



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Драгана Шеклић**

**МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ МИГРАЦИЈЕ**  
**ЋЕЛИЈА КАРЦИНОМА КОЛОНА**  
**У АНТИТУМОРСКОМ ДЕЛОВАЊУ**  
**НОВОСИНТЕТИСАНИХ ПЛАТИНА(IV) КОМПЛЕКСА И**  
**ПРИРОДНИХ БИОАКТИВНИХ СУПСТАНЦИ**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2018. године**

<b>I Аутор</b>
Име и презиме: <b>Драгана С Шеклић</b>
Датум и место рођења: <b>09.12.1981. године, Чачак</b>
Садашње запослење: <b>Стручни сарадник на Природно-математичком факултету у Крагујевцу</b>
<b>II Докторска дисертација</b>
Наслов: <b>Молекуларни механизми миграције хелија карцинома колона у антитуморском деловању новосинтетисаних платина(IV) комплекса и природних биоактивних супстанци</b>
Број страница: 236
Број шема: 24
Број слика: 56
Број табела: 36
Број графикана: 41
Број библиографских података: 376
Установа и место где је рад израђен: <b>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</b>
Научна област (УДК): <b>Биологија, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, 577.2: 591.1</b>
Ментор: <b>Др Снежана Д. Марковић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу</b>
<b>III Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: <b>09.09.2015. године</b>
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: <b>IV-01-485/11, 09.09.2015. године</b>
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:  Др Снежана Марковић, доцент, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; ментор Др Андраш Штајн, редовни професор, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија Др Татајана Митровић, редовни професор, ПМФ Универзитет у Нишу, научна област: Биотехнологија; Др Наташа Ђорђевић, доцент, Државни Универзитет у Новом Пазару, научна област: Биологија; Др Верица Јевтић, доцент, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, научна област Координациона хемија и Бионеорганска хемија.
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:  _____ Др Татајана Митровић, редовни професор, ПМФ Универзитет у Нишу, ужа научна област: Биотехнологија; председник Комисије  _____ Др Наташа Ђорђевић, ванредни професор, Државни Универзитет у Новом Пазару, ужа научна област: Биологија  _____ Др Милош Матић, доцент, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија  _____ Др Верица Јевтић, доцент, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област Неорганска хемија  _____ Др Милена Милутиновић, научни сарадник, ПМФ Универзитета у Крагујевцу, научна област Биологија
Датум одбране докторске дисертације:

*...мами, Александри и Марији*

## Захвалница

*Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, ако део пројеката Министарства на просвету, науку и технолошки развој Републике Србије, број III41010 .*

*Огромну захвалност дугујем свом ментору др Снежани Марковић, доценту Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, на пренетом знању, подрици и разумевању током мог професионалног развоја. Захваљујем се за драгоцене савете и несебичну помоћ коју ми је пружила који су омогућили да ова дисертација буде успешно финализована.*

*Захваљујем се др Татјани Митровић, редовном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу на конструктивним саветима и предлозима у досадашњем раду и током писања ове докторске дисертације.*

*Посебну захвалност дугујем др Наташи Ђорђевић, ванредном професору Универзитета у Новом Пазару на бескрајном стрпљењу, разумевању и подрици како у професионалном тако и у личном развоју.*

*Желела бих да се захвалим свим члановима комисије др Милени Милутиновић, научном сараднику, др Милошу Матићу, доценту и др Верици Јевтић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу на несебичној помоћи, сарадњи, идејама и драгоценим сугестијама током целокупне реализације ове докторске дисертације.*

*Посебу захвалност дугујем др Данијели Матић-Вигњевић на несебичној помоћи у током стицања првих знања о ћелијској биологији, као и на свесрдој помоћи и драгоценим сугестијама у досадашњем раду.*

*Захваљујем се својим колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на великој помоћи и позитивној атмосфери током експерименталног рада.*

*На крају, посебну захвалност дугујем својој породици: супругу Предрагу, брату Драгану и његовој породици и својим родитељима на љубави, разумевању и подрици у сваком тренутку свог живота.*

*Драгана*



## САДРЖАЈ

РЕЗИМЕ	VII
SUMMARY	IX
СПИСАК ШЕМА, СЛИКА, ТАБЕЛА, ГРАФИКОНА	XI
ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА	XV
УВОД	1
1. Канцер дебелог црева – колоректални карцином	1
1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома и фактори ризика	4
1.2. Ћелијске линије као модел системи испитивања колоректалног карцинома	5
2. Миграција, инвазија и метастаза	7
2.1. Метастазе као вишестепени процес	8
2.1.1. Стицање инвазивног потенцијала у процесу ЕМТ - инвазивни фенотип	10
2.2. Индукција и регулација ЕМТ у колоректалном карциному	11
2.3. Протеински маркери ЕМТ	14
2.3.1. Е-кадхерин, грађа, функција, регулација и улога у ЕМТ	14
2.3.2. $\beta$ -катенин као компонента адхерентне међућелијске везе и улога у CRC	16
2.3.3. Frizzled рецептори - активатори Wnt сигналних путева	19
2.3.4. Н-кадхерин - протеин маркер ЕМТ	21
2.3.5. Виментин маркер мезенхимског фенотипа и процеса ЕМТ у ћелији	22
2.3.6. Матрикс металопротеиназе и њихова-улога у ЕМТ у процесу миграције	24
3. Редокс статус	26
3.1. Реактивне врсте кисеоника и азота	26
3.2. Улога ROS и RNS у процесу ЕМТ	28
3.3. Антиоксидациони заштитни систем, глутатион и улога у канцеру	29
4. Терапија канцера, хемиоретапеутици и биоактивне природне супстанце у лечењу CRC	31
4.1. Цисплатина и комплекси платине(IV)	32
4.2. Цитотоксичност и апоптоза	34
4.3. Значај комбинованх третмана хемотерапеутика и биоактивних природних супстанци	35
4.4. Биолошка активност испитиваних врста гљива и лишајева	36
4.4.1. Биомедицински потенцијал гљива	37
4.4.2. Биомедицински потенцијал лишајева	40
ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	42
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	44
1. Хемикалије и реагенси	45
2. Ћелијске линије као модел систем	46
2.1. Култивација ћелијских линија	47
2.2. Третмани	48
2.2.1. Појединачни третмани и преинкубација ћелија	49
2.2.2. Комбиновани третмани и преинкубација ћелија	50
3. Испитивање цитотоксичности и типа ћелијске смрти	50
3.1. МТТ тест за вијабилност ћелија	50
3.2. Акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода	51
4. Испитивање молекуларних механизма миграције ћелија	51
4.1. Испитивање миграторног потенцијала ћелија	51
4.2. Имунофлуоресцентна микроскопска метода за локализацију и квантификацију протеина	52
4.2.1. Одређивање протеинске експресије Frizzled-7 рецептора	53
4.2.2. Одређивање протеинске експресије нуклеарног и цитоплазматског $\beta$ -катенина	53

4.2.3. Одређивање протеинске експресије Е- и Н-кадхерина	54
4.2.4. Одређивање протеинске експресије виментина	54
4.3. Одређивање концентracије металопротеиназе 9	54
5. Испитивање параметара редокс статуса	55
5.1. Одређивање концентracије супероксид анјон радикала (NBT есеј)	55
5.2. Одређивање концентracије нитрита по Griess-у	56
5.3. Одређивање концентracије редукованог глутатиона	56
6. Статистичка обрада резултата	57
6.1. Израчунавање цитотоксичности третмана - IC50 вредности	57
6.2. Израчунавање интеракције ефеката биоактивних супстанци у комбинованим третманима на основу МТТ теста	57
6.3. Обрада резултата за миграторни потенцијал и параметре редокс статуса у односу на број вијабилних ћелија	58
6.4. Квантификација протеинске експресије добијене имунофлуоресценцом помоћу ImageJ софтвера	58
РЕЗУЛТАТИ	61
1. Цитотоксичност третмана и тип ћелијске смрти	61
1.1. Ефекти третмана на вијабилности ћелија и цитотоксичност	61
1.2. Тип ћелијске смрти изазван појединачним и комбинованим третманима	69
2. Ефекти третмана на миграторни потенцијал и механизме миграције ћелија колоректалног карцинома	76
2.1. Ефекти третмана на миграторни потенцијал ћелија	76
2.2. Ефекти третмана на протеинску експресију маркера миграције ћелија	81
2.2.1. Протеинска експресија Е-кадхерина	81
2.2.2. Протеинска експресија β-катенина	91
2.2.2.1. Протеинска експресија цитоплазматског β-катенина	92
2.2.2.2. Протеинска експресија нуклеарног β-катенина	101
2.2.3. Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора на ћелијској мембрани	111
2.2.4. Протеинска експресија Н-кадхерина	120
2.2.5. Протеинска експресија виментина	130
2.3. Концентracије металопротеиназе-9	139
3. Ефекти третмана на редокс статус ћелија колоректалног карцинома	144
3.1. Концентracија супероксид анјон радикала	144
3.2. Концентracија нитрита	150
3.3. Концентracија глутатиона	155
ДИСКУСИЈА	161
ЗАКЉУЧЦИ	184
ЛИТЕРАТУРА	187
ПРИЛОЗИ	209

## РЕЗИМЕ

### Молекуларни механизми миграције ћелија карцинома колона у антитуморском деловању новосинтетисаних платина(IV) комплекса и природних биоактивних супстанци

Колоректални карцином представља другу најчешћи малигни тумор дигестивног тракта и узрок смртности код људи, тако да су истраживања антиканцерогених биоактивних супстанци од великог значаја за терапију ове болести. Разумевање механизма миграције, инвазије, метастазе и испитивање нових биоактивних супстанци са антимигранторним деловањем, представља једну од стратегија у терапији карцинома. Реактивне врсте кисеоника и азота представљају базу регулације низа молекуларно-физиолошких функција у организму, укључујући генезу и прогресију карцинома. Стога је познавање међузависности молекуларних механизма редокс статуса и сигналних путева миграције ћелија карцинома колона од великог значаја. Комплекси платине(IV) имају ефикасније антитуморско деловање у односу на цисплатину, са мањом токсичношћу а већом ефикасношћу у третману резистентних тумора. Тестирани екстракти гљива и лишајева се користе у традиционалној медицини и њихови ефекти на миграцију ћелија колоректалног карцинома нису довољно испитани. Примена котретмана, природних биоактивних супстанца и хемиотерапеутика (цисплатина), као и новосинтетисаних комплекса платина(IV), кроз синергистичко антиканцерогено деловање, доприноси смањењу негативних ефекта хемиотерапеутика.

**Циљ** дисертације је да се испита потенцијално антиканцерогено деловање (цитотоксичност и антимигранторни потенцијал) новосинтетисаних комплекса платине(IV) и биоактивних супстанци из природних извора (екстракти лековитих гљива и лишајева), са акцентом на молекуларне механизме и кључне протеине сигналних путева миграције, као и на параметре редокс статуса у ћелијама колоректалног карцинома. **Специфични циљеви и методологија:** (1) тестирати антиканцерогене ефекте биоактивних супстанци, хемијски новосинтетисаних и екстрахованих из природних извора на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480) у третманима (а) Pt(IV) комплекси: [PtCl<sub>4</sub>(dbu-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс1**, [PtCl<sub>4</sub>(dpe-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс2**, одговарајући лиганди (**Лиганд 1** и **Лиганд 2**), **цисплатина** (позитивна контрола); (б) **екстракти гљива** (*Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*) и **лишајева** (*Platismatia glauca*, *Pseudoevernia furfuraceae*); (в) **котретман** Pt(IV) комплекси са екстрактом *Phellinus linteus*, са акцентом на тип инетрреакције компоненети у котретману; (2) испитати цитотоксичност третмана (МТТ тест) и тип ћелијске смрти (акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода) ћелија канцера и здравих ћелија фибробласта (MRC-5); (3) испитати промене миграаторног потенцијала HCT-116 и SW-480 ћелија, Transwell миграаторним тестом и дефинисањем локализације и квантификацијом кључних протеина сигналних путева миграције и међућелијске комуникације, помоћу имунофлуоресцентне микроскопске методе (Е-кадхерин и цитоплазматски β-катенин, као маркери међућелијских веза; Frizzled-7-рецептор и нуклеарни β-катенин, као маркери Wnt сигналног пута; Н-кадхерин и виментин, као компоненте цитоскелета миграаторних ћелија); (4) одредити концентрацију металопротеиназе 9, колориметријском методом (ELISA); (5) одредити промене параметара редокс статуса (спектрофотометријско одређивање концентрације супероксид анјон радикала, нитрита и редукованог глутатиона).

**Резултати дисертације:** Хемијска једињења, у првом реду Pt(IV) комплекс 2, делују цитотоксично и проапототски на HCT-116 и SW-480 ћелијама. Аптозоа као доминантан тип смрти у третману Pt(IV) комплексима, резултат је дисбаланса редокс статуса. Хемијска једињења, у првом реду Лиганд 1, показују антимигранторне ефекте, који су последица повећане експресије Е-кадхерина и релоцирања у међућелијске везе, стварања међућелијских контаката, као и редукције промигранторних маркера (нуклеарни β-катенин, Н-кадхерин, виментин и MMP-9). Екстракти

гљива, са посебним акцентом на врсту *P. linteus*, показују цитотоксичне и проапототске, ћелијски селективне ефекте. Екстракти гљива, *L. edodes* на НСТ-116 ћелијама, односно *P. linteus* и *S. sinensis* на SW-480 ћелијама, показују антимиграторни потенцијал посредством повећања експресије Е-кадхерина и редукције промиграторних маркера. Екстракти лишајева, са акцентом на врсту *P. furfuracea*, показују цитотоксичне, проапототске и прооксидационе ефекте на ћелијама колоректалног карцинома, док метанолни екстракт испољава антимиграторне ефекте, који су резултат повећања експресије Е-кадхерина и смањења промиграторних протеина. Екстракт *P. glauca* са антиоксидационим деловањем, испољава промиграторни ефекат на SW-480 ћелијама, смањујући експресију Е-кадхерина и цитоплазматског  $\beta$ -катенина и повећавајући нуклерани  $\beta$ -катенин, што указује на нуклерану прераспodelу  $\beta$ -катенина, појачану активацију Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута и активацију репресора експресије Е-кадхерина. Котретмани *P. linteus* са хемијским једињењима (*P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2) показују значајан цитотоксични и проапототски ефекат у односу на појединачне третмане, што указује на синергистичко деловање ових биоактивних супстанци. Котретмани (са нагласком на *P. linteus* + Лиганд 1) показују ефикасније антимиграторно деловање у односу на појединачне третмане, уз значајно повећање експресије Е-кадхерина и смањење промиграторних протеина. Испитивани третмани хемијским супстанцама и екстрактима гљива и лишајева испољавају ћелијски специфичне биолошке ефекте на НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

**Закључци дисертације:** НСТ-116 ћелије су осетљивије на третмане екстрактима лишајева и комбиноване третмане, у смислу цитотоксичних, проапототских, антимиграторних и прооксидационих ефеката третмана. SW-480 ћелије су генерално осетљивије на појединачне третмане хемијским једињењима и екстрактима гљива, у смислу цитотоксичних и проапототских ефеката. Третмани хемијским једињењима показују акутне цитотоксичне ефекте на MRC-5 здравим ћелијама, а након продуженог третмана ћелије се опорављају, док екстракти из природних извора и комбиновани третмани не показују значајне цитотоксичне ефекте на здравим ћелијама, што потврђује њихово антиканцерогено деловање. НСТ-116 ћелије показују добру покретљивост и инвазивни потенцијал - нижа протеинска експресија антимиграторних маркера (Е-кадхерин, цитоплазматски  $\beta$ -катенин и Frizzled 7 рецептор), у односу на промиграторне маркере (нуклеарни  $\beta$ -катенин, Н-кадхерин, виментин, MMP-9). SW-480 ћелије су слабије покретљиве, као последица више експресије антимиграторних и ниже експресије промиграторних протеинских маркера. Сви испитивани третмани показују боље антимиграторне ефекте на НСТ-116 ћелијама, што је последица осетљивости на промене редокс статуса, у првом реду нивоа  $O_2^-$ . Антимиграторна својства испитиваних третмана мање зависе од типа третмана, већ зависе од типа ћелијске линије. Сви третмани са антимиграторним ефектима доводе до повећања антимиграторних епителних протеин маркера (Е-кадхерина) и редукције експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина и мезенхимских маркера (Н-кадхерина, виментина и MMP-9) на обе ћелијске линије. Промене параметара редокс статуса, у смислу повећања концентрације  $O_2^-$  у третманима екстрактима из природних извора, могу се сматрати одговорним за антимиграторни ефекат третмана. Са друге стране, индукција оксидационог стреса, може се повезати са цитотоксичним ефектима третмана.

**Коначан закључак:** Новосинтетисани Pt(IV) комплекси имају побољшана својства у виду цитотоксичних, проапототских и антимиграторних/антиинвазивних ефеката у односу на широко коришћени лек цисплатину. Извори биоактивних супстанци коришћени у традиционалној медицини са подручја на коме примарно расту (испитиване врсте лишајева) показују значајно боље биолошке ефекте у односу на комерцијално добијене врсте (испитиване врсте гљива). Комбиновани третмани Pt(IV) комплекса са природним биоактивним супстанцама дају обећавајуће резултате на ћелијама колоректалног карцинома. Обзиром на ћелијски специфичне одговоре добијене у овом истраживању, увођење у терапију и примена контролисаних доза одређених суплемената исхрани, води ка остваривању бољих антитуморских ефеката код инвазивних форми колоректалног карцинома.

## SUMMARY

### **Molecular mechanisms of colorectal cells migration in antitumor action of new-synthesized platina(IV) complex and natural bioactive substances**

Colorectal carcinoma is the second most common malignant tumor of the digestive tract and cause of mortality in humans, so research of anti-cancer bioactive substances is of great importance for the treatment of this disease. Understanding the mechanisms of migration, invasion, metastasis, and the testing of new bioactive substances with anti-migratory activity is one of the strategies in the treatment of cancer. Reactive oxygen and nitrogen species represent the basis for regulation of molecular-physiological functions in the body, including genesis and progression of the cancer. Therefore, the knowledge of the interdependence of molecular mechanisms of redox status and signaling pathways of migration of colon carcinoma cells is of great importance. Platinum(IV) complexes have more effective anti-tumor activity compared to cisplatin, with lower toxicity and greater efficacy in the treatment of resistant tumors. Tested extracts of mushrooms and lichen are used in traditional medicine and their effects on the migration of colorectal carcinoma cells have not been particularly tested. The use of natural bioactive substances and chemotherapeutics (cisplatin, as well as newly synthesized platinum(IV) complexes) in co-treatment, through synergistic anticancer activity, contributes to the reduction of the negative effects of chemotherapeutics.

The **aim** of the dissertation is to investigate the possible anticancer activity (cytotoxicity and anti-migratory potential) of newly synthesized platinum(IV) complexes and bioactive substances from natural sources (extracts of medicinal mushrooms and lichen), with emphasis on molecular mechanisms and key proteins for migration signaling pathways, as well as on parameters of redox status in colorectal carcinoma cells. **Specific objectives and methodology:** (1) to test the anticancer effects of bioactive substances, chemically newly synthesized substances and those extracted from natural sources on colon carcinoma cell lines (HCT-116, SW-480) in treatments with (a) Pt(IV) complexes: [PtCl<sub>4</sub>(dbu-*S,S*-eddp)] - **Pt(IV) complex 1**, [PtCl<sub>4</sub>(dpe-*S,S*-eddp)] - **Pt(IV) complex 2**, corresponding ligands (**Ligand 1** and **Ligand 2**), **cisplatin** (positive control); (b) mushrooms extracts (*Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*) and **lichens** (*Platismatia glauca*, *Pseudovernia furfuraceae*); (v) **co-treatment** of Pt(IV) complexes with the extract of *Phellinus linteus*, with an emphasis on the type of interreaction; (2) to examine the cytotoxicity of the treatments (MTT assay) and the type of cell death (acridine orange/ethidium bromide microscopic method) for cancer cells and healthy fibroblast cells (MRC-5); (3) to examine changes in the migratory potential of HCT-116 and SW-480 cells, the *Transwell* migration assay, and the definition of localization and the quantification of key proteins of migration signaling pathways and intercellular communication using an immunofluorescence microscopic method (E-cadherin and cytoplasmic  $\beta$ -catenin as markers of intercellular connections; Frizzled-7 receptor and nuclear  $\beta$ -catenin, as markers of Wnt signaling pathway; N-cadherin and vimentin, as components of cytoskeleton of migratory cells); (4) to determine the concentration of metalloproteinase 9 by colorimetric method (ELISA); (5) to determine the changes in redox status parameters (spectrophotometric determination of the concentration of superoxide anion radical, nitrites and reduced glutathione).

**Results of the dissertation:** Chemical compounds, primarily Pt(IV) complex 2, act cytotoxic and pro-apoptotic on HCT-116 and SW-480 cells. Apoptosis as the dominant type of cell death in the treatment with Pt(IV) complexes is the result of a redox imbalance. The chemical compounds, in particular Ligand 1, show anti-migratory effects due to increased expression of E-cadherin and relocation to intercellular bonds, the formation of cellular contacts, and the reduction of pro-migratory markers (nuclear  $\beta$ -catenin, N-cadherin, vimentin and MMP- 9). Mushroom extracts, with a special emphasis on *P. linteus*, show cytotoxic and pro-apoptotic, cell-selective effects. Mushroom extracts, *L. edodes* on HCT-116 cells, or *P.*

*linteus* and *C. sinensis* on SW-480 cells, show anti-migratory potential by increasing the expression of E-cadherin and reducing pro-migratory markers. The lichen extracts, with the emphasis on *P. furfuracea*, show cytotoxic, pro-apoptotic and pro-oxidative effects on colorectal carcinoma cells, while the methanol extract exhibits anti-migratory effects, which are the result of an increase in E-cadherin expression and a decrease in pro-migratory proteins. *P. glauca* extract with anti-oxidative action, exhibits a pro-migratory effect on SW-480 cells, reducing the expression of E-cadherin and cytoplasmic  $\beta$ -catenin and increasing nuclear  $\beta$ -catenin, indicating a nuclear redistribution of  $\beta$ -catenin, enhanced Wnt/ $\beta$ -catenin activation signaling pathway and activation of E-cadherin expression repressor. Co-treatment of *P. linteus* with chemical compounds (*P. linteus* + Pt(IV) complex 2) show significant cytotoxic and pro-apoptotic effects related to individual treatments, indicating the synergistic action of these bioactive substances. Co-treatments (with emphasis on *P. linteus* + Ligand 1) show more effective anti-migratory action related to individual treatments, with a significant increase in E-cadherin expression and reduction in pro-migratory proteins. The examined treatments with chemical substances and extracts of fungi and lichen express cellular specific biological effects on HCT-116 and SW-480 cells.

**Conclusions of the dissertation:** HCT-116 cells are more susceptible to treatments with lichen extracts and co-treatments, in terms of cytotoxic, pro-apoptotic, anti-migratory and pro-oxidative effects. The SW-480 cells are generally more sensitive to individual treatments with chemical compounds and mushroom extracts, in terms of cytotoxic and pro-apoptotic effects. Treatments with chemical compounds show acute cytotoxic effects on MRC-5 healthy cells, with certain recovery of cells after prolonged treatment, while extracts from natural sources and combined treatments do not show significant cytotoxic effects on healthy cells, which confirm their anticancer activity. HCT-116 cells exhibit good mobility and invasive potential – lower protein expression of anti-migratory markers (E-cadherin, cytoplasmic  $\beta$ -catenin and Frizzled 7 receptor) compared to pro-migratory markers (nuclear  $\beta$ -catenin, N-cadherin, vimentin, MMP-9). SW-480 cells are less mobile, because of greater expression of anti-migratory and lower expression of pro-migratory protein markers. All examined treatments show better anti-migratory effects on HCT-116 cells, which is a consequence of sensitivity to the redox status changes, especially in relation with  $O_2^-$  levels. The anti-migratory properties of the examined treatments are less dependent on the type of treatment but depend on the type of cell line. All treatments with anti-migratory effects lead to an increase in anti-migratory epithelial protein markers (E-cadherin) and the reduction of the expression of nuclear  $\beta$ -catenin and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin and MMP-9) on both cell lines. Changes in redox status parameters, in terms of increased  $O_2^-$  concentration, in treatments with extracts from natural sources, can be considered responsible for the anti-migratory effect of treatment. On the other hand, induction of oxidative stress can be associated with cytotoxic effects of treatment.

**The final conclusion:** The newly synthesized Pt(IV) complexes possess improved properties in the form of cytotoxic, pro-apoptotic and anti-migratory/anti-invasive effects compared to the widely used cisplatin drug. Sources of bioactive substances used in traditional medicine from the area where they primarily grow (investigated lichens species) show significantly better biological effects than commercially obtained species (investigated mushroom species). Combined treatments of the Pt(IV) complex with natural bioactive substances provide promising results on colorectal carcinoma cells. Given the cell-specific responses obtained in this study, the introduction into therapy and the application of controlled doses of certain nutritional supplements lead to the achievement of better antitumor effects in invasive forms of colorectal carcinoma.

## СПИСАК ШЕМА, СЛИКА, ТАБЕЛА И ГРАФИКОНА

- Шема 1.** Хистолошка грађа дебелог црева
- Шема 2.** Колоректални карцином, аденом-карцином секвенца
- Шема 3.** Типови ћелијске миграције
- Шема 4.** Метастатска каскада и ЕМТ прелазни стадијуми
- Шема 5.** Процес епително-мезенхимске транзиције
- Шема 6.** Сигнални путеви укључени у ЕМТ у колон канцеру
- Шема 7.** Структура  $\beta$ -катенина
- Шема 8.** Канонски Wnt сигнални пут
- Шема 9.** Улога NO у ћелији канцера
- Шема 10.** Интеракције цисплатине и DNK
- Шема 11.** Плодоносно тело гљиве *Phellinus linteus*
- Шема 12.** Плодоносно тело гљиве *Cordyceps sinensis*
- Шема 13.** Плодоносно тело гљиве *Coprinus comatus*
- Шема 14.** Плодоносно тело гљиве *Lentinus edodes*
- Шема 15.** Плодоносно тело гљиве *Ganoderma lucidum*
- Шема 16.** Талус лишаја *Pseudoevernia furfuracea*
- Шема 17.** Талус лишаја *Platismatia glauca*
- Шема 18.** Хемијска синтеза Pt(IV) комплекса
- Шема 19.** Морфолошки изглед НСТ-116 ћелија на електронском микроскопу
- Шема 20.** Морфолошки изглед SW-480 ћелија на електронском микроскопу
- Шема 21.** Морфолошки изглед MRC-5 ћелија на електронском микроскопу
- Шема 22.** Квантификација протеинске експресије помоћу ImageJ софтвера
- Шема 23.** Протеинска експресија антимигранторних/промигранторних маркера у НСТ-116 ћелијској линији
- Шема 24.** Протеинска експресија антимигранторних/промигранторних маркера у SW-480 ћелијској линији
- Слика 1.** Типичне морфолошке промене НСТ-116 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увећање 400 $\times$
- Слика 2.** Типичне морфолошке промене SW480 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увећање 400 $\times$
- Слика 3.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама
- Слика 4.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима
- Слика 5.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива
- Слика 6.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева
- Слика 7.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h)
- Слика 8.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима
- Слика 9.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива
- Слика 10.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева.
- Слика 11.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h)
- Слика 12.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама
- Слика 13.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима
- Слика 14.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива
- Слика 15.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева
- Слика 16.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$  катенина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h)
- Слика 17.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима
- Слика 18.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива
- Слика 19.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева
- Слика 20.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h)





- Табела 7.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-0h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на НСТ-116 ћелијској линији
- Табела 8.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-6h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на НСТ-116 ћелијској линији
- Табела 9.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-0h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на SW-480 ћелијској линији
- Табела 10.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-6h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на SW-480 ћелијској линији
- Табела 11.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија, након третмана хемијским једињењима
- Табела 13.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија након комбинованих третмана КТ-0h
- Табела 14.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија након комбинованих третмана КТ-6h
- Табела 15.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија, након третмана хемијским једињењима
- Табела 16.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након третмана екстрактима гљива и лишажева
- Табела 17.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након комбинованих третмана КТ-0h
- Табела 18.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након комбинованих третмана КТ-6h
- Табела 19.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 20.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 21.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 22.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 23.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 24.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 25.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 26.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 27.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 28.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 29.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.
- Табела 30.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита ( $NO_2^-$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 31.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 32.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 33.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 34.** Ефекти екстраката гљива и лишажева на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Табела 35.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама
- Табела 36.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама
- Графикон 1.** Ефекти хемијских једињења на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија
- Графикон 2.** Ефекти екстраката гљива на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија
- Графикон 3.** Ефекти екстраката лишажева на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија

**Графикон 4.** Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност НСТ-116 ћелија

**Графикон 5.** Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност SW-480 ћелија.

**Графикон 6.** Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност MRC-5 ћелија.

**Графикон 7.** Процент живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија, након комбинованих третмана екстрактом *Phellinus linteus* (50 µg/mL) и хемијским једињењима (10 µM)

**Графикон 8.** Процент живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија, након комбинованих третмана екстрактом *Phellinus linteus* (50 µg/mL) и хемијским једињењима (10 µM)

**Графикон 9.** Миграторни потенцијал НСТ-116 и SW-480 ћелија.

**Графикон 10.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних хемијским једињењима

**Графикон 11.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних екстрактима гљива

**Графикон 12.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних метанолним екстрактима лишајева

**Графикон 13.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија након котретмана *P. linteus* и хемијским једињењима

**Графикон 14.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних хемијским једињењима

**Графикон 15.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних екстрактима гљива

**Графикон 16.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних метанолним екстрактима лишајева

**Графикон 17.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија након котретмана *P. linteus* и хемијским једињењима

**Графикон 18.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 19.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима

**Графикон 20.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива

**Графикон 21.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева

**Графикон 22.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h)

**Графикон 23.** Концентрација ММП-9 у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима.

**Графикон 24.** Концентрација ММП-9 у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива

**Графикон 25.** Концентрација ММП-9 у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева

**Графикон 26.** Концентрација ММП-9 у SW-480 ћелијама након котретмана

**Графикон 27.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 28.** Ефекти екстраката гљива на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 29.** Ефекти екстраката лишајева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 30.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 ћелијама

**Графикон 31.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у SW-480 ћелијама

**Графикон 32.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 33.** Ефекти екстраката гљива на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 34.** Ефекти екстраката лишајева на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 35.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита у НСТ-116 ћелијама

**Графикон 36.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита у SW-480 ћелијама

**Графикон 37.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 38.** Ефекти екстраката гљива на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 39.** Ефекти екстраката лишајева на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама

**Графикон 40.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију GSH у НСТ-116 ћелијама.

**Графикон 41.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију GSH у SW-480 ћелијама.

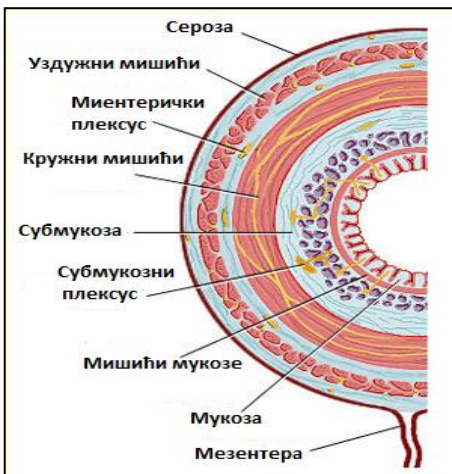
## ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

АО/ЕБ - акридин оранж/етидијум бромид	КТ - комбиновани третмана
AOS - антиоксидациони заштитни систем	LRP - <i>Low-density lipoprotein Receptor related Protein</i>
AP-1 – активатор протеин-1	МАРК – митогени активатор протеин киназе
APC - <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>	МЕТ - мезенхимско-епителна транзиција
ARM - <i>Armadillo</i>	miRNA - микро РНК
ATCC - <i>The American Type Culture Collection</i>	MMP - металопроотеиназе
Bcl-2 - <i>B-cell lymphoma 2</i>	mRNA –информациона РНК
bHLH - <i>Basic Helix-Loop-Helix</i>	NBT – нитро <i>blue</i> тетразолијум
Bid - <i>BH3 interacting-domain death agonist</i>	NCI – Национални Институт за канцер
BM - базална мембрана	NF-κB - <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
BSA - говеђи албумин из серума	NHERF - <i>Na/H Exchanger Regulatory Factor</i>
CAF - канцеру придружени фибробласти	NO – азот моноксид
CI - комбинациони индекс	NOS - <i>Nitric Oxide Synthase</i>
СКII - казеин киназа II	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> - супероксид ањон радикал
CRC- колоректални карцином	ONOO <sup>-</sup> - пероксинитрит
CRD - цистеином богати домени	p38 - <i>P38 Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
СТС - циркулишуће туморске ћелије	PDGFR - <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptors</i>
СТС – циркулишуће ћелије карцинома	PKC - протеин киназа C
DMEM - медијум за гајење ћелија	PI3K/AKT - <i>Phosphatidyl Inositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase/Protein kinase B</i>
DNK – дезоксирибонуклеинска киселина	Pt(II) - платина(II)
Dsh- <i>Dishevelled</i>	Pt(IV) - платина(IV)
ECM – екстрацелуларни матрикс	PTP - протеин тирозин фосфатаза
EGF - епидермални фактор раста	RAK - <i>Rac/p21-activated</i>
EGFR – рецептор епидермалног фактора раста	RNK - рибонуклеинска киселина
EMT - епитенло-мезенхимска транзиција	RNS – реактивне врсте азота
FADD - <i>Fas Associated Death Domain Protein</i>	ROS - реактивне врсте кисеоника
FAP - <i>Familiar Adenomatous Polyposis</i>	SCRIB - <i>Scribbled homolog</i> протеин
FBS – фетални телећи серум	SOD - супероксид дисмутаза
FZD - <i>Frizzled</i>	TAM - канцеру придружене макрофаге
FOXC2 - <i>Forkhead box protein C2</i>	TCF/LEF - Т-ћелијски фактор/лимфоцитни везујући фактор
GBP - GSK3β везујући протеин	TCF3 - транскрипциони фактор 3
GM-CSF - гранулоцито-макрофаге колонијални стимулирајући фактор	TGF - трансформишући фактор раста
GSH - глутатион	TIMP – ткивни инхибитор металопроотеиназе
GSK3β – гликоген ситетаза киназе 3β	TNF/Fas - <i>Tumor Necrosis Factor/Fatty acid synthetase</i>
HGF – фактор раста хепатоцита	TNFα - <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
Hh - <i>Hedgehog</i>	Wnt - <i>Wingless</i>
hMLH - <i>Human MutL Homolog</i>	YY1 - <i>Yin Yang 1</i>
HNPCC - <i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>	ZEB - <i>Zinc finger E-box Binding homeobox</i>
IL-2 - интерлеукин 2	
JNK - <i>c-Jun N-terminal Kinase</i>	
KLF8 - <i>Krüppel-like family of transcription factor</i>	

## УВОД

### 1. Канцер дебелог црева - колоректални карцином

Дебело црево је завршни део гастроинтестиналног тракта, а чине га цекум, апендикс, колон и ректум. Колон је највећи део дебелог црева, са основном улогом у мешању несварених делова хране са слузи и бактеријама флоре колона, и формирање фецеса. У слузокожи колона врши се апсорпција највећег дела воде и минералних материја. Мишићним покретима зида црева, фекалије се померају у завршни део дебелог црева - ректум. Овде се фекалије складиште пре него што се излуче преко аналног отвора (Ponz и Di, 2001).



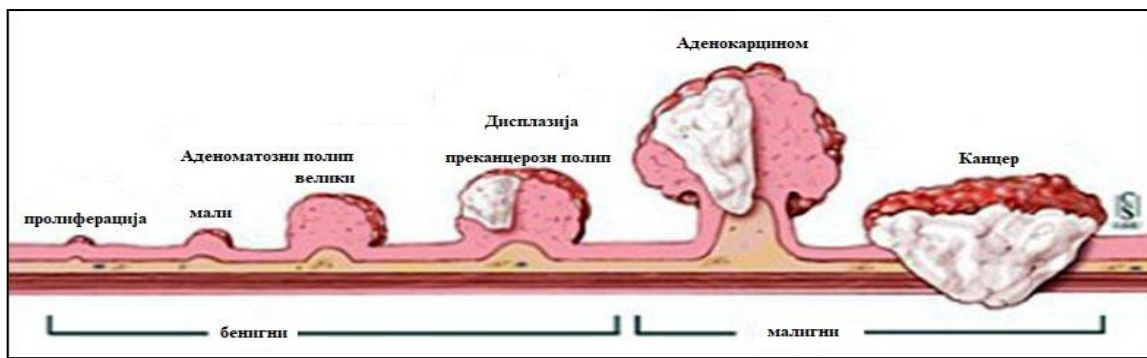
**Шема 1.** Хистолошка грађа дебелог црева (модификовано са <http://www.gistsupport.org>)

У хистолошкој грађи зида дебелог црева разликују се четири слоја. Непосредно уз зид трбушне дупље налази се сероза, испод је мишићни слој који се састоји од уздужних и кружних мишића. Мишићни слој са унутрашње стране облаже субмукоза - слој везивног ткива. Испод субмукозног слоја налази се слој мукозе који се састоји од једног слоја епителних ћелија (површинског епитела), везивног ткива (базалне ламине) и мишићног слоја (*lamina muscularis mucosae*), (Шема 1) (Guyton, 2003).

Унутрашњу површину дебелог црева карактерише велики број инвагинација-крипти које залазе у слој везивног ткива и то до дубине од око 50 ћелија, а називају се Либеркинијеве крите са основном улогом у апсорпцији воде. Ћелије слузокоже дебелог црева се обнављају деобом и диференцијацијом из матичних ћелија смештених у доњим деловима крипти, а затим мигрирају ка лумену црева (Ponz и Di, 2001).

Међу најчешћа обољења дебелог црева спадају синдром иритабилног колона, инфламаторне болести црева (улцерозни колитис и Кронува болест), колоректални полипи и колоректални карцином (енгл. *ColoRectal Carcinoma*, CRC) (Ponz и Di, 2001). Колоректални карцином представља канцерозну лезију која настаје или у зиду колона или у зиду ректума. Услед мутације у ћелијама епитела, долази до пролиферације ћелија и стварања проканцерозне лозе ћелија које за последицу имају формирање аберантне крипте цревног епитела (Weinberg, 2007; Ponz и Di, 2001).

Удружене са новонасталим мутацијама, а услед одржавања континуитета у поремећеној пролиферацији и диференцијацији ћелија епитела, настаје агрегација епителног ткива тј. аденоматозни полип (аденом). Даљи настанак проканцерозне лезије иде преко фаза интермедијарни и касни аденом, да би на крају дошло до трансформације у аденокарцином. Стадијум аденокарцином *in situ* је још увек на интактној базалној мембрани. Прве морфолошке промене на унутрашњем слоју зида црева уочавају се као диспластичне промене. Када дође до деградације базалне мембране, карцином већ има метастатски потенцијал и прелази у инвазивни карцином (Шема 2), (Weinberg, 2014). Канцер дебелог црева најчешће метастазира у јетру и плућа (Weitz и сар., 2005). Колоректални аденокарцином може захватити само поједине или све слојеве зида дебелог црева.



**Шема 2.** Колоректални карцином, аденом-карцином секвенца  
(модификовано са <http://www.acgaec.com/colon-polyps?lightbox=imageyip>)

Клиничка слика CRC у својоим почетним фазама је асимптоматска или је прате симптоми који не дају типичну клиничку слику. CRC одликује веома спор раст, па од почетка болести до испољавања првих симптома најчешће прође између 5-10 година. Симптоматологија надаље зависи од локализације и степена развоја саме болести (Weinberg, 2014).

Према **типу ћелија** од којих настају, колоректални тумори се могу класификовати на: 1) аденокарциноме (настају у жезданим ћелијама у зиду црева), 2) планоцелуларне карциноме (настају од ћелија сличних ћелијама коже), 3) карциноидне туморе (неуроендокрини карциноми), 4) саркоме (настају из глаткомишићних ћелија) и 5) лимфоме (тумори лимфног ткива). Више од 95% CRC су аденокарциноми (Ponz и Di, 2001).

Према **начину настанка** CRC се деле на: спорадичне, наследне и фамилијарне. Најучесталији облик канцера дебелог црева је спорадични, док је најмања учесталост наследног карцинома. У 10-30% случајева ради се о фамилијарном типу колоректалног карцинома.

Спорадични CRC је најчешћи по својој учесталости. Одликује се тиме што не постоје породичне и наследне предиспозиције, већ се мутације јављају код појединца без утицаја наслеђа

(Суас и сар., 1999). Губитак хетерозиготности за *APC* (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli*) ген, праћене мутацијама *K-ras* гена а затим и *p53*, су ране појаве у спорадичној колоректалној канцерогенези. Такође, мутације и у генима *DCC* и *SMAD* заступљене су у око 80-95% случајева спорадичног типа колоректалног карцинома (Weitz и сар., 2005).

Наследни CRC, са уделом од 3 до 5% свих CRC, у својој основи има наследну компоненту тј. мутације које се наслеђују. Главна одлика наследног CRC је развој болести у раном животном добу. Најчешће се наслеђује склоност у виду наследне полипозе дебелог црева (енгл. *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* - HNPCC) позната као Линчов синдром. Пацијенте са овим синдромом одликује повећана склоност ка различитим типовима канцера, а нарочито према колон канцеру. У основи стоје мутације у *hMLH* (енгл. *Human MutL Homolog*) генима репарационог система (*hMLH1* и *hMLH2*), који резултира микросателитским нестабилностима, које су одговорне за већину случајева HNPCC (Martin и сар., 2007; Mitchell и Sullivan, 2001; Dunlop и сар., 2000; Aarnio и сар., 1999; Millar и сар., 1999).

Око 20% случајева CRC повезано је са породичним наслеђем у виду фамилијарног колоректалног карцинома (енгл. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP). Људи са класичним типом FAP поседују многобројне бенигне полипе у дебелом цреву већ у раној младости. Број полипа се повећава годинама, па их у дебелом цреву може бити до хиљаду. Просечна старост у којој долази до развоја карцинома је 39 година (Weitz и сар., 2005). У основи је рана мутација *APC* гена, која доводи до стварања аденома код кога долази до активирања мутације *K-ras* онкогена, а надаље са губитком функције туморских супресора *SMAD4* и *p53* долази до прелаза аденома у карцином (Lengauer и сар., 1998). Ово је класичан пример развоја карцинома малигном алтерацијом аденома путем названим аденом-карцином секвенца (Kinzler и Vogelstein, 1998).

У литератури је познат и варијетет ослабљена (атенуирана) FAP, где је појава и раст полипа одложен, а CRC се развија око 55 године, тзв. Гарднеров синдром. Овај синдром одликује присуство полипа на другим местима у организму а узроковано је класичном и атенуораном FAP. У клиничкој пракси уочен је и трећи најблажи тип FAP, назван аутозомна рецесивна FAP. У клиничкој слици овог поремећаја долази до развоја мањег броја полипа (мање од 100 полипа), а главни узрок је двоалелна мутација у гену *MUTYH* чине овај тип канцера компатибилним са FAP фенотипом (Segditsas и Tomlinson, 2006; Weitz и сар., 2005).

Синдром тестерастих (вилонских) полипа, познат као синдром хиперпластичне полипозе, је релативно редак синдром кога карактерише мноштво тестерасто назубљених полипа присутних у колону. До 1996. године се мислило да ови полипи не могу малигно алтерирати, међутим данас је познато да из оваквих полипа може настати CRC (Weinberg, 2014; O'Brien и сар., 2007).

## 1.1. Епидемиологија колоректалног карцинома и фактори ризика

Учесталост CRC варира у различитим подручјима света. Колоректални карцином се сматра једним од главних узрочника смртности у Европи и развијеним земљама света. У Србији од CRC оболи 3800, а умре 2300 особа годишње. Колоректални карцином је други најчешћи узрок смртности, код мушкараца после карцинома плућа, а код жена после карцинома дојке. У Србији, код оба пола, учесталост обољевања од CRC расте са годинама старости и највећа је код мушкараца од 70-74 године, а код жена са 75 година и више. У новије време уочава се пораст броја оболелих у млађем животном добу до 40 година (Altobelli и сар., 2014). Епидемиолошке студије су показале да је учесталост оболевања од CRC већа у развијеним земљама. Такође је показано да код становништва које мигрира из неразвијених у развијене земље долази до повећане стопе оболевања. То последично доводи у везу начин живота, начин исхране (исхрана богата мастима) и физичку неактивност са настанком канцера (Altobelli и сар., 2014; Boyle и Lagman 2000).

У најзначајније факторе ризика за CRC спадају начин исхране, генетска предиспозиција, старосно доба. Такође у факторе ризика убрајају се телесна тежина, физичка неактивност, пушење, конзумирање алкохола, постменопауза код жена. Највећи фактор ризика, поред генетске предиспозиције, јесте начин исхране. Исхрана богата воћем и поврћем као изворима целулозних влакана смањује ризик од овог типа канцера (Fernández и сар., 2016). Повећан ризик од CRC имају особе које имају личну историју аденоматозних полипа или породичну историју канцера дебелог црева. Висок ризик имају и особе са историјом инфламаторних болести црева (улцерозни колитис или Кронова болест) или имају један од два наследне синдрома (HNPCC или FAP) (Aarnio и сар., 1999).

