jiang G. Nanoscale drug delivery for targeted chemotherapy. *Cancer letters*. 2016; 379(1):24-31.

92. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39:295-312.
93. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novak B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transition. *Journal of Cell Science.* 2012; 125:4703-4711.
94. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation.* 2003; 36(3):131-49.
95. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation.* 2003; 36(3):165-75.
96. Đelić N, Stanimirović Z. Principi genetike. *Elit medica.* 2004; 93-101.
97. Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(5), 297-306.)
98. Dowdy S, Kaulich M. Cyclin D: Cdk4/6 activates RB by mono-phosphorylation during early G1 phase. *Cancer Research.* 2014; 74(19): 1304-1304.
99. Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Raulet D. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *The Journal of experimental medicine.* 2012; 209(13): 2409-2422.
100. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation.* 2003; 36(3):165-75.
101. King RJB. *Cancer Biology.* Harlow, England; New York: Prentice Hall, 2000.
102. Greinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC, Rapp A. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research.* 2012; 40(20):10263-10273.
103. Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira I I, Bishop AJ, Motoyama N, Finkel T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science.* 2012; 336(6078): 225-228.

104. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggresome accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(46):27986-28000.
105. Kitagishi Y, Matsuda S, Minami A, Ono Y, Nakanishi A, Ogura Y. Regulation in Cell cycle via p53 and PTEN Tumor Suppressors. *Cancer Stud Mol Med Open J*. 2014; 1(1):1-7.
106. Petrović M, Todorović D. Apoptoza i ćelijski ciklus. *Racionalna terapija*. 2014; 6(1):21-32.
107. Hindley C, Philpott A. The cell cycle and pluripotency. *Biochem J*. 2013; 451:135-143.
108. Yhang J, Wan L, North B, Inuzuka H, Wei W. The role od APC E3 Ubiquitin ligase complex in tumorigenesis. *Springer*. 2014. 89-111;
109. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003; 3:421-429.
110. Lukas C, Bartkova J, Latella L, Falck J, Mailand N, Schroeder T, Sehested M, Lukas J, Bartek J. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res*. 2001; 61:4990–4993.
111. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, PiwnicaWorms H, Elledge SJ. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 1997; 277:1497-1501.
112. Lu M, Breysens H, Salter V, Zhong S, Hu Y, Baer C, Knapp S. Restoring p53 function in human melanoma cells by inhibiting MDM2 and cyclin B1/CDK1-phosphorylated nuclear iASPP. *Cancer cell*. 2013; 23(5):618-633.
113. Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug discovery today*. 2012; 17(5): 194-202.
114. Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, Vandenabeele P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*. 2009; 11:1050-1062.

115. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH . Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differ.* 2009; 16(1):3-11.
116. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14:1237-1243.
117. Yamashima T, Oikawa S. The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Progress in neurobiology.* 2009; 89(4):343-358.
118. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature.* 2015; 517:311–320.
119. Van Noorden CJ. The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem.* 2001; 103:241-251.
120. Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Mocarski ES. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288(43):31268-31279.
121. Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe.* 2007; 2:147-159.
122. Jagtap P, Szabo C. Poly-(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4:421-440.
123. Vanlangenakker N, Berghe TV, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr Mol Med.* 2008; 8:207-220.
124. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* 2007; 87:99-163.

125. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a wellorchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1757:1371-1387.
126. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 2000; 1:489-495.
127. Eulalia VM, Pablo B, Vicente S, Francisco B, Victoria M, González LJ. Avascular necrosis in HIV-infected patients receiving antiretroviral treatment: study of seven cases. *HIV clinical trials*, 2015.
128. Vaidya SA, Korner C, Sirignano MN, Amero M, Bazner S, Rychert J, Altfeld M. Tumor necrosis factor α is associated with viral control and early disease progression in patients with HIV type 1 infection. *Journal of Infectious Diseases.* 2014; 210(7): 1042-1046.
129. Hao B, Cheng S, Clancy CJ, Nguyen MH. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2013; 57(1): 326-332.
130. Vanden Berghe T, Kalai M, Denecker G, Meeus A, Saelens X, Vandenabeele P. Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis not. *Cell. Signal.* 2006; 18: 328-335.
131. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4):239-257.
132. Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell death & disease.* 2014; 5(1): 996.
133. Vang S, Longley K, Steer CJ, Low WC. The unexpected uses of urso-and tauroursodeoxycholic acid in the treatment of non-liver diseases. *Global Advances in Health and Medicine.* 2014; 3(3): 58-69.
134. Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 1995; 5(1):21-26.