Развој сваке малигне промене је вишестепен процес, а у основи стоје промене у различитим групама гена. Ћелије карцинома карактерише неконтролисана пролиферација, измене енергетског метаболизма, бесмртност, избегавање програмиране ћелијске смрти (одсуство апоптозе), способност упостављања неоангиогенезе, и способност формирања секундарних тумора (метастаза) (Weinberg, 2014). Инвазивни потенцијал, инвазивност и метастатски потенцијал са тенденцијом продирања у околна ткива, "расејавање" путем крвотока и лимфотока и формирање метастаза на удаљеним органима у организму, главне су карактеристике малигнућ ћелија (De Rosa и сар., 2015; Weinberg, 2014).

## 1.2. Ћелијске линије као модел системи испитивања колоректалног карцинома

Истраживање и откривање нових, потенцијалних антитуморских лекова обухвата многобројна претклиничка и клиничка тестирања. У претклиничким истраживањима потенцијално активно антиканцерогено једињење се испитује на ћелијским линијама и анималним моделима. Потенцијални антиканцерогени лекови пролазе прескрининг на неколико ћелијских линија, а једињења која покажу цитостатску или цитотоксичну активност се испитују детаљније на најчешће 60 различитих ћелијских линија пореклом из различитих органа (Burger и Fiebig, 2004).

Ћелијске линије представљају изоловане популације ћелија способне за гајење у лабораторијским условима. Према критеријуму да ли за свој раст захтевају везу са подлогом, могу бити: адхерентне (залепљене) или у суспензији (не захтевају везу са подлогом или другим ћелијама). Према генетичкој структури ћелијске линије могу бити: генетички идентичне (хомогене) или генетичке различите (хетерогене) популације. Ћелијске линије (културе) могу бити примарне и имортализоване. Примарне ћелијске културе су добијене непосредном изолацијом из ткива, поступцима центрифугирања из крви, механичком изолацијом (пресовањем ткива кроз различите филтере) или ензимском деградацијом (коришћењем колагеназа и трипсина). Поред предности које несумњиво имају примарне културе (очувана генетичка и морфолошка структура), значајни су недостаци у смислу изолације, пречишћавања и чувања примарних култура (каратак животни век, смањење вијабилности изолованих ћелија, и др.). Други тип ћелија су имортализоване ћелијске линије, које су такође изоловане као примарне културе, а затим генетички измењене са циљем очувања неограничене способности пролиферације. Имортализоване ћелијске линије комерцијално се купују одабиром из колекција ћелијских линија као што су ATCC (*The American Type Culture Collection*) и ECACC (*The European Collection of Animal Cell Cultures*) (Harrison и Rae, 1997). Имортализоване ћелијске линије су нашле многобројне примене у истраживањима молекуларне биологије ћелије, физиологије, биохемије. Веома су погодне за изучавање ћелијских процеса: сигнализације, пролиферације, диференцијације и ћелијске смрти (Cvetković и сар., 2017; Živanović и сар. 2017; Šeklić и сар., 2016; Milutinović и сар., 2015; Ćurčić и сар. 2012).

Испитивања на културама ћелија су у основи истраживања молекуларних процеса који се догађају у ћелијама канцера. Ефекти терапеутских агенаса, хемијских једињења или лекова могу се евалуирати упоредо на здравим и малигним ћелијама. У том смислу, ћелијске линије пружају могућност за лако истраживање ћелијских механизма, са једне стране, али и механизма којима подлежу тестиране супстанце, са друге стране (Cvetković, 2017; Ćurčić, 2014; Allen и сар., 2005). Коришћење ћелијских линија је нашло примену у решавању проблема повезаних са механизмима



настанка одређене болести и развоју нових дијагностичких и терапеутских процедура. Недостаци рада на ћелијским линијама су везани за изолованост ћелија из природног окружења, где под утицајем средине, ћелије свакако мењају своје карактеристике, те се радом на ћелијским линијама добија ужа слика проблема. У том смислу, новија истраживања као што су култура ткива и ткивни инжињеринг, које у својој основи имају манипулацију различитим ћелијским линијама, донекле симулирају услове природног микроокружења. Поред примене у поступцима генске манипулације, производње вирусних вакцина, у ћелијским линијама, технологијом рекомбинантне DNK, добијају се биолошки производи као што су ензими, специфични протеини, хормони, моноклонска антитела, интерлеукини, и др. Криопрезервација и складиштење матичних ћелија је још једна од примена културе ћелија. Због свега наведеног култура ћелија је постала основ молекуларне генетике, имунологије, фармакологије и производње лекова и готово неопходна за развој биотехнологије (Harrison и Rae, 1997).

Комерцијално набављене ћелијске линије CRC представљају добар модел систем за истраживање ефеката потенцијалних лекова, јер се ефекти могу испитивати у односу на познате генетичке абнормалности карактеристичне за дату линију. HCT-116 је имортализована адхерентна ћелијска линија која је изолована из примарног хуманог канцера дебелог црева. По морфологији ове ћелије су епителу сличне, а по миграторним способностима веома инвазивне. Одликује их брз и прогресиван раст и диплоидан кариотип. Ова ћелијска линија експримира кератин, маркер епителних ћелија, док са друге стране експримира и TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  (енгл. *Transforming Growth Factor*), стога је погодна за испитивање процеса епително-мезенхимске транзиције. HCT-116 експримирају Fizzled 7 рецептор, поседују мутиран ген за  $\beta$ -катенин, док су APC и p53 гени немутирани, па је у том смислу ова ћелијска линија погодна за испитивање компоненти Wnt сигналног пута. Такође мутирани су и гени репарационог система MLH1 и TC71 као и ras протоонкоген у кодону 13.

Ћелијска линија SW-480 је такође имортализована, изолована из примарног хуманог аденокарцинома дебелог црева. Ћелије су полигоналног облика, епителу-сличне морфологије, а карактеристична је раст у малим кластерима. Има анеуплоидни кариотип и нешто спориче пролиферише у односу на HCT-116 ћелије. Такође представља инвазивни тип канцера колоне, експримира и кератин, Fizzled 7 рецептор, епидермални фактор раста (EGF) као и GM-CSF (енгл. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) који је карактеристичан за ћелије имуног система са улогом цитокина. Ова ћелијска линија експримира онкогене c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, myb, sis и fos, а поседује и мутацију у кодону 12 за ras протоонкоген. APC и p53 гени су мутирани док је ген за  $\beta$ -катенин немутиран као и ген за MLH1 (Пуас и сар., 1997). Собзиром на горе наведено, може се закључити да HCT-116 и SW-480 ћелијске линије представљају добар модел

систем са испитивање цитоксичних ефеката антиканцерогених активних супстанци, као и механизма миграције ћелија канцера.

MRC-5 је имортализована адхерентна ћелијска линија изолована из здравих феталних фибробласта плућа. По морфологији ћелије су вретенастог облика, а одликује је веома брз раст. Собзиром да нема познате генске мутације, представља добар контролни модел систем за поређење ефеката потенцијалних антиканцерогених лекова на здраве ћелије.

## 2. Миграција, инвазија и метастаза

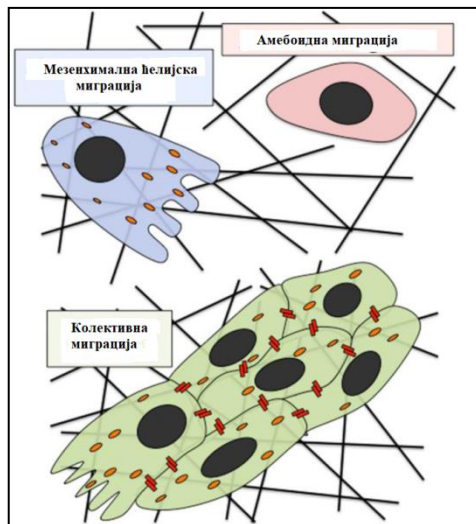
Ћелијска миграција је неопходан процес током живота, почев од ембрионалног развоја (гаструлација, ембрионална морфогенеза, развој нервног система, развој васкуларног система и палценте), као и током одржавања хомеостатских процеса у организму (имуни одговор). У току развоја канцера, миграција ћелија представља кључни проблем у третману пацијената, а и лош је прогностички маркер (Friedl и Wolf, 2010).

Ћелијска **миграција** подразумева свако кретање ћелија у простору, и може бити 2D или 3D. У *in vitro* условима, ћелијска миграција може се одвијати према одређеном атрактанту (извор хране), без присуства компоненти екстрацелуларног матрикса-строме (енгл. *Extracellular Matrix*, ECM). Такво кретање представља кретање у две димензије (2D). У случају да постоји баријера коју чине компоненте ECM, као и у зависности од тога да ли долази до нарушавања и ремоделирања, или продирања кроз ECM, говоримо о кретању у три димензије „3D“ (Kawauchi, 2012; Friedl и Wolf, 2010).

**Инвазија** је процес кретања ћелија карцинома кроз ECM и околна ткива, лимфне и крвне судове, тј. „3D миграција“. Да би ћелије могле да врше инвазију околног ткива неопходно је да стекну **инвазивност** - особину ћелија канцера која им омогућава кретање у 3D. Инвазивност је способност ћелија карцинома да наруши интегритет базалне мембране (BM), што за последицу има контакт са компонентама ECM, као и способност ремоделирања ECM. Мера инвазивности је **инвазивни потенцијал** (Clark и Matic Vignjevic, 2015). Ћелије карцинома које стичу способност инвазије пролазе кроз низ трансформација. У првом реду долази до промене облика и поларности ћелије чиме задобија **инвазивни фенотип** са реаражираним компонентама ћелијског цитоскелета и ослабљеним међућелијским везама. Ћелија са инвазивним потенцијалом има способност излучивања протеолитичких ензима и металопротеиназа које разграђују међућелијски матрикс и олакшавају продирање малигних ћелија у околна ткива (Weinberg, 2014; Friedl и Wolf, 2010; Mattila и Lappalainen, 2008; Gupton и Gertler, 2007).

На основу свега горе наведеног, може се закључити да ћелије могу мигрирати без инвазије, док се инвазија као процес не може догодити без миграције (Friedl и Wolf, 2010; Mattila и Lappalainen, 2008).

Миграција као и инвазија ћелија може бити појединачна и колективна, како је представљено на **Шеми 3**. Појединачно кретање ћелија може бити: 1) без ремећења структуре ЕСМ – амeboидно, 2) уз ремоделирање компоненти ЕСМ - ћелија задобија инвазивни потенцијал и инвазивни фенотип (мезенхимална ћелијска миграција) (Kawauchi, 2012; Gupton и Gertler, 2007). Ћелије канцера могу мигрирати и колективним путем као група ћелија са очуваним међућелијским везама. У групи ћелија један тип ћелија има инвазивни потенцијал и ремоделира ЕСМ, правећи путању за остале ћелије из кластера (Kawauchi, 2012).



**Шема 3.** Типови ћелијске миграције (модификовно из Kawauchi, 2012)

**Метастатски потенцијал** представља способност одвајања малигнућ ћелија (појединачно или у групама) од примарног тумора, као и способност ћелија да населе друга ткива и органе у организму, чиме омогућавају стварање секундарних тумора. **Метастаза** представља секундарне канцере а на удаљеној локацији у организму (Friedl и Wolf, 2010; Gupton и Gertler, 2007).

## 2.1. Метастаза као вишестепени процес

Формирање метастаза је вишестепени процес који започиње инфилтрацијом (инвазијом) ћелија карцинома у околно ткиво, наставља се интравазацијом, екстравазацијом а завршава формирањем удаљених колонија (**Шема 4**). Настанак метастаза омогућава добро развијена мрежа лимфних путева, као и крвних судова (Schoumacher и сар., 2010; Gupta и Massague, 2006).

Метастаза започиње задобијањем инвазивног потенцијала, тј. малигне ћелије у оквиру инвазивног фронта примарног тумора морају стећи инвазивни фенотип. Током задобијања инвазивног фенотипа, канцерозна ћелија (малигна ћелија) ће проћи кроз специфичан след догађаја

који се означава као епително-мезенхимска транзиција – ЕМТ и постати миграторна канцерозна ћелија (Шема 4) (Nieto и сар., 2016; Friedl и Wolf, 2010).

Стицањем инвазивног потенцијала, миграторна канцерозна ћелија започиње метастаску каскаду, најпре локалним одвајањем од примарног тумора и ремоделирањем компоненти ЕСМ. Надаље процесом интравазације, миграторна канцерозна ћелија улази у циркулацију (крвоток и/или лимфоток), где интерреагујући са тромбоцитима, лимфоцитима и другим ћелијским компонентама крви долази до формирања циркулишућих кластера (енгл. *Circulating Tumor Cells*, CTC), а све у циљу преживљавања у циркулацији (Nieto и сар., 2016). Ношени крвљу или лимфом ови кластери завршавају у удаљеним ткивима и органима. Процесом екстравазације миграторне ћелије карцинома напуштају крвне судове, док процесом **колонизације** насељавају циљане органе (Шема 4) (Weinberg, 2014; Gupta и Massague 2006). Након колонизације новог ткива, сада већ метастатске ћелије, често дуго остају неактивне, као појединачне или у форми малих кластера (микрометастаза). Јако мали број микрометастаза ће наставити даље да пролиферише, док ће остале остати у латентној фази (Clark и Vignjević, 2015; Weinberg, 2014).

Од великог броја канцерозних ћелија које се одвајају од тумора, само неколико процената успешно прође кроз све фазе и доспе у органе где ће формирати метастазу. Преживеле микрометастазе ће формирати клинички детектабилне туморске структуре, тј. макрометастазе. Формирања метастаза се сматра процесом јако ниске ефикасности, а инвазија и колонизација су два главна ограничавајућа корака (Weinberg, 2014; Friedl и Wolf, 2010; Thyeri, 2002).



Шема 4. Метастатска каскада и ЕМТ прелазни стадијуми

Е-епителна ћелија; EM1-прелазни епително-мезенхимски стадијум 1; EM2/3- прелазни епително-мезенхимски стадијуми 2 и 3; М-метастатска ћелија; TAM - канцеру придружене макрофаге (енгл. *Tumor-Associated Macrophages*); CAF - канцеру придружени фибробласти (енгл. *Cancer-Associated Fibroblasts*); CTC - циркулишуће туморске ћелије, енгл. *Circulating Tumor Cells* (модификовано из Nieto и сар. 2016)

### 2.1.1. *Стицање инвазивног потенцијала у процесу епително-мезенхимске транзиције - инвазивни фенотип*

Главни услов за отпочињање метастатске каскаде, како је раније наглашено, јесте стицање инвазивног фенотипа канцерозне ћелије са миграторним потенцијалом (Gupta и Massague, 2006).

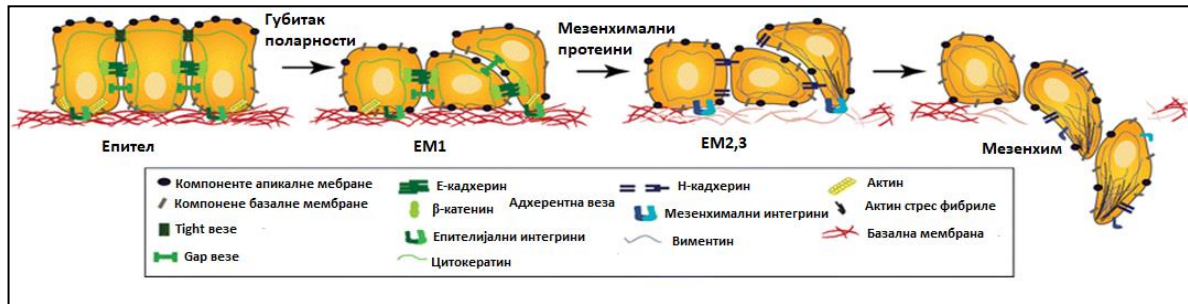
Инвазивни фенотип ћелија одликују морфолошке карактеристике у смислу промена облика и поларности ћелије. Тако, ћелије епитела цилиндричног облика, јасне апикално-базалне и латералне оријентације, задобијају издужен вретенаст облик. Ово се постиже, у првом реду, раскидањем међућелијских веза, међу којима су и адхерентне везе. Један од кључних корака у процесу раскидања адхерентних веза је деструкција Е-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса (Yang и Weinberg, 2008). Деструкцијом овог комплекса долази до повећања цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина, и релокације  $\beta$ -катенина у нуклеус, што за последицу има експресију репресора Е-кадхерина који функционишу као индуктори ЕМТ, како ће бити описано касније. С друге стране активацијом транскрипције од стране  $\beta$ -катенина у нуклеусу долазу до експресије протеолитичких ензима међу којима су матриксметалопротеиназе (ММП), који излучени у међућелијски простор лизирају екстрацелуларне домене Е-кадхерина и тиме доводе до раскидања међућелијских контаката. Сви предходни процеси, у првом реду репресија Е-кадхерина без обзира на механизам, доводе до покретања експресије мезенхимских протеинских маркера међу којим су и Н-кадхерин, виментин, што резултира потпуном реорганизацијом ћелијског цитоскелета (Nieto и сар., 2016; Weinberg, 2014).

Све горе наведене промене у канцерозној ћелији имају за циљ формирање покретне ћелије мезенхимског фенотипа са секреторним способностима деструкције базалне мембране (ВМ) и компоненти ЕСМ (**Шема 5**) (Ueno и сар., 2014; Micalizzi и сар., 2010).

Канцерозне ћелије које стекну мезенхимски фенотип (повећан миграторни и инвазивни капацитет) карактерише одсуство молекуларних маркера карактеристичних за епител (Е-кадхерин, калудин (тип 3, 4, 7),  $\alpha$ -катенин,  $\gamma$ -катенин, оклудин, десмоплакин и плакоглобин) и присуство мезенхимских молекуларних маркера (Н-кадхерин, виментин, фибронектин,  $\beta$ -катенин, десмин, стромецелин-3, интегрини  $\alpha V\beta 6$ , Twist1, Twist2, Vsig, ZEB1, SMA, SOX, Snail, Slug, AXL, NOTCH-1, ETS1, FLT1, FOXC2, HOXB7, ACTA2 и PDGF) (Ding и сар., 2016; Gurzu и сар., 2015; Kraus и сар., 2015; Ueno и сар., 2014; Kalluri и Weinberg, 2009).

Трансформација канцерозних ћелија у инвазивни фенотип догађа се у процесу ЕМТ (**Шема 5**). Током ЕМТ ћелија канцера пролази кроз низ прелазних стадијума губи епителне, а добија особине мезенхимске ћелије (Micalizzi и сар., 2010; Thiery и сар., 2009; Yang и Weinberg, 2008; Thiery, 2002). ЕМТ почиње у ћелијама на граници тумора и околног ткива, у региону инвазивног

фронта, док ћелије унутар строме тумора остају непромењене, задржавајући епителне морфолошке карактеристике и очувану пролиферацију (Thiery и сар., 2009).



**Шема 5.** Процес епително-мезенхимске транзиције (модификовано из Micalizzi и сар., 2010)

Током процеса ЕМТ долази до генетичких и морфолошких реаранжмана, током којих ћелија пролази кроз низ интермедијерних фенотип стадијума (Nieto и сар., 2016; Huang и сар., 2015). Градацију морфолошких карактеристика (од епителних ка мезенхимским) прати смена стабилних и нестабилних стадијума, а све у циљу формирања мезенхимске ћелије са метастаским потенцијалом. У том смислу, стабилни стадијуми са јасним морфолошким карактеристикама су епителни (Е) и мезенхимски (М), док нестабилне (прелазне) стадијуме карактерише нарушавање међућелијских веза (EM1), покретање експресије Snail, Н-кадхерина, виментина и мезенхималних интегрина (EM2/3) (Шема 5) (Jolly и сар., 2017; Zadran и сар., 2014; Zhang и сар., 2014; Lu и сар., 2013).

Током ЕМТ, ћелије одликује заустављање ћелијске пролиферације, уз промовисање преживљавања ћелија и отпорност на ћелијску смрт. С тим у вези, ове ћелије могу имати различите улоге: мезенхимске ћелије канцера са промигранторним инвазивним карактеристикама, матичне и дормантне ћелије канцера у највећем броју случајева одговоране за рецидив канцера, „старе“ (*senescence*) канцерозне ћелије са улогом у синтези различитих фактора раста и улогом у регулацији микроокружења, ћелије резистентне на хемиотерпеутике и имуно резистентне ћелије (Celià-Terrassa 2012; Bonavida и Baritaki 2011; Thiery и сар., 2009). Познато је да се ЕМТ дешава током прогресије канцера дебелог црева (Clark и Vignjević, 2015; Brabletz и сар., 2001).

## 2.2. Индуkcија и регулација ЕМТ у колоректалном карциному

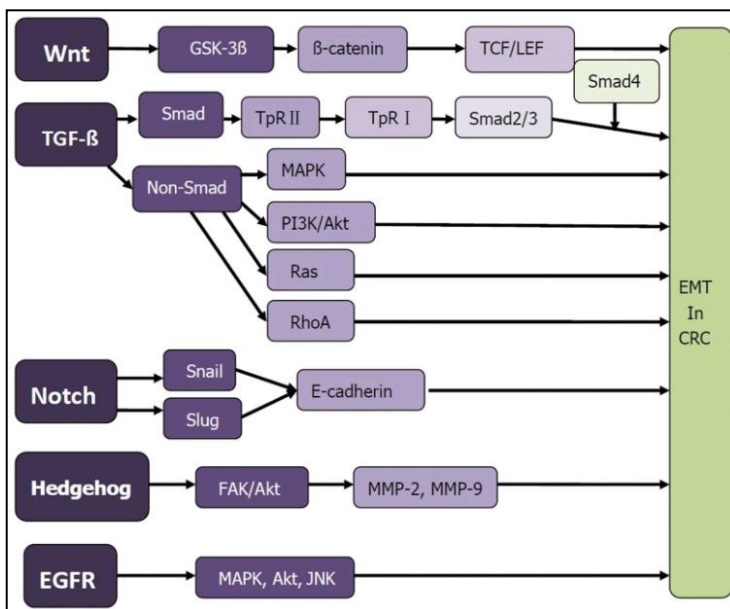
ЕМТ је динамичан процес, одиграва се у више корака и има комплексан регулаторни механизам са активацијом и регулацијом различитих сигналних путева. ЕМТ започиње деловањем фактора из спољашње средине: TNF $\alpha$  (енгл. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), TGF $\beta$  и фактора раста

хепатоцита (енгл. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF), које стварају туморске ћелије или ћелије у окружењу као одговор на присуство канцера (Spaderna и сар., 2008). Активацијом рецептора на ћелијској мембрани отпочиње сигнална каскада.

### Сигнални путеви

ЕМТ је индукована хиперактивацијом једног сигналног пута или вероватније, истовременим активирањем више путева од којих су кључни: Wnt/ $\beta$ -катенин, TGF- $\beta$ , Notch, Hedgehog (енгл. *Hedgehog*, Hh) и рецептор епидермалног факора раста (енгл. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) (Шема 6). Поред ових у сигнализацију ЕТМ укључени су и други сигнални путеви које регулишу неке од компоненти горе наведених путева (DanJuan и сар., 2015; Lopez-Novoa и Nieto, 2009; Bates и Mercurio. 2005).

Активација TGF- $\beta$  сигналног пута као главног регулатора ЕМТ, може бити двојака: преко SMAD протеина или SMAD независним путем (non-SMAD) (Conidi и сар., 2013). SMAD зависни пут се покреће везивањем TGF- $\beta$  лиганда за TGF- $\beta$  рецептор типа 2 и 1. Димеризација два рецептора и фосфорилација серин-треонин резидуа омогућава фосфорилацију и активацију SMAD2 и SMAD3 протеина. Активирани SMAD протеини одвајањем од SARA протеина, хетеро-олигомеризују са SMAD4, и транслоцирају се у једро, препознајући SMAD везујуће елементе у промоторним регионима ЕМТ-асоцираних гена, што последично доводи до експресије или репресије таргет гена, као што су *MMP2*, *SPI-1* и  $\alpha$ -SMA. Као тумор-супресор, SMAD4 повећава експресију Е-кадхерина, што доводи до јачања веза између ћелија (Shi и Massague, 2003).



**Шема 6.** Сигнални путеви укључени у ЕМТ у колон канцеру (модификовано из DanJuan и сар., 2015)

TGF- $\beta$  сигнализација преко non-SMAD укључена је у активацију сигналних путева: митоген активирајућег протеин киназа (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MAPK) и фосфатидилинозитол-3ОН киназа/ протеин киназа В (енгл. *Phosphatidyl Inositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase/Protein kinase B*, PI3K/AKT). Многи сигнални путеви укључени су у ЕМТ, као што су MAPK пут Ras/Raf/MEK/ERK, JNK (енгл. *c-Jun N-terminal Kinase*), p38 (енгл. *P38 Mitogen-Activated Protein Kinases*). Поред ових, TGF- $\beta$  у току ЕМТ може активирати и сигналне путеве: RhoA, c-Src, m-TOR и PP2A/p70s6K (Му и сар., 2012; Lee и сар., 2006).

Notch сигнални пут укључен је у регулацију експресије Е-кадхерина активацијом Slug или експресијом Snail главних маркера процеса ЕМТ. Овај сигнални пут не функционише независно, већ је у сарадњи са различитим сигналним путевима укљученим у процес ЕМТ (Leong и сар., 2007).

Hedgehog сигнални пут као и EGFR сигнална каскада укључени су у процес ЕМТ. Нп сигнални пут, регулацијом FAK/AKT сигналних путева, активира експресију MMP-2 и MMP-9, а регулацију експресије Е-кадхерина активацијом Snail (Chen и сар., 2013). Аутофосфорилација тирозинских остатака у С-терминалном домену EGFR активирају различите сигналне молекуле MAPK, протеин киназе Б и JNK сигналних путева (Oda и сар., 2005).

Један од кључних сигналних путева у ЕМТ је и Wnt/ $\beta$ -катенин сигнални пут, чијом активацијом долази до ослобађања  $\beta$ -катенина у цитоплазму и његовог релоцирања у једро, што доводи до експресије више различитих гена (Segditsas и Tomlinson, 2006).

### **Транскрипциони фактори регулатори ЕМТ**

Транскрипциони фактори представљају главне регулаторе процеса ЕМТ, а могу се поделити у три групе. У прву групу спадају Snail фамилија (Snail1 и Snail2-Slug), који се директно везују за E-box промотора Е-кадхерина и тако онемогућавају његово експимирање (Најра и сар., 2002). У другу групу спадају фамилија ZEB (енгл. *Zinc finger E-box Binding homeobox*) протеина, ZEB1 и ZEB2, који супримирају транскрипцију Е-кадхерина преко двоструко негативне повратне спреге експресије ZEB1/ZEB2 и микро RNA (miRNA) miRNA-200 фамилије (Eger и сар., 2005). Трећа група укључује фамилију bHLH (енгл. *Basic Helix-Loop-Helix*) протеина, Twist1 и Twist2, који онемогућавају експресију Е-кадхерина преко индукције Snail транскрипционог фактора (Wels и сар., 2011; Drake и сар., 2009; Bracken и сар., 2008).

Процес ЕМТ је регулисан различитим miRNA, које имају улогу у инхибицији или деградацији транскрибоване mRNA (енгл. *messenger – mRNA*). Тако miRNA-200 и miRNA-205 значајно супримирају процес ЕМТ и промовишу епителни фенотип везивањем за транскрипционе факторе Snail1/2 и Twist (Lennox и Behlke, 2011), док miRNA-30a утишава Snail транскрипциони фактор



редукујући процес EMT (Ebert и Sharp, 2010). Неке од чланова miRNA суперфамилије, као што су miRNA-9, miRNA-103/107 и miRNA-155, промовишу метастазу канцера индукцијом процеса EMT (Chen и сар., 2013; La Rocca и сар., 2009). Тако miRNA-9 директно инхибира транскрипцију E-кадхерина, док miRNA-103/107 супримира miRNA-200 и тиме промовише EMT (Chen и сар., 2013).

## 2.3. Протеински маркери EMT

Међу првим догађајима који прате процес EMT је нарушавање међућелијских веза путем деструкције комплекса E-кадхерин/ $\beta$ -катенин.

### 2.3.1. E-кадхерин, грађа, функција, регулација и улога у EMT

E-кадхерин је протеин из групе кадхерина. То су трансмембрански гликопротеини, главни медијатори међућелијских веза. Подфамилија кадхерина састоји се од више од 16 молекула који, иако кодирани од стране различитих гена, чине посебну групу филогенетски и структурно сродних молекула, са молекулском тежином од око 120 kDa (Jankowski и сар., 1997). У зависности од њихове дистрибуције у ткивима, постоји неколико подкласа кадхерина: епителни E-кадхерин, неуронски N-кадхерин, плацентални P-кадхерин и васкуларно ендотелни VE-кадхерин. Протеин E-кадхерин је кодиран од стране *CDH1* гена који се налази на хромозому 16q22 (van Roy и Verh, 2008).

Главна улога E-кадхерина је формирање адхерентних међућелијских веза које граде два хомолога E-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса из суседних ћелија. Молекул E-кадхерина једне ћелије везује својим екстрацелуларним доменом (састоји се од пет кадхерин типа понављања) за E-кадхерин друге ћелије, а веза се остварује по типу хомотипске реакције и зависна је од присуства калцијумових јона. Оваква формација се назива "молекуларни рајсфершлус". Интрацелуларни домен E-кадхерина преко P120 се везује за  $\beta$ - или  $\gamma$ -катенин у цитоплазми, а веза са актинским елементима цитоскелета се даље остарује преко  $\alpha$ -катенина. На ћелијској мембрани E-кадхерин се локализује у специјализованим раскрсницама, тзв. зонама адхезије (Petrova и сар., 2016; Alberts и сар. 2008).

Поред кључне улоге у грађи адхерентне везе у ћелији и очувању апикално базалне поларизације ћелије, E-кадхерин има улогу регулатора различитих процеса у ћелији: пролиферације, миграције, апоптозе. E-кадхерин управља овим процесима у ћелији слањем сигнала посредно, преко  $\beta$ -катенина, чиме је негативан регулатор активног Wnt сигналног пута. У ћелијама здравог колона, E-кадхерин је присутан на базолатералној страни ћелијске мембране, у

свим криптама и површинским ентероцитима, успостављајући на тај начин интегритет слузокоже. Е-кадхерин је у високом степену експримиран у централним деловима карцинома а потпуно је одсутан у инвазивном фронту тумора и у појединачним ћелијама које мигрирају (Petrova и сар., 2016; Weinberg, 2014). Brabletz и сарадници (2001) су показали да ћелије које су већ дале метастазе у јетри, реекспримирају Е-кадхерин што показује да су прошле кроз процес мезнхимско-епителне транзиције (МЕТ) и поново се вратиле у епителни фенотип.

У ћелијама инвазивног фронта многих карцинома, укључујући CRC, запажен је губитак и смањена протеинска експресија Е-кадхерина. Губитак функционалног Е-кадхерина се сматра кључним у процесу ЕМТ, чиме епителне ћелије губе адхерентне везе и апикално базалну поларност, стичу фибробластни тип фенотипа праћен инвазивним и миграционим особинама. Зато, смањење Е-кадхерина представља маркер почетне фазе метастатске каскаде (DanJuan и сар., 2015).

Велики број студија наглашава критичну улогу мутација у гену за Е-кадхерин као главни механизам одговоран за настанак и активацију ћелије карцинома. Смањење експресије може бити резултат инактивације или присуства дисфункционалног промотора, као последица хроматинске реорганизације у регулаторном домену или DNK метилације у промоторном региону овог гена. Поред ових механизма смањена експресија гена за Е-кадхерин регулисана је и повећањем транскрипционих репресора: Snail (Snail1 и Snail2), ZEB1, транскрипциони фактор 3 (енгл. *E2A immunoglobulin enhancer-binding factors E12/E47*, TCF3) и KLF8 (енгл. *Krüppel-like family of transcription factors*) који циљају промоторни регион Е-кадхерина и тиме спречавају активност промотора и даљу експресију гена (Tsanou и сар., 2008; Kwak и сар. 2007).

Губитак трансактиватора RB за Мус који активирају експресију Е-кадхерина, трансактивација осталих кадхерина од стране WT1 (специфичног блокатора Е-кадхерина), фосфорилација армадило (АРМ) поновака  $\beta$ -катенина путем тирозин киназе или лизирање ектодомена Е-кадхерина путем MMP, може довести до смањења протеинске експресије или настанка дисфункционалног Е-кадхерина (DanJuan и сар., 2015; Hosono и сар., 2000).

Познато је да је мембрански Е-кадхерин једини функционалан облик овог протеина док је цитоплазматски облик нефункционалан. Цитоплазматски присутан Е-кадхерин, последица је неисправних транзиција овог протеина кроз цитоплазму, било да је реч о немогућности инкорпорирања на ћелијску мембрану или је резултат абнормалног придруживања протеинима цитоплазме. Такође, може доћи до задржавања Е-кадхерина у цитоплазматским везикулама посредством TWIST, Goosecoid, E2.2 и FOXC2 (енгл. *Forkhead box protein C2*) (Tsanou и сар. 2008; DanJuan и сар., 2015).

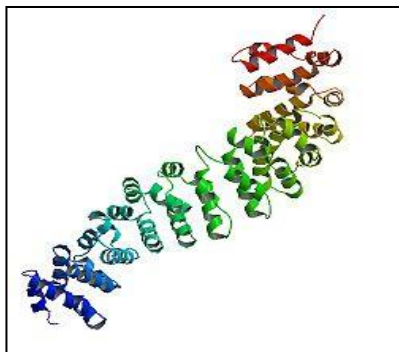
Недостатак Е-кадхериана доводи до нарушавања кадхерин-катенинског комплекса, чиме се повећава присуство слободног  $\beta$ -катенина у цитоплазми, који ће транслоциран у једро интераговати са Т-ћелијским фактором/лимфоцитним везујућим фактором (енгл. *T-Cell Factor / Lymphoid Enhancer Factor*, TCF/LEF) и покренути експресију различитих гена (MacDonald и сар., 2009).

### 2.3.2. $\beta$ -катенин као компонента адхерентне међућелијске везе и улога у CRC

Друга компонента Е-кадхерин-катенинског комплекса је  $\beta$ -катенин. Протеин величине 92 kDa (Шема 7), кодиран је геном за  $\beta$ -катенин (*CTNNB1*) који се налази на хромозому 3p, и припада групи катенинских протеина. Поред њега у ову групу спадају  $\alpha$ -катенин и  $\gamma$ -катенин који у ћелији граде катенински комплекс. Свака од компоненти комплекса има значајну улогу у изградњи адхерентне везе са Е-кадхерином (Kraus и сар., 1994).

$\beta$ -катенин је укључен у процесе ембриогенезе и органогенезе као кључни сигнални протеин Wnt сигналног пута. Значајну улогу има и у ткивној морфогенези као компонента међућелијских веза, регенерацији, као и нормалном развоју и функцији ткива и одржању хомеостазе у организму (MacDonald и сар., 2009). У ћелијама здравог епитела колона,  $\beta$ -катенин је распоређен у мембранском делу, док се у аденому и карциному појављује и цитоплазматска и нуклеарна локализација. Хемијска грађа овог протеина има значајну улогу у његовој функцији.

Централни регион  $\beta$ -катенина је грађен од 12 ARM (енгл. *Armadillo*) понављања, који су окружени различитим N- и C-терминалним доменима. Сви ARM поновци формирају облик суперхеликса који садржи дугачак, позитивно набијен жлеб који представља централни регион протеина (Шема 7). Централни регион чини круту „скелу“, која служи као платформа за многе  $\beta$ -катенин везујуће протеине на мембрани, у цитосолу и у једру (Alberts и сар., 2008; Drees и сар., 2005; Moon и сар., 2002). Протеини који се везују за  $\beta$ -катенин имају делове који се преклапају са деловима жљеба  $\beta$ -катенина, блокирајући везивна места и онемогућавајући истовремено везивање више кључних протеина, нпр. Е-кадхерина, APC и TCF/LEF. Специфичан C-хеликс који се налази



према C терминалном крају, у близини последњег ARM поновка је неопходан за сигналну активност  $\beta$ -катенина, док је недоступан за улогу у адхезији ћелија (Novellasdemunt и сар., 2015; Alberts и сар., 2008).

**Шема 7.** Структура  $\beta$ -катенина (модификовано из Huber и сар., 1997)

$\beta$ -катенин игра кључну улогу у свим нивоима колоректалне канцерогенезе. Запажено је повећање нуклеарног  $\beta$ -катенина од раног аденома до аденокарцинома. У првој фази канцерогенезе нуклеарни  $\beta$ -катенин активира гене укључене у ћелијску деобу, док у другој фази повишен ниво  $\beta$ -катенина стимулише експресију гена укључених у ћелијску покретљивост (Novellasademunt и сар., 2015; Weinberg, 2014; White и сар., 2012).  $\beta$ -катенин је један од најзначајнијих протеина у формирању инвазивног фенотипа, а повећан ниво запажен је у инвазивном фронту многих карцинома, укључујући хумани CRC (Tsanou и сар., 2008). Ниво цитоплазматског  $\beta$ -катенина се у метастазама враћа на нормалне вредности механизмом релокализације у адхерентне везе (Weinberg, 2014; Brabletz и сар., 2001).

### ***$\beta$ -катенин - локализација у ћелији и улога у процесу ЕМТ***

У ћелији,  $\beta$ -катенин може бити присутан у два пула: мембрански и интрацелуларни (цитоплазматски и нуклеарни). Као део Е-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса,  $\beta$ -катенин чини везу између Е-кадхерина и актинских филаменте цитоскелета (Mahmood и сар., 2017; Alberts и сар., 2008). Индикатор је очуваних адхерентних међућелијских веза у неинвазивним карциномима. Присуство  $\beta$ -катенина у цитоплазми може бити последица ослобађања из мембранског пула услед нарушавања Е-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса, или присуства аберантних форми протеина. Ослобађање из Е-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса догађа се услед смањене експресије Е-кадхерина, деактивације гликоген синтазе киназе  $3\beta$  (енгл. *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* , GSK-3 $\beta$ ) која учествује у деградацији  $\beta$ -катенина, услед мутација APC или услед фосфорилације тирозина 654  $\beta$ -катенина. Аберантне форме протеина настају услед мутације *CTNNB1* гена или посттранслационе модификације (Sánchez-Tilló и сар., 2011; Stemmer и сар., 2008).

$\beta$ -катенин присутан у цитоплазми бива деградиран путем деструктивног комплекса (уколико су APC и GSK-3 $\beta$  активни), или бива транслоциран у једру где активира експресију таргет гена у оквиру Wnt сигналног пута. Активација Wnt сигналног пута доводи до повећања експресије многих гена који имају улогу репресора експресије Е-кадхерина, а тиме и до процеса ЕМТ. Инхибирањем експресије Е-кадхерина долази до нагомилавања цитоплазматског  $\beta$ -катенина, који услед немогућности везивања у међућелијске везе, интерагује са Snail, што доводи до директног активирања Wnt сигналног пута (Mahmood и сар., 2017; Stemmer и сар., 2008) који је, како је предходно наглашено, један од кључних у процесу ЕМТ.

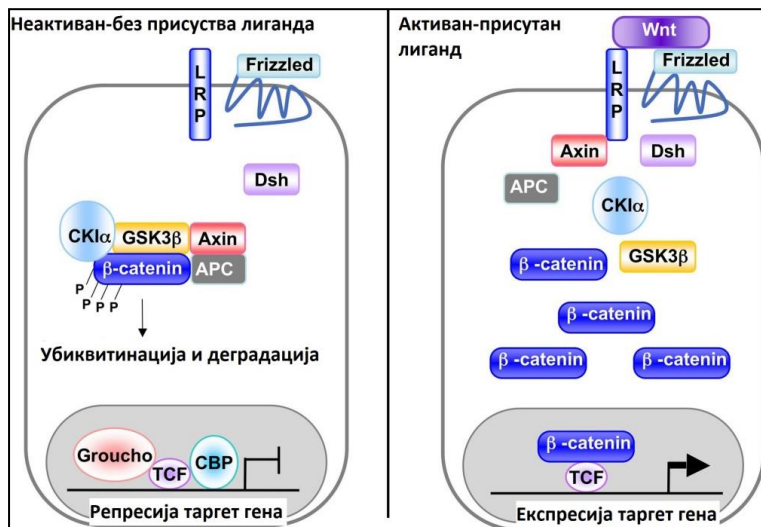
Такође, аберантне форме  $\beta$ -катенина, као што су мутације у делу серин и треонин остатака, места везивања GSK-3 $\beta$  серин треонин киназе, омогућавају  $\beta$ -катенину да “побегне” од протеозомалне деградације, транслоцира се у нуклеус и покрене експресију таргет гена Wnt сигналног пута (Li и сар., 2012; MacDonald и сар., 2009; Alberts и сар., 2008).

***β-катенин главни регулатор канонског Wnt сигналног пута***

Wingless/Frizzled (Wnt/FZD) сигнални путеви есенцијални су за диференцијацију, миграцију, пролиферацију и поларизацију ћелија током ембрионалног развоја. Током ембриогенезе, Wnt сигнални путеви имају кључну улогу у органогенези, успостављању симетрије тела, и сл. У одраслом организму, Wnt путеви су активирани током реакције имуног система, у регенеративним процесима, трудноћи, плацентацији. Wnt сигнални путеви такође имају кључну улогу у регулацији ткивне и ћелијске поларности, формирању синапси између неурона, регулацији пролиферације, у одржању хомеостазе у организму. Неправилности у сигнализацији Wnt путева укључене су у настанак многих болести почев од канцера (црева, желуца, јетре, јајника, дојке и фоликула длаке), инфламаторних, метаболичких и неуролошких обољења (Li и сар., 2012; MacDonald и сар., 2009; Stemmer и сар., 2008). Према регулацији интрацелуларне каскаде, Wnt путеве сврставамо у катенин зависне (канонске) - Wnt/β-катенин, и катенин независне (неканонске) - Wnt/ћелијска поларност, и Wnt/Ca<sup>2+</sup> (MacDonald и сар., 2009). Познато је да постоји међусобна регулација ових путева (Alberts и сар., 2008; Akiyama, 2000).

Wnt/β-катенин сигнални пут укључује Wnt протеин лиганде, Frizzled (FZD) рецепторе, Dishevelled (Dsh), APC/GSK3β/Axin комплекс (кога чине Axin, APC, Axin 2 (кондуктин) и казеин киназа II-CKII), β-катенин, TCF/LEF транскрипциони фактор и преко 20 таргет гена: *cyclin D*, *survivin*, *Snail*, *Slug*, *MMP-7*, *CD44*, *Nr-CAM*, *L1*, *гликопротеин P*, *interleukin 8*, *Id2*, *C-jun*, *Fra-1*, *Groucho*, *CBP/p300*, *Frizzled*, *Akt1*, *PPARδ*, *Axin 2*, *Met*, *EphB2*, *iNOS* и *B3* (Valenta и сар., 2012).

У одсуству Wnt протеин лиганда, нема активације Wnt сигналног пута. APC/GSK3β/Axin деструктивни комплекс, присутан у цитоплазми, везује се за фосфорилисани β-катенин (Pinson и сар., 2000). Овако награђен комплекс пролази убиквитинацију путем b-TrCP (везује за фосфорилисане N терминалне серин/треонин остатке β-катенина), а затим следи протеозомална деградација, као последњи стадијум у деградацији β-катенина (**Шема 8**).



**Шема 8.** Канонски Wnt сигнални пут (модификовано из Eisenmann, 2005)

Везивањем Wnt лиганда за FZD рецептор на мембрани долази до активирања Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута. Ова веза индукује интеракцију FZD рецептора са ко-рецептором липопротеином мале молекулске масе (енгл. *Low-density lipoprotein Receptor related Protein*, LRP) и активира цитоплазматски протеин Dsh. Активиран Dsh интерагује са везујућим протеином (енгл. *GSK3 $\beta$  Binding Protein*, GBP), чиме инхибира GSK3 $\beta$  киназу чија је улога фосфорилација слободног  $\beta$ -катенина (**Шема 9**) (MacDonald и сар., 2009; Akiyama, 2000). Нефосфорилисан  $\beta$ -катенин остаје слободан у цитоплазми. Axin се везује за фосфорилисани LRP ко-рецептор што доводи до распадања APC/GSK3 $\beta$ /Axin комплекса. Као последица деструкције комплекса,  $\beta$ -катенин остаје слободан у цитоплазми. Акумулирани  $\beta$ -катенин у цитоплазми транслоцира се у једру и везује за TCF/LEF транскрипциони фактор, покрећући експресију циљаних гена, везујући се за E-box домене регулаторних региона таргет гена (Najdi и сар., 2011; Alberts и сар., 2008; Eisenmann, 2005).

### ***Регулација EMT од стране Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута***

Регулација EMT од стране Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута своди се на регулацију фосфорилације Snail протеина путем GSK3 $\beta$ . Фосфорилација серина 108, 112, 116 и 120 у другом мотиву Snail одговорна је за његову убиквитин-зависну деградацију, док фосфорилација серин 97, 101 у првом мотиву фаворизује нуклерани експорт Snail. Различити путеви фаворизују повећање активности Snail преко репресије GSK3 $\beta$ -зависне фосфорилације. Активација Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута доводи до инхибиције активности GSK3 $\beta$ , што за последицу има нуклерани транспорт  $\beta$ -катенина и повећану експресију таргет гена међу којима је и *Snail*. Инхибиција GSK3 $\beta$ , преко ILK и PKB онемогућава фосфорилацију Snail са једне стране, такође омогућава нуклеарни транспорт  $\beta$ -катенина са друге стране, чиме су компоненте Wnt пута укључене у регулацију EMT. Коначно, Notch и NF- $\kappa$ B (енгл. *Nuclear Factor Kappa B*) сигнални путеви раскидају GSK3 $\beta$ -Snail интеракцију чиме повећавају стабилност Snail у ћелији (Anastas и Moon, 2013; Wu и Pan, 2010).