135. Ristić-Fira A, Petrović I, Todorović nactivation of HTB63 human melanoma cells by irradiation with proton and gamma rays, *Oncology Rep.* 2004; 12:1323-1328.
136. Wickman G, Julian L, Olson MF. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. *Cell Death & Differentiation.* 2012; 19(5): 735-742.
137. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium- mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(42):26159-26165.
138. Taylor RC, Cullen SP, Martin Sj. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat REV Mol Cell Biol.* 2008; 9:231-241.
139. Metz GE, Galindo I, Abeyá MM, Echeverría MG, Alonso C. Intrinsic, extrinsic and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in RK13 cells infected with equine arteritis virus. *Virus research.* 2016; 213:219-223.
140. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005; 54(7):1024-1033.
141. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology.* 2013; 87(7): 1157-1180.
142. Panganiban RAM, Snow AL, Day RM. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *International journal of molecular sciences.* 2013; 14(8): 15931-15958.
143. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology.* 2013; 14(1):32.

144. Choudhary GS, Al-Harbi S, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*. 2015; 1-9.
145. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2016; 1857(8):1243-1246.
146. Borner C, Andrews DW. The apoptotic pore on mitochondria: are we breaking through or still stuck? *Cell Death Differ*. 2014; 21:187–191.
147. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013; 5(6): a008672.
148. Zhang J, Wang J, Jiang JY, Liu SD, Fu K, Liu HY. Tanshinone IIA induces cytochrome c-mediated caspase cascade apoptosis in A549 human lung cancer cells via the JNK pathway. *International journal of oncology*. 2014; 45(2):683-690.
149. Renault TT, Teijido O, Antonsson B, Dejean LM, Manon S. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x L: keep your friends close but your enemies closer. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2013; 45(1): 64-67.
150. Phesse TJ, Myant KB, Cole AM, Ridgway RA, Pearson H, Muncan V, Clarke AR. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo. *Cell Death & Differentiation*. 2014; 21(6):956-966.
151. Ha JH, Shin JS, Yoon M K, Lee MS, He F, Bae KH, Chi SW. Dual-site interactions of p53 protein transactivation domain with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins reveal a highly convergent mechanism of divergent p53 pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(10): 7387-7398.
152. He K, Zheng X, Zhang L, Yu J. Hsp90 inhibitors promote p53-dependent apoptosis through PUMA and Bax. *Molecular cancer therapeutics*. 2013; 12(11):2559-2568.
153. Takahashi M, Kakudo Y, Takahashi S, Sakamoto Y, Kato S, Ishioka C. Overexpression of DRAM enhances p53-dependent apoptosis. *Cancer medicine*. 2013; 2(1):1-10.

154. Olivos DJ, Mayo LD. MDM2 silencing promotes tumor-initiating cells in osteosarcoma and breast cancer. *Cancer Research*. 2015; 75(15): 2241-2241.
155. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2014; 42(3):125-152.
156. Zhou XY, Liu YJ, Li D. Biological Effects of p53 Mutation W248 and H175 on MCF-7 Cells. In *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications. 2013; 790: 550-554.
157. Lüers A, Neemann N, Prenzel R, Scriba DC, Willborn K, Stropiep U, Griesinger F. P53 disruptive mutation is a negative predictive factor in EGFR M+ NSCLC treated with TKI. *Pneumologie*. 2016; 70(1): 134.
158. Kalis AJ. *Papaveraceae*. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 1979; 28:209-226.
159. Jyoti, Biswas Surjyo. *Chelidonium majus L.-a review on pharmacological activities and clinical effects*. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*. 2013; 2(4):238-245.
160. *Assesment report on Chelidonium majus L., herba*. European medicines agency, 2011.
161. Gañán NA, Dias AM, Bombaldi F, Zygadlo JA, Brignole EA, de Sousa HC, Braga ME. Alkaloids from *Chelidonium majus L.*: Fractionated supercritical CO₂ extraction with co-solvents. *Separation and Purification Technology*. 2016; 165:199-207.
162. Rahman AU, Choudhary MI. Chemistry and biology of steroidal alkaloids. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 1998; 50:61-108.
163. Salminen KA, Meyer A, Jerabkova L, Korhonen LE, Rahnasto M, Juvonen RO, Raunio H. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine*. 2011; 18(6):533-538.
164. Cahlíková L, Hulová L, Hrabínová M, Chlebek J, Hošťálková A, Adamcová M, Macáková K. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*. 2015; 103:192-196.