### ***2.3.3. Frizzled рецептори - активатори Wnt сигналних путева***

Frizzled (FZDs) протеини су рецепторни протеини Wnt сигналних путева. Познато је 10 FZD рецептора, које активира око 19 Wnt различитих лиганда. Wnt лиганди су секреторни гликопротеини, веома конзервативне структуре, очувани од најједноставнијих организама до сисара. Према грађи и функцији FZD мембрански рецептори, кодирани од стране *Frizzled* гена, веома су слични групи класичних рецепторних G протеина. То су трансмембрански протеини који садрже између 500 и 700 аминокиселина. Екстрацелуларно оријентисан хидрофилни аминокрај садржи цистеином богате домене (CRD) величине од 40-100 аминокиселина за који се везује Wnt

лиганд. Протеин граде седам трансмембранских хидрофобних региона у форми  $\alpha$ -хеликса. Интрацелуларни С крај је варијабилани међу различитим члановима породице (Alberts и сар., 2008; Behrens и сар., 1998).

Frizzled-7 (FZD7) је трансмембрански протеин који припада породици FZD рецептора. Граде га 574 аминокиселине, а кодиран је *Frizzled* геном лоцираним на 2q33 хромозому са 3859 нуклеотида. mRNA FZD7 је детектована у првим ступњевима гаструлације и оријентације орално аборалне осе, у ткивима феталних бубрега и плућа, као и у скелетним мишићима, срцу, мозгу и плаценти (MacDonald и He, 2012; Vincan и сар., 2007). У интестиналном епителу сисара, експресија mRNA FZD7 је ограничена на прогениторске матичне ћелије крипти. Позната је његова улога у преносу сигнала за диференцијацију, пролиферацију ћелија, успостављање хомеостазе и тродимензионалне архитектуре ткива цревног тракта (Kinga и сар., 2012). FZD7 mRNA је нађена у широком спектру канцера укључујући: меланом, канцер плућа, канцер езофагуса, канцер желуца, канцер дебелог црева (Vincan и сар., 2007). Такође, код хистолошки нормалног епитела колона, експресија FZD7 протеина није детектована (Gregorieff и сар., 2005).

Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализација је главни регулаторни механизам експресије *FZD7* гена (Kinga и сар., 2012). Постранскрипционе модификације и присуство miRNA-206, miRNA-222, miRNA-126 у различитим ткивима одређују ниво експресије FZD7.

Специфични активатор FZD7 у CRC је Wnt3а лиганд. Експресија FZD7 рецептора у строми и инвазивном региону тумора се разликује и у корелацији је са ниском нуклеарном и цитоплазматском локацијом  $\beta$ -катенина (Kim и сар., 2008). Добро диференциране ћелије карцинома у тубуларним структурама централног региона строме су активно пролиферишуће, и у њима је  $\beta$ -катенин претежно везан за мембране, а FZD7 је претежно изражен у цитоплазми и на мембрани. Дедиференцијација у процесу EMT ћелија карцинома у инвазивном фронту је повезана са повећаном експресијом  $\beta$ -катенина (цитоплазматског и нуклеарног) и смањеном пролиферацијом ћелија, док је експресија FZD7 смањена, а детектован је у цитоплазми (Ueno и сар., 2008). Са променом облика, ћелије од епителне ка мезенхимској током процеса EMT, запажено је и опадање експресије FZD7 рецептора (Sipos и Galamb, 2012).

FZD7 има могућност модулатије преноса сигнала преко канонског и не-канонског Wnt пута. Уколико FZD7 активирају Wnt3 и Wnt7 лиганди, покрећу сигнализацију Wnt канонских сигналних путева, док се неканонски Wnt пут активира у присуству Р-спондина који спречава деградацију Rnf43 (Sipos и Galamb, 2012; Vincan и сар., 2007). Који ће пут бити активиран, зависи од лиганда који ће се везати, као и од доступности корцептора, околности у ћелији и ванћелијског окружења. Такође, FZD7 има улогу у сигнализацији и модулатију многих сигнала путева (Jak/Stat3 и NOTCH3, RhoA) (Sipos и Galamb, 2012).

FZD7 игра важну улогу током метастазе, регулисањем прелазних стадијума ЕМТ као и у регулисању критичних стадијума ЕМТ и мезенхимско-епителној транзицији (МЕТ) на месту формирања секундарног тумора (Сао и сар., 2015; Quante и сар., 2013). Промовишући диференцијацију ћелија, преко промоције експресије Е-кадхерина, FZD7 промовише МЕТ преко регулације канонске Wnt сигнализације, док активацијом неканонског Wnt/PCP пута, FZD7 регулише миграцију ћелија карцинома колона, што указује на међусобну регулацију различитих Wnt путева (Сао и сар., 2015; Quante и сар., 2013; Sipos и Galamb, 2012). Ueno и сарадници (2008) су показали да ћелијске линије CRC експримирају FZD7, а степен експресије сразмеран је нивоу диференцијације: што је већи ниво диференцијације већа је и експресија FZD7. Експресија FZD7 рецептора као и активација, у многеме зависе од ћелијског контекста, тј. од ћелијског микроокружења (Quante и сар., 2013).

#### **2.3.4. Н-кадхерин - протеин маркер ЕМТ**

Н-кадхерин је трансмембрански гликопротеин величине 130 kD, кодиран геном за Н-кадхерин који се састоји од 16 егзона, а мапиран је на 250-kb региону 18q11 хромозома (Wallis и сар., 1994). Екстрацелуларни домени овог протеина чине пептиди са His-Ala-Val (HAV) аминокиселинском секвенцом која се налази близу N-терминалног краја. Цитоплазматски домен Н-кадхерина је сродан са интрацелуларним актином и интерагује са  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -катенином. Екстрацелуларни домени посредују у хомофилним интеракцијама између суседних ћелија (Blaschuk, 2015).

Н-кадхерин је скелетни протеин присутан у мезенхимским ћелијама у нервном, скелетно-мишићном и хематопоезском ткиву, али не и у епителном ткиву (Gumbiner, 2005). Његова главна функција је активација влакана динамичке адхезије ћелија, што доводи до миграције мезенхималних ћелија. Поред учешћа у грађи међућелијских веза, Н-кадхерин је укључен у многе процесе у ћелији као што су диференцијација, миграција, инвазија и сигнала трансдукција током ембриогенезе (Weinberg, 2014; Gumbiner, 2005).

Експресија Н-кадхерина омогућава ћелијама тумора интеракцију са ћелијама фибробласта и ендотелним ћелијама стварајућу *gap* тип везе. Тиме се одиграва интеракција ћелија канцера са ћелијама домаћина која предходи миграцији и инвазији у околна ткива. Н-кадхерин повећава афинитет ћелија карцинома према ендотелним ћелијама крвних судова, а проласком кроз ендотел долази до продора ћелија карцинома у крв. Такође, Н-кадхерин омогућава миграцију у околне структуре и миграцију у лимфне чворове. Миграторни фенотип окарактерисан Н-кадхерином, омогућава расејавање ћелија из примарног карцинома као и хомофилне адхезивне везе са ћелијама из окружења (Theveneau и Mayor, 2012; Yilmaz и Christofori, 2009).



H-кадхерин је укључен у многе процесе у карциному, као што су пролиферација, инвазија, метастаза и резистенције на хемиотерапеутике (Jiang и сар., 2007; Bracke и сар., 1994; Rubinfeld и сар., 1993).

#### ***Инвазивни фенотип регулисан H-кадхерином***

У ембриогенези током гаструлације, ћелије пролазе кроз ЕМТ у којој долази до експресије H-кадхерина и репресије E-кадхерина. Слична ситуација је у карциномима где губитак E-кадхерина корелира са експресијом H-кадхерина а ова појава је означена као кадхерински „прекидач“ (*switching*) (Wheelock и сар., 2008; Maeda и сар., 2006).

Регулација експресије H-кадхерина диригована је транскрипционим факторима блокаторима експресије E-кадхерина, као што су Snail, Slug, Twist, E47, TCFE2A, ZEB2 и ZEB1. Познато је да Twist (репресор E-кадхерина) директно индукује експресију H-кадхерина у ћелијама карцинома желуца. Регулација експресије кадхерина преко p120 посредника, одиграва се на нивоу одржања укупног кадхерина у ћелији. Уколико је експресија H-кадхерина покренута, отпочеће p120-катенин индукована деградација већ присутног E-кадхерина у ћелији, чиме се одржава количина укупног кадхерина у ћелији (Eastham и сар., 2007; Reynolds, 2007). Фактори раста, као што је TGF $\beta$ , који доводе до репресије транскрипције E-кадхерина, индиректно повећавају експресију H-кадхерина преко ослобађеног p120-катенина из катенинског комплекса. Тако, услед недостатка E-кадхерина, p120-катенин интерагује са H-кадхерином и стабилизује га на површини ћелије, што промовише мезенхимски фенотип (Reynolds, 2007; Maeda и сар., 2006).

Рецептори фактора раста регулишу многе аспекте понашања ћелија, укључујући покретљивост ћелије и инвазију. NHERF (енгл. *Na/H Exchanger Regulatory Factor*) повезује H-кадхерин са PDGFR (енгл. *Platelet-Derived Growth Factor Receptors*) преко интеракција са  $\beta$ -катенином у ламелиподији чиме повећава покретљивост ћелије (McKay и Morrison, 2007). Интеаркција H и P-кадхерина стабилизује активирани GTP-азе Rac и Cdc42, што подстиче покретљивост ћелија. Такође интеракција ова два кадхерина промовише ендоцитозу E-кадхерина путем конкуренције за p120-катенин. Кадхерински прекидач може дуално утицати на сигнализацију факторима раста, повећањем H-кадхеринских интеракција са рецепторима који стимулишу раст и покретљивост и смањују негативну регулацију коју даје E-кадхерин (Sanchez-Heras и сар., 2006).

#### ***2.3.5. Виментин маркер мезенхимског фенотипа и процеса ЕМТ у ћелији***

Виментин је протеин величине 57 kD, кодиран једном копијом гена за виментин лоцираном на 10p13 хромозому. Један је од најшире заступљених и високо конзервираних протеина из фамилије

интермедијарних филамената, присутан у свим мезенхимским ћелијама. Чине га 466 аминокиселина, које граде  $\alpha$ -хеликс у облику шипке са N- и C-терминалним доменима названим "глава" и "реп". Паралелним удруживањем молекула добија се облик завојнице, што чини основни структурални облик овог протеина. Познато је да виментин формира хомополимере и хетерополимере са другим члановима породице интермедијарних филамената, што се приписује спиралном  $\alpha$ -домену. Формирање високо стабилних полимера контролисано је фосфорилацијом и пост-транслационим модификацијама које регулишу монтажу / демонтажу виментина (Clarke и Allan, 2002).

Експресија виментина започиње веома рано (у 8,5 ембрионалном дану). Присутан је у широком спектру прекурсорних ћелија: панкреаса, Сертолијевих ћелија, неурона, трофобласта, фибробласта, ендотелних ћелија, макрофага, неутрофила, леукоцита, мезенхимских ћелија и реналних стромалних ћелија (Helfand и сар., 2004; Clarke и Allan, 2002; Eckes и сар., 2000). У адултном организму, експресија виментина је ограничена на мезенхимске ћелије везивног ткива, централни нервни систем и мишиће. Основна улога виментина је одржавање целуларног интегритета чиме чини ткивну архитектуру, обезбеђујући стабилност и снагу различитих органа (Eckes и сар., 2000).

Регулација експресије виментина подлеже сложеној контроли (Larsson и сар., 2004). У оквиру промоторног региона виментина уочава се више везујућих мета: TATA box, 8 GC-box, NF- $\kappa$ B везујуће место, AP-1 везујуће место, PEA3 везујуће место, Sp/XKLF везујуће место и ZBP-89 везујуће место. Експресију виментина може активирати  $\beta$ -катенин/TCF, везујући се за потентно место (468 bp узводно од промотра) и тиме повећати инвазивни потенцијал ћелија карцинома (Fuchs и Weber, 1994).

Повећана експресија виментина уочена је код различитих карцинома, укључујући карцином простате, гастроинтестиналне карциноме, карциноме CNS, дојке, карцином плућа и др. Прекомерна експресија виментина у ћелији канцера корелира са повећаним растом тумора, повећаном миграцијом, инвазијом и лошом прогнозом. Последњих година, виментин је добио велики значај као маркер ЕМТ, блиско повезаном са инвазијом и метастазама (Lazarova и Bordonaro, 2016; Todosi и сар., 2012). Абнормална експресија виментина резултира реконструкцијом цитоскелетних протеина епителних ћелија, што доводи до појаве карактеристика фибробласту сличног фенотипа и омогућава лакшу миграцију. Током ЕМТ, повећана експресија виментина може бити последица активације NF- $\kappa$ B, TGF $\beta$ 1 и Wnt/ $\beta$ -катенин сигналних путева (Lazarova и Bordonaro, 2016; Mendez и сар., 2010). Епигенетске модификације типа метилација гена за виментин честе су у напредним стадијумима CRC, што служи као дијагностички маркер у детекцији и праћењу CRC.

SCRIB (енгл. *Scribbled homolog*) протеин је укључен у миграцију ћелија, и у интеракцији са виментином бива заштићен од деградације, што показује да је могућа улога повећане протеинске експресије виментина током ЕМТ, заправо стабилизација SCRIB протеина у циљу промовисања усмерене ћелијске миграције и повећања инвазивног капацитета ћелија (Mendez и сар., 2010).

Поред цитосолне локализације у ћелији, виментин је присутан и као нуклеарни и екстрацелуларни протеин. Улога ових позиција још увек није добро расветљена, али се не искључује могућност улоге транскрипционог фактора, сигналног молекула или улоге у међућелијској комуникацији. Broxmeуer и сарадници (2013), показали су да у активираним макрофагама долази до фосфорилације виментина и његовог даљег експорта на површину ћелије. Екстрацелуларни виментин се везује на површину ћелија карцинома, привлачи ћелије имуног система (НК ћелије) које поседују НКp46 рецепторе у окружењу канцера, и њихову активност потискује различитим механизмима, чиме се ствара безбедно окружење, тј. „избегавање“ имуног одговора, што повољно утиче на прогресију канцера.

### 2.3.6. Матрикс металопроотеиназе - улога у ЕМТ и у процесу миграције

Матрикс металопроотеиназе (ММП) чине фамилију од најмање 25 цинк зависних ендопептидаза, са главном улогом у одржавању екстрацелуларне хомеостазе путем ослобађања фактора раста, хемокина и адхезионих молекула на површини ћелије. Такође, не мање значајна, улога ММП је у деградацији компоненти ЕСМ и ВМ током различитих физиолошких стања (трудноћа, плацентација, репарација ткива, и др.) (Woessner, 1991). Подела ММП према супстрату који разлажу је: ММП матрикса (ММРМ), желатиназе (ММП-1 и ММП-3), колагеназе (ММП-2 и ММП-9), ММП које лизирају строму (ММП-3, ММП-7, ММП-10) и ММП везане за мембрану (МТ-ММП) (Christiansen и Rajasekaran, 2006).

Синтетисане у форми проензима, ММП своју каталитичку активност остварују (ауто)протеолитичком обрадом, чиме се преводe у активно стање. Активација подразумева везивање цистенског остатка продомена за јон  $Zn^{2+}$  у средишту молекула, захваљујући коме се одиграва протеолитичка активност (Newby, 2005).

Ензимска активност металопроотеиназа је строго контролисана на више нивоа: на нивоу генске експресије, стабилности mRNK, активације проензима и инхибиције ензимске активности њиховим ендогеним ткивним инхибиторима. Генска експресија ММП регулисана је од стране многих сигналних путева укључујући NFκB, Wnt/ β-катенин, TGF-β, Notch-1, EGFR (Ries и Petrides, 1995). Важну улогу у контроли њихове експресије имају транскрипциони фактори који везују AP-1 (енгл. *Activator Protein-1*) и припадају фамилији *jun* и *fos* гена (Woessner, 1991). Регулација протеолитичке активности ММП одвија се преко специфичних ткивних инхибитора

TIMP-1 до TIMP-4 (енгл. *Tissue Inhibitor of Matrixmetalonroteinases*, TIMP), формирањем комплекса са MMP. Регулација активности MMP од стране TIMP кључна је за многе биолошке процесе, укључујући миграцију, инвазију, ћелијску пролиферацију, ангиогенезу и апоптозу. У ћелијама CRC, цитотоксичност изазвана помоћу TNF и IL-2, супримирана је TIMP-1, чиме овај фактор доприноси расту карцинома. Дисрегулација активности TIMP активности доводи до неконтролисаних разградње ЕСМ која је у основи процеса туморског метастазирања (Woessner, 1991). TIMP-1 везује активну форму MMP-1 и MMP-3, а његово одсуство је одговорно за рецидив карцинома (Hofmann и сар., 2005).

У канцеру MMP играју важну улогу у процесима инвазије и метастазе (Malemud, 2006), деградацији компоненти ЕСМ и ВМ (Fu и сар., 2004). Повећана експресија MMP-1 уочена је у почетним фазама инвазије, док је у метастазама мање заступљена, па се сматра кључном у процесу инвазије примарног тумора (Page-McCaw и сар., 2007). MMP-2 (желатиназа А) и MMP-9 (желатиназа Б), су металопроотеиназе најчешће повезане са процесом метастазе, услед способности да разлажу колаген типа IV, главну компоненту ВМ. Ниво MMP-2 и MMP-9 је значајно повишен у CRC у односу на здраво ткиво. Протеолитичка активност MMP-2, зависна од интеракције са  $\beta 1$  интегринима, деградирајући њих, повећава покретљивост ћелија. Повишен ниво MMP-2 карактеристичан је за инвазивни тип CRC. MMP-7 промовише инвазију CRC протеолизом компоненти ЕСМ као активатор проензимске форме MMP-2 и MMP-9 (Fu и сар., 2004).

Интеракција MMP-1 са Е-кадхерином у канцерозним ћелијама епителног фенотипа, доводи до разградње Е-кадхерин/ $\beta$ -катенин комплекса и ослобађања  $\beta$ -катенина који, релоциран у једро, интерагује са TCF/LEF покрећући експресију *MMP-7* гена (Nawrocki-Raby и сар., 2003). Такође протеолиза екстрацелуларних домена Е-кадхерина од стране MMP-3 доводи до активације Snail1 путем реактивних врста кисеоника и покретања експресије виментина, MMP-9 и Н-кадхерина. Активацијом Wnt сигналног пута услед деактивације GSK3 $\beta$ , долази до активације транскрипционих фактора Snail, Twist и ZEB, репресора Е-кадхерина. Слободни Snail1 интеракцијом са FOX-C2 и SIP1, директно активира експресију мезенхимских гена (Christiansen и Rajasekaran, 2006) у процесу ЕМТ чији је исход мезенхимски тип ћелија. Мезенхимске ћелије секретују MMP-2 и MMP-9, које деградирају ВМ и помажу процес инвазије (Christiansen и Rajasekaran, 2006).

### 3. Редокс статус

Оксидациони стрес се дефинише као поремећај прооксидационо-антиоксидационе (редокс) равнотеже, при чему се фаворизују проксиданси који указују на потенцијално оштећење ћелија. Према Halliwell-у и Gutteridge-у (2006), ради се о озбиљно нарушеном балансу између продукције реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS) и азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) са једне стране и антиоксидационе заштите са друге стране. Оксидациони стрес стоји у основи многобројних патолошких појава, укључујући и малигне болести (Droge, 2002).

#### 3.1. Реактивне врсте кисеоника и азота

Кисеоник и неки његови метаболички производи, се називају реактивним врстама кисеоника (ROS), настали су у бројним физиолошким и патолошким процесима, као споредни производи транспорта електрона у митохондријама. То су молекули, јони и атоми који имају један или више неспарених електрона у својој структури (Žikić и сар., 2000). Основне особине ових молекула су веома кратак полуживот, изузетно велика реактивност и тежња да реагују са електронима других молекула како би постали електронеутрални. Током ових процеса формирају се нове ROS које затим учествују у низу ланчаних реакција, креирајући нове реактивне производе (Đorđević и сар., 2008).

Реактивне врсте кисеоника обухватају слободне радикале кисеоника (супероксид –  $O_2^{\cdot-}$ , хидроксил –  $\cdot OH$ , пероксил –  $RO_2^{\cdot}$ , алкоксил –  $RO^{\cdot}$  и хидропероксил радикал –  $HO_2^{\cdot}$ ) и реактивне врсте кисеоника које нису радикали (водоник пероксид –  $H_2O_2$ , хипохлорна киселина –  $HOCl$ , озон –  $O_3$  и синглет кисеоник –  $^1O_2$ ). Реактивне врсте кисеоника имају способност реакције са липидима мембране, нуклеинским киселинама, протеинима, ензимима и другим молекулима, што може довести до њихових оштећења (Marković и сар., 2006; Ambs и сар., 1998). У физиолошким концентрацијама, ROS регулишу молекуларне механизме многобројних физиолошких процеса у ћелијама, штите организам од патогена, имају кључну улогу у имунском одговору, ћелијској пролиферацији, инфламацији, ћелијској адхезији, метаболичким процесима, старењу и апоптози (Marković и сар., 2007; Halliwell и Gutteridge, 2006; Droge, 2002; Wink и Mitchell, 1998). Такође ROS имају значајну улогу у регулацији различитих сигналних путева у ћелијама. Функционисање многих протеина зависи од редокс статуса ћелије (Droge, 2002). Међу најзначајнијим ROS у канцеру издвајају се супероксид анијон радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и водоник пероксид ( $H_2O_2$ ).

Једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника настаје супероксид анијон радикал, према следећој реакцији:  $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$

Настаје у готово свим аеробним ћелијама, а најзначајнији процес у коме се ствара је респираторни ланац митохондрија (Halliwell и Gutteridge, 2006; Andreyev и сар., 2005). Значајне количине се продукују у ендоплазматичном ретикулуму, реакцијама оксидаза (ксантинооксидаза, P450 оксидаза, NAD(P)H оксидаза, липооксигеназа, циклооксигеназа, алдехидоксидаза). Супероксид анион радикал може настати дејством различитих лекова, најчешће цитостатика, радијације, зрачења, биотрансформацијом екзогенних и ендогенних супстрата (Droge, 2002; Liochev и Fridovich, 1994).

У физиолошким условима ензим супероксид дисмутаза (SOD) својом активношћу трансформише  $O_2^-$  у мање реактиван  $H_2O_2$  који учествује у формирању других ROS реакцијом са различитим биолошким супстратима.  $H_2O_2$  индукује пероксидацију липида, оштећује ензиме, ремети синтезу DNK и учествује у процесу канцерогенезе и настанку многих болести (Droge, 2002; Žikić и сар., 2000). У физиолошким концентрацијама  $O_2^-$  имају улогу у сигналној трансдукцији преко мембранских рецептора, контроли вентилације, релаксацији глатке мускулатуре и активацији имунолошких одговора (Dumitru и сар., 2007; Droge, 2002).

Поред ROS, у организму се продукују и реактивне врсте азота (RNS). Азот моноксид (енгл. *Nitric Oxide*, NO), као извор свих RNS, неполаран је, високо дифузибилан сигнални молекул, који има особине слободних радикала, јер садржи један неспарен електрон (Ignarro, 1999). Синтезише се од аминокиселине L-аргинина, активношћу ензима азот оксид синтетазе (енгл. *Nitric Oxide Synthase*, NOS), у присуству молекуларног кисеоника и NADPH као косупстрата. Физиолошка функција NO зависи првенствено од његове концентрације.

При ниским концентрацијама, NO делује као сигнални молекул који регулише релаксацију глатке мускулатуре, проток крви, учествује у неуротрансмисијама, у активности тромбоцита, хомеостази гвожђа, у ћелијском преживљавању и пролиферацији, док у високим концентрацијама показује антиканцерогену активност (Vannini и сар., 2015). Ниже концентрације NO (мање од 100 nM) спречавају апоптозу у појединим ћелијама канцера, чиме фаворизују канцерогенезу, неоангиогенезу и прогресију канцера. Високе концентрације NO (више од 500 nM) могу имати про-апоптотски ефекат, цитотоксично и антиканцерогено дејство (Vannini и сар., 2015; Thomas и сар., 2008) (Шема 9). Сматра се да су високе концентрације NO пореклом из макрофага, неутрофила, ендотелних ћелија, хепатоцита, срчаних миоцита и хондроцита (Fukumaga и сар., 2006).

Цитотоксични ефекти NO посредовани су пре оксидационим продуктима које генерише у реакцији са молекулским кисеоником и ROS, него његовим директним деловањем. У биолошким системима могу се наћи редокс форме азот монооксида: слободни радикал  $NO^{\bullet}$ , нитрозил катјон ( $NO^+$ ), који настаје једноелектронском оксидацијом  $NO^{\bullet}$ , и нитроксил анион ( $NO^-$ ), који настаје

једноелектронском редукцијом  $\text{NO}^\bullet$ . Све три редокс форме  $\text{NO}$  могу да реагују са  $\text{ROS}$ , редокс активним металима и тиолима. Азот моноксид може да се оксидује до нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) који се користе и као његови биоиндикатори. У реакцији  $\text{NO}$  са  $\text{O}_2^-$  долази до формирања веома агресивог молекула пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) (Pacher и сар., 2007).

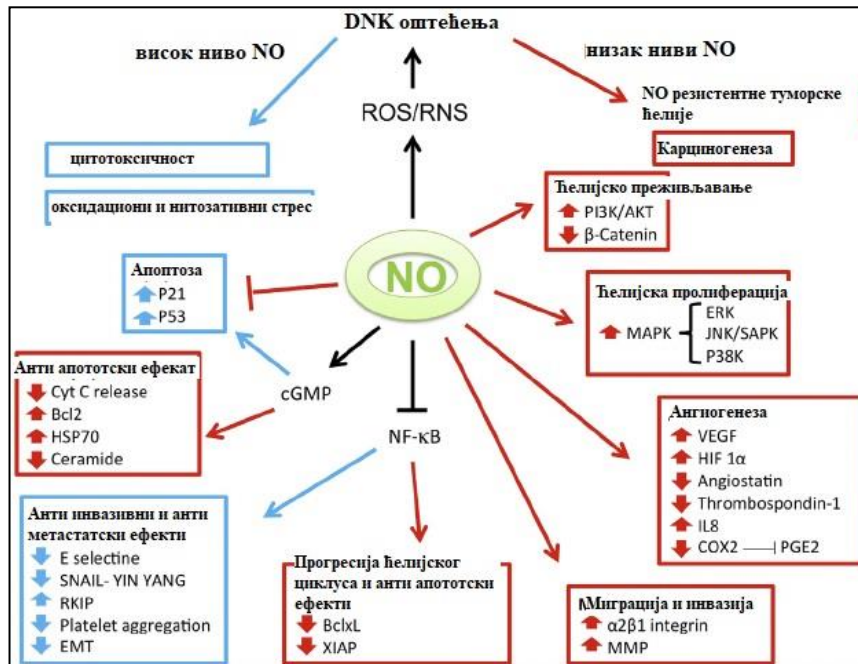
### 3.2. Улога $\text{ROS}$ и $\text{RNS}$ у процесу $\text{EMT}$

Проканцерогена активност  $\text{ROS}$  и  $\text{RNS}$  укључује стимулацију и промоцију ћелијске пролиферације, инвазивност, ангиогенезу, метастазу и инхибицију апоптозе, док антиканцерогени ефекти подразумевају њихов утицај на застој ћелијског циклуса, изазивање апоптозе и некрозе, инхибицију ангиогенезе и миграције (Шема 9).

Недавна истраживања показала су да  $\text{ROS}$  и  $\text{RNS}$  имају важну улогу у свим фазама метастазе тумора, укључујући процесе  $\text{EMT}$ , миграцију, инвазију ћелија карцинома и ангиогенезу око туморске лезије. Процес метастазе карцинома као и  $\text{EMT}$ , регулисани су од стране  $\text{ROS}$  и  $\text{RNS}$  и то на нивоу транскрипционе регулације експресије гена укључених у процес  $\text{EMT}$ , активације различитих молекула у оквиру сигналних путева током  $\text{EMT}$  (Wu, 2006).

Интрацелуларно генерисане велике количине  $\text{ROS}$  путем фактора раста и цитокина (као што су  $\text{TGF}\beta$  и  $\text{HGF}$ ) активирају протеине ћелијске адхезије доводећи до миграције ћелија канцера. Као сигнални молекули,  $\text{ROS}$  могу оксидовати протеин киназу  $\text{C}$  (енгл. *Protein Kinase C*,  $\text{PKC}$ ) и протеин тирозин фосфатазе (енгл. *Protein Tyrosine Phosphatase*,  $\text{PTP}$ ), одговорне за инвазију ћелија канцера. Регулација  $\text{EMT}$  од стране  $\text{ROS}$  може бити преко  $\text{MAPK}$  и  $\text{RAK}$  (енгл. *Rac/p21-activated kinase*) сигнала. Главни сигнал за покретање метастазе туморских ћелија јесте покретањем  $\text{MAPK}$  каскаде преко  $\text{RAK}$  и  $\text{TGF}\beta/\text{Smad}$  и интегрин-посредоване сигнализације, при чему је  $\text{RAK}$  ефекторни протеин са улогом ремоделирања цитоскелета.  $\text{AP-1}$  и  $\text{Smad}$  могу бити активирани преко  $\text{ROS}$  активираних  $\text{PKC}$  и  $\text{TGF}\beta 1$ . Такође, гени за Е-кахедрин, интегрине и  $\text{MMP}$ , укључене у процес  $\text{EMT}$ , подложни су регулацији од стране  $\text{ROS}$  сигналних молекула, најпре  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wu, 2006).

Како је раније наглашено, ефекти  $\text{NO}$  на канцер могу бити стимулативни и супресорни. Ниске концентрације  $\text{NO}$  имају стимулативни ефекат на инвазију канцерозних ћелија преко повећања експресије  $\text{MMP-2}$  и  $\text{MMP-9}$  и смањења  $\text{TIMP-2}$  и  $\text{TIMP-3}$ . Ограничавајући пролиферацију ћелија леукоцита,  $\text{NO}$  модулира имуни одговор домаћина у присуству туморских ћелија (Vahora и сар., 2016).



Шема 9. Улога NO у ћелији канцера (модификовано из Vannini и сар., 2015)

Третман ћелија позитивних на EMT донором NO, инхибира EMT путем модификације и дисрегулације NF-κB/Snail/YY1/RKIP петље, за који је показано да регулише EMT. NO-посредована инхибиција EMT је резултат, делом, S-нитрозилације транскрипционих фактора NF-κB, Snail, YY1 (енгл. *Yin Yang 1*), чиме се инхибирају њихове активности везане за DNK. Инхибиција Snail фактора резултира активацијом експресије RKIP (енгл. *Raf Kinase Inhibitory Protein*) која је под његовом транскрипционом регулацијом, чиме се посредством NO инхибира *in vitro /in vivo* EMT фенотип. Ови резултати указују на потенцијалну терапеутску ефикасност NO донора у инхибицији EMT и метастаза, као и на њихову улогу у сензибилизацији туморских ћелија отпорних на хемиотерапеутике и апоптозу (Vannini и сар., 2015; Bonavida и Baritaki, 2011) (Шема 9). Сублеталне дозе ROS и RNS, индуковане од стране биомолекула из природних извора могу изазвати смањење миграције ћелија CRC (Šeklić и сар, 2016).

### 3.3. Антиоксидациони заштитни систем, глутатион и улога у канцеру

Антиоксидациони заштитни систем (енгл. *Antioxidative Defence System*, AOS) има улогу у спречавању, ограничавању или „поправци“ оштећења насталих деловањем реактивних врста. Антиоксиданси имају способност стабилизације, односно деактивације ROS и RNS (Halliwell и Gutteridge, 2006; Dröge, 2002). Антиоксидациони заштитни систем се састоји од ензимских и неензимских компоненти. Неензимске компоненте AOS обухватају супстанце растворљиве у



мастима (витамин А, провитамин А, витамин Е, коензим Q) и супстанце растворљиве у води (витамин С, глутатион, мокраћна киселина, хистидин и др.). Поред њих, у ћелијама постоје антиоксидациони ензими, као што су SOD, каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px), глутатион редуктаза (GR), глутатион S-трансфераза (GST) и др. (Halliwell и Gutteridge, 2006; Žikić и сар., 2000).

Антиоксиданси играју кључну улогу у превенцији многих болести, укључујући и канцер. Антиоксидационе супстанце природног порекла имају велику предност у односу на синтетске, за које је утврђен низ нежељених ефеката, као и генотоксична активност (Carocho и Ferreira, 2013). Лековитост природних препарата које се користе у фармацији и народној медицини је у великој мери резултат присуства различитих биоактивних једињења са изузетно високом антиоксидационом активношћу (Ćurčić, 2014).

Глутатион (GSH) је трипептид ( $\gamma$ -L-глутамил-L-цистеинил-глицин), који представља неензимску компоненту AOS и присутан је у свим ћелијама сисара као слободан или везан у цитосолу, једру, митохондријама или микрозомима (Žikić и сар., 2000). Синтетише се активношћу  $\gamma$ -глутамилцистеин синтетазе (GCS) и глутатион синтетазе (GS) у серији ензимских реакција (Griffith, 1999; Meister и Anderson, 1983). Глутатион у ћелијама постоји у редукованој (GSH) и оксидованој форми (GSSG). Одржавање оптималног односа GSH:GSSG у ћелији је кључно за преживљавање ћелија, а дефицит GSH може довести до оксидационих оштећења (Marković и сар., 2011, 2014; Žikić и сар., 2000).

Глутатион има многобројне улоге у ћелији: у синтези и деградацији протеина, формирању дезоксирибонуклеотида, складиштењу и транспорту цистеина, регулацији ћелијског редокс баланса, заштити ћелија од слободних радикала и у детоксификацији, као кофактор ензима глутатион S-трансферазе. Заштитна улога GSH од оксидационог оштећења заснива се на способности сулфхидрил групе (-SH) да у директној и брзој реакцији са реактивним врстама (Pisoschi и Pop, 2015). Одржавањем редокс хомеостазе у ћелији, GSH доприноси регулацији функције целуларних протеина, ћелијског циклуса, апоптозе, некрозе и ћелијске сигнализације (Pallardó и сар., 2009).

Многи типови канцера имају повишен ниво ROS и RNS у поређењу са нормалним ткивом, као и повишен ниво антиоксидационих ензимских и неензимских компоненти, међу којима је и GSH (Oltra и сар., 2001). Ово повећање може бити резултат адаптивног одговора на оксидациони стрес присутан у ћелији карцинома. Иако је GSH важан у детоксикацији од канцерогена, показано је да код многих типова канцера повећава резистенцију и смањује цитотоксичност многих хемиотерапеутских лекова и зрачења (Ganesaratnam и сар., 2004).

Познато је да GSH игра важну улогу у настанку и прогресији различитих врста канцера укључујући и CRC (Traverso и сар., 2013). Показано је да ниво GSH корелира са растом метастатских канцера јетре и метастатског меланома (Varitaki и сар., 2010). Такође је потврђена директна корелација између нивоа GSH и пролиферације и отпочињања метастатске каскаде у многим инвазивним туморима. Висок ниво GSH у канцерозним ћелијама омогућава им да преживе оксидациони стрес чиме фаворизују преживљавање ћелија са високим инвазивним и метастатским потенцијалом (Carretero и сар., 2001). Ћелије меланома које су имале виши ниво GSH дале су већи проценат метастатских колонија када су апликоване у мишеве, него исте ћелије са базичним, нижим нивом GSH. Могуће је да је одржавање високог нивоа интрацелуларног GSH круцијално у екстраваскуларном расту метастатских ћелија. Метастатске ћелије са очуваном митохондријалном GSH хомеостазом имају предност у преживљавању у прелазном периоду непосредно након интра-синусоидног уласка и интеракције са активираним васкуларним ендотелијалним ћелијама. У том смислу, нарушавање хомеостазе на нивоу митохондрија и GSH је кључно за сензибилизацију инвазивних ћелија канцера на антиканцерогене у чијој је основи продукција ROS и RNS (Traverso и сар., 2013).

#### **4. Терапија канцера, хемиотерапеутици и биоактивне природне супстанце у лечењу CRC**

У лечењу канцера користи се више различитих приступа. Лечење се углавном спроводи комбинацијом хирушког лечења, зрачења и терапије цитостатицима како би се постигао потпуни терапијски учинак.

Лечење CRC првенствено је хирушко. Радио- и хемиотерапија немају значаја као примарни начин лечења, већ се употребљавају као додатна терапија након радикалне хирушке интервенције у циљу побољшања њених ефеката. Постоперативно зрачење и хемиотерапија имају за циљ уништење заосталих малигних ћелија, које су релативно честе након хирушке интервенције. Уједно, циљ је и да се блокира, спречи или одложи развој или напредак рецидива. У хемиотерапији, лекови који се употребљавају у широкој примени код пацијената са CRC су 5-флуороурацил, оксалплатина, иринотекан и доксорубин (Milić и Damjanović, 2013).

Цитостатици (хемиотерапеутици) су хемикалије које делују на метаболизам ћелије, спречавају њен раст инхибицијом одређених ензима, оштећују једро ћелије и инхибирају ћелијску деобу. Намењени су терапији пацијената са малигнитетима. Недостатак примене хемиотерапеутика је

последица чињенице да већина ових лекова убија и здраве брзопролиферишуће ћелије (нпр. коштане сржи и слузокоже дигестивног тракта), последичо изазивајући многобројне нуспојаве (al-Tweigeri и сар., 1996).

Према начину деловања, цитостатици су подељени у неколико класа: 1) алкилирајући агенси, 2) антимерболити 3) антиканцерогени антибиотици 4) цитостатици изоловани из природних извора и 5) бактеријски ензими (Janković, 2003). Алкилирајући агенси су супстанце које поседују алкил радикале који се лако везују за атоме азота у пуринским и пиримидинским базама нуклеинских киселина. Веома су ефективни на брзо растућим ћелијама, јер приликом репликације ДНК долази до грешака, прекида и смрти ћелије. Најважније групе алкилирајућих агенаса су пликавци, нитрозоурије и деривати платине (цисплатина и карбоплатина).

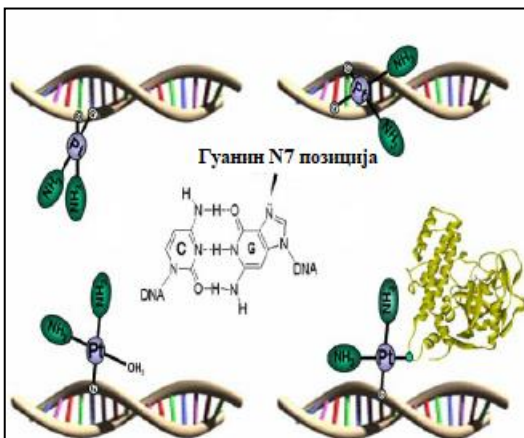
#### 4.1. Цисплатина и комплекси платине(IV)

Цисплатина (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) је неутрални квадрато платински комплекс Pt(II), односно једињење платине(II) на који су координирана два молекула амонијака и два хлоридна ањона у *cis* положају (Chou и сар., 2008). Цисплатина је лек избора за многе типове канцера, укључујући канцере уrogenиталног тракта (тестиси, оваријуми, бешика), неке од малигнух болести крви, немикроцелуларни карцином плућа и малигне туморе главе и врата. Примењује се интравенски у виду инфузионог раствора, а активира хидролизом након отпуштања једног односно два хлоридна ањона.

Иако је концентрација хлорида у крви довољно висока да се спречи или омете превермена хидролиза цисплатине, она се догађа. Поред хидролизе, велики део цисплатине деактивира се у интеракцији са компонентама крви, везивањем за протеине крвне плазме, у првом реду албумине и током дистрибуције кроз организам (чак 98% унетог лека) (Sabo и сар., 2004). Део цисплатине (око 1%) који доспе до циљане ћелије улази активним транспортом преко носача за бакар, али се уједно доагађа и ћелијски ефлукс преко АТР транспортера бакра, АТР7В и АТР7А, MRP2 (Chou и сар., 2008). Цисплатина у ћелијском цитосолу интерагује са S-донорским молекулима (тиолима), у првом реду за GSH, што додатно смањује проценат лека који ће интераговати са ДНК. Глутатион и други тиоли везују цисплатину брзо и иреверзибилно (Chou и сар., 2008). Деактивиран платина-GSH адукт се излучује из ћелије помоћу глутатион S-конјуговане пумпе што за последицу има појаву резистенције канцерозних ћелија. Неспецифична везивања за молекуле који нису ДНК мета могу допринети механизму цитотоксичности цисплатине у туморским ћелијама (Sabo и сар., 2004).

У ћелији где је знатно мања концентрација хлоридних јона измењују се релативно лабилни хлоридни ањони са хидроксилним јонима, при чему настају делимично хидролизоване моно- и

диаква врсте цисплатине. Цисплатина у таквом облику интерагује са ДНК правећи оштећења најчешће у виду унутарланчане укоснице (*crosslinkers*). Једињења платине своју биолошку активност остварују ковалентним везивањем за суседне пуринске базе гуанин или аденин на позицији N7 градећи примарно 1,2- или 1,3-унутарланчане везе, ређе међуланчане унакрсне везе (Lazić и сар., 2010; Sabo и сар., 2004). Интеакција цисплатине са гуанином на N7 позицији (1,2-d(GpG)) чини 70% насталих лезија, док интеракције са аденином на истој позицији (1,2-d(ApG)) чине 20% насталих лезија. Преостале међућелијске везе цисплатине и ДНК чине око 5% лезија. Награђени адукти цисплатине и ДНК узрокују савијање и одмотавање ДНК хеликса, прекидање ДНК ланца, што као одговор покреће репартивне механизме ДНК (Шема 10), (Chou и сар., 2008). Уколико репарација изостане или није довољно ефикасна, ћелија улази у програмирану ћелијску смрт, апоптозу.



**Шема 10.** Интеракције цисплатине и ДНК (модификовано из Sereda и сар., 2007)

Цисплатина као цитостатик, поред тога што је веома ефикасна у акутној цитотоксичности, има и многа нежељена дејства у виду токсичних нус појава (Zhang и сар., 2010). Нежељени (токсични) ефекти цисплатине су последица интеракције платинског лека са здравим ткивима током дистрибуције лека кроз организам. У првом реду то су нефротоксичност, неуротоксичност, ототоксичност, еметогенеза, као и развој примарне и стечене резистенције (Zhang и сар., 2010). Иако се тешко подносе, пре свега због неуропатија изазваних неуротоксичношћу, развоја примарне и стечена резистенција, данас цисплатина (лек *Platinol®*, *Bristol-0Myers Squibb Company*) и оксалплатина имају клиничку примену. Неки комплекси платине су још и фази испитивања, укључујући оне који имају оралну примену тј. платина(IV) комплекси (Zhang и сар., 2010).

Платина(IV) (Pt(IV)), представља координационо једињење платине и, за разлику од једињења платине(II) комплекса који се примењују искључиво интравенски, Pt(IV) комплекси се могу се користити орално јер су инертнији. Предност Pt(IV) комплекса у поређењу са Pt(II) комплексима је у октаедарној геометрији коју одликују два аксијална лиганда (Graham и сар., 2000; Levi и сар.,

2000). Активирање реактивних група као потенцијалних лигатора за DNK, омогућено је смањеном реактивношћу која проистиче из кинетичке инертности. Антитуморска активност комплекса Pt(IV) односи се на њихову интеракцију са молекулима DNK, редукујући се до платина(II) (Graham и сар., 2000). Као и комплекси платине(II), и комплекси Pt(IV) интерагују са другим биомолекулима у организму (пептидима, протеинима и ензимима) редукујући Pt(IV) до Pt(II), чиме структура Pt(II) доспева до ћелије и има већу могућност за реакцију са DNK. Међу овим клинички испитиваним комплексима Pt(IV) треба издвојити ипроплатину, тетраплатину и сатраплатину. Сатраплатина показала је изванредну активност на ћелијама канцера грлића материце, јајника, дебелог црева, простате и микроцелуларног карцинома плућа. Овај орални хемиотерапеутик доспео је до III фазе клиничког испитивања (Desoize и Madoulet, 2002).

#### 4.2. Цитотоксичност и апоптоза

Хемиотерапеутици у својој основи имају тројако дејство на ћелије: спречавају раст канцера спречавајући деобу ћелија (антипролиферативно дејство), заустављају раст ћелија (цитостатско дејство) и доводе до смрти ћелија (цитотоксично дејство). Ефекте потенцијалних хемиотерапеутика на вијабилност ћелија канцера у култури дефинише се као цитотоксичност. У лабораторијским условима постоји велики број тестова којима се евалуирају потенцијални цитотоксични ефекти, углавном одређивањем процента живих ћелија након деловања неког цитотоксичног третмана. Методе за процену броја преживелих ћелија у култури углавном се заснивају на мерењу индикатора метаболичке активности ћелија, превођењем одређене класе хемикалија од стране живих ћелија у облике који се лако могу мерити (Riss и сар., 2011).

Апоптоза као тип ћелијске смрти у основи је генетички програниран механизам за контролу броја ћелија којим се успоставља равнотежа између пролиферације и броја одумрлих ћелија. Апоптоза је физиолошки процес током ембриогенезе, а може бити покренута у многим физиолошким и патолошким стањима: услед недостатак међућелијских сигнала, одсуством цитокина, фактора раста и хормона, оштећења DNK, стање оксидационог стреса, или активирањем рецептора на мембрани. У патолошким стањима као што је канцер, ћелије процес апоптозе свде на најмању меру или у потпуности заобилазе. Изостанак апотозе може бити последица нарушавања баланса између проапоптотских и антиапоптотских протеина, смањена сигнализације путем рецептора смрти и смањење функције каспаза. Морфолошке и биохемијске промене у ћелији током апоптозе се односе на релокацију фаосфатидил-серина на спољашњу страну мембране, кондензацију хроматинског материјала у једру, фрагментацију једра, цепање DNK. У касној апоптози долази до набирања мембране, кондензације цитосола, модификације

цитоплазматских органела, губљења интегритета мембране и на крају формирања великих цитоплазматских делова-апоптотских тела (Alberts и сар., 2008; Adams и Cory, 2002; Adrain и Martin, 2001).

Апоптоза се у ћелији покреће активирањем каспаза, а овај процес може бити инициран од стране спољашњег и унутрашњег пута. Спољашњи апототски пут се активира везивањем лиганда за рецептор смрти из TNF/Fas (енгл. *Tumor Necrosis Factor/Fatty acid synthetase*) породице чији цитоплазматски домени трпе конформационе промене, што утиче на накупљање DD (енгл. *Death Domain*) молекула који преко FADD (енгл. *Fas Associated Death Domain Protein*), активирају прокаспазу 8. Сигнал покренут TNF/Fas може ићи у два правца: један који укључује митохондрије преносећи сигнал преко Bid (BH3 interacting-domain death agonist) који се транслоцира у митохондрије и ремети пермеабилност спољашње митохондријалне мембране, што доводи до ослобађања цитохрома C; други сигнални пут је независан од митохондрија, доводи до активације каспазе 3 од стране каспазе 8, а на даље других ефекторних каспаза. Унутрашњи апототски пут покреће сигнал из унутрашњости ћелије, најчешће из митохондрија где долази до промена на нивоу пропустљивости спољашње митохондријалне мембране праћено ослобађањем цитохрома C, који доводи до активирања и стварања специфичних структура (молекула) који активирају ефекторне каспазе. Главни регулаторни протеини унутрашњег, митохондријаног пута су протеини Bcl-2 (енгл. *B-cell lymphoma 2*) породице (Ćurčić, 2014; Sankari и сар., 2012).

### **4.3. Значај комбинованих третмана хемиотерапеутика и биоактивних природних супстанци**

Комбинована терапија као новији приступ лечењу оболелих од канцера, омогућава комбиновање два или више цитостатика (хемијски синтетисаних или из природних извора) са различитим механизмима деловања и са различитим нежељеним дејствима, а све у циљу постизања синергистичких цитостатских ефеката са минималним токсичним деловањем по здраве ћелије у организму. Оваква врста терапије омогућава истовремено циљање различитих путева који су укључени у настанак и развој канцера, користећи различите механизме деловања компоненти комбиноване терапије. Један од циљева комбиноване терапије јесте смањити резистенцију туморских ћелија на хемиотерапеутике (Housman и сар., 2014). Неколико студија објављених последњих година је показало да је лечење карцинома комбиниваном терапијом много ефикасније од употребе лекова појединачно (Fernández и сар., 2016; Housman и сар., 2014; Singh и сар., 2013). Данашње Европске и светске препоруке као стандардни приступ лечења CRC наводе комбиновану терапију оксалплатином и 5-флуороурацилом коме је додат леуковирин (фолинску

киселину-провитамин витамина В9). Такође, у клиничкој пракси се користи комбинација капецитабина, оксалплатине и фолинске киселине, као и фолинске киселине и оксалплатине. Такође, хемосензибилизација ћелија канцера помоћу фитохемикалија, заснована је на употреби природног једињења у циљу повећање активности лека и превазилажења резистенције. Фитохемикалија у комбинованом третману, првенствено има за циљ превазилажење хеморезистенције преко модулације сигналних путева или молекула у ћелији одговорних за резистенцију (Redondo-Blanco и сар., 2017). Обећавајући комбинаторни приступ лечењу CRC природним једињењима у комбинацији са хемотерапеутицима омогућава да се утиче на више од једног циља у ћелији, као и да се повећа потенцијал хемотерапије (хемосензитизацијом) (Redondo-Blanco и сар., 2017; Gupta и сар., 2011).

#### **4.4. Биолошка активност испитиваних врста гљива и лишајева**

Биоактивни једињења из природних извора, од давнина се користе у циљу очувања и побољшања здравља људи. Биљке, гљиве и лишајеви, као извор потенцијално биоактивних супстанци, у основи су традиционалне медицине и фармакологије и користе се за лечење различитих болести, укључујући и канцер. Биоактивне супстанце из природних извора углавном се у народној медицини користе у облику чајева, облога, екстракта и тинктура док су савремене технологије омогућиле изолацију биолошки активних компоненти. Биолошки активне компоненте из природних извора припадају различитим групама једињења: фенолна једињења, фитостероли, фитостероли, лактини, олигосахариди, полинезасићене масне киселине (Niedzwiecki и сар., 2016; Ћурчић, 2014; Saha и сар., 2010; Hsieh и сар., 2009). Поред примарних метаболита као што су протеини, угљени хидрати и липиди, веома значајну улогу имају одређена једињења без значајне нутритивне улоге, тзв. секундарни метаболити (Hsieh и сар., 2009). У најзначајније секундарне метаболите убрајамо: полифеноле, терпеноиде, алкалоиде и антибиотике. Потенцијална биоактивна једињења широко су истражена и много је података који указују на позитивне ефекте на превенцију и смањење ризика од CRC (Fernández и сар., 2016). Поред користи у превенцији, неки од ових молекула имају потврђена антиканцерогена дејства па могу бити корисни за лечење CRC, посебно у комбинацији са другим лековима. Поред антиканцерогене активности, многи биомолекули, као молекули мале молекулске масе, по уласку у ћелију делују као модулатори и/или инхибитори бројних сигналних путева регулишући процесе ћелијског циклуса, диференцијацију, апоптозу и ћелијску миграцију (Housman и сар., 2014).

#### 4.4.1. Биомедицински потенцијал гљива

Одабране врсте гљива *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus* и *Ganoderma lucidum* комерцијално су набављене од Medical Herbs, Нови Сад као увезени, готови препарати гајених врста, са употребом као додаци исхрани. Ове гљиве се користе у целом свету и имају потврђене позитивне ефекте на здравље људи. Одабране врсте гљива се вековима користе као деликатеси или допуна исхрани у циљу побољшања општег здравственог стања, или као помоћна лековита средства, алкохолни и безалкохолни напици, сирупи, тинктуре и капи за побољшање варења и ублажавање тегоба у организму. Досадашња истраживања су потврдила имуномодулаторна, антиоксидациона, антибактеријска, антивирусна, антиканцерогена дејства ових гљива (Kamilya и сар., 2006; Rowan и сар., 2003), Цитотоксични, проапоптотски и амтимигрантни/промигрантни, као и антиметастатски ефекти екстраката ових гљива такође су потврђени (Šeklić и сар., 2016; Wasser, 2010). Како литературни подаци потврђују, гљиве акумулирају различите примарне и секундарне метаболите укључујући минералне материје, органске киселине, витамине, полисахариде, протеине, масти, уља, флавоноиде и фенолне киселине (Wasser, 2011).

##### *Phellinus linteus*

*Phellinus*, (Berk. et Curt.) Teng, је од давнина била препозната као лековита врста на територији Далеког Истока где је њено природно станиште. *Phellinus linteus* припада роду *Phellinus*, породице *Hymenochaetaceae*, реда *Aphyllporales*, и класи гљива *Basidiomycetes*. Плодоносно тело ово гљиве је копитастог облика, дрвенасте конзистенције а боја варира од браон до црне (**Шема 11**). Географско распрострањење станишта ове гљиве су Јапан, Кина, Кореја и Исланд. У природи *Phellinus* расте на стаблима листопадног дрвећа која су старија од сто година. Коришћена је у традиционалној медицини Далеког истока за лечење гастроинтестиналних тегоба. Горког је укуса а конзумира се у облику чаја (Zhu и сар. 2008). Како литературни подаци наводе, код вештачки култивисане врсте, ефикасност у знатној мери може бити редукована (Šeklić и сар., 2016). Једино се у природним условима станишта и климе стварају компоненте које дају лековите ефекте *P. linteus* (Zhu и сар. 2008).



**Шема 11.** Плодоносно тело гљиве *Phellinus linteus* (преузето са <http://www.healthwarehouse.co/mesimakobu-phellinus-linteus-experiencing-the-benefits/>)



***Cordyceps sinensis***

*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. се сматра изузетно лековитом гљивом од најстаријих времена. Ова гљива припада роду *Ophiocordyceps*, породице *Ophiocordycipitaceae*, *Hypocreales* реда, и класи гљива *Sordariomycetes*, разреду *Ascomycota*. Ова ентомопаразитска гљива, паразитира на ларвама мољца. Плодоносно тело клија у виду изданка жуте до браон боје а чине га стабљика и главица (**Шема 12**). Природно станиште јој је у планинским регијама Непала и Тибета (Kim, 1991). У бројним истраживањима је установљено да се ради о најпотентнијој до сада изучаваној гљиви, са веома широким спектром позитивних дејстава на човеково здравље. Истраживања су показала да садржи велику количину арсеника и друге тешке метале, тако да је ова врста потенцијално токсична, те су производња и продаја строго регулисани CFDA (*China Food and Drug Administration*) (Kim, 1991). *C. sinensis* је проглашена за угрожену врсту у Кини, због превеликог експлоатисања.



**Шема 12.** Плодоносно тело гљиве *Cordyceps sinensis* (преузето са <http://www.dr-fungus.com/ljekovite-gljive/cordyceps-opcenito>)

***Coprinus comatus***

*Coprinus comatus* (Berk.) Pegle. или длакава гљива из рода *Coprinus*, припада породици *Agaricaceae*, реда *Agaricales*, и класи гљива *Agaricomycetes*, реда *Basidiomycota*. Плодоносно тело се састоји од шешира и стабљике. Шешир је величине од 5-18 cm, широк је и док је млад обликом подсећа на велики жир (**Шема 13**) (Dotan, 2011). Распрострањена је свуда у Европи, осим у медитеранском и субмедитеранском подручју. Расте на травнатим површинама. Пријатног је



укуса, а мирис јој је освежавајући. Цењени је деликатес, по укусу се сврстава у сам врх јестивих гљива. Лако се може узгајати (Dotan, 2011; Yu и сар., 2009). Екстракт ове гљиве није комерцијално доступан па се једино користи као сушена или у облику таблета од праха пресоване гљиве.

**Шема 13.** Плодоносно тело гљиве *Coprinus comatus* (преузето са <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schopftintling-Coprinus-comatus.jpg>)

***Lentinus edodes***

*Lentinus edodes* (O.F.Müll.) Pers., у народу позната као Шитаке, су изузетно лековите медицинске гљиве већ вековима. Шитаке пипадају роду *Lentinula*, фамилији *Marasmiaceae*, такође реда *Agaricales*. Као и предходна испитивана врста, припадају класи *Agaricomycetes*, разделу *Basidiomycota*. Назив ове гљиве потиче од јапанских речи са значењем храст. Шитаке је самоникла у Јапану, Кини, Кореји и другим азијским земљама умереног климатског појаса (Kamilya и сар., 2006). Плодоносно тело чине шешир бледо до црвенкасто-смеђе боје и кратка централно постављена дршка (**Шема 14**) (Kim, 1991). Препознатљива је по својој лековитости, изванредном укусу и богатој ароми. Познат је широк спектар бенефита ове гљиве по здравље људи (Kamilya и сар., 2006). Садржи дијететска влакна која имају важну улогу у функционисању гастроинтестиналног тракта (Kamilya и сар., 2006).



**Шема 14.** Плодоносно тело гљиве *Lentinus edodes* (преузето са <http://www.medicinalmushroomshop.com/Lentinus-Edodes-Shiitake>)

***Ganoderma lucidum***

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, познатија као Реиши (гљива бесмртности; храстова сјајница) се већ 4000 година примењује у традиционалној медицини Јапана, Кине и Кореје. Ова гљива припада роду *Ganoderma*, фамилији *Ganodermataceae*, реду *Polyporales*, класи *Basidiomycetes* и разделу *Basidiomycota*. Расте у свим деловима света, али је веома ретка. У Јапану се може пронаћи на старом дрвету шљиве, а у Европи, Азији, северној и јужној Америци најчешће расте на



пањевима, корењу, оболелим стаблима четинара или храста и кестена. Плодоносно тело ове гљиве се састоји се од бело-жуте дршке и сјајног шешира (**Шема 15**).

**Шема 15.** Плодоносно тело гљиве *Ganoderma lucidum* (модификовано са <https://www.google.rs/search?q=ganoderma+lucidum>)

Горког је укуса и дрвенасте грађе. *G. lucidum* је коришћена у традиционалној медицини Кине и Јапана. Концентрација полисахарида као биоактивних материја у плодноносним телима ове гљиве веома зависи од фазе развоја плодносног тела, времена складиштења после брања као и од услова под којима се чува, што је потврђено и код других медицински важних гљива (Lindequist и сар., 2005). Препарати ове гљиве у облику капсула, ампула, екстраката и чајева користе се широм света (Lindequist и сар., 2005).

#### 4.4.2. Биомедицински потенцијал лишајева

Одабране врсте лишајева *Pseudevernia furfuracea* и *Platismatia glauca* узорковане су из својих природних станишта са планине Таре, Србија. Ови, као и друге врсте лишајева, вековима имају примену у народној медицини, а њихова лековита својства користе се и данас у различитим деловима света. Употреба лишајева у медицинске сврхе почиње у 3. и 4. веку пре нове ере. Фитомедицина веома рано указује на значај лишајева, а посебно се издваја неколико родова: *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physica*, *Rocella*, *Usnea* и *Xanthoria*. Врсте из ових родова коришћене су у лечењу упалних процеса у организму, гастринтестиналних поремећаја (дијареје и повраћања) кожных обољења и епилепсије. У 18. веку лишај *Pseudevernia furfuracea* употребљен је за лечење респираторних болести (Malhotra и сар., 2007).

Многобројним научним истраживањима је потврђено да је широки спектар секундарних метаболита одговоран за изражену терапеутску активност. Један од најзначајнијих и најиспитиванијих метаболита лишаја, уснинска киселина, данас се користи као изузетан антисептик са антибактеријским, антивиралним и антиканцерогеним ефектима (Malhotra и сар., 2007). Најновија истраживања показују да алкохолни екстракти лишајева показују атимикробно, антиканцерогено, антиоксидационо дејство (Mitrović и сар., 2014; Kosanić и сар., 2013; Kosanić и Ranković 2011; Mitrović и сар., 2011).

#### *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf

Талус овог лишаја је листаст или псеудо-жбунаст, величине до 10 cm, уздигнут или висећи, беличасто сиве до тамније сиве боје, са изидијама и дорзовентрално спљоштеним режњевима (Шема 16). Веома је чест у Европи, на местима где је ваздух чист може се наћи на кори дрвећа, силикатним стенама и оградама (Malhotra и сар., 2007). У хемијском саставу преовладава атраринска киселина (енгл. *atraric acid*) и диметил каперат (*trimethyl 2-hydroxyheptadecane1,2,3-tricarboxylate*) (Mitrović и сар., 2014). Алкохолни екстракти овог лишаја су показали антиоксидационо, антибактеријско, фунгицидно и антибиофилм дејство (Mitrović и сар., 2014; Nomura и сар., 2013). Цитотоксично дејство је показано на различитим канцерозним ћелијским

линијама: FemX (хумани меланом) и LS174 (хумани канцер колона) (Kosanić и сар., 2013). Такође литературни подаци показују да киселине изоловане из талуса лишаја *P. furfuracea* индукују апоптозу у L1210 ћелијама (Bézivin и сар., 2004).



**Шема 16.** Талус лишаја *Pseudoevernia furfuracea* (модификовано са <http://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=67680>)

### *Platismatia glauca*

Талус лишаја *Platismatia glauca* (L.) W.L.Culb. и C.F.Culb. је грмаст, причвршћен само средишњим делом за подлогу на којој расте, па на први поглед изгледа као листаст. Доња страна талуса је глатка, обично бела у средини, смеђа при рубовима док је горња страна смеђкасто-зелена до сива, с уздигнутим рубовима (**Шема 17**). Распрострањење овог лишаја је широко, у Европи, Северној Америци, а пренесена врста може се наћи и у Аустралији (Bilovitz и Mayrhofer, 2008). У хемијском саставу преовладава атраринска киселина, оливетол (*5-Pentyl-1,3-benzenediol*) и оливетонид, док су остала једињења као микроелементи заступљени у траговима (Mitrović и сар., 2014).



**Шема 17.** Талус лишаја *Platismatia glauca* (модификовано са [https://www.nahuby.sk/obrazok\\_detail.php?obrazok\\_id=348978](https://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=348978))

## ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

### *Хипотезе*

- ❖ Колоректални карцином представља другу најчешћу локализацију малигних тумора дигестивног тракта и на другом је месту по узроку смртности код људи, тако да су истраживања специфичних антиканцерогених биоактивних супстанци од суштинског значаја за терапију ове болести.
- ❖ Метастаза карцинома, као неповољан пут напретка туморске болести, генетски је регулисан процес и предмет истраживања бројних молекуларно-биолошких студија чији је циљ разумевање механизма миграције, инвазије и метастазе туморских ћелија, као и испитивање нових биоактивних супстанци са антимиграторним деловањем, што представља једну од стратегија у терапији карцинома.
- ❖ Реактивне врсте кисеоника и азота (ендогено синтетисане или генерисане биометаболизмом антиканцерогених супстанци након терапије) представљају базу регулације низа молекуларно-физиолошких функција у организму, али и патофизиолошких феномена, укључујући генезу и прогресију карцинома. Стога је неопходно боље познавање међузависности молекуларних механизма редокс статуса и сигналних путева који су укључени у миграцију ћелија карцинома колона.
- ❖ Комплекси платине(IV) имају ефикасније антитуморско деловање у односу на циспалтину, мање су токсични по организам и ефикаснији у третману резистентних тумора.
- ❖ Тестирани екстракти природних производа (гљиве и лишајеви) се користе у традиционалној медицини и њихови ефекти на миграцију ћелија колоректалног карцинома нису довољно испитани.
- ❖ Примена комбинованих третмана, природних биоактивних супстанца и стандардних хемиотерапеутика (цисплатина), као и новосинтетисаних комплекса платина(IV), кроз синергистичко антитуморско деловање (цитотоксични и антимиграторни ефекти), доприноси смањењу негативних ефекта хемиотерапеутика.

На основу наведених хипотеза, **циљ ове докторске дисертације** је да се испита потенцијално антиканцерогено деловање (цитотоксичност и антимиграторни потенцијал) новосинтетисаних комплекса платине(IV) и биоактивних супстанци из природних извора (екстракти лековитих гљива



и лишајева), са акцентом на молекуларне механизме и кључне протеине сигналних путева миграције, као и на параметре редокс статуса у ћелијама колоректалног карцинома.

### **Специфични циљеви**

- ❖ Тестирати антитуморске ефекте биоактивних супстанци, хемијски новосинтетисаних и екстрахованих из природних извора, на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116 и SW-480):
  - (а) Pt(IV) комплекси: [PtCl<sub>4</sub>(dbu-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс 1**, [PtCl<sub>4</sub>(dpe-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс 2**, одговарајући лиганди (**Лиганд 1** и **Лиганд 2**), као и Pt(II) комплекс – **цисплатина** (позитивна контрола);
  - (б) екстракти гљива (*Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*) и лишајева (*Platismatia glauca*, *Pseudoevernia furfuraceae*);
  - (в) **котретман** хемијским платинским комплексима са екстрактом *Phellinus linteus*, са акцентом на тип инетрације компоненти у котретману.
- ❖ Одредити цитотоксичност третмана МТТ тестом и тип ћелијске смрти акридин оранж/етидијум бромид микроскопском методом, на ћелијским линијама канцера, као и ћелијској линији здравих фибробласта (MRC-5).
- ❖ Испитати промене миграторног потенцијала HCT-116 и SW-480 ћелија, Transwell миграторним тестом.
- ❖ Испитати промене молекуларних механизма миграције ћелија канцера, дефинисањем локализације и квантификацијом кључних протеина сигналних путева миграције и међућелијске комуникације, помоћу имунофлуоресцентне микроскопске методе:
  - Е-кадхерин и цитоплазматски β-катенин, као маркери међућелијских веза
  - Frizzled-7 рецептор и нуклеарни β-катенин, као маркери Wnt сигналног пута
  - Н-кадхерин и виментин, као компоненте цитоскелета миграторних ћелија.
- ❖ Одредити концентрацију металопротеиназе 9, ензима укљученог у деградацију екстраћелијског матрикса, колориметријском методом (ELISA).
- ❖ Одредити промене параметара редокс статуса:
  - спектрофотометријско одређивање концентрације реактивних врста кисеоника (супероксид анион радикал) и азота (нитрити, као показатељи концентрације азот монооксида, NO), и антиоксидационог статуса (редуковани глутатион, GSH).

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу. Истраживања су реализована у оквиру научно-истраживачког пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС, ИИИ 41010) и међународног FP7 пројекта (*Centre for Preclinical Testing of Active Substances* - CPSTAS, GA206809).

У експерименту су коришћени следећи третмани:

### 1. Pt(IV) комплекси

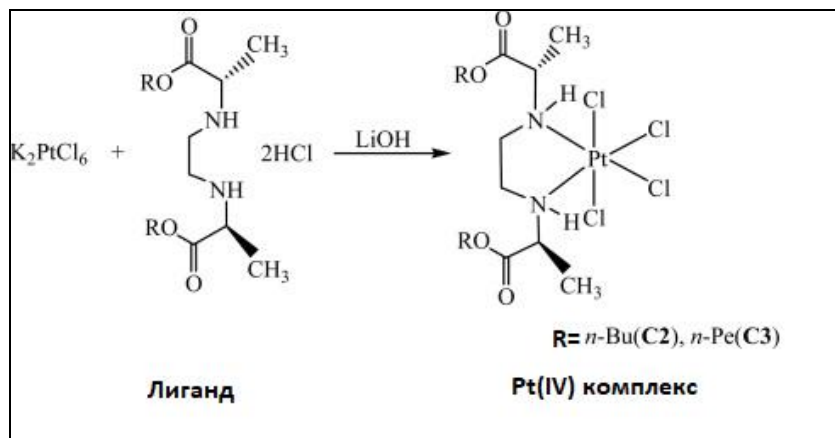
**а. Pt(IV) комплекс 1** -  $[PtCl_4(dbu-S,S-eddp)]$  = тетрахлоридо(*O,O'*-дибутил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноат) платина(IV)

**б. Лиганд 1** – *O,O'*-дибутил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноат дихидрохлорид трихидрат,

**в. Pt(IV) комплекс 2** -  $[PtCl_4(dpe-S,S-eddp)]$  = тетрахлоридо(*O,O'*-дипентил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноат) платина(IV)

**г. Лиганд 2** – *O,O'*-дипентил-*(S,S)*-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-пропаноат дихидрохлорид дихидрат

добијени у чврстом стању од Доц. др Верице Јевтић, Лабораторија за неорганску хемију, Института за хемију, ПМФ у Крагујевцу, где су и синтетисани према процедури коју су детаљно описали Stojković и сарадници (2014) (**Шема 18**).



**Шема 18.** Хемијска синтеза Pt(IV) комплекса (модификовано из Stojković и сар., 2014).

2. Метанолни екстракти гљива *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*. Комерцијални производи (плодоносно тело гљиве у сувом стању) наведених врста гљива као додаци исхрани су добијени од Medical Herbs, Нови Сад.
3. Метанолни, ацетонски и етилацетатни екстракти лишајева *Platismatia glauca*, *Pseudevernia furfuracea*. Талису изабраних врста лишајева су сакупљени од стране колега са Департмана за Биологију, ПМФ у Нишу, на локалитету Тара, Србија.

Екстракција биоактивних супстанци из природног материјала (гљиве и лишајеви) и припрема екстраката је урађена у Лабораторији за ботанику, Институт за биологију и екологију, ПМФ у Крагујевцу, према стандардној процедури (Šeklić и сар., 2016; Mitrović и сар., 2014).

## 1. Хемикалије и реагенси

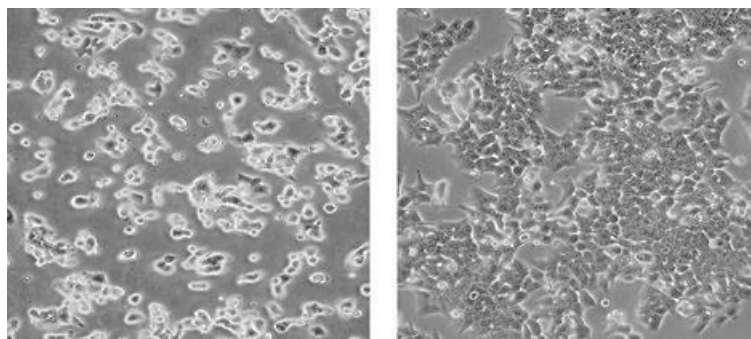
Коришћене хемикалије и реагенси набављени су од различитих произвођача. Метанол, етилацетат, ацетон, натријум нитрат ( $\text{NaNO}_3$ ) и натријум хидрогенкарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ ) су набављени од “Зорка фарма“ Шабац, Србија. *Cis*-диаминдихлоридоплатина(II) (цисплатина), 5,5'-дитио-*бис*(2-нитробензоева киселина) (DTNB), трипан плаво, сулфанил амид, сулфанилска киселина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), сумпорна киселина ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) и динатријум хидроген фосфат ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) од Sigma Chemicals CO., St Louis, MO, USA. Акридин оранж (АО) од Acros Organics, New Jersey, USA. Медијум за гајење ћелија (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), фетални говеђи серум (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 0.25% Трипсин-EDTA, нормални козји серум (*Normal gouth sera*, NGS), пеницилин и стрептомицин од GIPCO, Invitrogen, USA. Диметил-сулфоксид (DMSO), етидијум бромид (ЕБ), 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) и говеђи албумин из серума (*Bovine Serum Albumine*, BSA), *Tween 20*, кристал виолет, 2-(*N морфолиноетан сулфонска киселина*) (MES) од SERVA, Germany. Поливинил алкохол медијум, *N*-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид од Fluca Analytical, Switzerland. Параформалдехид од Merck, Germany. Сулфаниламид и сулфанилна киселина од МР Хемија, Србија. *Human MMP-9 DuoSet ELISACa.No. DY91, active I proforme MMP-9, R&D Systems*, Frizzled 7 примарно антителио и секундарно антителио NorthernLights™ NL557 од RD Systems, USA. Примарна антителиа за  $\beta$ -катенин (цитоплазматски и једарни) од Invitrogen Corporation, Camarillo, CA. *N*-кадхерин примарно антителио набављено је од Abcam, Cambridge, UK, док је Е-кадхерин примарно антителио набављено од BD Systems, UK. Примарно антителио за виментин од Dako,



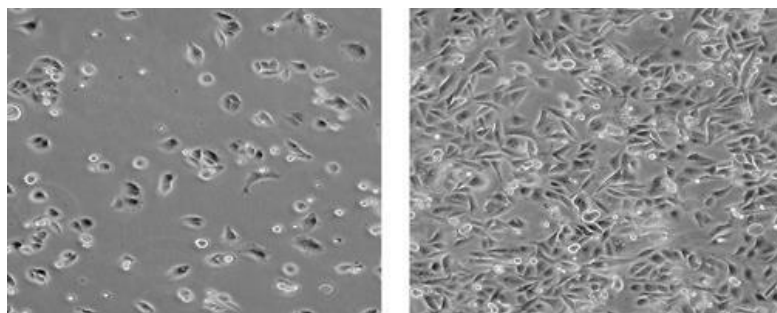
Glostrup, Denmark. Секундарно антитело коњуговано са Cy3 или Alexa 448, DAPI (*Diamidino-2-phenylindole*) боја за детекцију једара од Thermo Scientific, USA.

## 2. Ћелијске линије као модел систем

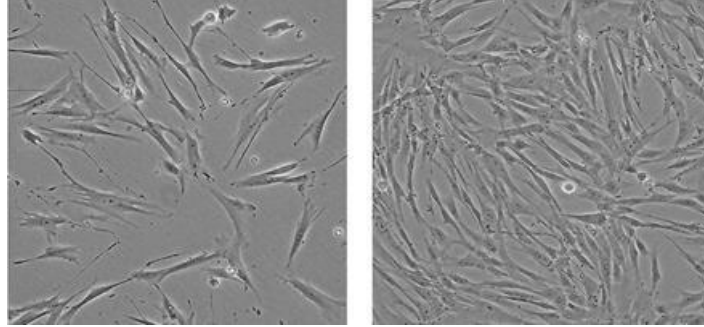
У дисертацији, као екпериментални модел систем коришћене су две имортализоване адхерентне ћелијске линије колоректалног карцинома, HCT-116 и SW-480, као и MRC-5 ћелијска линија здравих феталних фибробласта плућа (**Шема 19, 20 и 21**). Све три ћелијске линије су култивисане у DMEM медијуму, на 37 °C, са 5% CO<sub>2</sub>.



**Шема 19.** Морфолошки изглед HCT-116 ћелија на електронском микроскопу (преузето са: *American Type Culture Collection - ATCC*; <https://www.lgcstandards-atcc.org>)



**Шема 20.** Морфолошки изглед SW-480 ћелија на електронском микроскопу (преузето са: *American Type Culture Collection - ATCC*; <http://www.lgcstandards-atcc.org>)



**Шема 21.** Морфолошки изглед MRC-5 ћелија на електронском микроскопу микроскопу (преузето са: *American Type Culture Collection - ATCC*; <https://www.lgcstandards-atcc.org>)

Ћелијске линије колоректалног карцинома су добијене љубазнишћу др Данијеле Вигњевих, Институт Кири, Париз, док су фибробласти коже добијени од др Милице Пешић, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић”, Београд. Све три линије су набављене из "банке ћелија" *American Type Culture Collection*, ATCC.

Поступак гајења ћелија у култури подразумева раст ћелија у контролисаним условима, најсличнијим условима средине из које су ћелије изоловане. Ћелије за свој раст и размножавање захтевају одговарајуће услове: температуру, влажност ваздуха, одређену рН и концентрацију CO<sub>2</sub>.

Рад са ћелијским линијама изводи се у стерилним условима, у ламинарној комори, у циљу њиховог успешног одгајања и спречавања контаминација.

Ћелије су гајене у стерилним фласковима (Т-25 и Т-75 cm<sup>3</sup>) у хранљивом DMEM медијуму, обогаћеним са 10% FBS-а уз додаток антибиотика (100 IU/ml пеницилин, 100 µg/ml стрептомицин) на 37 °C, и 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору.

## 2.1. Култивација ћелијских линија

Криотубе са залеђеним ћелијама су чуване у контејнеру са течним азотом (Spectrum Series 20), на -196 °C. За потребе експеримената из криотубе је одлеђена суспензија ћелија и ресуспендована у 5 ml медијума. Суспензија ћелија је центрифугирана 10 минута на 1200 обртаја/минуто. Медијум је аспиран, а талог ћелија је ресуспендован у 5 ml медијума и ћелије су засејане у фласк од 25 cm<sup>3</sup>. Наредног дана је замењен медијум (Mazur, 1970).

НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелије су адхерентне ћелијске линије, и када постигну конfluентност од 80-90%, потребно их је пасажирати процесом који представља пребацивање мањег броја ћелија у други фласк, са новим хранљивим медијумом (Freshney, 1983). Да би се ћелије пасажирале потребно је да се раскину везе са подлогом као и међућелијске везе, процесом

трипсинизације који подразумева: одстрањивање медијума из флашка, испирање ћелија са 1 ml 0.25% трипсина, додавање 1 ml 0.25% трипсина на флашк Т-25. Након неколико минута ћелије ће се одлепити и биће фино дисперговане. Процес трипсинизације се прекида додатком медијума за гајење ћелија, чиме се постиже разређивање ћелија и неутрализација трипсина. Преношењем мање запремине ћелија у нови флашк и додатком свежег храхљивог медијума ћелије се одржавају у култури.

Ћелијска вијабилност је процењивана на основу бојења трипан плавим. Трипан плаво је боја која улази у цитоплазму ћелија са оштећеном мембраном и отуда се мртве ћелије виде под микроскопом као плаво обојене, док живе ћелије остају необојене. Ћелијска суспензија је мешана са бојом у односу 1:1 и наливана на коморицу за бројање ћелија (хемоцитометар). Ћелије су бројане у 2 велика дијагонална квадрата, површине  $0.0003 \text{ mm}^2$ , на хемоцитометру под светлосним инвертним микроскопом на увећању 10x. Средња вредност броја ћелија из два квадрата се користила за прерачун одређивања броја ћелија у mL суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе.

Број ћелија по милилитру = средња вредност броја ћелија из оба квадрата x разблажење x  $10^4$  (корекциони фактор - дубина коморе и запремина у mL)

Вијабилност ћелија је израчуната према следећој формули:

Број живих ћелија/укупан број ћелија (живе и неживе) x 100 = % живих ћелија.

Вијабилност ћелија коришћених у експериментима је била већа од 90%.

## 2.2. Третмани

У појединачним третманима ћелија коришћени су:

1. Pt(IV) комплекси: Pt(IV) комплекс 1, Лиганд 1, Pt(IV) комплекс 2, Лиганд 2
2. Pt(II) комплекс – цисплатина, као позитивна контрола
3. Метанолни екстракти гљива *P. linteus*, *C. sinensis*, *L. edodes*, *C. comatus*, *G. lucidum*
4. Метанолни, ацетонски и етилацетатни екстракти лишајева *P. glauca* и *P. furfuraceae*.

У комбинованим третманима коришћени су метанолни екстракти гљиве *P. linteus* у комбинацији са ниским дозама испитиваних хемијска једињења.

Испитивана хемијска једињења (платина(IV) комплекси, лиганди и цисплатина) су првобитно растварана у малој запремини концентрованог диметил-сулфооксида, а након тога разблаживани са медијумом за гајење ћелија у одговарајућој запремини, тако да је почетна концентрација раствора (шток) била 100 mM. Концентрација диметил-сулфооксида у највишој коришћеној концентрацији у третману је 0,5%, што представља нецитотоксичну концентрацију диметил-сулфооксида за

коришћене ћелијске линије (Hostanska и сар., 2007). Шток је стерилисан филтрацијом кроз филтер са порама 0,2  $\mu\text{m}$ . Добијени стерилани раствори разблажени су стерилним хранљивим медијумом за гајење ћелија до одговарајућих концентрација коришћених у различитим есејима.

Екстракти гљива и лишајева су растварани идентично растворима тестираних хемијских једињења, а почетна (шток) концентрација је била 1 mg/mL. Шток је стерилисан филтрацијом како је предходно описано а добијени стерилни раствори су такође разблажени стерилним хранљивим медијумом до одговарајућих концентрација коришћених у различитим есејима.

У зависности од есеја, тестиране ћелијске линије су инкубиране са третманима 24 и 72 сата, или само 24 сата, и након тог временског периода су одређивани специфични параметри (описано у даљем тексту).

### **2.2.1. Појединачни третмани и преинкубација ћелија**

За одређивање цитотоксичности (МТТ тест), НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелије су засејаване у микротитар плоче са 96 отвора ( $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације на 37 °C, ћелије су третиране са 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних хемијских једињења (1, 10, 25, 50, 100 и 500  $\mu\text{M}$ ), метанолног екстракта гљива, и метанолног, ацетонског и етилацетатног екстракта лишајева (1, 10, 50, 100, 250 и 500  $\mu\text{g/mL}$ ). Нетретираним (контролним) ћелијама је замењен медијум.

За одређивање типа ћелијске смрти (АО/ЕБ микроскопска метода), НСТ-116 и SW-480 ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 отвора ( $2 \times 10^4$  ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације у инкубатору, ћелије су третиране са 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних хемијских једињења (10  $\mu\text{M}$ ), екстракта *P. linteus* (10, 25, 50 и 250  $\mu\text{g/mL}$ ) и екстракта лишајева (10 и 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Нетретираним (контролним) ћелијама је замењен медијум.

За одређивање миграторног потенцијала Transwell методом, НСТ-116 и SW-480 ћелије су ресуспендоване у 500  $\mu\text{L}$  медујума без серума са испитиваним хемијским једињењима (10 и 50  $\mu\text{M}$ ), или екстраката гљива и лишајева (10 и 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

За одређивање протеинске експресије микроскопском имунофлуоресцентном методом, НСТ-116 и SW-480 ћелије су засејане на покровно стакло у микротитар плочи са 6 отвора ( $5 \times 10^4$  ћелија по бунарићу).

За одређивање концентрације MMP- 9, НСТ-116 и SW-480 ћелије су засејане у микротитар плоче са 6 отвора ( $1 \times 10^6$  ћелија по бунарићу) и третиране са 2 mL раствора испитиваних хемијских једињења (10 и 50  $\mu\text{M}$ ) и екстраката гљива и лишајева (10 и 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

За одређивање концентрације  $\text{O}_2^-$  (NBT тест), концентрације нитрита (метода по Griess-у) и концентрације GSH, НСТ-116 и SW-480 ћелије су засејаване у микротитар плоче са 96 отвора

( $1 \times 10^4$  ћелија по бунарићу за NBT и Griess методу, а  $5 \times 10^5$  ћелија по бунарићу за одређивање GSH). Ћелије су третиране хемијским једињењима (0.1, 10, 50 и 250  $\mu\text{M}$ ) и екстрактима гљива и лишајева (10, 50, 100 и 250  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 2.2.2. Комбиновани третмани и преинкубација ћелија

За испитивање потенцијалних синергистичких ефеката испитиваних супстанци, ћелије су третиране комбинованим третманима. Комбиновани третмани су извођени на два начина:

- а) одговарајуће концентрације одабране врсте гљиве (*P. linteus*) и хемијских једињења додавани су симултано – **КТ-0h** (МТТ тест, АО/ЕБ тест, Transwell метода, протеинска експресија методом имунофлуоресценце, концентрација металопротеиназе 9, параметри редокс статуса),
- б) екстракт *P. linteus* је аплициран 6 сати пре третмана хемијским једињењем – **КТ-6h** (МТТ тест, АО/ЕБ тест, параметри редокс статуса).

За испитивање потенцијалних синергистичких цитотоксичних ефеката, одређивање типа ћелијске смрти и концентрације параметара редокс статуса, НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелије су третиране екстрактом *P. linteus* у финалним концентрацијама од 10, 25, 50 и 250  $\mu\text{g/mL}$  и хемијским једињењима у финалној концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ .  $\text{IC}_{50}$  вредности израчунате су у односу на концентрације екстракта *P. linteus*.

За одређивање миграторног потенцијала, протеинске експресије имунофлуоресцентном микроскопском методом и концентрације металопротеиназе 9, НСТ-116 и SW-480 ћелије су третиране екстрактом *P. linteus* у финалним концентрацијама од 10 и 50  $\mu\text{g/mL}$  и хемијским једињењима у финалној концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ .

## 3. Испитивање цитотоксичности и типа ћелијске смрти

### 3.1. МТТ тест за вијабилност ћелија

За одређивање вијабилности ћелија и процену цитотоксичности третмана коришћена је колориметријска метода, МТТ тест (Mosmann, 1983). МТТ је жуто обојена тетразолијумова со, која се у живим ћелијама под дејством митохондријаних редуктаза редукује у љубичасто обојен формазан. Интензитет боје се може квантификовати мерењем на спектрофотометру на одређеној таласној дужини. По завршетку третмана у контролне (нетретиране) и третиране ћелије је додаван раствор МТТ-а (5  $\text{mg/mL}$ ) у запремини од 25  $\mu\text{L}$  и 100  $\mu\text{L}$  свежег медијума. Након инкубације од 2 сата на 37 °C, раствор МТТ је аспириран и формазан је растваран у 150  $\mu\text{L}$  DMSO-а. Апсорбанца је мерена на 550 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C). Бунарићи у којима је био само медијум без ћелија, касније аспириран и додат DMSO, служили су као слепа проба ("blank").

Добијене вредности апсорбанци су пропорционалне интензитету ћелијске респирације, односно броју вијабилних ћелија. Процент вијабилних ћелија је израчунаван као однос апсорбанци третираних ћелија и апсорбанце контролних ћелија, помножен са 100.

На основу добијених вредности за проценат вијабилних ћелија у третману, у односу на контролне, нетретиране ћелије процењује се цитотоксичност третмана. Инхибиторне дозе третмана које убијају половину од иницијалног укупног броја ћелија,  $IC_{50}$  вредности су израчунате су на основу крива дозне зависности коришћењем софтвера (CalcuSyn, BIOSOFT, Cambridge, UK).

### **3.2. Акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода**

За одређивање типа ћелијске смрти коришћена је АО/ЕБ микроскопска метода (Baskić и сар., 2006). Акридин оранж (АО) је боја која улази у живе и мртве ћелије емитујући зелену флуоресценцу када се веже за двоструке ланце нуклеинских киселина (DNK) или црвену флуоресценцу ако се веже за једноланчану нуклеинску киселину (RNK). Етидијум бромид (ЕБ) улази само у мртве ћелије и емитује црвену флуоресценцу везивањем за DNK. Разликују се четири типа ћелија у зависности од флуоресцентне боје и морфолошког аспекта (кондензације хроматина у обојеним нуклеусима). (а) Живе ћелије су једнолично зелено обојене. (б) Ћелије у раној апоптози (још увек имају неразграђену нуклеусну мембрану, али је започето цепање DNK) имају зелене нуклеусе, али долази до кондензације и фрагментације хроматина, па се под микроскопом уочавају зелени фрагменти у једру. (в) Ћелије у касној апоптози имају наранцасто или црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином. (г) Некротске ћелије су кондензоване и униформно црвене боје.

Након истека времена инкубације, у бунариће са третираним и контролним ћелијама додати су АО и ЕБ у концентрацији 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  у дестилованој води. Раствори су додавани у односу 1:1. Одмах након додавања АО/ЕБ, ћелије су посматране и бројане под флуоресцентним микроскопом (Ti-Eclipse, Nikon), на увећању 400x. Бројано је најмање 300 ћелија по бунарићу. Број живих ћелија, ћелија у апоптози (раној и касној) и у некрози, изражен је у процентима, у односу на укупан број избројаних ћелија.

## **4. Испитивање молекуларних механизма миграције ћелија**

### **4.1. Испитивање миграторног потенцијала ћелија**

За испитивање миграторног потенцијала ћелија - 2D, коришћена је Transwell метода (Chen, 2005). Принцип методе заснива се на мерењу покретљивост ћелија засејаних на мембрани са порам у присуству и одсуству атрактанта, у овом случају 10% FBS. Пролазост ћелија праћена је у

присуству и одсуству третмана. Transwell плоча се састоји од плоче са 24 места (бунарића) и 24 коморица које на свом дну имају мембрану са порама величине 8  $\mu\text{m}$  на које се засејавају ћелије (24 well ThinCert™, Greiner Bio-One). HCT-116 и SW-480 ћелије коришћене у експерименту су култивисане у DMEM медијуму са 10% FBS а затим су у фласку испране два пута PBS-ом, и дидат је DMEM медијуму без серума. Након 24 сата ћелије су трипсинизирани, а затим центрифугиране 3 min на 800 обртаја/минути. Након центрифугирања ћелије су пребројане и  $1 \times 10^5$  ћелија је ресуспендовано у 500 mL DMEM медијума без серума са различитим третманима. Контроле ћелије су засејане у DMEM медијуму без серума. Овако припремљена ћелијска суспензија у третману је засејана у коморице са мембранским дном, док је у плочу са бунарићима, у све бунариће додат DMEM медијум са 10% FBS-а. Плоче су инкубирани 24 h на 37 °C у инкубатору. После истека инкубације, ћелије на мембранама су испране PBS-ом и фиксиране 4% параформалдехидом, 20 минута на собној температури. После поновног испирања PBS-ом, ћелије које нису мигрирале су одстрањене са унутрашње стране мембране помоћу памучног штапића за уши. Затим је у бунариће додат 0.1% кристал виолет у 200 mM MES пуферу, pH = 6,0, како би се обојиле преостале ћелије на мембрани. Плоче су инкубирани 10 минута, а затим су мембране исечене уз помоћ скалпела и пренете у плочу са 96 бунарића. Додавањем 100  $\mu\text{L}$  10% сирћетне киселине мембране су одбојене, а апсорбанца је мерена на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 450 nm. Добијена апсорбанца представља миграторни потенцијал ћелија и изражен је као оптичка густина (OD). Резултати су приказани и у односу на проценат вијабилних ћелија у присуству одговарајућих концентрација третмана.

#### **4.2. Имунофлуоресцентна микроскопска метода за локализацију и квантификацију протеина**

За одређивање експресије протеина коришћена је техника имунофлуоресценце. Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских делова флуоресцентним бојама. Специфичност реакције антиген-антитело омогућава да се овом методом тачно и прецизно прати, како присуство и локализација, тако и дистрибуција одређеног протеина у ћелији или ткиву. Ова техника омогућава посматрање и локализацију појединачних протеина, као и комплетних ћелијских структура. Секундарно антитело као индикаторни молекул је обележено флуоресцентном бојом која на одређеној таласној дужини емитује светлост. Детекција се врши флуоресцентним микроскопом. Метода је описана у Higuchi и сар. (2001).