165. Colombo ML, Bosisio E. Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L.(Papaveraceae). *Pharmacological Research*. 1996; 33(2):127-134.
166. Sárközi A, Janicsák G, Kursinski L, Kéry A. Alkaloid composition of *Chelidonium majus* L. studied by different chromatographic techniques, *Chromatographia*. 2006; 63:81–86.
167. Kursinszki L, Sárközi A, Kéry A, Szöke E. Improved RP-HPLC method for analysis of isoquinoline alkaloids in extracts of *Chelidonium majus*, *Chromatographia*. 2006; 63: 131–135.
168. Suchomelová J, Bochoráková H, Paulová H, Musil P, Táborská E. HPLCquantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae (Short communication), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007; 44:283–287.
169. Táborská E, Bochoráková H, Dostál J, Paulová H. The greater celandine (*Chelidonium majus* L.-review of present knowledge. *Ceska Slov Farm.* 1995; 44(2):71-75.
170. Jakovljević DZ, Stanković MS, Topuzović MD. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI Journal*. 2013;12:260-268.
171. Maji AK, Banerji P. *Chelidonium majus* L.(Greater celandine)–A Review on its Phytochemical and Therapeutic Perspectives. *International Journal of Herbal Medicine*. 2015; 3(1):10-27.
172. Pelagić V. *Stvarni narodni učitelj*. Srpska književna zadruga, Beograd,1893.
173. Mills S, Bone K. *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.
174. Fulde G, Wichtl M. (). *Analytik von Schollkraut*. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 1994; 135: 1031-1035.
175. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpe/733-2009-12.pdf>
176. Van Wyk B-E, Wink M. *Medicinal Plants of the World: An Illustrated Scientific Guide to Important Medicinal Plants and Their Uses*, first ed. Timber Press, Portland, Oregon, 2004.

177. Zuo GY, Meng FY, Hao XY, Zhang YL, Wang GC, Xu GL. Antibacterial alkaloids from *Chelidonium majus* Linn (Papaveraceae) against clinical isolated of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Pharm.Pharm.Sci.* 2008; 11:90–94.
178. Gerencer M, Turecek PL, Kistner O, Mitterer A, Savidis-Dacho H, Barrett NP. In vitro and in vivo anti-retroviral activity of the substance purified from the aqueous extract of *Chelidonium majus* L. *Antivir.Res.* 2006; 72:153-156.
179. Yang G, Lee K, Lee MH, Kim SH, Ham IH, Choi HY. Inhibitory effects of *Chelidonium majus* extract on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 2011; 138(2):398-403.
180. Chung HS, An HJ, Jeong HJ, Won JH, Hong SH, Kim HM. Water extract isolated from *Chelidonium majus* enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor kappa B activation in mouse peritoneal macrophages. *J.Pharm.Pharm.* 2004; 56:129–134.
181. Kim DS, Kim SJ, Kim MC, Jeon YD, Um JY, Hong SH. The therapeutic effect of chelidonic acid on ulcerative colitis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 2012; 35(5):666-671.
182. Heo JI, Kim JH, Lee JM, Lim SS, Kim SC, Park JB. Antioxidant activity and its mechanism of *Chelidonium majus* extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science.* 2013; 21(2):136-141.
183. Mazzanti G, Di Sotto A, Di Giacomo S, Durazzi F, Mariani P, Nicoletti M. *Chelidonium majus* L. does not potentiate the hepatic effect of acetaminophen. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 2013; 65(7- 8):1117-1120.
184. Tierra M, Frawley D. *Planetary Herbology: an integration of Western herbs into the traditional Chinese and Ayurvedic systems.* Motilal Banarsidass Publ. 1999.