Ћелије су после истека инкубације са третманом (24 сата) фиксиране за покровну плочицу 4% параформалдехидом у PBS, и инкубирани 20 минута на собној температури. После испирања у PBS, ћелије су пермеабелизоване хладним метанолом (-20 °C) или различитим концентрацијама

Triton X100 у PBS. Поступак пермеабилитације зависи од локације протеина у ћелији. После испирања у PBS следи поступак блокирања антигена 1% BSA у PBS у трајању од 30 минута. Овај поступак је за све испитиване протеине исти. После блокирања, додаје се раствор примарног антитета у концентracији према добијеном упутству. У петри кутију се ставља парче парафилма а затим се дезинфикује 75% алкохолем. На парафилм се наноси кап (60  $\mu\text{L}$ ) раствора примарног антитета у PBS, на кап се поставља покривна плочица тако да страна на којој су ћелије буде окренута ка парафилму. Након инкубације 1 сат са примарним антителима, покривне плочице се испирају три пута по 15 минута PBS-ом, а иста процедура се поновља за инкубацију са секундарним антителима конјугованим са одређеном флуорофором. Додавањем секундарног антитета постиже се визуелизација маркираног протеина. За визуелизацију једара коришћена је DAPI плава боја, у разблажењу 1:1000 уз раствор секундарног антитета. После инкубације 1 сат са секундарним антителима, покривне плочице су испране три пута по 15 минута PBS-ом и залепљене на предметно стакло уз помоћ поливинил алкохол медијума. Препарати су остављени преко ноћи да се осуше а затим посматрани под флуоресцентним микроскопом (Nikon Ti-Eclipse), на филтерима одређених таласних дужина и увеличању 600x.

#### **4.2.1. Одређивање протеинске експресије Frizzled-7 рецептора**

Одређивање протеинске експресије Frizzled-7 рецептора вршено је имунофлуоресцентном методом (Ye и сар., 2013). После поступка фиксације, који је предходно објашњен, ћелије су пермеабилитоване 2 минута хладним метанолом ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), а затим је извршено блокирање антигена како је предходно објашњено. Ћелије су инкубирани са раствором примарног антитета, анти-Frizzled-7 у PBS концентрације 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , а затим са секундарним антителима конјугованим са NorthernLights™ NL557, у разблажењу 1:100 у PBS.

#### **4.2.2. Одређивање протеинске експресије нуклеарног и цитоплазматског $\beta$ -катенина**

Одређивање протеинске експресије нуклеарног и цитоплазматског  $\beta$ -катенина вршено је имунофлуоресцентном методом (Song и сар., 2011). После фиксације, ћелије су пермеабилитоване 3 минута 0,25% Triton X100 раствором у PBS-у, а затим је извршено блокирање антигена како је предходно објашњено. Ћелије су затим инкубирани сат времена са раствором примарног антитета анти- $\beta$ -катенин (нуклеарни или цитоплазматски) у PBS-у концентрације 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Након инкубације са примарним антителима и испирања (предходно објашњено) иста процедура је поновљена за инкубацију са секундарним антителима. За маркирање цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина коришћено је секундарно антителима конјуговано са Cy3, разблажено у PBS у односу



1:200, док је за маркирање нуклераног  $\beta$ -катенина коришћено секундарно антитело конјуговано са Alexa 488 и разблажено у PBS у односу 1:200.

#### **4.2.3. Одређивање протеинске експресије Е- и Н-кадхерина**

Протеинска експресија Е- и Н-кадхерина одређивана је имунофлуоресцентном методом (Phillips и сар. 2014). После фиксације, ћелије су пермеабелизоване 2 минута 0,1% Triton X100 раствором у PBS, а затим испране и блокиране како је претходно објашњено. Затим су ћелије инкубирани са раствором примарног антитела анти-Е-кадхерин или анти-Н-кадхерин у PBS концентрације 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . За маркирање Е-кадхерина коришћено је секундарно антитело конјуговано са Alexa 488, док је за маркирање Н кадхерина коришћено секундарно антитело конјуговано са Cy3 флуорофором разблажено у PBS у односу 1:200.

#### **4.2.4. Одређивање протеинске експресије виментина**

Протеинска експресија виментина одређивана је имунофлуоресцентном методом (Yu и сар. 2014). Ћелије су фиксирани како је претходно објашњено у параформалдехиду, пермеабелизоване 15 минута 0,1% Triton X100 у PBS, а затим испране и блокиране. Овако фиксирани ћелије су инкубирани са раствором примарног антитела анти-виментин у PBS у односу 1:200. За маркирање виментина коришћено је секундарно антитело конјуговано са Cy3 флуорофором разблажено у PBS у односу 1:200.

### **4.3. Одређивање концентрације металопротеиназе 9**

Укупна концентрација металопротеиназе 9 (MMP-9) у третираним и контролним ћелијама је мерена ензимском, имунолошком методом, ELISA (енгл. *Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) према приложеном протоколу (*Human MMP-9 DuoSet ELISACa.No. DY91, active I proforme MMP-9, R&D Systems*). Квантификација је вршена колориметријски, а интензитет боје је директно пропорционалан концентрацији MMP-9. Метода се заснива на мерењу укупне (активне и проензимске форме) MMP-9, ензима одговорних за разградњу екстрацелуларног матрикса (Коерке и сар., 2015). Абсорбанца је мерена на 450 nm на ELISA читачу. Концентрација је прерачуната на основу концентрација MMP-9 из стандардне криве.

НСТ-116 и SW-480 ћелије су гајене и третиране како је претходно описано у поглављу *Третмани*. Након истека инкубације у трајању од 24 сата, медијум са третманима, као и медијум из контролних (нетретираних) ћелија је сакупљен у стерилне епувете, центрифугиран 10 минута на

1200 обртаја/минути како би се одстраниле партикуле из супернатанта, а супернатант је сачуван и даље коришћен као узорак за есеј MMP-9.

На микротитар плочу са 96 бунарића наливено је 100  $\mu\text{L}$  раствора *Capture Antibody* (примарно антитело за MMP-9) у PBS, а затим је плоча инкубира преко ноћи на собној температури. Након истека инкубације, плоча је испрана 3 пута пуфером за испирање (*Wash buffer*) у сваки бунарић је додато 300  $\mu\text{L}$  1% BSA (*Reagent Diluent*). Плоча је инкубирана 60 минута на 37 °C. По завршеној инкубацији, сви бунарићи су аспирирани и додато је по 100  $\mu\text{L}$  узорка. За конструисање стандардне криве, у бунариће је додато по 100  $\mu\text{L}$  раствора познате концентрације MMP-9 (31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 и 2000  $\text{pg/mL}$ ). Плоча је инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације сви бунарићи су аспирирани и у сваки бунарић је додато по 100  $\mu\text{L}$  секундарног антитела за MMP-9 (*Detection Antibody*). Плоча је инкубирана 2 сата на собној температури. Након истека инкубације аспирирано је секундарно антитело, а затим је додато по 100  $\mu\text{L}$  *Streptavidin-HRP*. Овај протеин је створио комплекс стрептавидин-биотин који је отпоран на третирање органским растварачима. После истека инкубације од 20 минута на собној температури, у сваки бунарић је додато 100  $\mu\text{L}$  *Substrat Solution* ( $\text{H}_2\text{O}_2$  : Тетраметилбензидин = 1 : 1), а плоча је поново инкубирана 20 минута у мраку. Након истека инкубације додато је по 50  $\mu\text{L}$  2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (*Stop Solution*). Овај раствор је зауставио процес и фиксирао детектовану MMP-9. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу на 450 nm, према упутствима *R&Dsystem (Human MMP-9 DuoSet ELISA)*.

$$\text{nmol MMP-9/mL} = A/F$$

F-фактор добијен из стандардне криве

## 5. Испитивање параметара редокс статуса

### 5.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (NBT есеј)

Концентрација супероксид анјон радикала ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) је одређивана спектрофотометријски, NBT тестом (Auclair и Voisin, 1985). Метода се заснива на редукцији нитроblue-тетразолијума (NBT) до нитроblue-формаза у присуству  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . NBT тест се користи као мера стварања  $\text{O}_2^{\cdot-}$  у хемијским и биолошким системима. Потенцијал ћелија да стварају реактивне врсте кисеоника може се одредити мерењем редукције NBT. Оксидована форма NBT је жута, а редукован формазан је плава до сиво-црна. У контролне и третиране ћелије је, по завршетку инкубације ћелија са третманима, додаван раствор NBT (5  $\text{mg/mL}$ ) у запремини од 10  $\mu\text{L}$ . Након инкубације од 45 минута на 37 °C, додато је 10  $\mu\text{L}$  DMSO и бојена реакција је читавана на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 550 nm. Добијене вредности апсорбанци су коришћене у даљем прерачуну да би се

добила концентрација  $O_2^-$  изражена у  $nmol/mL$ . Вредности апсорбанци третираних и контролних ћелија су дељене са моларним екстинкционим коефицијентом за моноформазан ( $15,000 M^{-1} cm^{-1}$ ).

$$nmol\ NBT/mL = A/0.015 \times V_{cuv} / V_{ex}$$

A - апсорбанца;  $V_{cuv}$  - укупна запремина раствора у бунарићу = 120  $\mu L$ ;  $V_{ex}$  - запремина ћелија са третманом = 100  $\mu L$ .

## 5.2. Одређивање концентрације нитрита по Griess-у

Грисова реакција представља спектрофотометријско одређивање нитрита,  $NO_2^-$  (индикатора нивоа азот монооксида, NO). Овај тест се базира на диазотизационој реакцији, коју је првобитно описао Griess (1879). Сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, реагују са нитритима, дајући стабилно азотно једињење, пурпурне боје. Концентрација нитрита је директно пропорционална пурпурној боји чији се интензитет мери на ELISA читачу, на таласној дужини од 550 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је, по завршетку инкубације ћелија са третманима, центрифугирана 10 минута на 300 rpm, како би се одстраниле партикуле из супернатанта. У бунариће је додато 50  $\mu L$  супернатанта. У бунариће за стандардну криву, додата је серија разблажења  $NaNO_2$  концентрација 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 и 1.56  $\mu M$ . Уз помоћ вишеканалне пипете, додато је 50  $\mu L$  сулфаниламидног реагенса у све бунариће, као и у бунариће са нитритним стандардом за стандардну криву. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Након тога је додато по 50  $\mu L$  N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса у све бунариће. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла, а вредност апсорбанце је очитана на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 550 nm. Концентрација нитрита се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве за нитрите и изражава се у  $nmol/mL$ .

$$nmol\ NO_2^-/mL = A/F \times R$$

R – разблажење, F - фактор добијен из стандардне криве

## 5.3. Одређивање концентрације редукованог глутатиона

Концентрација редукованог глутатиона (GSH) у ћелијама је мерена спектрофотометријском методом (Вакер и сар., 1990). Метода се заснива на оксидацији редуковане форме глутатиона помоћу сулфидног реагенса 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB), чији се интензитет боје мери на ELISA читачу, на 405 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је, по завршетку времена инкубације ћелија са третманом, центрифугирана 10 минута на 1000 rpm. Медијум из свих бунарића је аспириран и додато је 100  $\mu L$  2.5% сулфосалицилне киселине.

Микротитар плоча је инкубирана 15 минута на леду и након тога центрифугирана 15 минута на 1000 rpm. На другу микротитар плочу је одпипетирано 50  $\mu$ L супернатанта и додато 100  $\mu$ l реакционе смеше, која је припремљена непосредно пре почетка рада. Реакциона смеша представља 1 mM DTNB, растворен у DMSO и допуњен фосфатним пуфером до потребне запремине. Микротитар плоча је инкубирана 5 минута на собној температури и након тога је апсорбанца прочитана на 405 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C). Концентрација GSH се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH, а изражава се у nmol/mL.

$$\text{nmol GSH/mL} = A/F$$

F - фактор добијен из стандардне криве

## 6. Статистичка обрада резултата

Сви експерименти су рађени у трипликату, а добијени резултати представљају средњу вредност из три независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су обрађени у SPSS (Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата (SPSS for Windows, ver. 17, 2008). Коришћена је ANOVA тест за поређење добијених резултата, при чему је  $p < 0.05$  сматрана статистички значајном разликом.

### 6.1. Израчунавање цитотоксичности третмана - IC<sub>50</sub> вредности

IC<sub>50</sub> вредности, концентрација која убија 50% ћелија, су прерачунате из дозно зависних крива добијених у компјутерском програму CalcuSyn, BIOSOFT, Cambridge, UK.

### 6.2. Израчунавање интеракције ефеката биоактивних супстанци у комбинованим третманима на основу МТТ теста

Потенцијале интеракције биоактивних супстанци у комбинованим третманима у односу на вијабилност, односно цитотоксичност, испитане су према Meyer и сар. (1998). Синергистички, адитивни или антагонистички ефекти у комбинованим третманима метанолног екстракта гљиве *P. linteus* и тестираних хемијских једињења су добијени поређењем ефеката котретманима (вредности МТТ теста вијабилности) са збирним ефектима добијеним у појединачним третманима (вредности МТТ теста вијабилност)

**инхибиција ћелијског раста (<sup>a</sup>)** = % невијабилних ћелија (100 – % вијабилних ћелија) у појединачним и котретманима за дату концентрацију (према МТТ тесту)

**очекивана цитотоксичност ( $f$ )** = збирна вредност % невијабилних ћелија у појединачним третманима који су додавани у котретману (према МТТ тесту) тј. ( $f^a$  екстракт) + ( $f^b$  хемијско једињење).

Тип реакције за сваку испитивану концентрацију котретмана су прерачунавани на основу формуле:

**СИ индекс ( $f$ )** = инхибиција ћелијског раста за дату концентрацију комбинованог третмана / очекивана цитотоксичност за дату концентрацију комбинованог третмана

**Тип интеракције ( $v$ )** - вредности СИ индекса  $> 1$  указују на синергизам, вредности 0.5-1 указују на адитиван ефекат, а вредности  $< 0.5$  указују на антагонизам.

### **6.3. Обрада резултата за миграторни потенцијал и параметре редокс статуса у односу на број вијабилних ћелија**

Број вијабилних ћелија у третманима је непосредно одређен МТТ тестом и ове вредности су коришћене за изражавање вредности миграторног потенцијала, концентрација ММР-9 и параметара редокс статуса у односу на број вијабилних ћелија. Прорачун се врши по следећој формули:  $C_x = C_{izr} / f$

$C_x$  – вредност параметра у односу на број ћелија;  $C_{izr}$  – оптичка густина или концентрација у целом бунарићу;

$f$  – фактор,  $f = \%_{\text{вијабилности}} / 100$

### **6.4. Квантификација протеинске експресије добијене имунофлуоресценцом помоћу ImageJ софтвера**

Препарати добијени у поступку маркирања протеина имунофлуоресценцом фотографисани су коришћењем *NIS elements* програмског пакета и начињено је најмање 30 микрографија по сваком третману. На свакој микрографији анализирано је најмање 6 ћелија уз помоћ ImageJ програмског пакета ради добијања података о квантификацији флуоресценце (Schneider и сар., 2012), а резултати су представљени као релативна флуоресценца по ћелији.

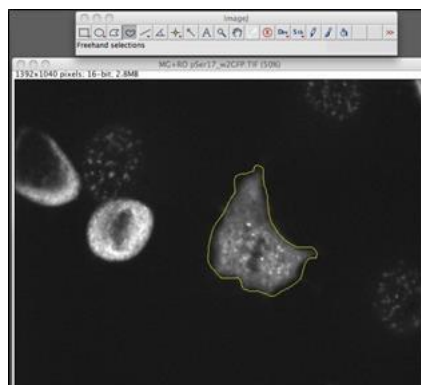
ImageJ је слободно доступан софтвер за анализу слика написан у програмском језику "Java" чији је аутор Вејн Ресбанд (Wayne Rasband) са Националног Института здравља Сједињених Америчких Држава из Bethesda, Maryland (Wayne Rasband, ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Уз помоћ програма ImageJ могу се приказати, уређивати, анализирати, обрађивати, меморисати и штампати фотографије различитих формата (TIFF, JPEG, GIF, и др). Програм ImageJ подржава стандардне функције обраде слике, али обезбеђује и одређивање разних морфометријских

показатеља објекта, као што су површина, обим, фактор облика, и слично. Може мерити удаљености и углове, дакле даје тополошке односе између означених објеката.

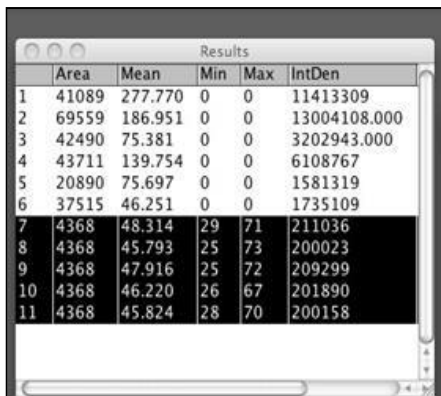
Припрема микрографија за анализу путем Image J програмског пакета се састоји у превођењу колор слике добијене на микроскопу у црно беле, одабиром опције IMAGE из главног менија а затим из падајућег подменија опцију COLOR. Одабиром опције SPLIT CHANNEL из подменија COLOR, добијају се три црно беле слике, које представљају првобитну микрографију подељену на боје-канале (црвени, зелени и плави). Чувањем слике која означава канал (боју) од интереса у TIFТ формату омогућава се рад са датом сликом појединачно. Да би се добили одговарајући подаци за квантификацију, потребно је из главног менија одабрати опцију ANALYZE а затим SET MEASUREMENTS, и селектовати поља AREA, INTEGRATED DENSITY и MEAN GRAY VALUE, како је приказано на **Шеми 22а**. Коришћењем алата из DRAWING/SELECTION TOOLS менија селектовати ћелију, како је приказано на **Шеми 22б**. Бирањем опције MEASURE из ANALYZE менија добијају се вредности за маркирану ћелију (**Шема 22в**). Поступак маркирања ћелија и мерења поновити на свим ћелијама од интереса. Мерење интензитета флуоресценце *background* врши се селектовањем региона без флуоресценце (црна позадина) (**Шема 22г**) коришћењем алата из DRAWING/SELECTION TOOLS менија, а затим одабиром опције MEASURE из ANALYZE менија. Поступак поновити најмање 4 пута на свакој микрографији.



**Шема 22а.** Подешавање опције ANALYZE

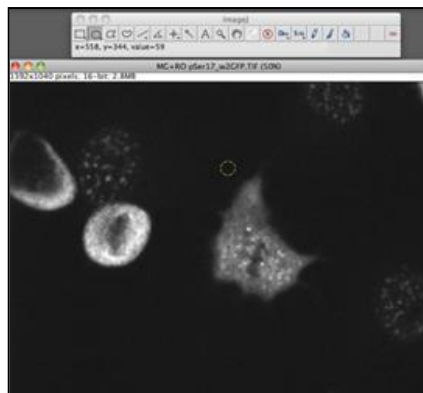


**Шема 22б.** Маркирање ћелије од интереса



	Area	Mean	Min	Max	IntDen
1	41089	277.770	0	0	11413309
2	69559	186.951	0	0	13004108.000
3	42490	75.381	0	0	3202943.000
4	43711	139.754	0	0	6108767
5	20890	75.697	0	0	1581319
6	37515	46.251	0	0	1735109
7	4368	48.314	29	71	211036
8	4368	45.793	25	73	200023
9	4368	47.916	25	72	209299
10	4368	46.220	26	67	201890
11	4368	45.824	28	70	200158

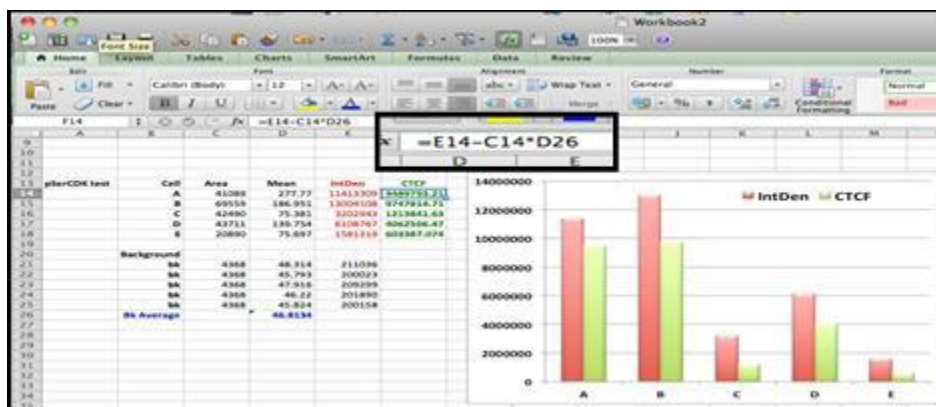
Шема 22в. Резултати



Шема 22г. Маркирање backgrounda

Када су добијени параметри у опцији RESULTS за све ћелије од интереса, као и за поља *background*, селектовати све податке из прозора RESULTS, копирати их помоћу *copy* и *paste* у Excel табелу како је приказано на Шеми 22д. Уз помоћ формуле израчунати *Corrected total cell fluorescence* (CTCF).

$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} * \text{Mean fluorescence of background readings})$ .



Шема 22д. Обрада добијених параметара у Excel табели

Резултати су обрађени у SPSS (Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата (SPSS for Windows, ver. 17, 2008), а добијене вредности представљају релативну флуоресценцу по ћелији.

## РЕЗУЛТАТИ

Истраживања у оквиру докторске дисертације су испитивања биолошких ефеката (цитотоксичност и антимигрантни потенцијал, молекуларни механизми миграције и редокс регулација ових механизма) хемијских Pt(IV) комплекса и екстраката природног материјала (гљиве и лишајеви) у појединачним и комбинованим третманима, на НСТ-116 и SW-480 ћелијским линијама карцинома колоне. За тест цитотоксичности третмана, коришћена је и здрава ћелијска линија, MRC-5.

У третманима су коришћени:

1. Новосинтетисана хемијска једињења - **Pt(IV) комплекс 1, Лиганд 1, Pt(IV) комплекс 2, Лиганд 2.**
2. **Цисплатина** ( $\text{Cl}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{Pt}$ ), Pt(II) комплекс као позитивна контрола.
3. Комерцијално доступни додаци исхрани - **метанолни екстракти гљива: *Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum***
4. Свеже узорковани природни материјал – **метанолни, ацетонски и етилацетатни екстракти лишајева: *Platismatia glauca*, *Pseudoevernia furfuraceae*.**

### 1. Цитотоксичност третмана и тип ћелијске смрти

У овом поглављу представљени су резултати који показују потенцијалну цитотоксичност испитиваних третмана на НСТ-116 и SW-480 ћелијским линијама карцинома колоне и здравим MRC-5 ћелијама, као и анализе типа ћелијске смрти који ови третмани изазивају.

#### 1.1. Ефекти третмана на вијабилности ћелија и цитотоксичност

Ефекти на вијабилности ћелија и цитотоксичност испитиваних хемијских једињења и екстраката гљива и лишајева у појединачним и комбинованим третманима одређивана је МТТ тестом, а резултати су приказани графички (**Прилогу 1 и 2**). Цитотоксичност је изражена преко  $\text{IC}_{50}$  вредности ( $\mu\text{M}$  или  $\mu\text{g/mL}$ ), концентрација која убија 50% ћелија, а вредности су приказане табеларно.

У даљем тексту су обрађени ефекти третмана у односу на сваку тестирану ћелијску линију.



**Ефекти третмана на НСТ-116 хелијској линији**

Сва испитивана хемијска једињења показују дозно и временски зависне ефекте на смањење хелијске вијабилности на НСТ-116 хелијској линији (**Прилог 1 – Графикон 1**). Обзиром да третмани показују израженији ефекат након 72 сата (**Графикон 1, Табела 1**), можемо говорити о антипролиферативном деловању тестираних хемијских једињења. На основу приказаних  $IC_{50}$  вредности (**Табела 1**), најинтензивнији цитотоксични ефекат показују Pt(IV) комплекс 2 и његов одоварајући Лиганд 2, а вредности су ниже и у односу на позитивну контролу цисплатине.

Све тестиране гљиве изазивају дозно и временски зависно смањење вијабилности НСТ-116 хелија само у високим концентрацијама (**Прилог 1 – Графикон 2**), осим у случају *P. linteus*, која показује добар цитотоксични ефекат (**Табела 1**), што се може узети у обзир приликом котретмана са јачим цитостатиком. Према критеријумима Америчког Националног Института за канцер (*American National Cancer Institute, NCI*), значајном цитотоксичношћу екстраката сматрају се  $IC_{50}$  вредности ниже од 30  $\mu\text{g/mL}$  (Suffness и Pezzuto, 1990). У односу на овај критеријум, тестирани екстаркати гљива не показују значајне цитотоксичне ефекте (**Табела 1**).

**Табела 1.** Цитотоксичност -  $IC_{50}$  вредности хемијских једињења ( $\mu\text{M}$ ) и екстраката гљива и лишајева ( $\mu\text{g/mL}$ ) у појединачним третманима на НСТ-116 хелијској линији.

Хемијско једињење		24 h	72 h
Цисплатина		263.66±8.02	104.41±9.01
Pt(IV) комплекс 1		325.15±4.87	193.25±23.01
Лиганд 1		455.92±1.28	169.13±1.56
Pt(IV) комплекс 2		96.08±4.01	68.023±2.17
Лиганд 2		76.50±1.98	67.72±1.71
Гљива	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	М	261.1±11.21	200.58±6.85
<i>Cordyceps sinensis</i>	М	>500	>500
<i>Letinus edodes</i>	М	>500	>500
<i>Coprinus comatus</i>	М	>500	>500
<i>Ganoderma lucidum</i>	М	>500	>500
Лишај	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	215.68 ± 12.87	57.81 ± 9.05
	А	176.41 ± 9.06	41.90 ± 6.63
	ЕА	62.42 ± 11.46	21.17 ± 1.28
<i>Platismatia glauca</i>	М	115.35 ± 12.93	38.21 ± 4.51
	А	205.02±12.2	34.32 ± 2.48
	ЕА	184.94 ± 8.50	37.72 ± 4.06

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Екстракти лишајева такође изазивају дозно и временски зависно смањење вијабилности НСТ-116 хелија (**Прилог 1 – Графикон 3**). Обзиром да су ефекти израженији након 72 сата, можемо

говорити о антипролиферативном деловању лишајева.  $IC_{50}$  вредности су приказане у **Табели 1**, показују да тестирани екстракти лишајева имају добре цитотоксичне ефекте на НСТ-116 ћелијској линији, након 72 сата третмана (све  $IC_{50}$  вредности су мање од  $60 \mu\text{g/mL}$ ). Значајне цитотоксичне ефекте показује етилацетатни екстракт *P. furfuracea*, у складу са NCI критеријумом. У односу на тип екстракције, резултати су показали да различите врсте екстраката показују разлике у цитотоксичности. Етилацетани екстракт *P. furfuracea* већ после 24 сата третмана показује јак цитотоксични ефекат, а ефекат је стабилан и у продуженом третману после 72 сата. Метанолни екстракт *P. glauca* показује најинтензивнији ефекат након 24 сата, док ацетонски екстракт ове врсте показује најјачи ефекат након 72 сата третмана.

У циљу испитивања потенцијалне синергистичке активности тестираних биоактивних супстанци, ћелије су третиране комбинованим третманима *P. linteus* и хемијских једињења. Комбиновани третмани су извођени тако што су екстракти *P. linteus* ( $10, 25, 50, 250 \mu\text{g/mL}$ , коришћене у појединачним третманима) и  $10 \mu\text{M}$  испитиваних хемијских једињења (цисплатина, Pt(IV) комплекси или лиганди) додавани истовремено (**КТ-0h**), или је хемијско једињење додавано 6 сати након третмана гљивом (**КТ-6h**).

Ефекти испитиваних котретмана на ћелијску вијабилност приказани су графички у Прилогу 2, а  $IC_{50}$  вредности ( $\mu\text{g/mL}$ ) приказани су табеларно, а потенцијалне синергистичке, адитивне или антагонистичке активности у комбинованим третманима испитивани су израчунавањем вредности комбинационих индекса (CI) које су дате у **Прилогу 3**. У даљем тексту најпре ћемо размотрити ефекте симултаних комбинованих третмана (КТ-0h), а затим и оне који су аплицирани у временском размаку од 6 сати (КТ-6h).

Котретмани КТ-0 h показују дозно и временски зависно смањење вијабилности НСТ-116 ћелија (**Прилог 2 – Графикон 4**). Најинтензивнији цитотоксични ефекат показали су *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2. Поређењем добијених  $IC_{50}$  вредности за метанолни екстракт гљиве *P. linteus* у појединачном (**Табела 1**) и КТ-0h третману (**Табела 2**), уочава се да комбиновани третмани показују јаче цитотоксичне ефекте. У односу на позитивну контролу (КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина) комбиновани третмани Pt(IV) комплексима 1 и 2 показују јачу цитотоксичност (**Табела 2**) на НСТ-116 ћелијској линији.

Што се тиче интеракција испитиваних супстанци у котретманима на НСТ-116 ћелијама, резултати КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина, након 24 сата показују антагонистички ефекат, са порастом концентрације екстракта ефекат прелази у адитивни, док је после 72 сата запажен синергистички ефекат, осим у највећој концентрацији екстракта где је ефекат остао адитиван (**Прилог 3 – Табела 7**). Резултати CI индекса свих осталих КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекси и

лиганди, указују на синергистички ефекат у нижим концентрацијама док је у вишим концентрацијама запажен углавном адитивни, ређе антагонистички ефекат (Прилог 3 – Табела 7).

Слично симултаним третманима, дозно и временски зависно смањење вијабилности НСТ-116 ћелија показују КТ-6h (Прилог 2 – Графикон 4). Према  $IC_{50}$  вредностима најинтензивнији цитотоксични ефекат показао је КТ-6h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 (Табела 2). Цитотоксичност метанолног екстракта *P. linteus* прати следећу градацију: појединачни третман < КТ-0h < КТ-6h, за третман са Pt(IV) комплекс 2 (Табеле 1, 2). У случају КТ-6 h, комбиновани третмани екстрактом *P. linteus* и свим хемијским једињењима (осим Pt(IV) комплекса 1) индукују значајан цитотоксични ефекат ( $IC_{50}$  вредности од 13.16 до 22.23  $\mu\text{g/mL}$ ), након 72 сата на НСТ-116 ћелијама (Табела 2).

Синергистички ефекти су углавном присутни у КТ-6h, осим у највећој концентрацији где је ефекат адитиван (Прилог 3 – Табела 8). Једино резултати КТ-6h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 1 показује антагонистички ефекат, осим највеће концентрације где је ефекат адитивни после 24 сата. У овом комбинованом третману, након 72 сата, ефекти показују дозну зависност од антагонизма, преко синергизма, до адитивних ефеката у већој концентрацији екстракта (Прилог 3 – Табела 8).

**Табела 2.** Цитотоксичност -  $IC_{50}$  вредности ( $\mu\text{g/mL}$ ) добијене у комбинованим третманима екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на НСТ-116 ћелијској линији

Врста екстракта	Време третмана <sup>a</sup>	10 $\mu\text{M}$	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	КТ-0h	Цисплатина	178.38±0.57	131.60 ±0.09
		Pt(IV) комплекс 1	160.03±0.45	100.45 ±0.60
		Лиганд 1	>250	131.25 ±1.03
		Pt(IV) комплекс 2	97.57±5.11	63.38±2.09
		Лиганд 2	>250	>250
	КТ-6h	Цисплатина	101.79±8.50	22.23±0.95
		Pt(IV) комплекс 1	>250	193.10 ±1.02
		Лиганд 1	24.48 ±0.23	18.18 ±2.45
		Pt(IV) комплекс 2	111.81±7.19	13.16±2.04
		Лиганд 2	45.77 ±0.14	19.84 ±0.11

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка.

<sup>a</sup> Комбиновани третмани - хемијско једињење (цисплатина, Pt(IV) комплекс или лиганд) су додавани истовремено (КТ-0 h), или 6 сати након третмана гљивом (КТ-6h).

### **Ефекти третмана на SW-480 ћелијској линији**

Испитивана хемијска једињења изазивају дозно и временски зависно смањење вијабилности (изузев Лиганда 1 где временска зависност изостаје) SW-480 ћелија (Прилог 1 – Графикон 1). Сви третмани, осим Лиганда 1, показују значајно јачи ефекат након 72 сата, што указује на антипролиферативно деловање.  $IC_{50}$  вредности за појединачне третмане су приказане у Табели 3 за SW-480 ћелијску линију. Најјачи цитотоксични ефекат показују Pt(IV) комплекс 2 и његов

одоварајући Лиганд 2 након 72 сата. Цисплатина као позитивна контрола показује јачи ефекат у односу на Pt(IV) комплекс 1, и оба лиганда за 24 сата, док за 72 сата има интензивнији ефекат од Pt(IV) комплекса 1 и његовог одговарајућег лиганда.

Добијени резултати тестираних метанолних екстракта гљива показују дозно зависно смањење вијабилности SW-480 ћелија (**Прилог 1 – Графикон 2**). Временска зависност изостаје у третманима екстрактима *G. lucidum*, *L. edodes* и *C. comatus* где су значајнији резултати запажени након 24 сата (**Графикон 2**). Дobar цитотоксичан ефекат добијен је у третманима екстрактима *P. linteus* и *C. sinensis* (**Табела 3**). У односу на NCI критеријум, екстракти не показују значајну цитотоксичност.

**Табела 3.** Цитотоксичност - IC<sub>50</sub> вредности хемијских једињења (μM) и екстракта гљива и лишајева (μg/mL) у појединачним третманима на SW-480 ћелијској линији.

Хемијско једињење		24 h	72 h
Цисплатина		108.40±2.15	59.47±0.48
Pt(IV) комплекс 1		201.29±1.69	111.29±0.14
Лиганд 1		170.13±0.19	>500
Pt(IV) комплекс 2		47.84±0.25	36.54±1.50
Лиганд 2		147.88±3.48	78.36±0.47
Гљива	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	М	170.94±5.11	169.80±2.56
<i>Cordyceps sinensis</i>	М	174.55±4.02	178.70±4.78
<i>Letinus edodes</i>	М	>500	>500
<i>Coprinus comatus</i>	М	>500	>500
<i>Ganoderma lucidum</i>	М	>500	407.50±2.96
Лишај	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	105.00±0.99	77.89±0.83
	А	86.62±1.11	51.28±0.75
	ЕА	>500	141.98±0.92
<i>Platismatia glauca</i>	М	56.35±0.09	197.10±0.45
	А	60.25±0.12	206.90±1.07
	ЕА	>500	173.85±0.09

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Смањење ћелијске вијабилности SW-480 ћелија након третмана метанолним, ацетонским и етилацетатним екстрактима две врсте лишајева показује дозну и временску зависност, осим у третману метанолним и ацетонским екстрактом *P. glauca* где су снажнији ефекти добијени после 24 сата (**Прилог 1 – Графикон 3**). На основу IC<sub>50</sub> вредности, екстракти *P. furfuracea* показују интензивнији цитотоксични ефекат након 72 сата, што указује на антипролиферативну активност (**Табела 3**). Метанолни и ацетонски екстракти *P. glauca* показују акутну цитотоксичност, након 24

сата третмана (Табела 3). У односу на NCI критеријум, метанолни и ацетонски екстракти *P. glauca* (након 24 сата) и *P. furfuracea* (након 72 сата) показују добру цитотоксичност на SW-480 ћелијама. Евидентно је да етилацетатни екстракт лишајева показује слабије ефекте у односу на метанолни и ацетонски, што указује на чињеницу да тип растварача и квантитативно/квалитативни однос екстрахованих секундарних метаболита значајно доприноси цитотоксичности природног материјала.

Када разматрамо комбиноване третмане, дозно и временски зависно смањење вијабилности SW-480 ћелија добијено је у свим КТ-0h (Прилог 2 – Графикон 5). Што се тиче цитотоксичности, најнижа IC<sub>50</sub> вредност добијена је у КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2, након 72 сата (Табела 4). Код овог котретмана је уочен најјачи синергистички ефекат са значајним падом вијабилности у односу на појединачне третмане метанолним екстрактом гљиве и остале котретмане (Прилог 3 – Табела 9). Значајно ниже IC<sub>50</sub> вредности су добијене у КТ-0h у односу на појединачне третмане екстрактом гљиве после 72 сата инкубације.

**Табела 4.** Цитотоксичност - IC<sub>50</sub> вредности (µg/mL) комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на SW-480 ћелијској линији.

Врста екстракта	Време третмана <sup>а</sup>	10 µM	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	КТ-0h	Цисплатина	155.07±0.03	81.69 ±0.85
		Pt(IV) комплекс 1	202.99±0.63	83.13 ±2.11
		Лиганд 1	>250	>250
		Pt(IV) комплекс 2	212.25±2.12	28.32±0.91
		Лиганд 2	>250	176.67 ±3.03
	КТ-6h	Цисплатина	212.70±0.75	18.77 ±0.93
		Pt(IV) комплекс 1	132.93±0.89	63.21 ±0.32
		Лиганд 1	>250	202.77 ±2.45
		Pt(IV) комплекс 2	284.06±2.12	83.53±3.17
		Лиганд 2	219.43 ±0.14	>250

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешке.

<sup>а</sup> Комбиновани третмани - хемијско једињење (цисплатина, Pt(IV) комплекс или лиганд) су додавани истовремено (КТ-0 h), или 6 сати након третмана гљивом (КТ-6h).

Слично као у случају симултаних котретмана, дозно и временски значајно смањење вијабилности SW-480 ћелија показују КТ-6h, осим у третману са Лигандом 2 где су интензивнији ефекти запажени после 24 сата (изостаје временска зависност) (Прилог 2 – Графикон 5). Најнижа IC<sub>50</sub> вредност (нижа од 30 µg/mL) добијена је у КТ-6h за *P. linteus* + цисплатина, док је од новосинтетисаних комплекса најцитотоксичнији ефекат у котретману показао Pt(IV) комплекс 1 (Табела 4). Цитотоксичност котретмана након 72 сата, показује тренд појединачни третмани *P. linteus* < КТ-0h < КТ-6h. Изузетак је КТ-0h за *P. linteus*+ Pt(IV) комплекс 2 који показује јачу и значајну цитотоксичност у односу на КТ-6h (Табела 4). У комбинованим третманима *P. linteus* +

лиганди (КТ-0h и КТ-6h),  $IC_{50}$  вредности су веће од  $IC_{50}$  вредности појединачно третираних гљивом (Табела 3), тј. цитотоксични ефекти су слабији од појединачних третмана екстрактом гљиве (Табела 4).

Према резултатима  $CI$  вредности у овим котретманима КТ-6h запажен је углавном антагонистички или адитивни ефекат, ређе синергистички (концентрација екстракта 25  $\mu\text{g/mL}$  после 72 сата) (Прилог 3, Табеле 9, 10).

### Ефекти третмана на MRC-5 ћелијској линији

Тестирана хемијска једињења на здравим MRC-5 ћелијама изазивају дозно зависну цитотоксичност, док временска зависност изостаје, осим у третману цисплатином и Pt(IV) комплексом 1 у високим концентрацијама (Прилог 1 – Графикон 1). У свим третманима, након 72 сата, ћелије се опорављају, тј. ови третмани немају антипролиферативни ефекат. Најјачи цитотоксични ефекат са најнижом  $IC_{50}$  вредности изазива третман Pt(IV) комплекс 2 након 24 сата, док су после 72 сата  $IC_{50}$  вредности веће од 500  $\mu\text{M}$  (Табела 5). На основу ових података, може се закључити да испитивана хемијска једињења показују антиканцерогене ефекте након 72 сата, у смислу да су цитотоксични на ћелијским линијама канцера (Табеле 1 и 3), док на здравој ћелијској линији показују добре ефекте (Табела 5).

**Табела 5.** Цитотоксичност -  $IC_{50}$  вредности хемијских једињења ( $\mu\text{M}$ ) и екстраката гљива и лишајева ( $\mu\text{g/mL}$ ) у појединачним третманима на здравој MRC-5 ћелијској линији.

Хемијско једињење		24 h	72 h
Цисплатина		359.25±0.45	>500
Pt(IV) комплекс 1		231.97±0.14	>500
Лиганд 1		>500	>500
Pt(IV) комплекс 2		82.74±0.56	>500
Лиганд 2		354.48±1.99	>500
Гљива	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	М	>500	>500
<i>Cordyceps sinensis</i>	М	>500	>500
<i>Letinus edodes</i>	М	>500	>500
<i>Coprinus comatus</i>	М	>500	>500
<i>Ganoderma lucidum</i>	М	289.54±10.36	>500
Лишај	Врста екстракта	24 h	72 h
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	126.84±0.65	371.81±0.46
	А	225.74±0.85	201.38±1.11
	ЕА	194.34±0.92	255.97±0.14
<i>Platismatia glauca</i>	М	414.31±0.12	389.09±0.60
	А	146.05±0.95	380.93±0.06
	ЕА	442.21±0.82	216.61±0.44

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Тестирани метанолни екстракти гљива *P. linteus* и *G. lucidum* дозно зависно смањују вијабилност MRC-5 ћелија, док остали третмани индукују пролиферацију ове здраве ћелијске линије (**Прилог 1 – Графикон 2**). Тестиране врсте гљива не показују цитотоксичну активност на здравој MRC-5 ћелиској линији, са  $IC_{50}$  вредностима већим од 500  $\mu\text{g/mL}$ , осим третмана *G. lucidum* у високим концентрацијама, што није значајно у односу на усвојен критеријум за  $IC_{50}$  вредности (Suffness и Pezzuto, 1990). И у овом случају можемо говорити о антиканцерогеном ефекту испитиваних метанолних екстраката гљива, *P. linteus* на НСТ-116 ћелијама, и *P. linteus* и *S. sinensis* на SW-480 ћелијама (**Табеле 1, 3, 5**).

Тестиране врсте лишјајева показују дозно зависно смањење вијабилности MRC-5 ћелија (**Прилог 1 – Графикон 3**). Временска зависност је уочена у третману ацетонским екстрактом *P. furfuracea*, као и у третману метанолним и етилацетатним екстрактима *P. glauca*. Код осталих третмана (метанолни и етилацетатни екстракт *P. furfuracea* и ацетонски екстракт *P. glauca*) интензивнији ефекат је након 24 сата (изостаје временска зависност) (**Графикон 3**). Најјача цитотоксичност, изажена преко  $IC_{50}$  вредности, добијена је у третманима метанолним екстрактом *P. furfuracea* и ацетонским екстрактом *P. glauca* (**Табела 5**). На основу ових података, тестирани екстракти лишјајева не показују значајну цитотоксичност на MRC-5 ћелијама ( $IC_{50}$  вредности су углавном веће од 200  $\mu\text{g/mL}$ ), мада је одређен степен цитотоксичности евидентан када се упореде са ефектима хемијских третмана и гљива на овим ћелијама.

Комбиновани третмани КТ-6h за *P. linteus* и хемијска једињења, у ниским концентрацијама гљиве показују чак пролиферативне ефекте на MRC-5 ћелијској линији, док само у највећој концентрацији *P. linteus* у котретману са Pt(IV) комплексом 2 и Лигандом 2 индукује смањење вијабилности ових ћелија (**Прилог 2 – Графикон 6**). На основу  $IC_{50}$  вредности, испитивани котретмани не показују цитотоксичност на MRC-5 ћелијској линији (**Табела 6**), што потврђује антиканцерогено деловање комбинованих третмана гљивом и хемијским супстанцама (**Табеле 2, 4**).

**Табела 6.** Цитотоксичност -  $IC_{50}$  вредности ( $\mu\text{g/ml}$ ) добијене у комбинованим третманима екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на здравој MRC-5 ћелијској линији.

Врста екстракта	Време третмана <sup>а</sup>	10 $\mu\text{M}$	24 h	72 h
<i>Phellinus linteus</i>	КТ-6h	Цисплатина	>250	>250
		Pt(IV) комплекс 1	>250	>250
		Лиганд 1	>250	>250
		Pt(IV) комплекс 2	>250	>250
		Лиганд 2	>250	>250

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешке.

<sup>а</sup> Комбиновани третмани - хемијско једињење (цисплатина, Pt(IV) комплекс или лиганд) су додавани 6 сати (КТ-6h) након третмана гљивом.

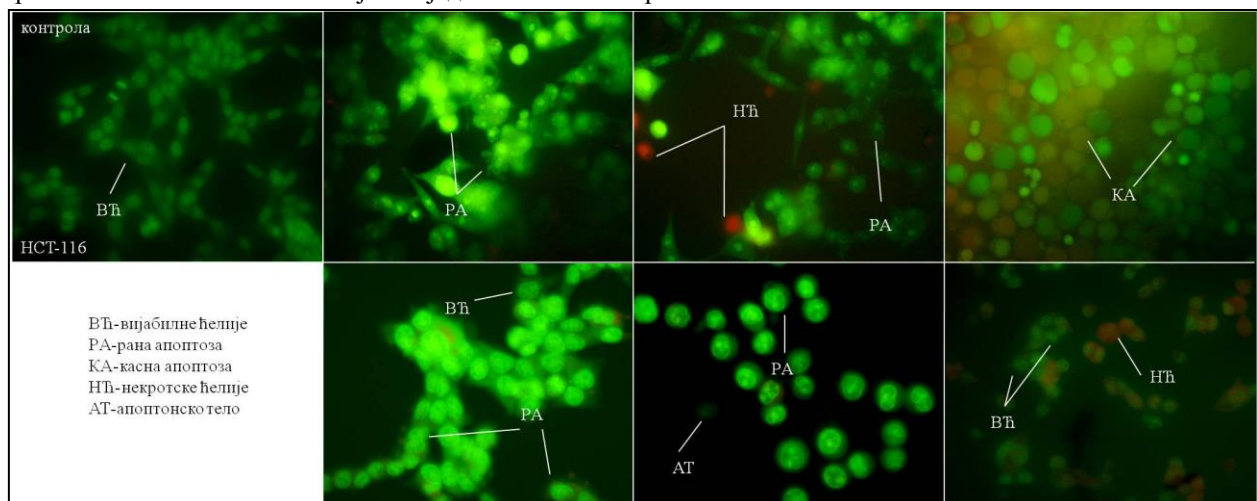
Поређењем цитотоксичних ефеката на две испитиване линије карцинома колона, можемо закључити да су SW-480 ћелије генерално осетљивије на појединачне третмане (хемијска једињења и екстракти гљива), са изузетком лиганада који јачи ефекат показују на НСТ-116 ћелијама после 24 сата. На основу  $IC_{50}$  вредности, може се закључити да су НСТ-116 ћелије осетљивије на продужено време третмана (72 сата) екстрактима лишајева.  $IC_{50}$  вредности појединачних третмана показују да су MRC-5 здраве ћелије најмање осетљиве, као и да у случају хемијских супстанци и *P. linteus* можемо говорити о антиканцерогеном ефекту.

Резултати показују (Прилог 3) да комбиновани третмани изазивају углавном синергистичке ефекте на ћелијама колоректалног карцинома, што зависи од коришћене концентрације, врсте комбинованог третмана и времена излагања. Генерално, комбиновани третмани значајније синергистичке ефекте постижу на НСТ-116 ћелијама, у поређењу са SW-480 ћелијама.

## 1.2. Тип ћелијске смрти изазван појединачним и комбинованим третманима

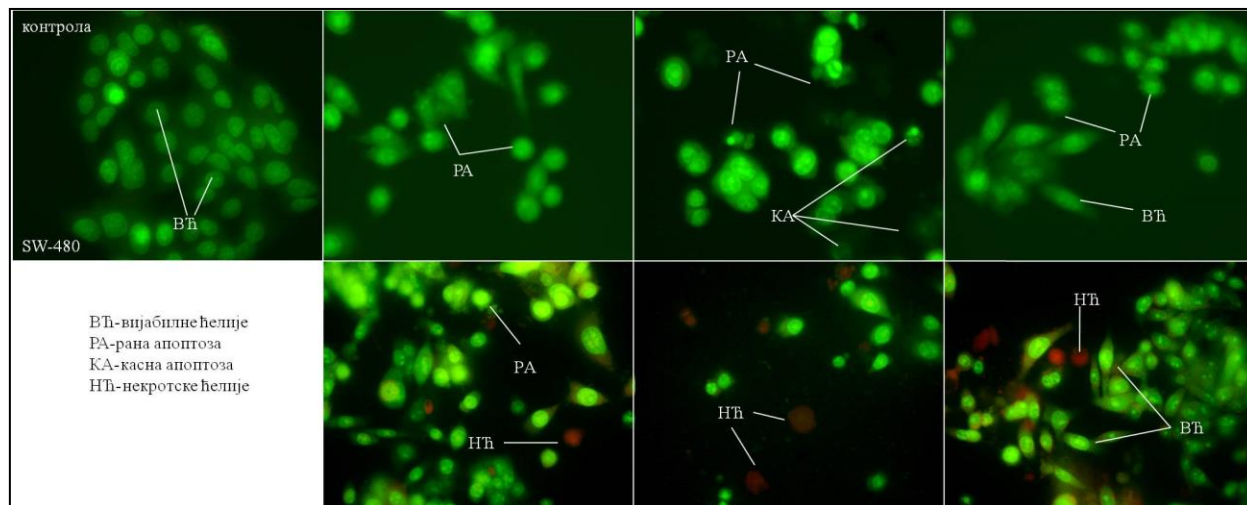
Обзиром да су испитивана хемијска једињења и екстракти гљива и лишајева показали цитотоксичност на тестираним ћелијским линијама карцинома колона, у даљем испитивању је одређиван тип ћелијске смрти, коришћењем АО/ЕБ микроскопске методе. Појединачни третмани испитиваних хемијских једињења и екстраката као и комбиновани третмани изазивају морфолошке промене НСТ-116 и SW-480 ћелија, карактеристичне за процесе апоптозе и некрозе (Слике 1 и 2). Карактеристичне морфолошке промене за процес апоптозе су пупљење ћелијске мембране, кондензација хроматина, смањење ћелијске запремине, фрагментација једра, формирање апоптотских тела. Некротске ћелије су кондензоване и униформно црвене боје.

**Слика 1.** Типичне морфолошке промене НСТ-116 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увеличање 400×. На слици су приказане репрезентативне слике добијене у третманима испитиваним хемијским једињењима и екстрактима





**Слика 2.** Типичне морфолошке промене SW480 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увеличање 400×. На слици су приказане репрезентативне слике добијене у третманима испитиваним хемијским једињењима и екстрактима.



### Ефекти третмана на тип смрти НСТ-116 ћелија

У **Табели 11** приказани су проценти живих ћелија, ране и касне апоптозе и некрозе НСТ-116 ћелија у појединачним третманима хемијским једињењима, после 24 и 72 сата. Хемијска једињења у концентрацији 10  $\mu\text{M}$  (нецитотоксична доза) изазивају доминантно рану апоптозу (**Табела 11**). Након дужег времена инкубације третмана (72 сата), проценат живих ћелија се смањује, а повећава се број ћелија у раној и касној апоптози. Pt(IV) комплекси 1 и 2 показују јаче праапоптотске ефекте (нарочито након 72 сата) у односу на третман цисплатином (позитивна контрола), док Лиганди 1 и 2 показују слабије ефекте у односу на комплексе и цисплатину.

**Табела 11.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија, након третмана хемијским једињењима. В – вијабилне ћелије; РА - рана апоптоза; КА - касна апоптоза; Н-некроза

Хемијско једињење	концентрације $\mu\text{M}$	В	РА	КА	Н
24 h					
Контролне ћелије	0	97.42±3.65	2.58±0.41	0	0
Цисплатина	10	77.93±0.88	22.06±0.50	0	0
Pt(IV) комплекс 1	10	71.47±0.10	28.53±0.99	0	0
Лиганд 1	10	84.24±0.41	14.74±0.01	0.5±0.00	0.5±0.01
Pt(IV) комплекс 2	10	78.84±3.25	11.04±1.05	10.12±0.23	0
Лиганд 2	10	82.93±0.63	16.46±0.45	0.6±0.00	0
72 h					
Контролне ћелије	0	95.44±1.36	4.56±0.03	0	0
Цисплатина	10	72.33±0.23	27.66±0.14	0	0
Pt(IV) комплекс 1	10	69.12±0.00	30.88±0.09	0	0
Лиганд 1	10	78.56±2.76	10.94±1.08	10.45±0.99	0.5±0.02
Pt(IV) комплекс 2	10	66.92±3.99	20.64±1.43	12.44±0.09	0
Лиганд 2	10	77.12±0.18	21.27±0.08	1.6±0.00	0

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка

Третмани екстрактима гљиве *P. linteus* и лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* изазивају апоптозу НСТ-116 ћелија као доминантан тип ћелијске смрти, а повећање броја НСТ-116 ћелија у раној и касној апоптози прати дозну и временску зависност (Табела 12). Третман екстрактом *P. linteus* у концентрацији 250  $\mu\text{g/mL}$  изазива најјачи проапоптотски ефекат (преко 60% ћелија у касној апоптози и 14% у некрози, после 72 сата).

**Табела 12.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија након третмана екстрактима гљива и лишајева. В – вијабилне ћелије; РА - рана апотоза; КА - касна апотоза; Н-некроза

24 h						
Гљива	Врста екстракта	концентрације ( $\mu\text{g/mL}$ )	В	РА	КА	Н
<i>Phellinus linteus</i>	М	10	72.88 $\pm$ 2.31	22.73 $\pm$ 2.31	4.39 $\pm$ 0.25	0
		25	68.12 $\pm$ 1.99	25.88 $\pm$ 1.44	6.58 $\pm$ 0.31	1.02 $\pm$ 0.01
		50	40.85 $\pm$ 2.88	35.48 $\pm$ 1.61	20.12 $\pm$ 1.88	3.55 $\pm$ 0.51
		250	27.50 $\pm$ 1.11	34.74 $\pm$ 1.99	32.34 $\pm$ 3.88	5.42 $\pm$ 1.01
<b>Лишај</b>						
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	10	79.12 $\pm$ 1.12	10.51 $\pm$ 0.13	10.30 $\pm$ 0.11	0
		100	65.17 $\pm$ 2.09	16.53 $\pm$ 0.55	18.30 $\pm$ 0.98	0
	А	10	66.47 $\pm$ 0.99	13.64 $\pm$ 0.99	19.89 $\pm$ 0.17	0
		100	28.79 $\pm$ 1.65	21.62 $\pm$ 0.29	49.59 $\pm$ 0.11	0
	ЕА	10	62.82 $\pm$ 0.45	17.79 $\pm$ 0.77	18.56 $\pm$ 0.66	1.17 $\pm$ 0.02
		100	28.33 $\pm$ 0.55	21.12 $\pm$ 0.01	50.07 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.05
<i>Platismatia glauca</i>	М	10	73.67 $\pm$ 0.88	15.34 $\pm$ 0.00	10.99 $\pm$ 0.16	0
		100	57.06 $\pm$ 0.11	11.87 $\pm$ 0.28	38.07 $\pm$ 0.44	0
	А	10	68.03 $\pm$ 0.44	12.52 $\pm$ 0.11	15.23 $\pm$ 0.54	4.22 $\pm$ 0.11
		100	40.00 $\pm$ 1.41	26.83 $\pm$ 0.51	26.17 $\pm$ 0.08	7.42 $\pm$ 1.09
	ЕА	10	76.53 $\pm$ 1.76	13.24 $\pm$ 0.49	9.02 $\pm$ 0.08	1.21 $\pm$ 0.01
		100	74.15 $\pm$ 0.01	30.73 $\pm$ 0.01	13.13 $\pm$ 0.33	11.99 $\pm$ 0.82
<b>72 h</b>						
Гљива	Врста екстракта	концентрације ( $\mu\text{g/mL}$ )	В	РА	КА	Н
<i>Phellinus linteus</i>	М	10	59.77 $\pm$ 1.32	39.66 $\pm$ 3.58	1.55 $\pm$ 0.23	0
		25	55.02 $\pm$ 0.44	44.98 $\pm$ 4.33	2.59 $\pm$ 0.02	0
		50	12.23 $\pm$ 0.19	47.57 $\pm$ 2.84	40.2 $\pm$ 0.00	0
		250	9.42 $\pm$ 0.88	10.05 $\pm$ 0.44	66.48 $\pm$ 2.99	14.05 $\pm$ 1.04
<b>Лишај</b>						
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	10	73.59 $\pm$ 2.72	16.07 $\pm$ 0.71	10.11 $\pm$ 0.91	0.23 $\pm$ 0.00
		100	31.70 $\pm$ 1.98	39.46 $\pm$ 0.54	28.84 $\pm$ 0.05	0
	А	10	61.43 $\pm$ 0.39	18.03 $\pm$ 0.43	20.50 $\pm$ 0.47	0.08 $\pm$ 0.00
		100	18.37 $\pm$ 0.11	18.10 $\pm$ 0.92	58.47 $\pm$ 0.06	5.06 $\pm$ 0.03
	ЕА	10	38.48 $\pm$ 1.06	41.37 $\pm$ 0.08	20.12 $\pm$ 0.00	0.28 $\pm$ 0.01
		100	8.05 $\pm$ 0.06	10.94 $\pm$ 0.44	75.39 $\pm$ 0.19	5.62 $\pm$ 0.01
<i>Platismatia glauca</i>	М	10	60.11 $\pm$ 0.38	31.54 $\pm$ 0.67	18.35 $\pm$ 0.99	0
		100	19.68 $\pm$ 0.72	37.87 $\pm$ 0.13	42.45 $\pm$ 0.76	0
	А	10	46.66 $\pm$ 1.99	22.45 $\pm$ 0.11	22.04 $\pm$ 0.20	8.85 $\pm$ 0.15
		100	20.10 $\pm$ 0.12	36.97 $\pm$ 0.33	32.73 $\pm$ 0.51	10.20 $\pm$ 0.55
	ЕА	10	45.53 $\pm$ 0.71	21.48 $\pm$ 0.67	22.21 $\pm$ 0.79	10.78 $\pm$ 0.03
		100	20.62 $\pm$ 0.01	28.22 $\pm$ 0.99	29.55 $\pm$ 0.75	21.61 $\pm$ 0.34

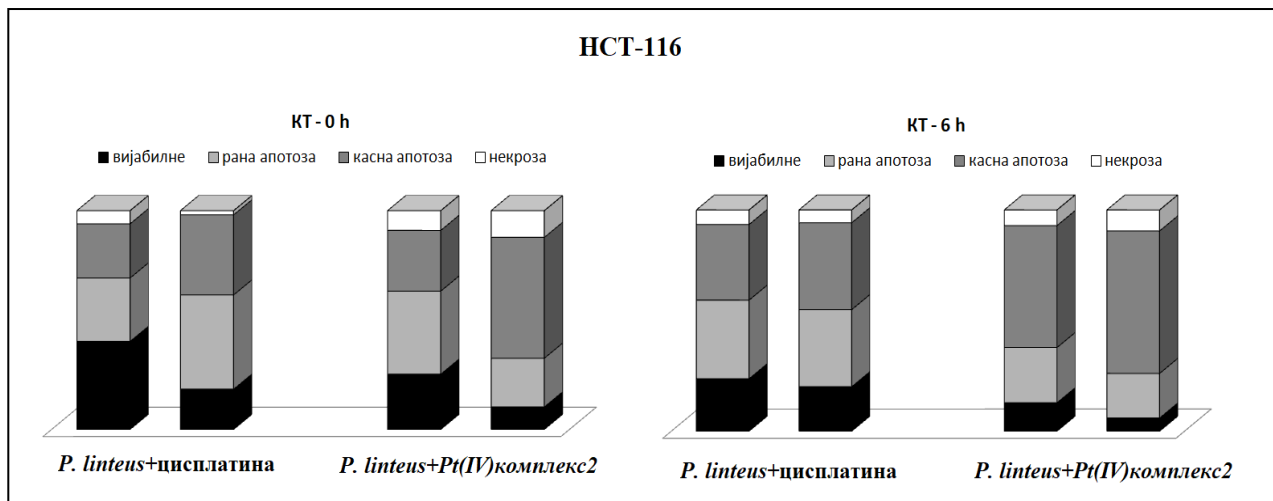
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка

Поређењем ефеката свих екстраката две врсте лишајева, најјачи проапоптотски ефекат показују етилацетатни екстракт *P. furfuracea* и ацетонски екстракт *P. glauca* у највишој тестираној концентрацији 100 µg/mL после 24 и 72 сата. Екстракати *P. glauca* изазивају некрозу у већем проценту (Табела 12), у односу на остале испитиване третмане (Табеле 11 и 12), где се некроза јавља у веома ниским процентима.

**Комбиновани третмани** КТ-0h за *P. linteus* + хемијска једињења показују дозно и временски зависне ефекте на смањење броја живих НСТ-116 ћелија и укупно повећање процента ћелија у апоптози и некрози (Прилог 4 – Табела 13). У свим комбинованим третманима запажено је присуство некротских ћелија, а њихов проценат се повећава са повећањем концентрације екстракта и продужетком времена излагања (72 сата). Најјаче проапоптотске и некротске ефекте индукује котретман КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 (најмање живих ћелија < 20% и највише ћелија у касној апоптози > 60%), значајнији и у односу на котретман са цисплатином (позитивна контрола). Котретмани *P. linteus* са лигандима индукују највећи проценат ћелија у раној апоптози, док у касној апоптози највише ћелија има у котретману *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 (Прилог 4 -Табела 13).

Комбиновани третмани КТ-6h за *P. linteus* + хемијска једињења (Прилог 4 – Табела 14) показују боље проапоптотске и некротске ефекте на НСТ-116 ћелијама, у односу на КТ-0h (Прилог 4 – Табела 13). У свим КТ-6h, доминантан тип смрти је апоптоза, а значајно је присутна и некроза (до 20% након 24 сата, односно до 26% након 72 сата). И у овом случају најбоље проапоптотске ефекте индукује котретман КТ-6h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2, након 72 сата. Котретман КТ-6h за *P. linteus* + цисплатина индуковао је најмањи проценат некрозе. На **Графикону 7** је приказан репрезентативан котретман екстрактом *Phellinus linteus* (50 µg/mL) и испитиванх хемијских једињења (10 µM) на НСТ-116 ћелијама.

**Графикон 7.** Процент живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија, након комбинованих третмана екстрактом *Phellinus linteus* (50 µg/mL) и хемијским једињењима (10 µM).



**Ефекти третмана на тип смрти SW-480 ћелија**

Испитивана хемијска једињења (Pt(IV) комплекси и њихови лиганди, као и цисплатина) изазивају апоптозу на SW-480 ћелијској линији (Табела 15). Процент ћелија у апоптози се повећава са продужењем времена излагања третманима (после 72 сата). Некротске ћелије су заступљене у веома ниском проценту. Најјачи ефекат на индукцију апоптозе је у третману са Pt(IV) комплексом 2, већа и у односу на цисплатину као позитивну контролу.

**Табела 15.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија, након третмана хемијским једињењима. В – вијабилне ћелије; РА - рана апоптоза; КА - касна апоптоза; Н-некроза

24 h	концентрације μM	В	РА	КА	Н
Контролне ћелије	0	97.42±3.65	2.58±0.41	0	0
Цисплатина	10	63.25±3.08	29.75±0.73	7.00±0.01	0
Pt(IV) комплекс 1	10	80.77±5.99	19.23±0.49	0	0
Лиганд 1	10	87.86±5.44	12.14±0.99	0	0
Pt(IV) комплекс 2	10	56.29±2.01	25.71±2.04	16.41±0.99	1.59±0.09
Лиганд 2	10	75.02±3.00	21.98±1.00	2.49±0.03	0.51±0.02
72 h	концентрације μM	В	РА	КА	Н
Контролне ћелије	0	95.44±1.36	4.56±0.03	0	0
Цисплатина	10	58.25±0.08	32.72±0.08	8.90±0.88	0.1±0.00
Pt(IV) комплекс 1	10	77.11±0.08	22.89±0.08	0	0
Лиганд 1	10	81.01±0.08	18.99±0.08	0	0
Pt(IV) комплекс 2	10	46.23±0.08	31.77±0.08	18.49±0.10	3.51±0.38
Лиганд 2	10	68.41±0.08	26.59±0.08	4.88±0.98	0.12±0.00

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Екстракт гљиве *P. linteus* дозно и временски зависно повећава проценат апоптотских и, у значајно мањој мери, некротских SW-480 ћелија (Табела 16).

Третмани метанолним, ацетонским и етилацетатним екстрактима лишајева показују дозно зависне проапоптотске ефекте (Табела 16). Евидентан је и временски зависан ефекат, осим у третману метанолним и ацетонским екстрактом *P. glauca* где су интензивнији ефекти добијени након 24 сата. Највећи проценат апоптозе запажен је у третману ацетонским екстрактима *P. glauca* после 24 сата и *P. furfuracea* после 72 сата (корелише са најнижим IC<sub>50</sub> вредностима за ове третмане). Сви тестирани екстракти лишајева у вишој концентрацији (100 μg/mL), након 72 сата изазивају некрозу SW-480 ћелија. Процент ћелија које су у некрози је значајан у свим третманима екстрактима *P. glauca* а повећава се са порастом концентрације и времена излагања третмну.

**Табела 16.** Проценти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након третмана екстрактима гљива и лишајева. В – вијабилне ћелије; РА - рана апоптоза; КА - касна апоптоза; Н-некроза

24 h						
Гљива	Врста екстракта	концентрације (µg/mL)	В	РА	КА	Н
<i>Phellinus linteus</i>	М	10	87.11±0.83	10.15±0.11	2.74±0.18	0
		25	70.70±0.59	11.88±0.56	8.15±0.88	0
		50	59.88±0.33	16.12±0.99	23.85±1.99	0.15±0.00
		250	19.99±0.59	18.01±1.00	56.86±4.01	5.14±0.99
<b>Лишај</b>						
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	10	75.87±1.54	14.14±0.99	9.99±0.01	0
		100	26.64±0.65	17.55±0.41	55.81±0.54	0
	А	10	83.07±0.98	8.16±1.33	8.77±0.09	0
		100	40.42±0.88	24.80±0.51	34.78±0.09	0
	ЕА	10	86.40±1.09	8.32±0.79	5.28±0.02	0
		100	80.99±0.12	10.46±0.77	8.55±0.34	0
<i>Platismatia glauca</i>	М	10	31.31±0.43	22.20±0.99	33.15±0.09	13.34±0.11
		100	22.57±0.14	31.58±0.40	27.40±0.58	18.45±1.05
	А	10	44.11±0.46	25.40±0.99	15.15±0.04	15.34±0.15
		100	18.79±0.10	32.35±0.45	28.45±0.58	20.40±1.05
	ЕА	10	61.50±0.88	8.82±0.01	24.60±0.04	5.08±0.12
		100	50.50±0.67	18.36±0.98	15.62±0.75	15.52±0.09
<b>72 h</b>						
Гљива	Врста екстракта	концентрације (µg/mL)	В	РА	КА	Н
<i>Phellinus linteus</i>	М	10	78.45±0.08	17.15±0.08	4.40±0.01	0
		25	64.05±0.08	25.45±0.08	10.59±0.85	0
		50	44.99±0.08	20.74±0.08	30.17±0.88	4.1±0.93
		250	12.88±0.08	8.6±0.08	66.78±0.19	11.74±0.00
<b>Лишај</b>						
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	10	82.06±0.76	15.28±1.07	8.66±0.01	0
		100	18.02±0.12	13.87±0.12	60.62±0.87	7.49±0.04
	А	10	70.25±1.22	18.84±0.80	10.91±0.00	0
		100	12.05±0.00	14.25±0.80	69.57±1.67	4.13±0.44
	ЕА	10	80.73±0.09	11.03±0.80	8.24±0.01	0
		100	24.82±0.08	5.61±0.87	66.08±0.54	3.49±0.04
<i>Platismatia glauca</i>	М	10	87.55±0.68	9.67±0.05	5.59±0.02	2.81±0.02
		100	64.23±0.80	16.76±0.71	8.73±0.40	10.28±0.78
	А	10	77.77±0.61	12.89±0.90	6.70±0.01	2.64±0.00
		100	49.00±0.10	24.42±0.85	20.58±0.05	6.00±0.44
	ЕА	10	78.77±1.01	9.03±0.07	7.10±0.05	5.10±0.58
		100	49.00±0.71	22.14±0.26	10.46±0.98	18.40±0.12

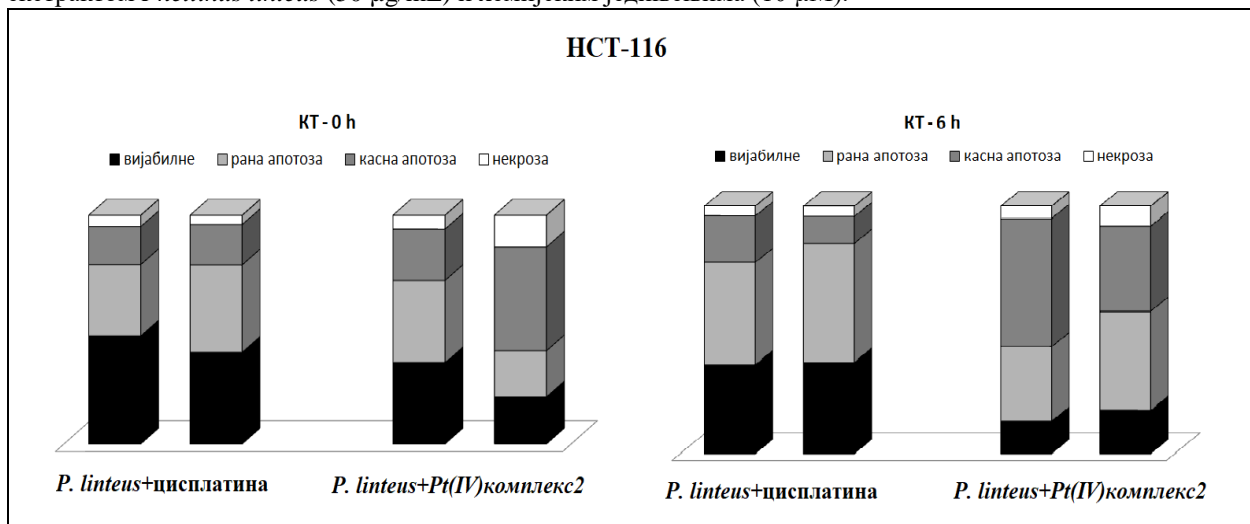
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Комбиновани третмани КТ-0h, у SW-480 ћелијама, индуковали су апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти (Прилог 4 – Табела 17). Најјачи проапоптотски ефекат индуковао је котретман *P. linteus* са дисплатином и Pt(IV) комплексом 1 након оба периода третмана. Међутим, укупно најинтензивније ефекте је постигао котретман *P. linteus* са Pt(IV) комплексом 2 након 72 сата (8.86% живих ћелија, 68.41% ћелија у апоптози и 22.70% ћелија у некрози). Ефекти КТ-0h на SW-480 ћелијама могли би се градацијски представити: *P. linteus* +

лиганди < *P. linteus* + Pt(IV) комплекси < *P. linteus* + цисплатина (Прилог 4 – Табела 17). У КТ-0h значајно је повећан проценат апототских ћелија (Прилог 4 - Табела 17) у односу на појединачне третмане екстрактом *P. linteus* после 72 сата (Прилог 4 - Табела 16).

Резултати добијени АО/ЕВ методом показују да котретмани КТ-6h (Прилог 4 – Табела 18) показују јаче проапототске и некротске ефекте на SW-480 ћелијама, у односу на КТ-0h (Прилог 2 – Табела 17). Евидентно је да се SW-480 ћелије у КТ-6h у највећем проценту налазе у апоптози, међутим проценат некротских ћелија је знатно виши у КТ-6h у односу на КТ-0h за репрезентативан котретман екстрактом *P. linteus*, 50 µg/mL и хемијских једињења, 10 µM (Графикон 8). Као и претходно у котретману КТ-0h, најбоље проапототске ефекте у КТ-6h индуковали су котретмани *P. linteus* са цисплатином и Pt(IV) комплексом 1 (Прилог 4 - Табела 18), након оба периода третмана.

**Графикон 8.** Процент живих, апототских и некротских SW-480 ћелија, након комбинованих третмана екстрактом *Phellinus linteus* (50 µg/mL) и хемијским једињењима (10 µM).



Процент апототских SW-480 ћелија је значајно већи у котретманима у односу на појединачне третмане гљивом, као и у КТ-6h у односу на КТ-0h (осим у КТ-6h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 после 24 сата, што је у корелацији са IC<sub>50</sub> вредностима). Генерално, најслабији проапототски ефекти су запажени у комбинованим третманима са лигандима без обзира на време додавања лиганда, што је у корелацији са антагонистичким или адитивним ефектима ових комбинованих третмана.

Упоредивањем ефеката комбинованих третмана на тип ћелијске смрти, евидентно је да сви комбиновани третмани показују проапототске ефекте, који су израженији у КТ-6h, што је у складу са цитотоксичношћу котретмана. Генерално, јачи некротски ефекат на испитиваним ћелијама колон канцера се испољава након дужег излагања котретманима (72 сата).

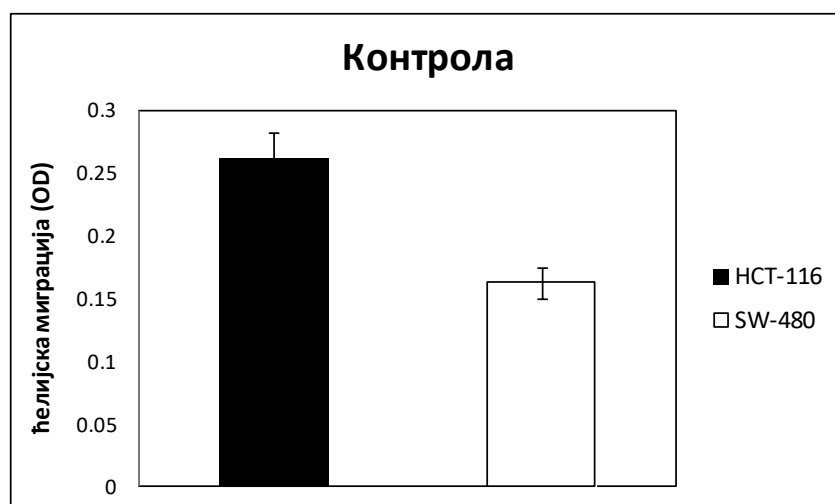
## 2. Ефекти третмана на миграторни потенцијал и механизме миграције ћелија колоректалног карцинома

У оквиру тестирања антиканцерогених ефеката биоактивних супстанци, испитвали смо, поред цитотоксичности, и антимиграторни потенцијал. За дефинисање ефеката третмана на механизме миграције, коришћене су ниске концентрације хемијских једињења и екстраката гљива и лишајева, дозе које не показују значајну цитотоксичност. Вођени тиме, од три врсте екстраката лишајева одабрани су метанолни екстракти. Ефекти комбинованих третманима (само КТ-0h) на миграторни потенцијал су мерени након 24 сата третмана.

### 2.1. Ефекти третмана на миграторни потенцијал ћелија

Миграторни потенцијал је одређиван Transwell методом, у контролним НСТ-116 и SW-480 ћелијама, као и у ћелијама третираним појединачним и котретманима у две сублеталне дозе (10 и 50  $\mu\text{M}$  за хемијске супстанце, односно 10 и 50  $\mu\text{g/mL}$  за екстракте лишајева и гљива), 24 сата од третмана. Миграторни потенцијал у нетретираним (контролним) НСТ-116 и SW-480 ћелијама приказан је на **Графикону 9**. Добијени резултати показују да НСТ-116 имају већи миграторни потенцијал у односу на SW-480 ћелије колоректалног карцинома.

Графикон 9. Миграторни потенцијал НСТ-116 и SW-480 ћелија.



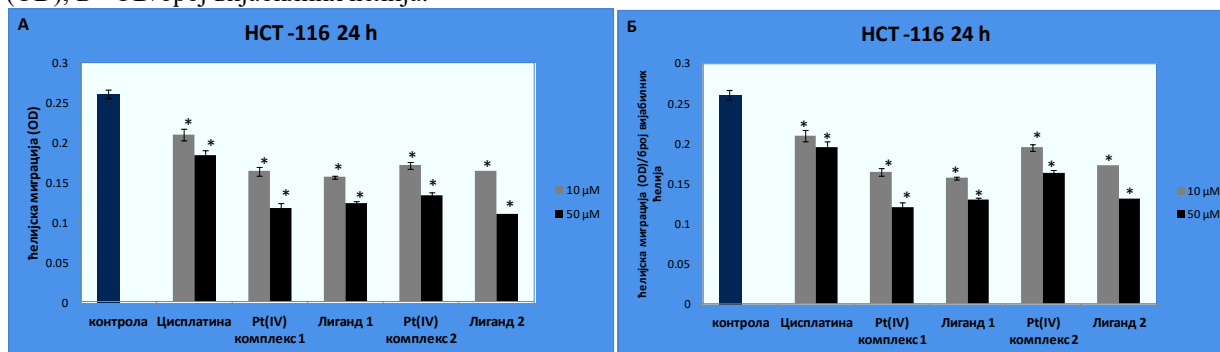
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

**Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија у појединачним и комбинованим третманима**

Резултати миграције у појединачним и котретманима на НСТ-116 ћелијској линији приказани су у **Графиконима 10А-13А**, док су вредности изражене у односу на број вијабилних ћелија (МТТ тест) приказане у **Графиконима 10Б-13Б**.

Сва испитивана хемијска једињења, значајно и дозно зависно снижавају миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија, у односу на нетретиране (контролне) ћелије (**Графикон 10**). Оба Pt(IV) комплекса 1 и 2, и њихови Лиганди показују значајније антимиграторне ефекте у односу на третман цисплатином (позитивна контрола), а укупно, Pt(IV) комплекс 1 и његов Лиганд 1 показују најјаче антимиграторне ефекте.

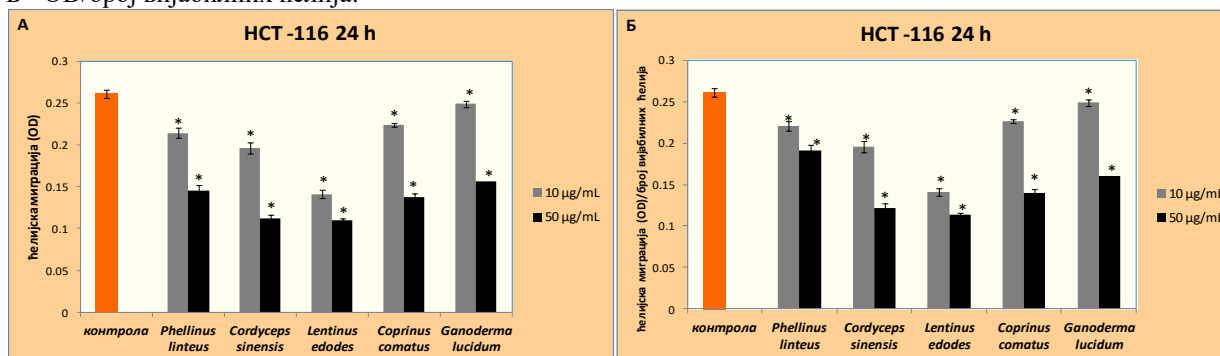
**Графикон 10.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних хемијским једињењима. А - абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности;

Метанолни екстракти гљива значајно, дозно зависно смањују миграцију НСТ-116 ћелија (**Графикон 11**), при чему најзначајније антимиграторне ефекте постижу *C. sinensis* и *L. edodes*.

**Графикон 11.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних екстрактима гљива. А - абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.

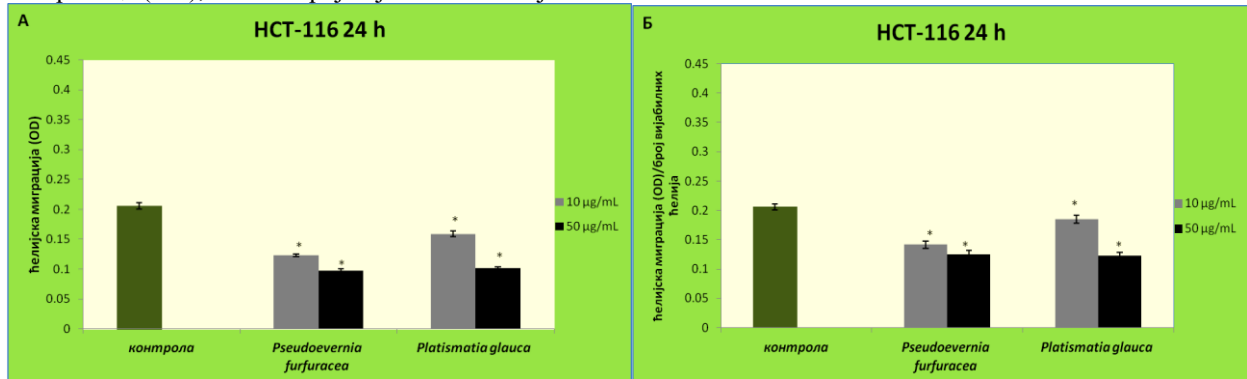


Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.



Метанолни екстракти лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* значајано и дозно зависно инхибирају миграцију НСТ-116 ћелија, при чему је значајнији антимигрантни ефекат постигнут екстрактом *P. furfuracea* (Графикон 12).

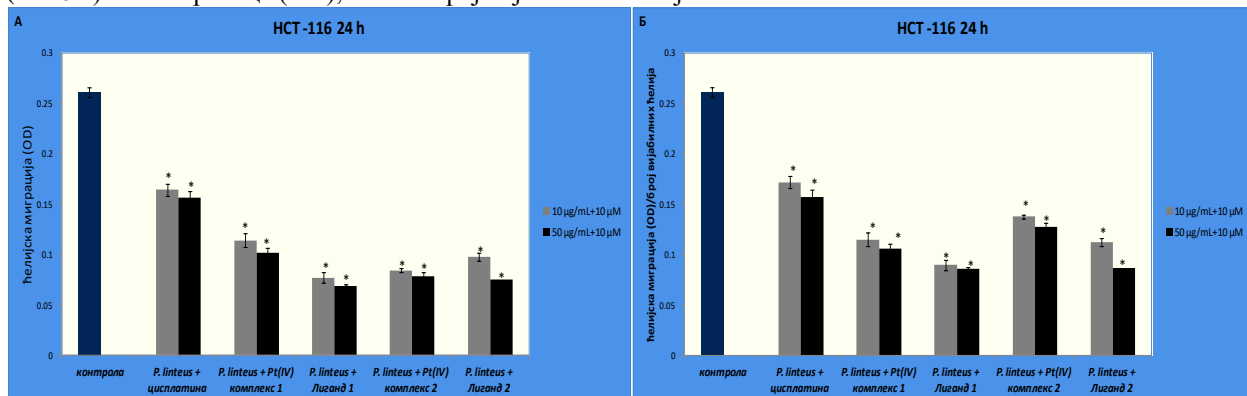
**Графикон 12.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија третираних метанолним екстрактима лишајева. А - абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

Комбиновани третмани метанолним екстрактом гљиве *P. linteus* са испитиваним хемијским једињењима (КТ-0h) значајно смањују миграцију НСТ-116 ћелија (Графикон 13). Више концентрације *P. linteus* (50 µg/mL) показују већи антимигрантни ефекат у комбинованом третману са свим хемијским једињењима (10 µg/mL). Котретмани гљиве са Pt(IV) комплексима и њиховим лигандима показују значајније антимигрантне ефекте у односу на котретман са цисплатином (позитивна контрола), а укупно најбоље ефекте показује КТ-0h за *P. linteus*+ Лиганд1 (Графикон 13).

**Графикон 13.** Миграторни потенцијал НСТ-116 ћелија након котретмана *P. linteus* и хемијским једињењима (КТ-0 h). А-абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.

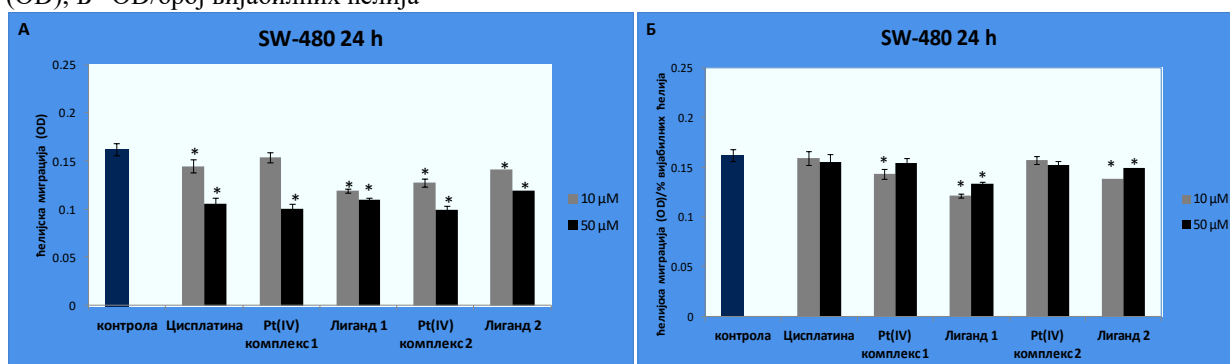


Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

**Миграторни потенцијал SW-480 ћелија у појединачним и комбинованим третманима**

Резултати миграције у појединачним и комбинованим третманима на SW-480 ћелијским линијама, очитани после 24 сата од третмана, приказани су као апсорбанце (Графикони 14-17А) и у односу на број вијабилних ћелија (Графикони 14-17Б). Сва испитивана хемијска једињења снижавају миграторни потенцијал SW-480 ћелија, дозно зависно у односу на нетретиране (контролне) ћелије (Графикон 14А). У односу на број вијабилних ћелија, једино лиганди показују значајан антимиграторни потенцијал на SW-480 ћелијама (Графикон 14Б). Третмани Pt(IV) комплекс 1, Лиганд 1 и Лиганд 2 изазивају значајније ефекте у концентрацији 10  $\mu\text{M}$ .

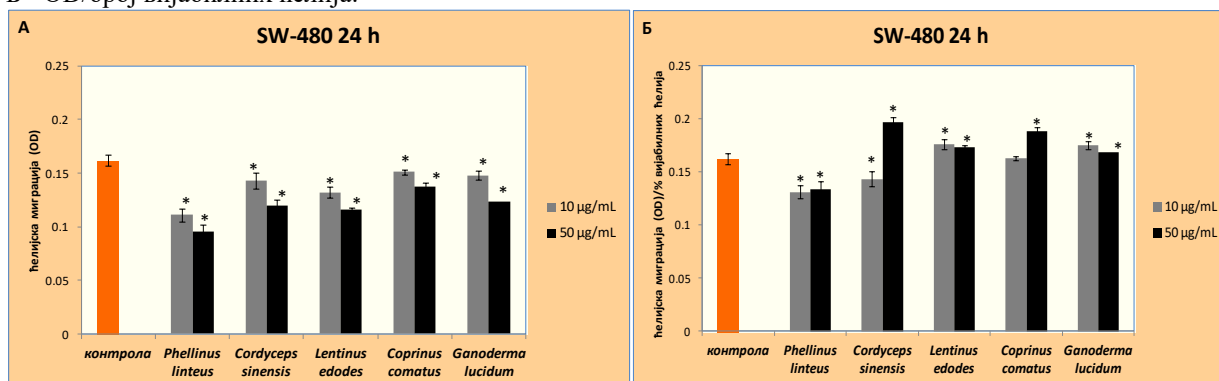
**Графикон 14.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних хемијским једињењима. А - апсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Миграторни потенцијал SW-480 ћелија значајно је смањен у третману метанолним екстрактима гљива (Графикон 15А). Међутим, када се вредности за миграцију изразе у односу на број вијабилних ћелија, сви третмани делују промиграторно, осим *P. linteus* и ниже концентрације (10  $\mu\text{g/mL}$ ) *C. sinensis*, који испољавају антимиграторни ефекат (Графикон 15Б).

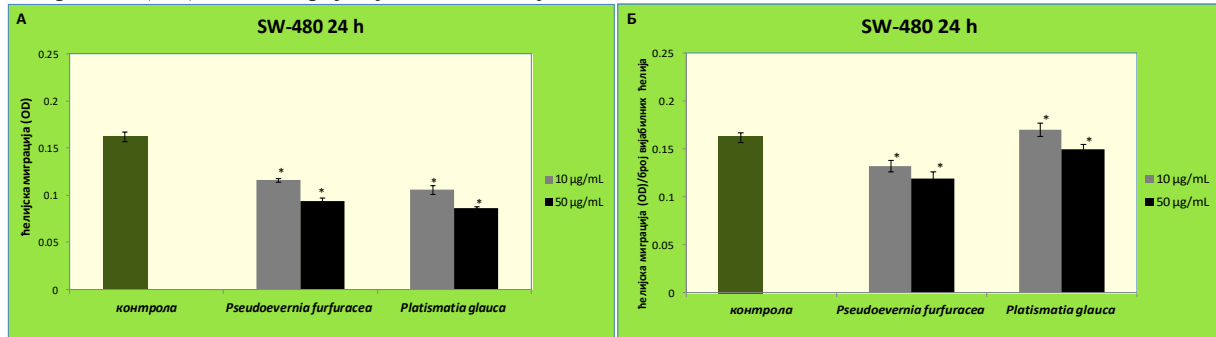
**Графикон 15.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних екстрактима гљива. А - апсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Метанолни екстракти лишјајева *P. furfuracea* и *P. glauca* значајно и дозно зависно смањују миграцију SW-480 ћелија (Графикон 16А). Када се ове вредности изразе у односу на проценат вијабилних ћелија, *P. furfuracea* у обе испитиване концентрације и *P. glauca* у концентрацији 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  изазивају антимигранторни ефекат, док *P. glauca* у концентрацији 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  повећава миграцију SW-480 ћелија (Графикон 16Б).

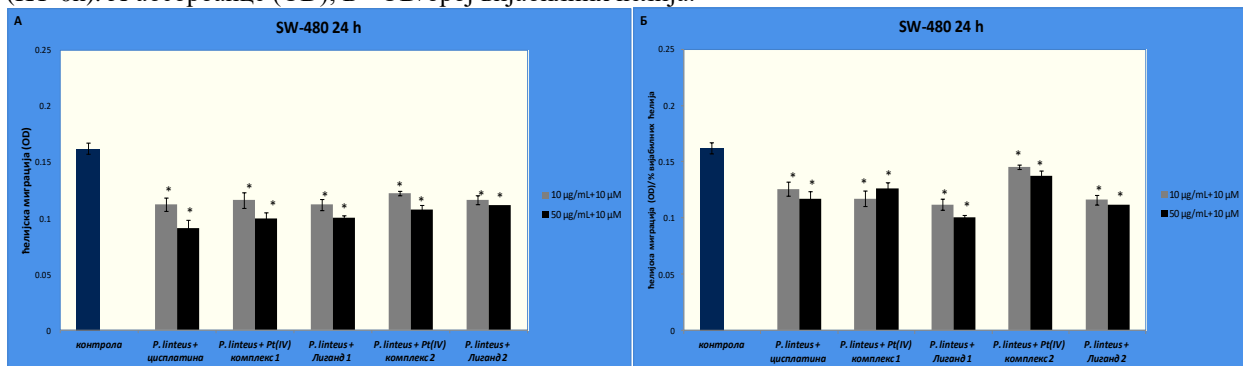
**Графикон 16.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија третираних метанолним екстрактима лишјајева. А - абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Котретмани (КТ-0h) *P. linteus* и хемијских једињења показују антимигранторне ефекте у SW-480 ћелијама (Графикони 17А). Овакав тренд се испољава и када се вредности изразе у односу на проценат вијабилних ћелија (Графикон 17Б), а најјачи антимигранторни потенцијал показује *P. linteus* + Лиганд 1.