185. Shin MC, Jang MH, Chang HK, Lim S, Han SM, Park HJ, Shim I, Lee JS, Kim KA, Kim CJ. Modulation of *Chelidonium Herba* on glycine-activated and glutamate activated ion currents in rat periaqueductal gray neurons. *Clin Chim Acta*. 2003; 337:93-101.
186. Hiller KO, GhorbaniM, Schilcher H. Antispasmodic and relaxant activity of chelidonine, protopine, coptisine, and *Chelidonium majus* extracts on isolated guinea-pig ileum. *PlantaMed*. 1998; 64:758–760.
187. Mahmoud ZER, SafaaZE, Mohamed LA, Ahmad T, Michael W. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids. *Phytomedicine*. 2013; 20:282–294.
188. Aljuraisy YH, Mahdi NKh, Al-Darraji MNJ. Cytotoxic effect of *Chelidonium majus* on cancer cell lines. *Al-AnbarJ.Vet.Sci*, 2012; 5:85–90.
189. Jabłoński M. Ukrain (NSC-631570) influences on bone status: a review. *Drugs under experimental and clinical research*. 1999; 26(5-6):317-320.
190. Song JY, Yang HO, Shim JY, Ahn JY, Han YS, Jung IS, Yun YS. Radiation Protective Effect of an Extract from *Chelidonium majus*. *International journal of hematology*. 2003; 78(3):226-232.
191. Huang KC. *The pharmacology of Chinese herbs*. CRC press, 1998.
192. Bone K, Mills S. *Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine*. Elsevier Health Sciences, 2013.
193. Monavari SH, Shahrabadi Ms, Keyvani H, Bokharai-Salim F. Evaluation of in vitro antiviral activity of *Chelidonium majus* L. against herpes simplex virus type-1. *African. J.Microbiol.Res*. 2012; 6(20):4360-4364.
194. Meng F, Zuo G, Hao X, Wang G, Xiao H, Zhang J, Xu G. Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *J Ehnopharmacol*. 2009; 125(3):494–496.

195. Lendfeld J, Kroutil M, Marsalek E, Slavik J, Preininger V, Simanek V. Isolation, chemistry and biology of alkaloids from plants of the papaveraceae: anti-inflammatory activity of quaternary benzylophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Medica*. 1981; 43(2): 161-165
196. Bark KM, Heo EP, Han KD, Kim MB, Lee ST. Evaluation of the phototoxic potential of plants used in oriental medicine. *J Ethnopharmacol*. 2010; 127(1):11-18.
197. Ma WG, Fukushi Y, Tahara S, Osawa T. Fungitoxic alkaloids from Hokkaido Papaveraceae. *Fitoterapia*. 2000; 71(5):527-534.
198. Song JY, Yang HO, Pyo SN, Jung IS, Yi SY, Yun Ys. Immunomodulatory activity of protein-bound polysaccharide extracted from *Chelidonium majus*. *Archives Pharmacol. Res*. 2002; 25(2):158-164.
199. Khmel'Nitskaia NM, Vorob'Ev KV, Kliachko LL, Ankhimova ES, Kosenko VA, Tryrnva EV, Mal'Tseva GS, Medveded EA. A comparative study of conservative treatment schemes in chronic tonsillitis in children. *Vestn Otorinolaringol*. 1998; 4:39-42.
200. Mitra S, Gole M, Samadjar K, Sur RK, Chakraborty BN. Antihepatotoxic activity of *Chelidonium majus*. *Int J Pharmacognosy*. 1992; 30:125-128.
201. Biswas SJ, Bhattacharjee N, Khuda-Bukhs AR. Efficacy of a plant extract (*Chelidonium majus* L.) in combating induced hepatocarcinogenesis in mice. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(5):1474-1487.
202. Banerjee A, Pathak S, Biswas SJ, Roy-Karmakar S, Boujedaini N, Belon P. *Chelidonium majus* 30C and 200C in induced hepato-toxicity in rats. *Homeopathy* .2010; 99(3):167-176.
203. Kulikova OG, Maltsev DI, Ilyina AP, Yamskova VP, Yamskov IA. Hepatoprotective Activity of Plant Peptides. *American Journal of Plant Sciences*. 2015; 6(7): 848.
204. Hadaruga DI, Hadaruga NG. Antioxidant activity of *Chelidonium majus* L. extracts from the Banat country. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*. 2009; 15(3):396-402.