**Графикон 17.** Миграторни потенцијал SW-480 ћелија након котретмана *P. linteus* и хемијским једињењима (КТ-0h). А-абсорбанце (OD); Б - OD/број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Поређењем добијених резултата миграторног потенцијала за нетретирани (контролне) ћелије, уочава се да НСТ-116 ћелије имају значајно већи миграторни потенцијал у односу на SW-480

ћелије. Сви третмани показују јаче антимигранторне ефекте на НСТ-116 ћелијама, у односу на SW-480 ћелије, где је запажен и промигранторни ефекат појединих третмана. Најјачи антимигранторни ефекат показују испитивана хемијска једињења, затим екстракти лишајева, затим екстракти гљива на НСТ-116 ћелијама. У SW-480 ћелијској линији, третмани испитиваним хемијским једињењима показују антимигранторни ефекат, док третмани екстрактима гљива и лишајева показују чак и промигранторни ефекат (у зависности од врсте и дозе).

Значајно је истаћи да су појединачни третмани са најјачим антимигранторним ефектима приближно истог интензитета на обе ћелијске линије. Поређењем резултата свих испитиваних супстанци у појединачним третманима на мигранторни потенцијал НСТ-116 ћелија уочава се да екстракт гљиве *L. edodes* показује најјачи антимигранторни ефекат у појединачним третманима, док на мигранторни потенцијал SW-480 ћелија најјачи ефекат има екстракт лишаја *P. furfuracea*.

Поређењем резултата свих испитиваних супстанци у појединачним и котретманима, уочава се да комбиновани третмани имају јачи ефекат на снижење мигранторног потенцијала НСТ-116 и SW-480 ћелија. Котретман екстрактом *P. linteus* и Лигандом 1 показује најјачи антимигранторни потенцијал на обе ћелијске линије.

## 2.2. Ефекти третмана на протеинску експресију маркера миграције ћелија

У овом делу истраживања, испитивана је протеинска експресија антимигранторних/промигранторних маркера и маркера ћелијске адхезије/ комуникације. У том смислу, испитивана је протеинска експресија епителијалног маркера Е-кадхериана и цитоплазматског  $\beta$ -катенина, затим кључних протеина Wnt сигналног пута (Frizzled 7 рецептор и нуклеарни  $\beta$ -катенин), као и мезенхимски маркери (Н-кадхерин и виментин), имунофлуоресцентном методом. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, а квантификација флуоресценце извршена је уз помоћ ImageJ софтверског пакета. Сви резултати су очитавани након 24 сата третмана.

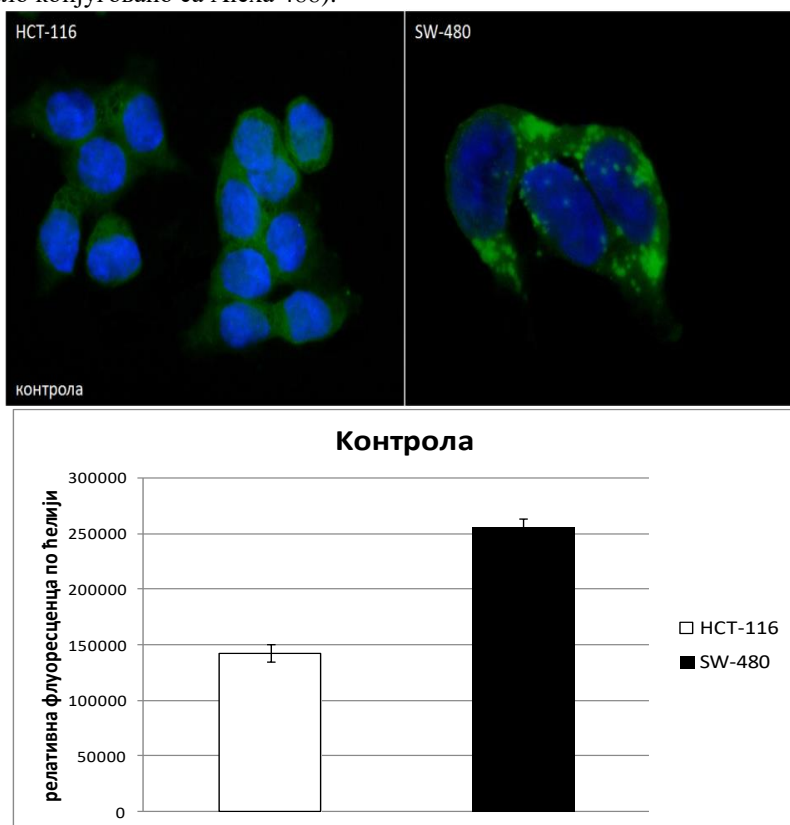
### 2.2.1. Протеинска експресије Е-кадхерина

Протеинска експресија Е-кадхерина, конститутивне компоненте адхерентних међућелијских веза, детектована је имунофлуоресценцом у контролним и третираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама CRC. Ћелије су третиране појединачним и комбинованим третманима у две сублеталне дозе (10 и 50  $\mu$ M хемијских супстанци, односно 10 и 50  $\mu$ g/mL екстраката гљива и лишајева).

Примарна локација Е-кадхерина у здравим ћелијама је у оквиру ћелијске мембране, у међућелијским везама. У ћелијама канцера са израженим мигранторним потенцијалом, Е-кадхерин је првенствено лоциран у цитоплазми.

Експресија Е-кадхерина је детектована у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама а микрографије и квантификација флуоресценце протеинске експресије Е-кадхерина приказани су на **Слици 3**. На микрографијама се уочава да је протеинска експресија Е-кадхерина већа у SW-480 ћелијама у односу на НСТ-116 ћелије. Цитоплазматска локализација Е-кадхерина у обе ћелијске линије је потврђена, при чему је у SW-480 ћелијама овај протеин присутан у накупинама, док је у НСТ-116 ћелијама хомогено распоређен у цитоплазми. Поређењем резултата интензитета флуоресценце добијених из нетретираних (контролних) ћелија уочава се да је протеинска експресија Е-кадхерина већа у SW-480 ћелијској линији (**Слика 3**, графички приказ), што је у корелацији са њиховим нижим миграторним потенцијалом (**Графикон 9**).

**Слика 3.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



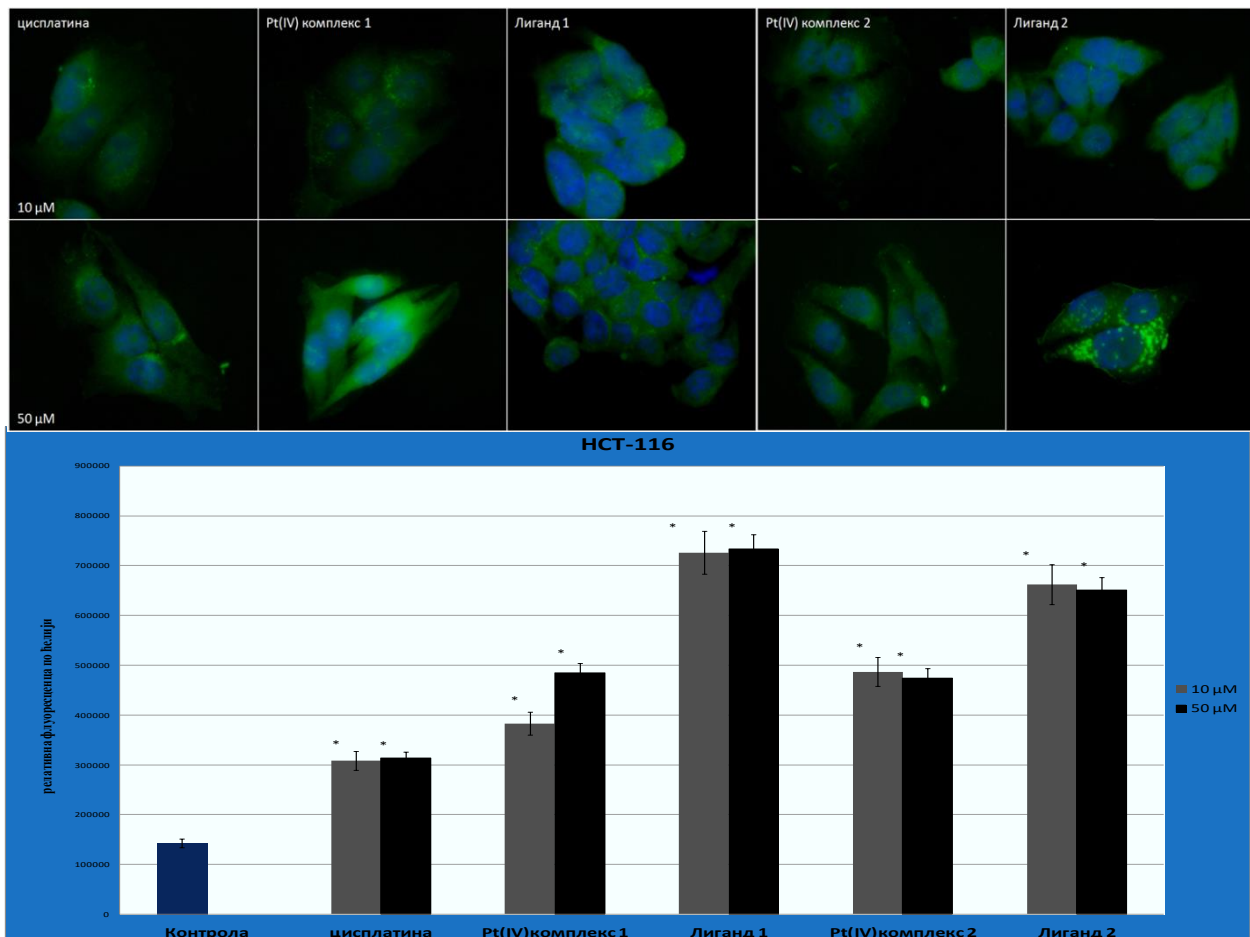
Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

### Протеинска експресије Е-кадхерина у третираним НСТ-116 ћелијама

На Сликама 4-7 приказани су резултати протеинске експресије Е-кадхерина (микрографије и графички приказ квантификације флуоресценце) у НСТ-116 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима.

На приказаним микрографијама (Слика 4) уочава се да је протеинска експресија Е-кадхерина значајно повећана у НСТ-116 ћелијама третираним испитивним хемијским једињењима. Повећање протеинске експресије Е-кадхерина парти тренд: цисплатина < Pt(IV) комплекс 1 и 2 < Лиганд 1 и 2 (Слика 4). Највеће повећање уочено је у третману лигандима, што је у корелацији са њиховим антимигранторним ефектом. Третман Лигандом 1 доводи до значајног повећања протеинске експресије Е-кадхерина са релокацијом Е-кадхерина у међућелијске везе и редукције броја протрузија (Слика 4).

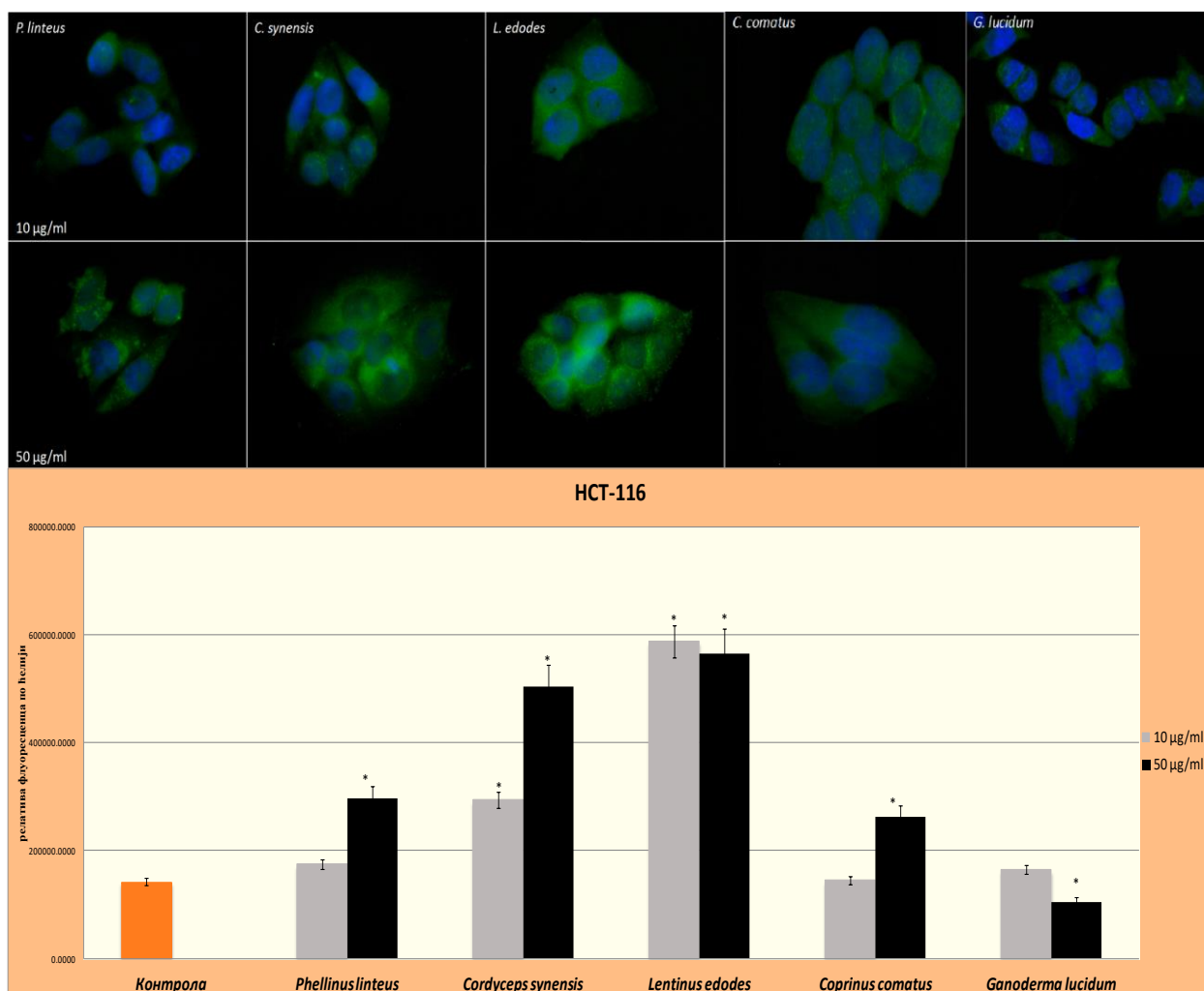
Слика 4. Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати су интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

На приказаним микрографијама (Слика 5) уочава се да је Е-кадхерин, осим на мембранама и међућелијским везама, присутан и у цитоплазми свих НСТ-116 ћелија третираним екстрактима гљива. Третмани екстрактима *P. linteus* (50 µg/mL), *C. synensis*, *L. edodes* и *C. comatus* (50 µg/mL) показују значајно повећање протеинске експресије Е-кадхерина са релокацијом Е-кадхерина у међућелијске везе и редукијом броја протрузија, што корелира са значајним антимиграторним ефектима испитиваних екстраката гљива. У третману екстрактом *C. comatus* (10 µg/mL) дошло је до релокације Е-кадхерина без повећања протеинске експресије (Слика 5). Протеинска експресија Е-кадхерина смањена је у третману екстрактом гљиве *G. lucidum* (Слика 5).

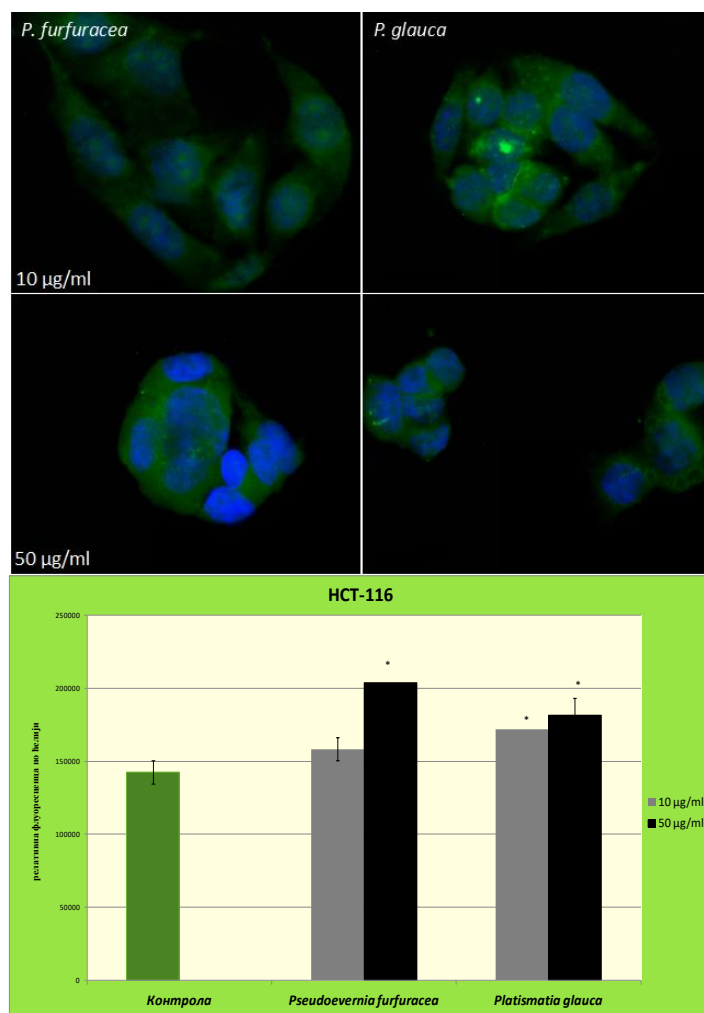
**Слика 5.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488)



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Е-кадхерин у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева је претежно лоциран у цитоплазми док је једино третман екстрактом *P. glauca* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) узроковао делимично релокацирање Е-кадхерина у међућелијске везе (Слика 6). Број протрузија је редукован у третманима вишим концентрацијама (Слика 6). Статистички значајно повећање експресије Е-кадхерина добијено је у третманима *P. furfuracea* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и *P. glauca*, а највише је повећан у ћелијама третираним екстрактом *P. furfuracea* у концентрацији 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Слика 6, графички приказ).

**Слика 6.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).

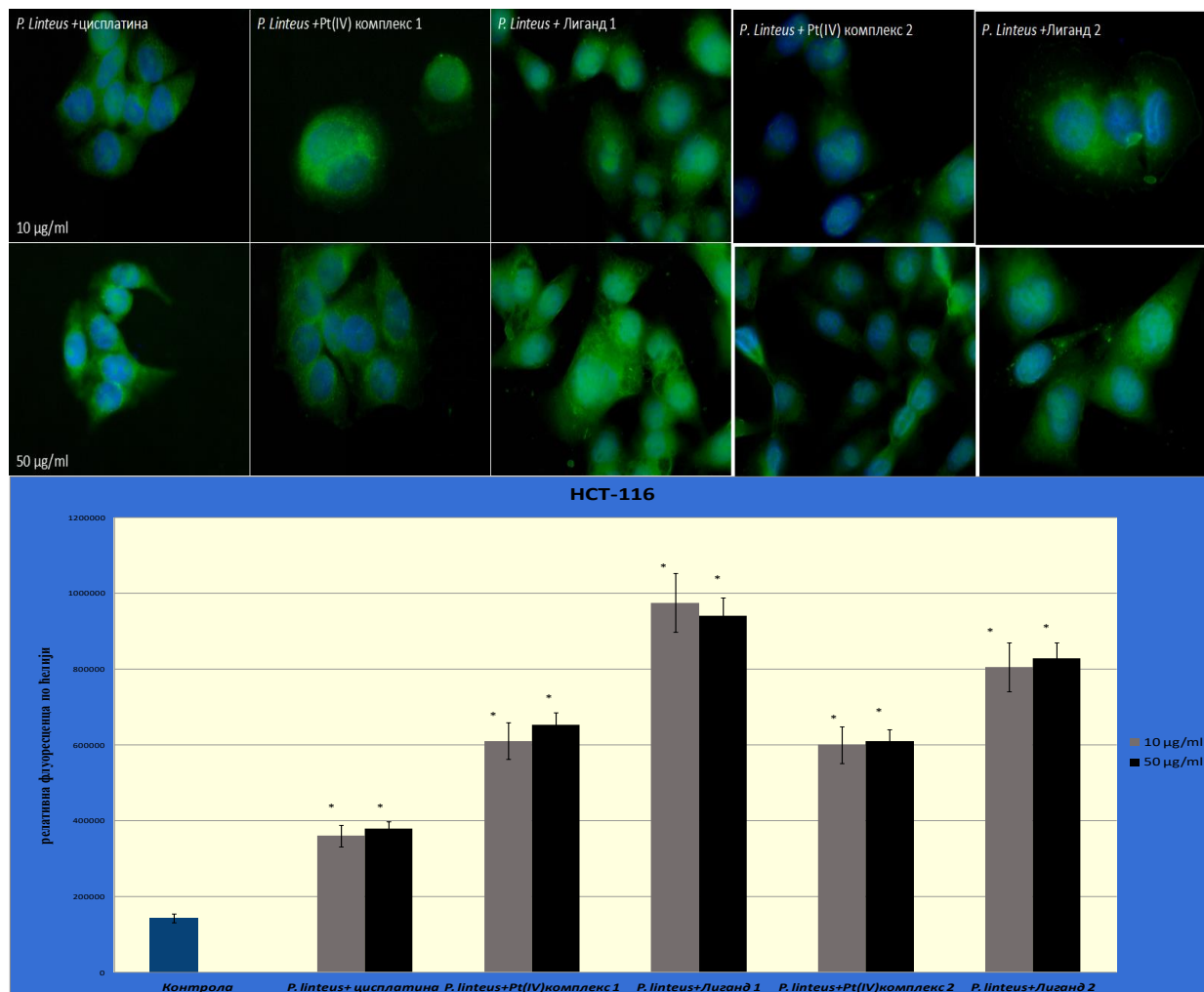


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.



На репрезентативним микрографијама (Слика 7) уочава се да је Е-кадхерин у НСТ-116 ћелијама претежно распоређен у цитоплазми, без релокације Е-кадхерина у међућелијске везе, након комбинованих третмана (КТ-0h) са *P. linteus* и хемијским једињењима. Број и величина протрузија је редукован у нижим концентрацијама *P. linteus* (Слика 7). Сви КТ-0h изазивају значајно и дозно зависно повећање експресије Е-кадхерина, у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије. Протеинска експресија Е-кадхерина у КТ-0h прати тренд: *P. linteus* + цисплатина < *P. linteus* + Pt(IV) комплекси 1, 2 < *P. linteus* + Лиганди 1, 2, при чему је најбољи ефекат показао је Лиганд 1 у комбинованом третману (Слика 7, графички приказ).

**Слика 7.** Протеинска експресија Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488)

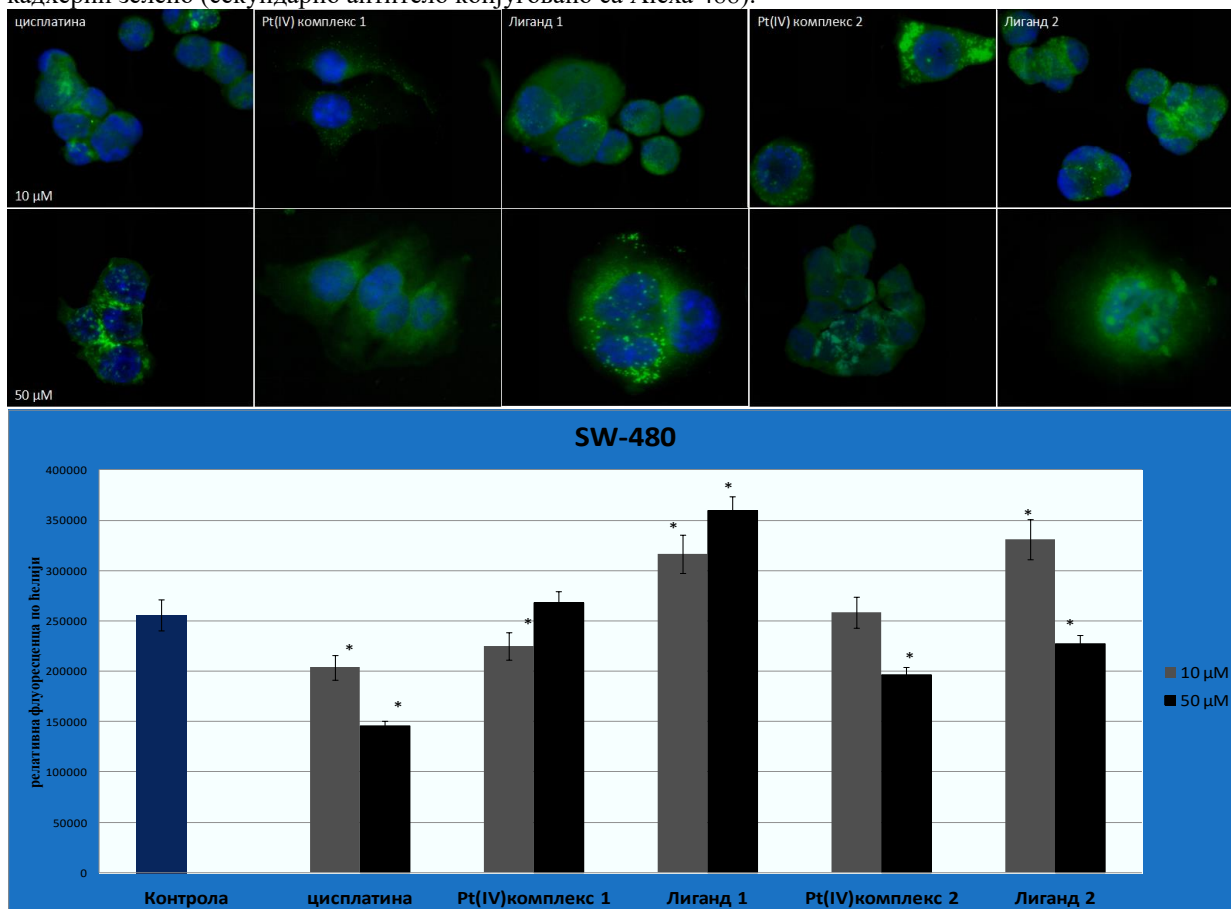


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности

### Протеинска експресије Е-кадхерина у третираним SW-480 ћелијама

На сликама 8-11 приказане су микрографије протеинске експресије Е-кадхерина и графички приказ квантификације флуоресценце у SW-480 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима. Цитоплазматска локација Е-кадхерина је задржана у SW-480 ћелијама третираним испитиваним хемијским једињењима. Е-кадхерин је делимично релоциран у међућелијске везе у третманима цисплатином, Лигандом 1 и Лигандом 2 и Pt (IV)комплексом 2 (50  $\mu\text{M}$ ) са очљивом редукцијом броја протрузија (Слика 8). Третмани Лигандом 1 и Лигандом 2 (10 $\mu\text{M}$ ) изазивају значајно повећање, док третмани Pt(IV) комплексима и цисплатином изазивају смањење Е-кадхерина у SW-480 ћелијама (Слика 8, графички приказ). Најјачи ефекат показује третман Лигандом 1 са највећим повећањем експресије Е-кадхерина, релокацијом у међућелијске везе и редукцијом броја протрузија, што је у складу са најјачим антимиграторним ефектом (Графикон 14).

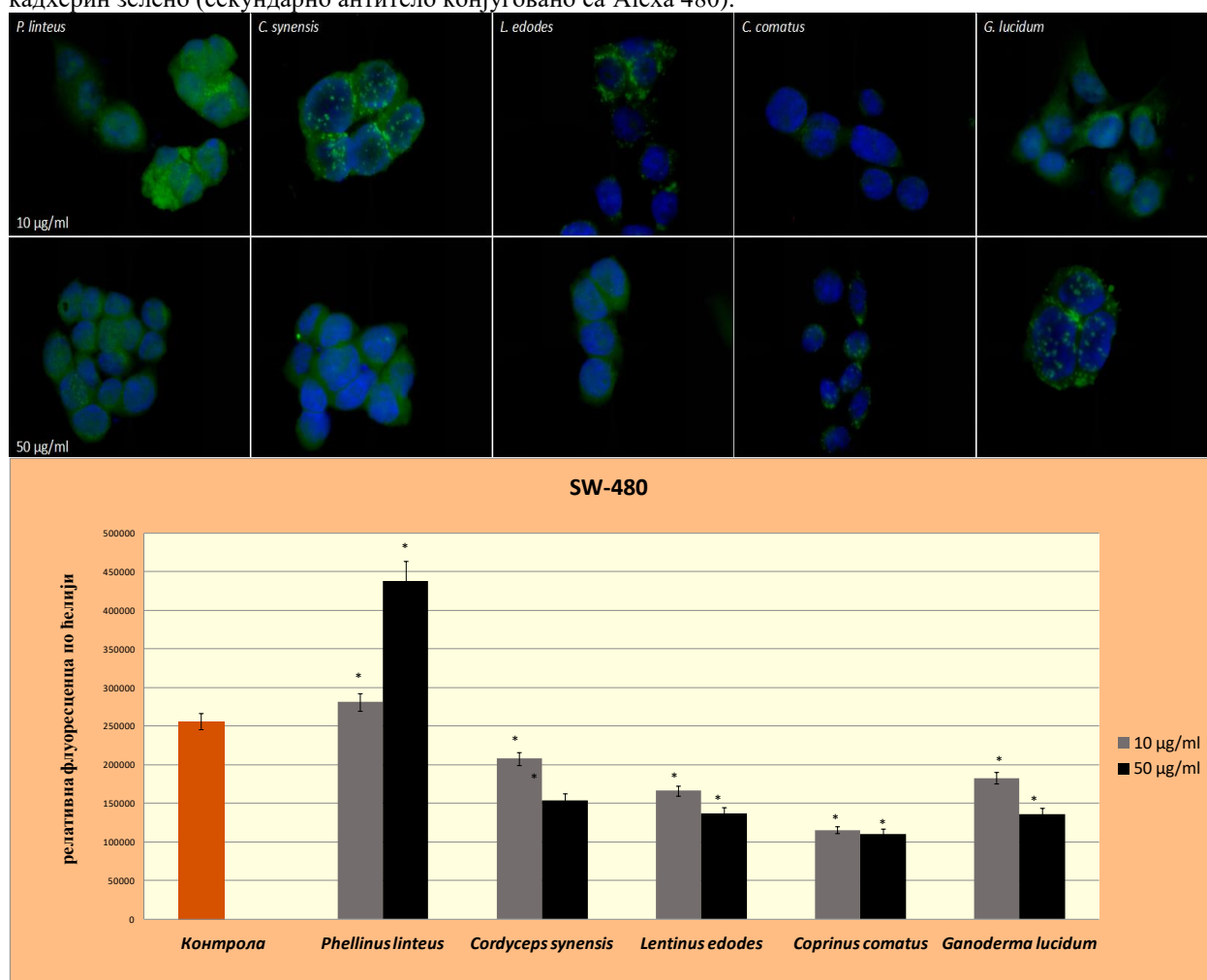
**Слика 8.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности

Е-кадхерин је лоциран првенствено у цитоплазми SW-480 ћелија третираних испитиваним екстрактима гљива (Слика 9). Релоцирање Е-кадхерин у међућелијске везе је изазвали су третмани екстрактима *C. synensis* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и *G. lucidum* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Редукција броја протрузија уочљива је у свим третманима, осим са *G. lucidum* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Третмани екстрактом *P. linteus* изазивају повећање експресије Е-кадхерина, док остали третмани (*C. synensis*, *L. edodes*, *C. comatus* и *G. lucidum*) у испитиваним концентрацијама снижавају његову експресију у односу на нетретиране SW-480 ћелије (Слика 9, графички приказ).

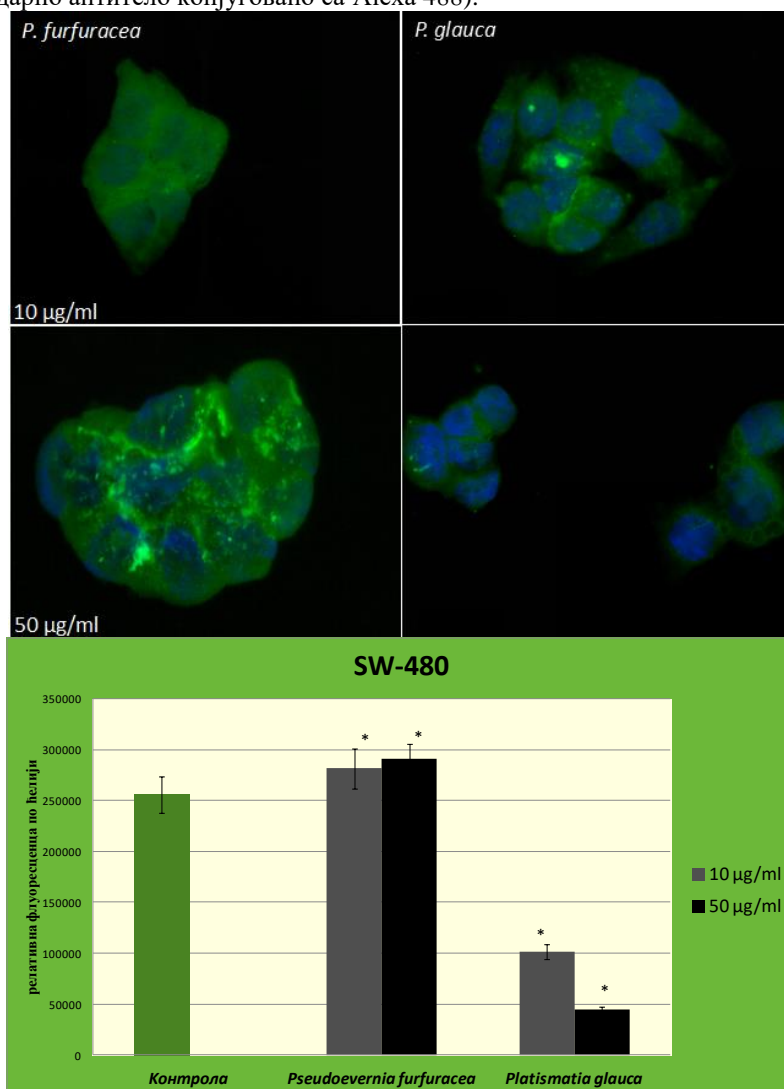
**Слика 9.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 480).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Након 24 сата трајања третмана екстрактом лишаја *P. furfuracea* долази до дозно зависног, статистички значајног повећања експресије Е-кадхерина у SW-480 ћелијама, са редукцијом броја протрузија и значајном релокацијом Е-кадхерина у међућелијске везе (Слика 10), што је у корелацији са антимигранторним ефектима овог екстракта (Графикон 16). Третмани екстрактом *P. glauca* снижавају протеинску експресију Е-кадхерина (Слика 10, графички приказ), концентрација 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  релоцира Е-кадхерин и у међућелијске везе, док виша доза екстракта узрокује агрегацију ћелија са редукцијом броја протрузија у односи на контролне SW-480 ћелије (Слика 10).

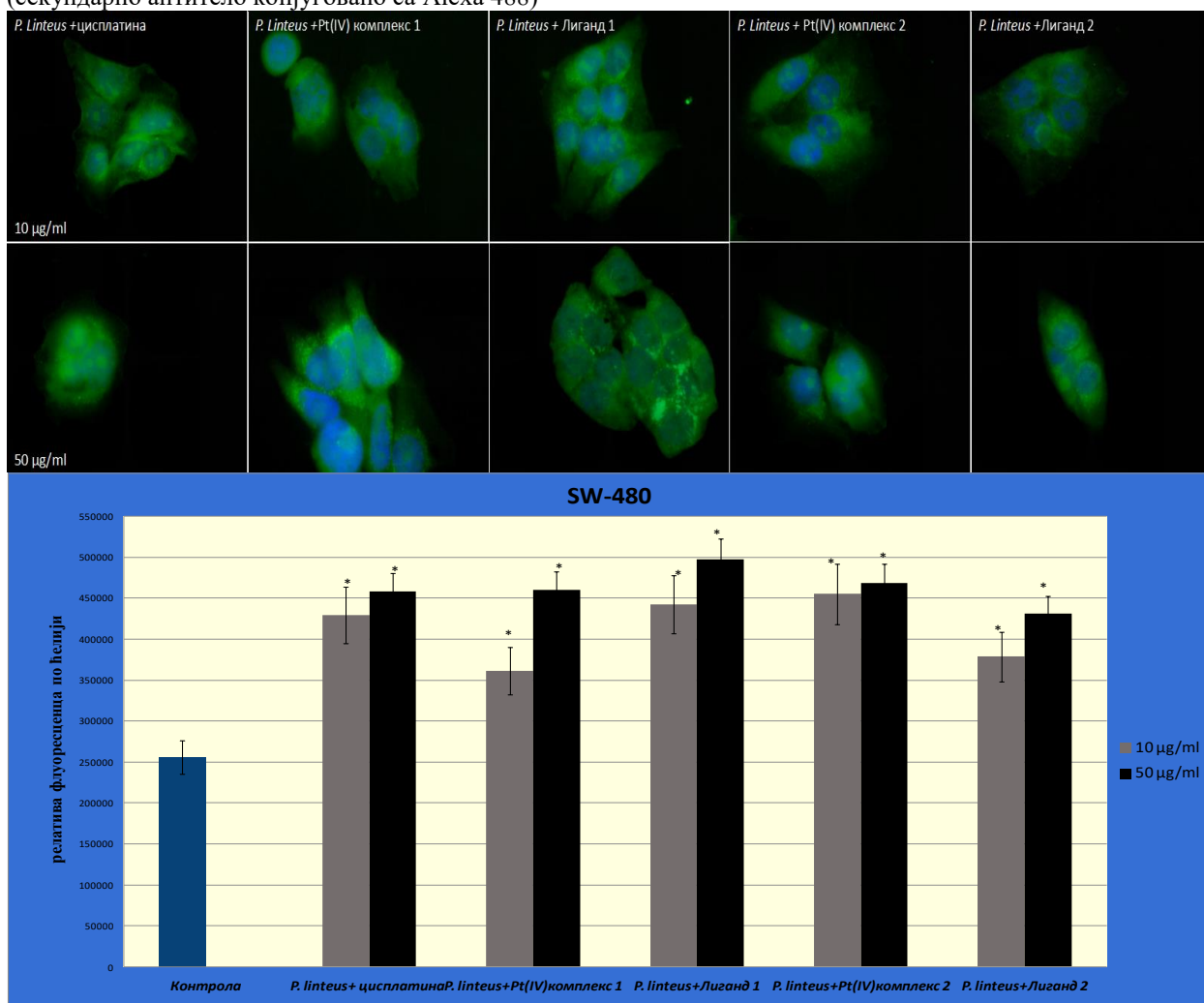
**Слика 10.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Комбиновани третмани (КТ-0h за *P. linteus* и хемијска једињења) индукују повећање експресије Е-кадхерина у SW-480 ћелијама, са цитоплазматском локацијом овог протеина (Слика 11). КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 (50 µg/mL + 10 µM) доводи до највећег повећања експресије Е-кадхерина, са локацијом Е-кадхерина у међућелијским везама и уз редукцију броја протрузија (Слика 11, графички приказ), што је у складу са антмиграторним ефектима овог комбинованог третмана (Графикон 17).

**Слика 11.** Протеинска експресија Е-кадхерина у SW-480 ћелијама након котретмана. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Е-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488)



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

Цитоплазматска локација Е-кадхерина је очувана у свим третманима испитиваним хемијским једињењима и екстрактима из природних извора (појединачним и КТ-0h) у обе ћелијске линије. Цитоплазматска локација Е-кадхерина у третираним ћелијама корелира са чињеницом да се ради о

карциномским ћелијским линијама. Редукција броја протрузија са релокацијом Е-кадхерина у међућелијске везе и повећањем његове експресије корелира са антимигранторним потенцијалом испитиваних третмана.

Поређењем добијених резултата протеинске експресије Е-кадхерина за све испитиване третмане на обе ћелијске линије, уочава се да НСТ-116 ћелије имају значајно већу протеинску експресију Е-кадхерина у свим третманима, у односу на SW-480 ћелије. С тим у вези можемо закључити да су сви испитивани третмани показали јачи ефекат на експресију Е-кадхерина у НСТ-116 ћелијама, него у SW-480 ћелијама.

Добијени резултати за експресију Е-кадхерина у појединачним третманима на НСТ-116 ћелијама, прате тренд: хемијска једињења > екстракти гљива > екстракти лишјајева. Поређењем ефеката на SW-480 ћелијској линији уочава се да третмани испитиваним хемијским једињењима повећавају експресију, док третмани екстрактима (изузев *P. linteus* и *P. furfuracea*) показују смањење протеинске експресије Е-кадхерина, што је у корелацији са ефектима на миграторни потенцијал ових третмана.

Лиганд 1 индукује највеће повећање експресије Е-кадхерина, поређењем резултата свих појединачних третмана на НСТ-116 ћелијама, док на протеинску експресију Е-кадхерина у SW-480 ћелијама, најјачи ефекат има екстракт гљиве *P. linteus*.

КТ-0h имају јачи ефекат у односу на појединачне третмане у обе испитиване ћелијске линије, а КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 показује најизразитије повећање протеинске експресије Е-кадхерина у обе испитиване ћелијске линије.

### 2.2.2. Протеинска експресија $\beta$ -катенина

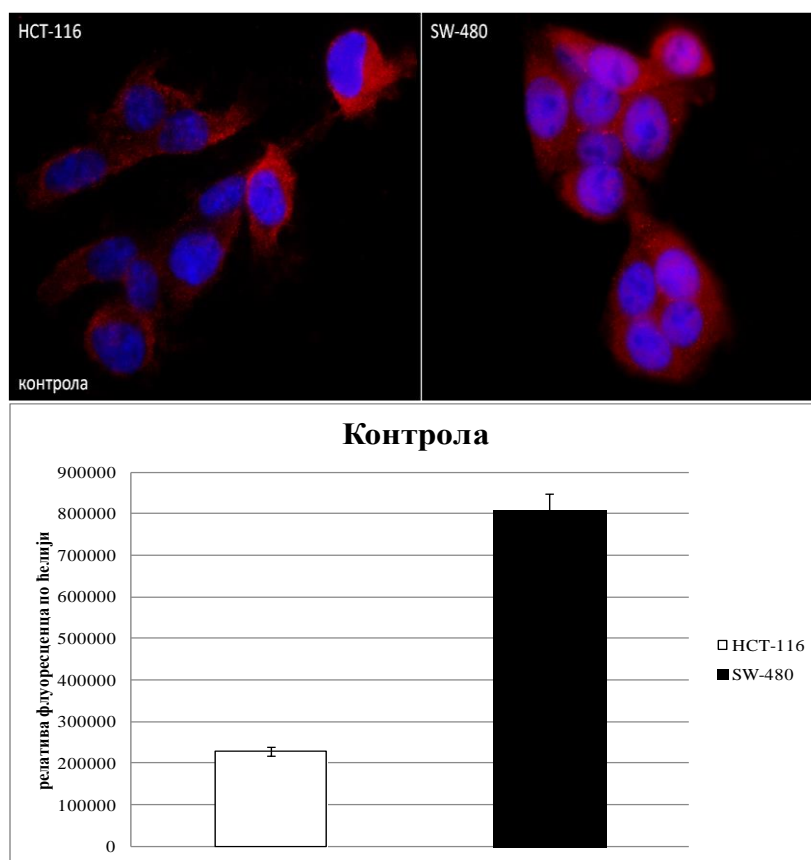
Протеинска експресија  $\beta$ -катенина, конститутивне компоненте адхерентних међућелијских веза и главног медијатора Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута, детектована је имунофлуоресценцом. Протеинска експресија  $\beta$ -катенина испитивана је у два пула, цитоплазматски и нуклеарни у контролним и третираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Ћелије су третиране појединачним третманима у две сублеталне дозе (10 и 50  $\mu$ M хемијских супстанци, односно 10 и 50  $\mu$ g/mL екстраката гљива и лишјајева) и котретманима (КТ-0 h). Време трајања третмана је 24 сата.

Као конституент ћелијских веза,  $\beta$ -катенин је у здравим ћелијама лоциран интрацелуларно уз ћелијску мембрану, без присуства у цитоплазми и једру, док је у промигранторним ћелијама карцинома његова локација цитоплазматска и нуклеарна.

### 2.2.2.1. Протеинска експресија цитоплазматског $\beta$ -катенина

Цитоплазматска фракција  $\beta$ -катенина је експримирана у обе испитиване ћелијске линије. Са микрографија се уочава да је цитоплазматски  $\beta$ -катенин више присутан у SW-480 ћелијама, које расту у калстерима што је одлика ове ћелијске линије, у односу на HCT-116 које су дисперговане са већим протрузијама (Слика 12), што је у корелацији са њиховим миграторним потенцијалом. Интензитет протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина је значајно виши у SW-480 ћелијама (Слика 12, графички приказ).