205. Then M, Szentmihalyi K, Sarkozi A, Varga IS. Examination on antioxidant activity in the greater celandine (*Chelidonium majus* L.) extracts by FRAP method. *Acta Biologica Szegediensis*. 2003; 47(1-4):115- 117.
206. Papuc C, Crivineanu M, Nicorescu V, Predescu C, Rusu E. Scavenging activity of reactive oxygen species by polyphenols extracted from different vegetal parts of celandine (*Chelidonium majus*). *Chemiluminescence Screening. Revista de Chimie*. 2012; 63(2):193-197.
207. Lenfeld J, Kroutil M, Marsalek E, Slavik J, Preininger V, Simanek V. Anti-inflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Medica*. 1981; 43(2):161-165.
208. Lei QF, Zhao XL, Xu LJ, Peng Y, Xiao PG. Chemical constituents of plants from tribe *Chelidoneae* and their bioactivities. *Chinese Herbal Medicines*. 2014; 6(1): 1-21.
209. Park JE, Cuong TD, Hung TM, Lee I, Na M, Kim JC et al. Alkaloids from *Chelidonium majus* and their inhibitory effects on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011; 21(23):6960-6963.
210. Yilmaz BS, Ozbek H, Citoglu GS, Ugraş S, Bayram I, Erdogan E. Analgesic and hepatoprotective effects of *Chelidonium majus* L. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*. 2007; 36(1):9-20.
211. Niederau C, Göpfert, E. The effect of chelidonium-and turmeric root extract on upper abdominal pain due to functional disorders of the biliary system. Results from a placebo-controlled double-blind study. *Medizinische Klinik (Munich, Germany: 1983)*. 1999; 94(8):425-430.
212. Luksa-Lichtenthaeler GL, Ladutko EI, Nowicky JW. Radiomodification effects of Ukrain, a cytostatic and immunomodulating drug, on intracellular glucocorticoid reception during short-term gamma-irradiation. *Drug Exp Clin Res*. 2000; 26(5/6):311-315.

213. Jablonski M, Gorzelak M, Patyra M, Jagieo-Wojtowicz E. Intermittent three-month treatment with Ukrain in intact and ovariectomized rats. Part II: Effect on bone mineral density of the femur. *Drug Exp Clin Res.* 2000; 26(5/6):327-331.
214. Zarei A, Changizi-Ashtiyani S, Rezaei A, Sheidaee H, Nabiyoni F. The effect of *Chelidonium majus* extract on the lipid profile and activity of pituitary-gonadal axis in hypercholesterolemic rats. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences.* 2014; 16(10):18-22.
215. Cho KM, Yoo ID, Kim WG. 8-hydroxydihydrochelerythrine and 8-hydroxydihydrosanguinarine with a potent acetylcholinesterase inhibitory activity from *Chelidonium majus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2006; 29(11):2317-2320.
216. Cahlikova L, Opletal L, Kurfurst M, Macakova K, Kulhankova A, Hostalkova A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Chelidonium majus* (Papaveraceae). *Natural Product Communication.* 2010; 5(11):1751-1754.
217. Sakineh KN, Hosein E. Multiple mechanisms of cell death induced by chelidonine in MCF-7 breast cancer cell line. *Chemico-/biological Interactions.* 2014; 223:141-149.
218. Kemény-Beke A, János Aradi J, Damjanovich JZ, Facskó A, Berta A, Bodnár A. Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Letters.* 2006; 237:67-75.
219. Jun L, Mi YS, Dae SY, TaeYH, Seon WH, Sang HN, Eun-Kyong S, Ki HP, Min SY. Cytotoxic Isoquinoline Alkaloids from *Chelidonium majus* var. *asiaticum*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 2005; 48:198-201.
220. Slunská Z, Gelnarova E, Hammerova J, Taborska E, Slaninova I. Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicology in Vitro.* 2010; 24:697-706.

221. Malikova J, Zdarilova A, Hlobilkova A, Ulrichova J. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Biol Toxicol.* 2006; 22:439-453.
222. Zhang Z, Guo Y, Zhang J, Wei X. Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Arch Pharm Res.* 2011; 34:791-800.
223. Vrba J, Doležel P, Vičar J, Modrianský M, Ulrichová J. Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology In vitro.* 2008; 22:1008-1017.
224. Noureini SK, Wink M. Transcriptional down regulation of hTERT and senescence induction in HepG2 cells by chelidonine. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(29):2603-3610.
225. Joubert A, Lottering ML, Panyer A. Influence of chelidonine, an inhibitor of tubulin polymerization on tyrosine kinase activity in normal, transformed and malignant cell lines. *Biomedical Research.* 2004; 25:27-33.
226. Panzer A, Joubert AM, Bianchi PC, Hamel E, Seegers JC. The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *Eur J Cell Biol.* 2001; 80:111–118.
227. Philchenkov A, Kaminsky V, Zavelevich M, Stoika R. Apoptogenic activity of two benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* L. does not correlate with their DNA damaging effects. *Toxicology In Vitro.* 2008; 22(2):287-295.
228. Colombo ML, Bugatti C, Mossa A, Pescalli N, Piazzoni L, Pezzoni G et al. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco.* 2001; 56(5-7):403-409.
229. Basu P, Bhowmik D, Kumar GS. The benzophenanthridine alkaloid chelerythrine binds to DNA by intercalation: Photophysical aspects and thermodynamic results of iminium versus

- alkanolamine interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2013; 129:57-68.
230. El-Readi MZ, Eid S, Ashour ML, Tahrani A, Wink M. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and *Chelidonium majus* alkaloids. *Phytomedicine*. 2013; 20(3-4):282-294.
231. Ciao J, Wang LJ, Wu MH, Qiao Y, Sun YJ, Guo J. Mechanism governing reversal of multidrug resistance in human breast carcinoma cells by chelerythrine. *Acta Acad Med Sin*. 2011; 33(1):45-50.
232. Sokoloff B. The oncostatic and oncolytic factors present in certain plants. *Oncology*. 1968; 22(1):49-60.
233. Kim DJ, Ahn B, Han BS, Tsuda H: Potential preventive effects of *Chelidonium majus* L. (*Papaveraceae*) herb extract on glandular stomach tumor development in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine (MNNG) and hypertonic sodium chloride. *Cancer Lett*. 1997; 112(2):203–208.
234. Capistrano R, Woutersb A, Lardonb F, Gravekampc C, Apersa S, Pieters L. In vitro and in vivo investigations on the antitumour activity of *Chelidonium majus*. *Phytomedicine*. 2015; 22:1279–1287.
235. Nowicky JW, Staniszewski A, Zbroja-Sontag W, Slesak B, Nowicky W, Hiesmayr W. (). Evaluation of thiophosphoric acid alkaloid derivatives from *Chelidonium majus* L. ("Ukrain") as an immunostimulant in patients with various carcinomas. *Drugs under experimental and clinical research*. 1990; 17(2):139-143.
236. Staniszewski A, Slesak B, Kolodziej J, Harłozinska- Szymrka A, Nowicky JW. Lymphocyte subsets in patients with lung cancer treated with thiophosphoric acid alkaloid derivatives from *Chelidonium majus* L. (Ukrain). *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 1992; 18:63-67.

237. Gansauge F, Ramadani M, Pressmar J, Gansauge S, Muehling B, Stecker K et al. NSC-631570 (Ukrain) in the palliative treatment of pancreatic cancer. Results of a phase II trial. *Langenbecks Archives of Surgery*. 2002; 386(8):570-574.
238. Kadan P, Korsh OB, Melnyk A. Ukrain therapy of recurrent breast cancer with lung metastases (case report). *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 1996; 22(3-5):243-245.
239. Safaa YE, Mahmoyd ZER, Michael W. Synergism of three-dryg combination of sangyinarine and other plant secondary metabolites with digitonin and doxorybicin in mylti-dryg resistant cancer cells. *Phytomedicine*. 2012; 19:1288-1297.
240. Skehan PI, Storeng R, Scydiero D, Monks A, McMakon J, Vistica D, Warren JT, Bokesh H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Nat. Cancer Inst*. 1990; 82:1107–1112.
241. Li J, Liang S, Jin H, Xy C, Ma D, Ly X. Tiam1, negatively regylated by miR-22, miR-183 and miR-31, is involved in migration, invasion and viability of ovarian cancer cells. *Oncology reports*. 2012; 27(6): 1835.
242. Janko C, Jeremic I, Biermann M, Chayrio R, Schorn C, Myñoz LE, Herrmann, M. Cooperative binding of Annexin A5 to phosphatidylserine on apoptotic cell membranes. *Physical biology*. 2013; 10(6):065006.
243. Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević N. Analysis of cycloheximide-indyced apoptosis in hyman leykocytes: Flyorescence microscopy using annexin V/propidiym iodide versys acridin orange/ethidiym bromide. *Cell Biology International*. 2006; 30:924-932
244. Shirali S, Aghaei M, Shabani M, Fathi M, Sohrabi M, Moeinifard M. Adenosine indyces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in hyman ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tymor Biology*. 2013; 34(2):1085-1095.

245. Loos C, Syrovets T, Mysyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Simmet T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials*. 2014; 35(6):1944-1953.
246. Riahi R, Yang Y, Zhang DD, Wong PK. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *Journal of laboratory automation*. 2012; 17(1):59-65.
247. Choy TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzym. Regul.* 1984; 22:27–55.
248. Development of Radiation Modulators for Use during Radiotherapy. National Cancer Institute. <https://sbir.cancer.gov/node/52>).
249. Vokes EE, Weichselbaum RR. Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8:911-934.
250. Sahlberg SH, Spiegelberg D, Lennartsson J, Nygren P, Glimelius Bengt, Stenerlöv B. The effect of a dimeric antibody molecule (ZEGFR: 1907) targeting EGFR in combination with radiation in colon cancer cell lines. *International journal of oncology*. 2012; 40(1):176.
251. Riddle JM. History as a tool in identifying new old drugs. *Adv Exp Med Biol*. 2002; 505:89–94.
252. Perez AT, Arun B, Tripathy D, Tagliaferri MA, Shaw HS, Kimmick GG, Cohen I, Shtivelman E, Caygill KA, Grady D, Schactman M, Shapiro CL. A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(1):111-118.
253. Kienle GS, Berrino F, Büsing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H. Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res.* 2003; 8(3):109-119.
254. Cui Y, Shu XO, Gao YT, Cai H, Tao MH, Zheng W. Association of ginseng use with survival and quality of life among breast cancer patients. *Am J Epidemiol.* 2006; 163(7):645-653.

255. Nouredini SK, Esmaili H. Multiple mechanisms of cell death induced by chelidone in MCF-7 breast cancer cell line. *Chemico-Biol. Interact.* 2014; 223:141–149.
256. Musianowycz J, Judmajer F, Manfreda D, Spangler P, Albrecht H, Hoffmann J. Clinical studies of Ukrain in terminal cancer patients(phase II). *Drugs Exp. Clin.Res.* 1992; 18:45–50.
257. Ernst E, Schmidt K. Ukrain- a new cancer cure? A systematic review of randomised clinical trials. *BMC Cancer.* 2005; 5:69-76.
258. Moussa SZ, El-Meadawy SA, Ahmed HA, Refat M. Efficacy of *Chelidonium majus* and propolis against cytotoxicity induced by chlorhexidine in rats. *Egyptian Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 2007; 25:42-61.
259. Dae JK, Byeongwoo A, Beom SH, Hiroyuki T. Potential preventive effects of *Chelidonium majus* L. (*Papaveraceae*) herb extract on glandular stomach tumor development in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine (MNNG) and hypertonic sodium chloride. *Cancer Lett.* 1997; 112:203–208.
260. Nadova S, Miadokova E, Alfoldiova L, Kopaskova M, Hasplova K, Hudecova A, Vaculcikova D, Gregan F, Cipak L. Potential antioxidant activity, cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Chelidonium majus* L. Extract on leukemia cells. *NeuroEndocrinol. Lett.* 2008; 29:649–652.
261. Fatemeh ZS, Behzad B, Mona O, Fatemeh Z. In vitro cytotoxic activity of four plants used in persian traditional medicine. *Adv. Pharm. Bull.* 2013; 3: 453–455.
262. Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature.* 1987; 5:328(6129):445-449.
263. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 88(3):323-331.
264. Kawabe T. G2checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol.CancerTher.* 2004; 3:513–519.

265. Lopus M, Panda D. The benzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamics through tubulin binding. A possible mechanism for its antiproliferative activity. *FEBSJ*. 2006; 273:2139–2150.
266. Wolff J, Knipling L. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry*. 1993; 32:13334–13339.
267. Jiang H, Zhang H, Hu X, Ma J. A meta-analysis of Shenqi Fuzheng combined with radiation in the treatment of nonsmall cell lung cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2015; 11(5):101.
268. Hernandez MC, Knox SJ. Radiobiology of radioimmunotherapy: targeting CD20 B-cell antigen in non-Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2004; 59(5):1274-1287.
269. Chmura SJ, Mauceri HJ, Advani S, et al. Decreasing the apoptotic threshold of tumor cells through protein kinase C inhibition and sphingomyelinase activation increases tumor killing by ionizing radiation. *Cancer Res*. 1997; 57:4340–4347.
270. Magné N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Van Houtte P, Gérard JP, Peyron JF. NF- κ B modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer letters*. 2006; 231(2):158-168.