**Слика 12.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у HCT-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

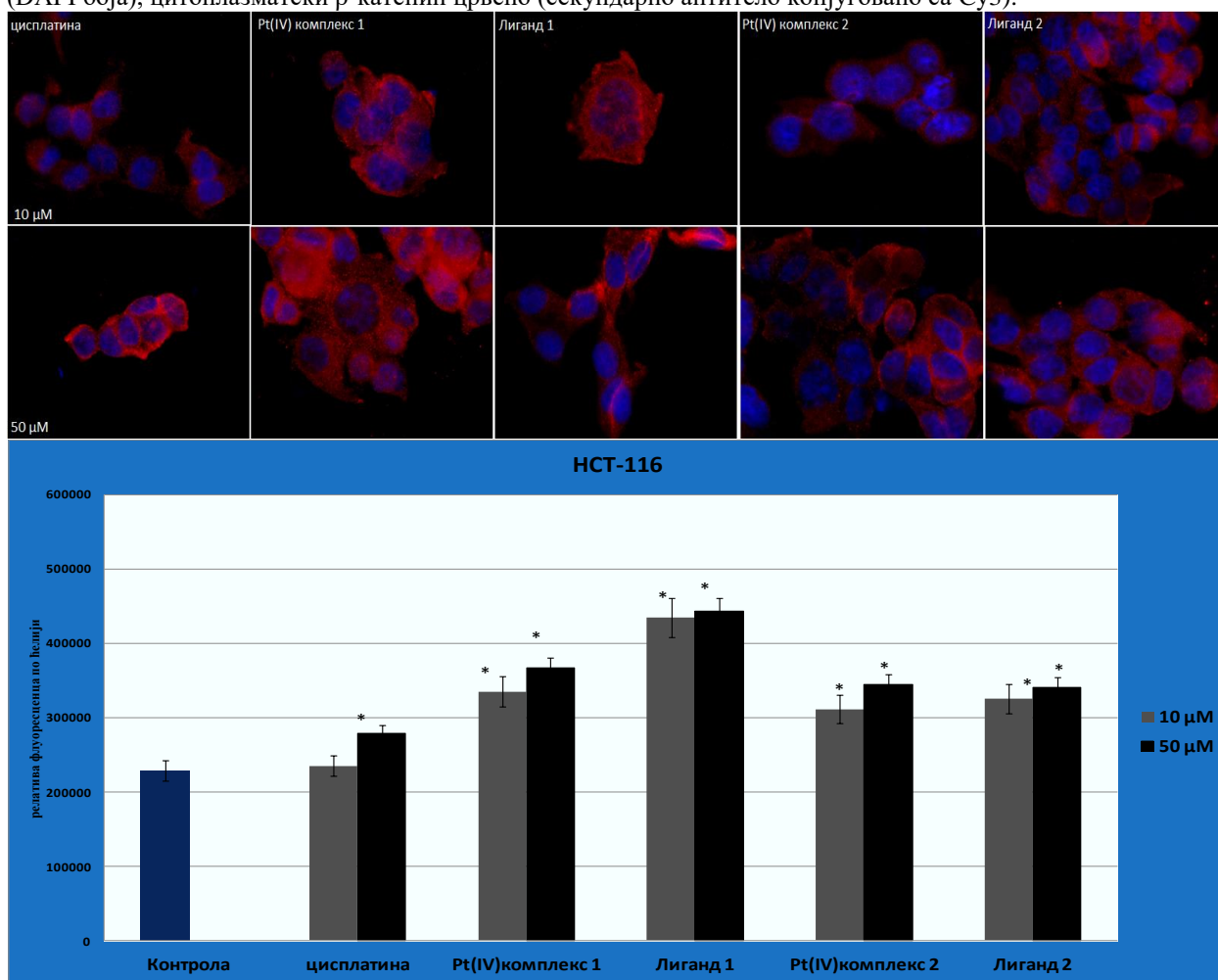


**Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у третираним НСТ-116 ћелијама**

На сликама 13-16 приказана је протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина (репрезентативне микрограгије и графички приказ квантификације флуоресценце) у НСТ-116 ћелијама третираним појединачним и КТ-0h.

Третмани хемијским једињењима повећавају агрегацију ћелија и успостављање међућелијских веза, са повећањем цитоплазматског  $\beta$ -катенина и приметном релокацијом у међућелијске везе (Слика 13). Третман Лигандим 1 је имао најјачи утицај на повећање протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина (Слика 13, графички приказ), што одговара његовим антимигранторним ефектима (Графикон 10).

**Слика 13.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

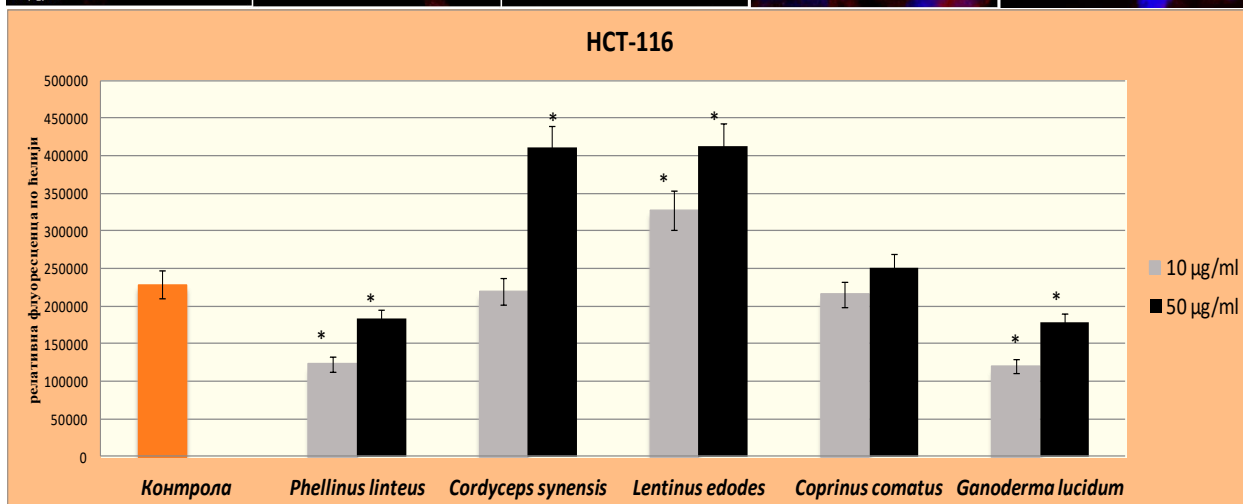
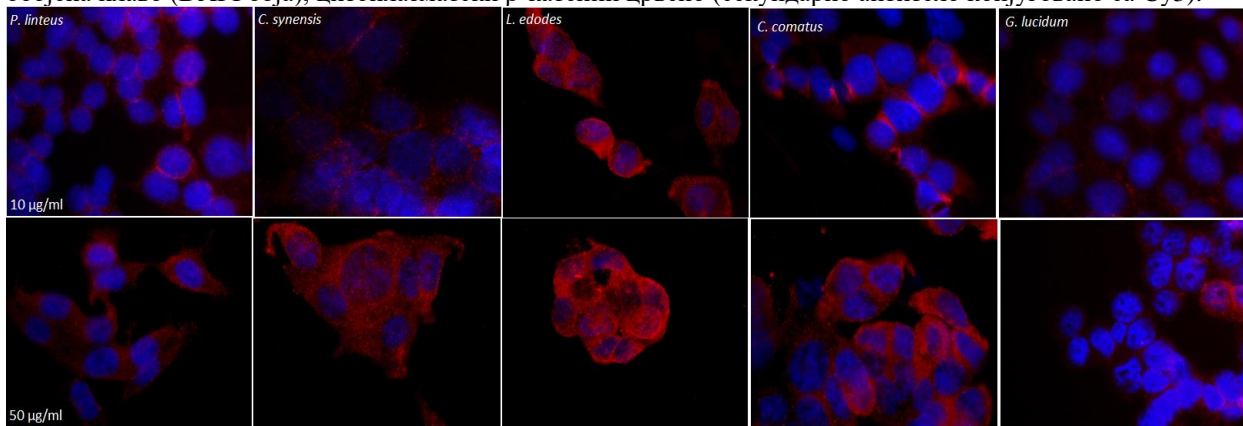


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.



У НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива, цитоплазматска фракција  $\beta$ -катенина је очувана (Слика 14). Третмани *C. synensis* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и *L. edodes* (10 и 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) изазивају дозно зависно, статистички значајно, повећање протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина, у односу на нетретиране ћелије (Слика 14, графички приказ), уз делимично присуство  $\beta$ -катенина у међућелијским везама и евидентну агрегацију ћелија са редукцијом броја и величине протрузија (Слика 14, микрографије). Третмани екстрактима *P. linteus* и *G. lucidum* показују значајно смањење интензитета експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина (Слика 14, графички приказ). У свим третманима (осим *P. linteus*, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) долази до агрегације ћелија са чвршћим успостављањем међућелијских веза, што корелира са антимигранторним ефектима ових третмана (Графикон 11). У нижим концентрацијама (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) екстраката *P. linteus*, *C. synensis*, *C. comatus*, *G. lucidum* уочава се лоцирање цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијске везе (Слика 14).

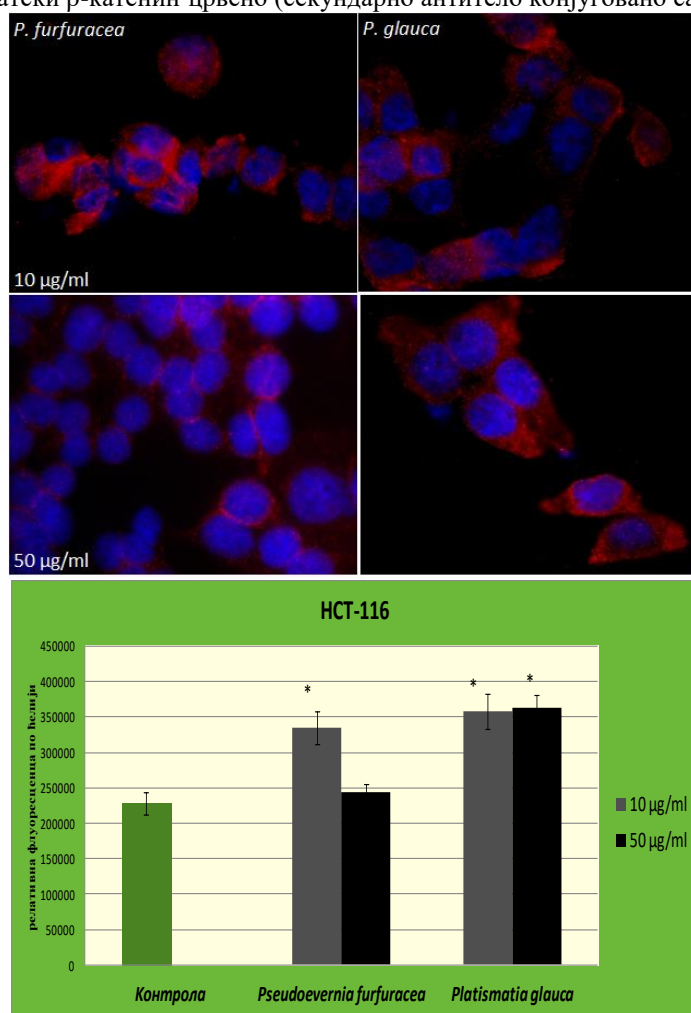
**Слика 14.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима лишајева узроковали су повећање протеинске експресије цитоплазматске фракције  $\beta$ -катенина (Слика 15), уз агрегацију третираних НСТ-116 ћелија, а третман *P. furfuracea* у концентрацији 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  изазвао је присуство цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијским везама (Слика 15). Екстракти *P. furfuracea* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и *P. glauca* индукују статистички значајно повећање експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина, у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије (Слика 15, графички приказ).

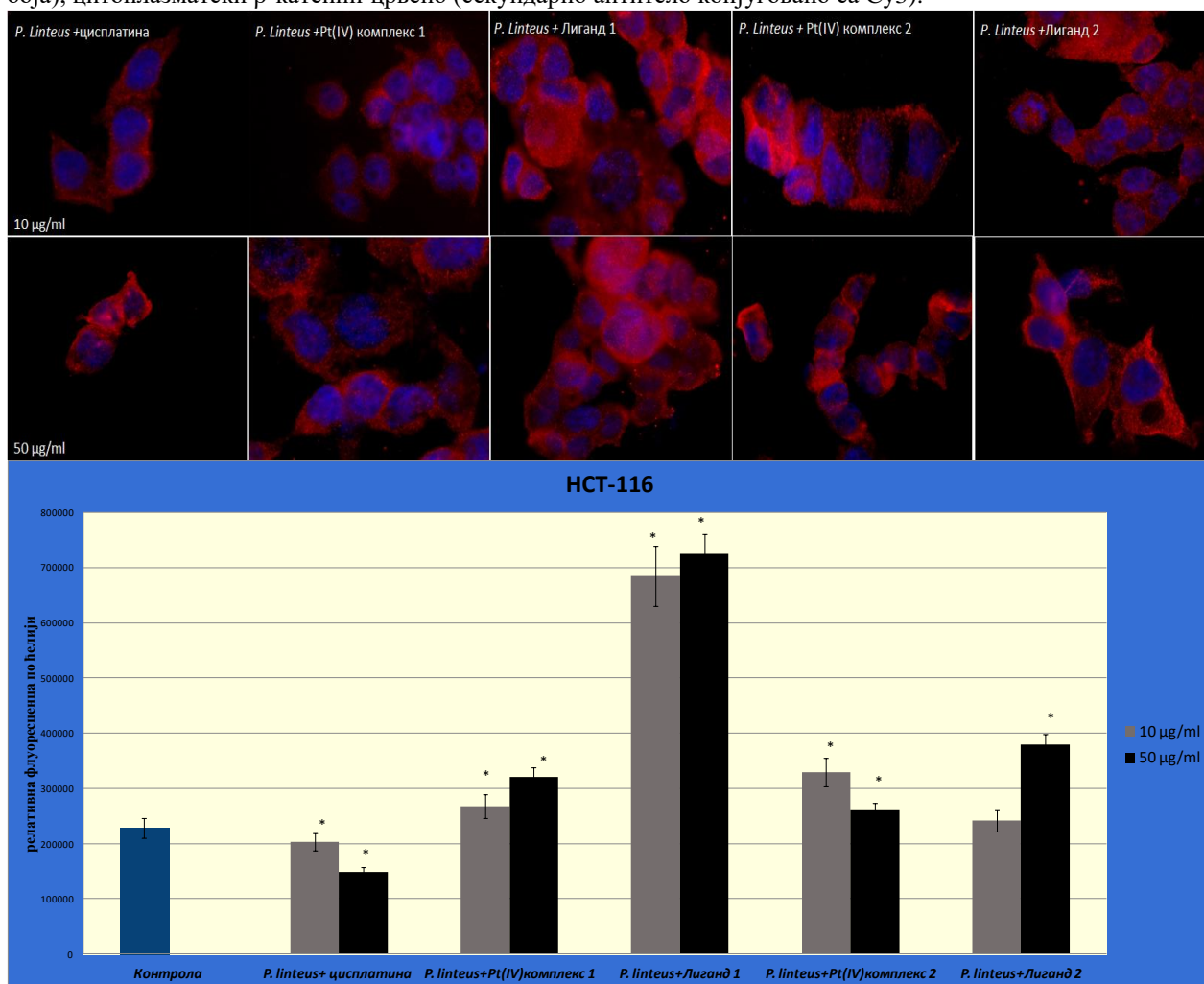
**Слика 15.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Цитоплазматска фракција  $\beta$ -катенина очувана је НСТ-116 ћелијама након комбинованих третмана (Слика 16). Сви КТ-0h (осим у *P. linteus* + цисплатина) индукују повећање експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина, у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије (Слика 16, графички приказ). Најбољи ефекат показао је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, уз присуство цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијским везама (Слика 16). Агрегација ћелија и редукција броја протрузија уочена је у свим КТ-0h, осим у КТ-0h са цисплатином и Лигандом 2 (Слика 16).

**Слика 16.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$  катенина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).

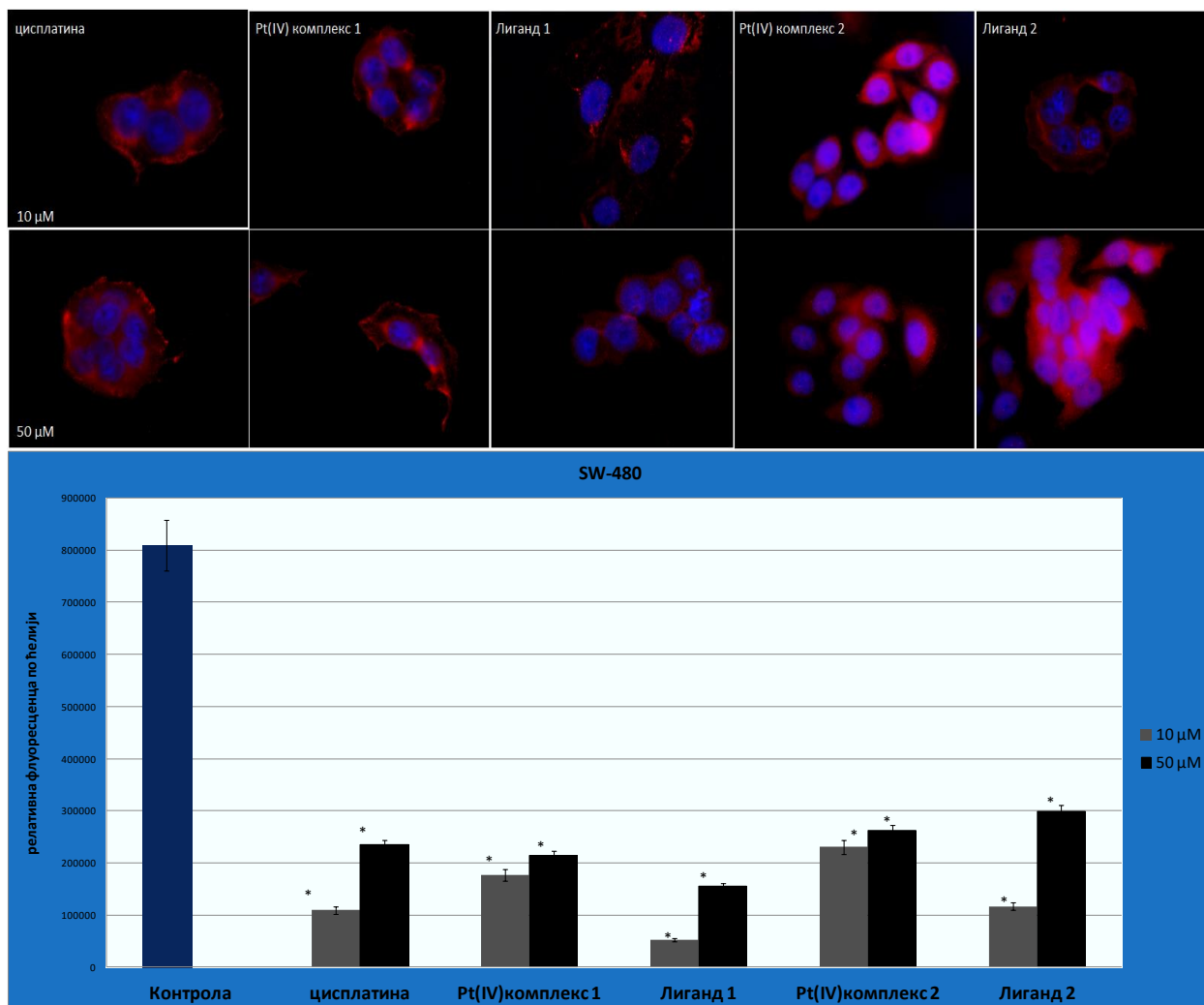


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

**Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у третираним SW-480 ћелијама**

На сликама 17-20 приказана је протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина (микрографије и графички приказ квантификације флуоресценце) у појединачним и комбинованим третманима SW-480 ћелија. Испитивана хемијска једињења значајно редукују експресију цитоплазматског  $\beta$ -катенина (Слика 17). Третмани цисплатином, Pt(IV) комплексом 1 и Лигандом 1 (обе концентрације) и Лигандом 2 (10  $\mu$ M), доводе до делимичног лоцирања цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијске везе (Слика 17, микрографије), што је у корелацији са антимигранторним ефектима ових хемијских једињења (Графикон 14). Лиганд 1 индукује најјачу редукацију протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина (Слика 17, графички приказ).

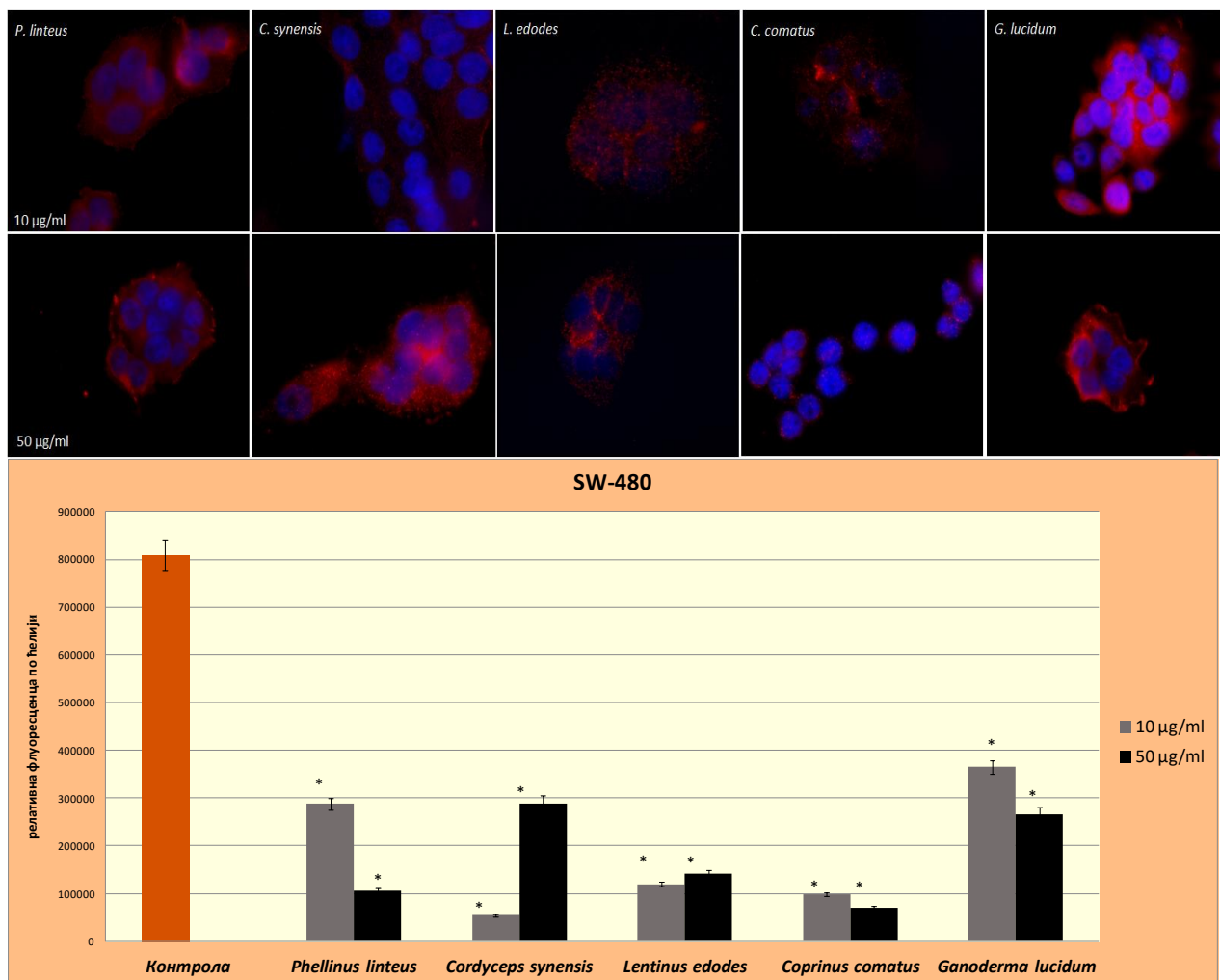
**Слика 17.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима гљива индукују значајно смањење протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама (Слика 18, графички приказ). На микрографијама се уочава да је дошло до агрегације ћелија у свим третманима, као и да екстракти *C. synensis*, *L. edodes* и *C. comatus*, у обе испитиване концентрације, релоцирају цитоплазматски  $\beta$ -катенин у међућелијске везе, док је у осталим третманима овај протеин лоциран у цитоплазми (Слика 18).

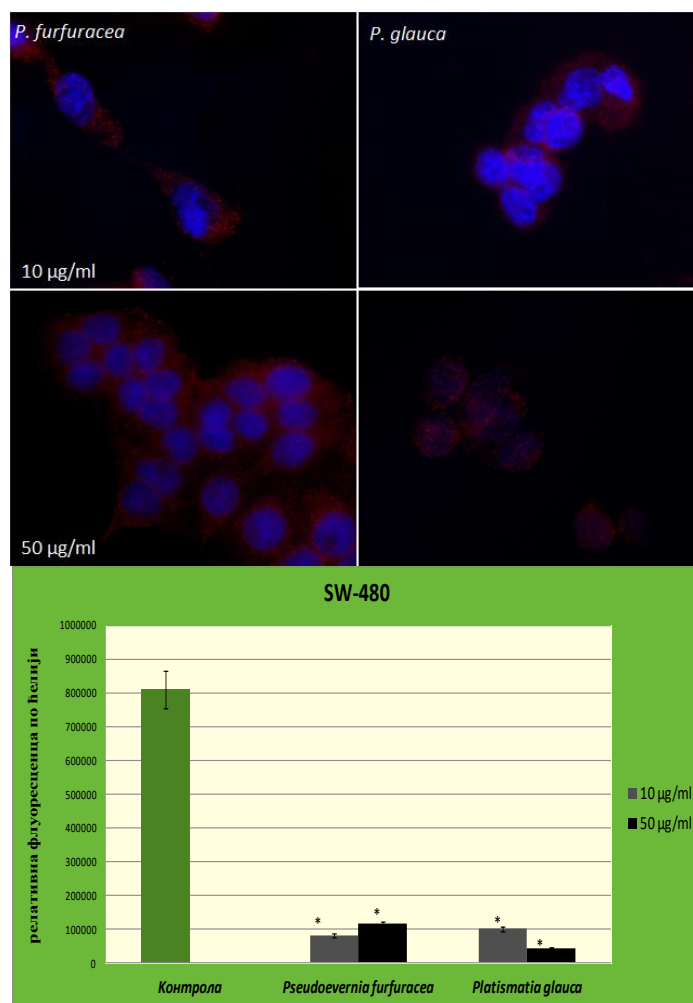
**Слика 18.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима лишајева показују значајно смањење протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина (Слика 19, графички приказ) и дифузни распоред у цитоплазми, без израженог присуства цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијским везама (Слика 19, микрографије). Највећа редукција цитоплазматског  $\beta$ -катенина добијена је у третману екстрактом *P. glauca* у концентрацији 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Слика 19, графички приказ).

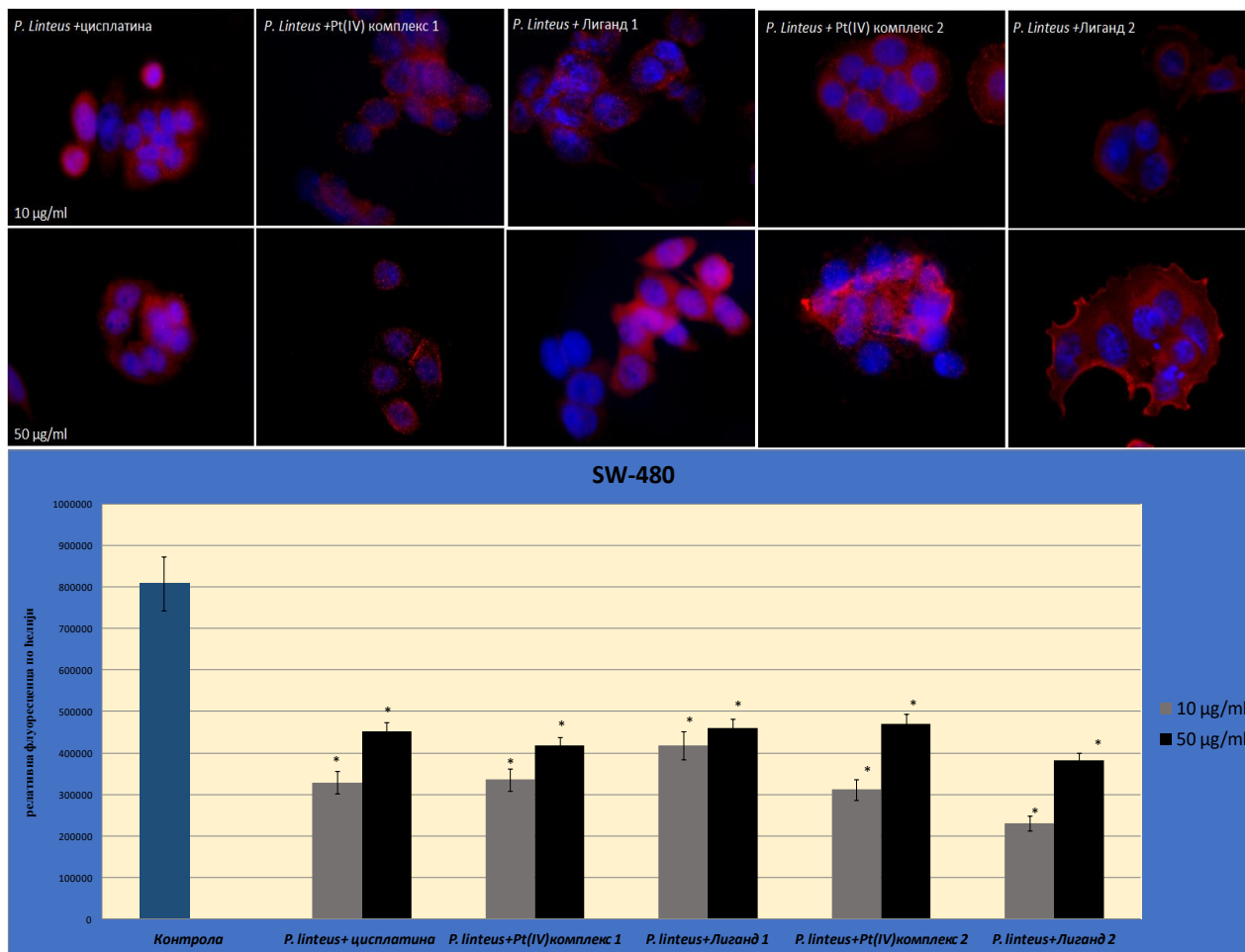
**Слика 19.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Значајно смањење протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина, праћено агрегацијом ћелија, индуковано је свим комбинованим третманима (Слика 20). КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 1, Лиганд 1, Pt(IV) комплекс 2 (у нижим концентрацијама) доводе до релоцирања цитоплазматског  $\beta$ -катенина у међућелијске везе (Слика 20, микрографије).

**Слика 20.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), цитоплазматски  $\beta$ -катенин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина је очувана у свим третманима у обе ћелијске линије, што корелира са чињеницом да се ради о имортализованим ћелијским линијама колоноректалног карцинома. Поређењем добијених резултата протеинске експресије цитоплазматског  $\beta$ -катенина за све испитиване третмане на обе ћелијске линије, уочава се да



НСТ-116 ћелије имају значајно већу експресију овог протеина, у односу на SW-480 ћелије, сходно јачим антимиграторним ефектима испитиваних третмана на НСТ-116 ћелијама и молекуларним карактеристикама ове ћелијске линије. Сви испитивани третмани повећавају протеинску експресију цитоплазмског  $\beta$ -катенина (осим *P. linteus* и *G. lucidum*) на НСТ-116 ћелијској линији, док на SW-480 ћелијама ови третмани индукују смањење цитоплазмског  $\beta$ -катенина.

Експресија цитоплазмског  $\beta$ -катенина у појединачним третманима на обе ћелијске линије, прати тренд: хемијска једињења > екстракти гљива > екстракти лишајева. Поређењем резултата свих појединачних третмана, протеинску експресију цитоплазмског  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама, највише смањује третман екстрактима *P. linteus* и *G. lucidum*, док је на повећање најјаче утицао третман Лигандом 1. Екстракт *P. glauca* у највећој мери редукује протеинску експресију цитоплазмског  $\beta$ -катенина на SW-480 ћелијама.

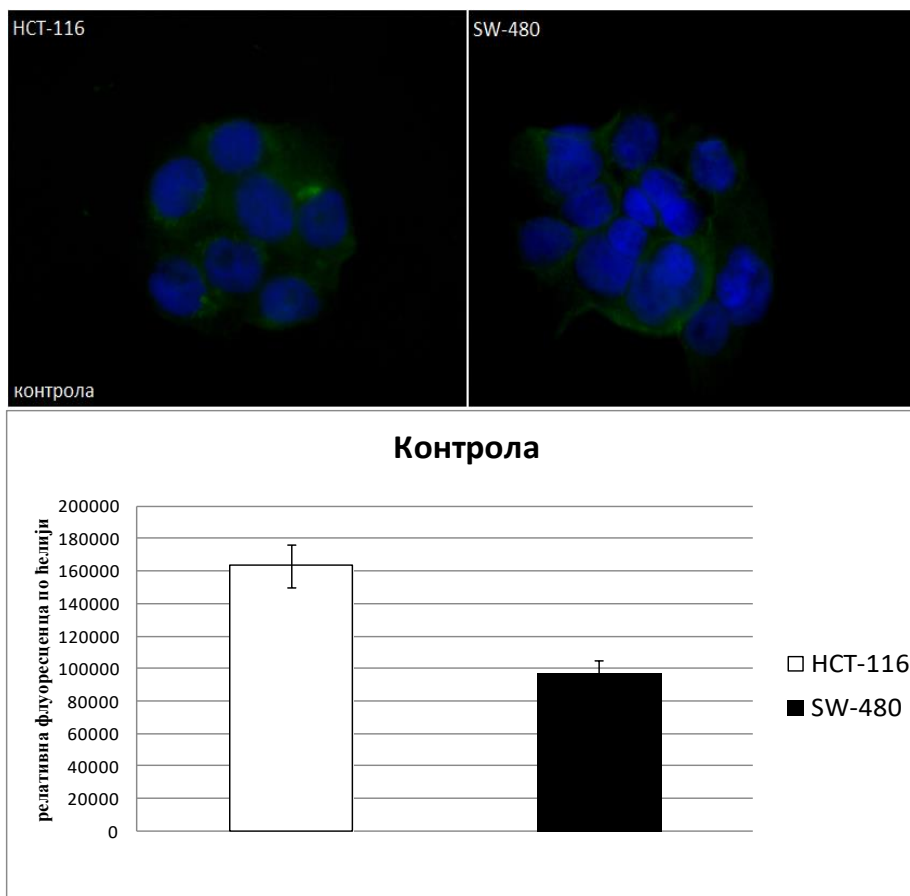
Појединачни третмани индукују јачу редукцију протеинске експресије цитоплазмског  $\beta$ -катенина на SW-480 ћелијама, у односу на КТ-0h. У НСТ-116 ћелијама, значајније повећање цитоплазмског  $\beta$ -катенина индукује КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 у односу на појединачне третмане. Највеће повећање експресије цитоплазмске фракције  $\beta$ -катенина индукује КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 на обе ћелијске линије (у НСТ-116 ћелијама у односу на све појединачне и КТ-0h, док у SW-480 ћелијама у односу на контролне ћелије).

#### 2.2.2.2. Протеинска експресија нуклеарног $\beta$ -катенина

На **Слици 21** приказана је протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина (микрографије и графички приказ интензитета флуоресценце) у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама колоректалног карцинома. Локација нуклеарног  $\beta$ -катенина је у оквиру нуклеуса и цитоплазме. Испитиване ћелијске линије имају изражен пролиферативни и миграторни капацитет, па с тим у вези, изражено присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина, док се у здравим ћелијама целокупни  $\beta$ -катенин деградира у цитоплазми и његово присуство у нуклеусу је строго контролисано. Поређењем резултата интензитета флуоресценце добијених из нетретираних ћелија, уочава се да је протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина већа у НСТ-116 ћелијској линији (**Слика 21**, графички приказ), што је у корелацији са њиховим већим пролиферативним капацитетом и миграторним потенцијалом (**Графикон 9**).



**Слика 21.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

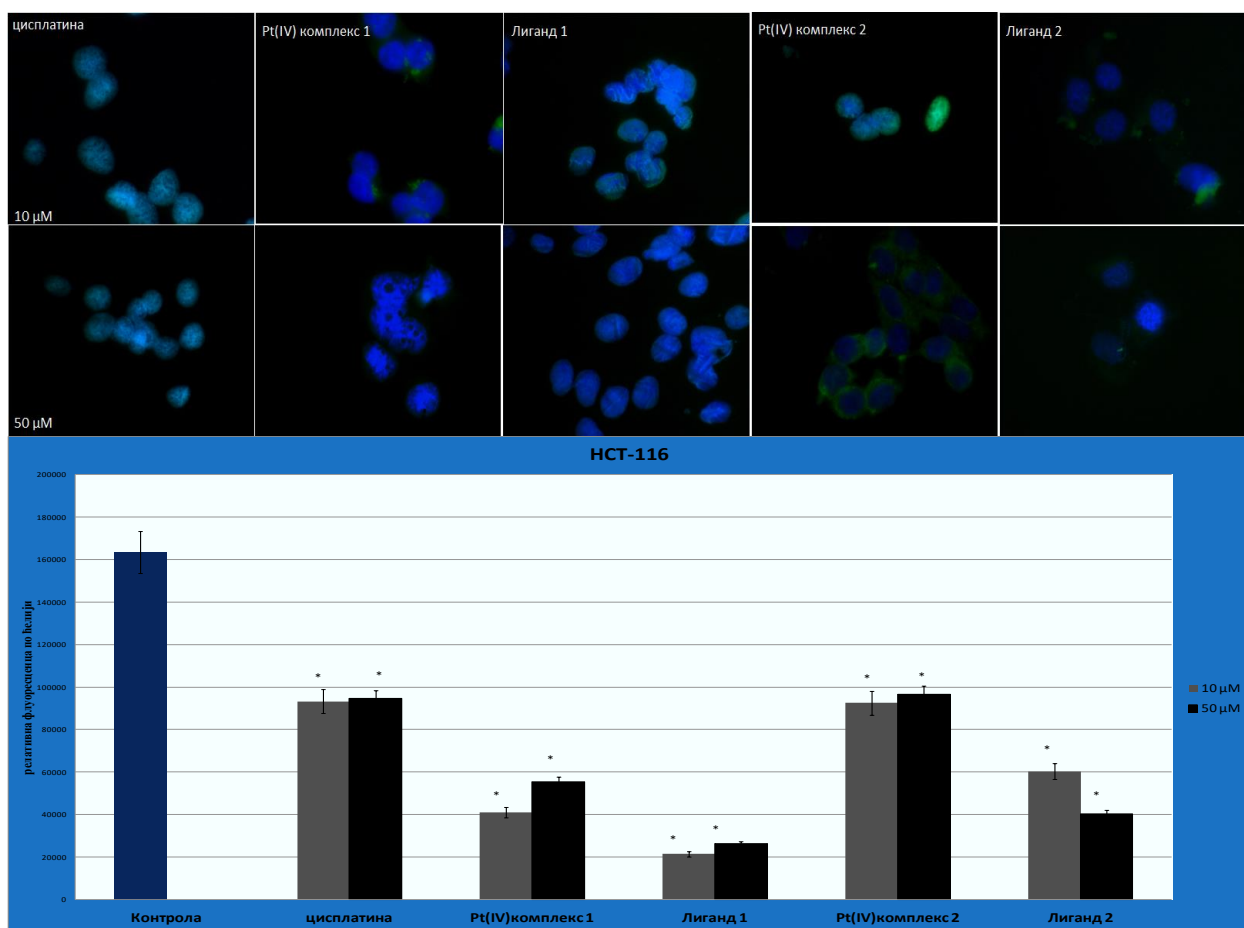
### ***Протеинска експресија нуклеарног $\beta$ -катенина у третираним НСТ-116 ћелијама***

На **сликама 22-25** приказана је протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина (микрографије и графички приказ квантификације флуоресценце) у појединачним и комбинованим третманима на НСТ-116 ћелијској линији.

На приказаним микрографијама (**Слика 22**), у третманима испитиваним хемијским једињењима, уочава се да је нуклеарни  $\beta$ -катенин највећим делом лоциран у нуклеусу а у третманима Pt(IV) комплексом 1 (10  $\mu$ M) и Pt(IV) комплексом 2 и Лигандом 2 (обе испитиване концентрације) његово присуство потврђено је и у цитоплазми. На микрографијама се уочава да третамни Pt(IV) комплексом 1 и Лигандом 1 у вишим концентрацијама, доводе до најјаче

редукције нуклеарног  $\beta$ -катенина, (Слика 22), што колерира са најјачим антимиграторним потенцијалом ових хемијских једињења (Графикон 10). Након 24 сата трајања третмана испитиваним хемијским једињењима, долази до смањене протеинске експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина у односу на нетретирание, контролне НСТ-116 ћелије (Слика 22, графички приказ), при чему најјачи ефекте показује Лиганд 1, значајно ниже и у односу на третман цисплатином (позитивна контрола).

**Слика 22.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).

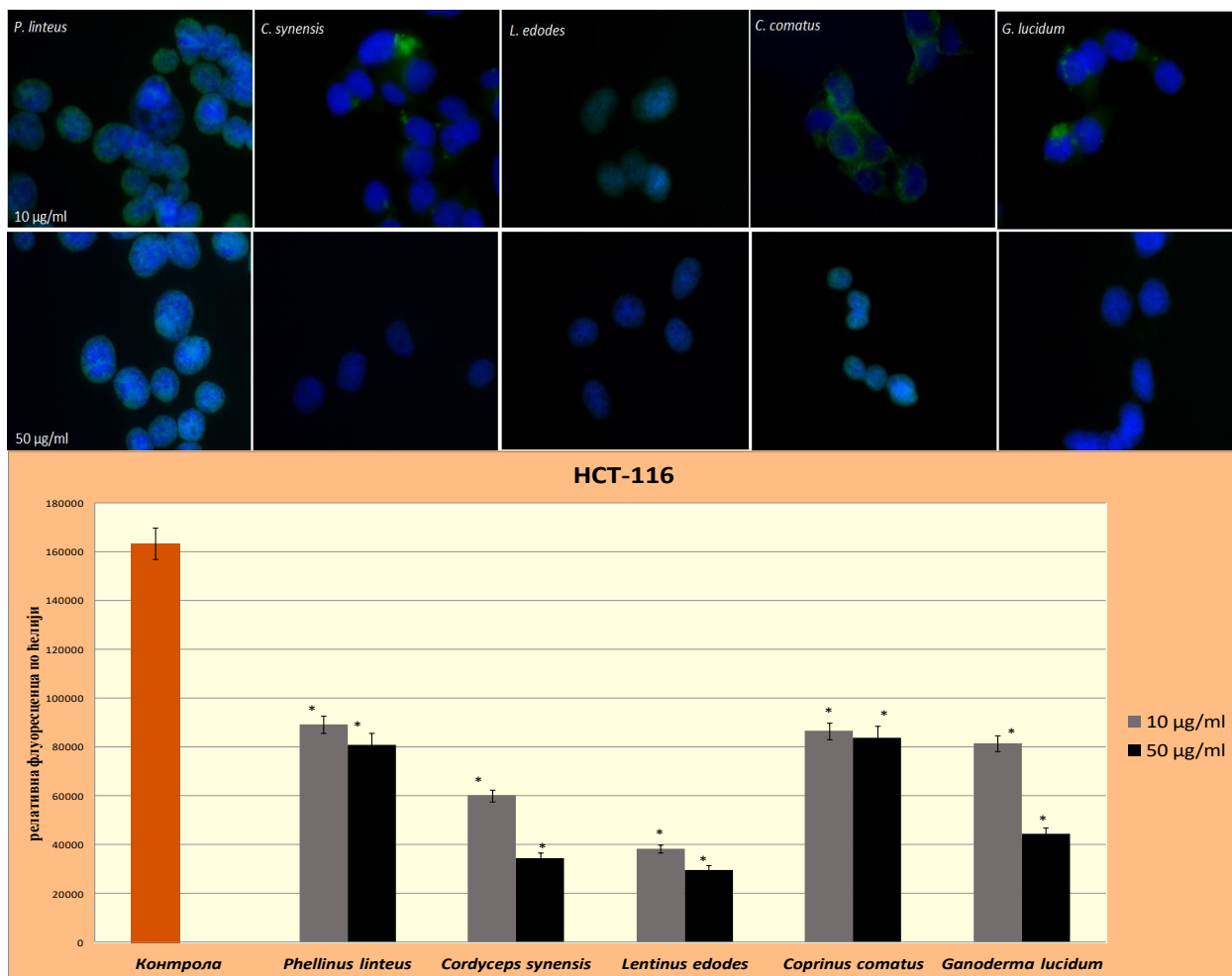


Резултати су интензитета протеинске експресије добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима гљива индукују значајно смањење протеинске експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина у односу на нетретирание НСТ-116 ћелије (Слика 23), при чему екстракти *C. synensis* и *L. edodes* показују најбоље ефекте. Више концентрације екстраката гљива ограничавају присуство

нуклеарног  $\beta$ -катенина на нуклеус НСТ-116 ћелија, док је у нижим концентрацијама третмана овај протеин присутан и у цитоплазми (Слика 23).

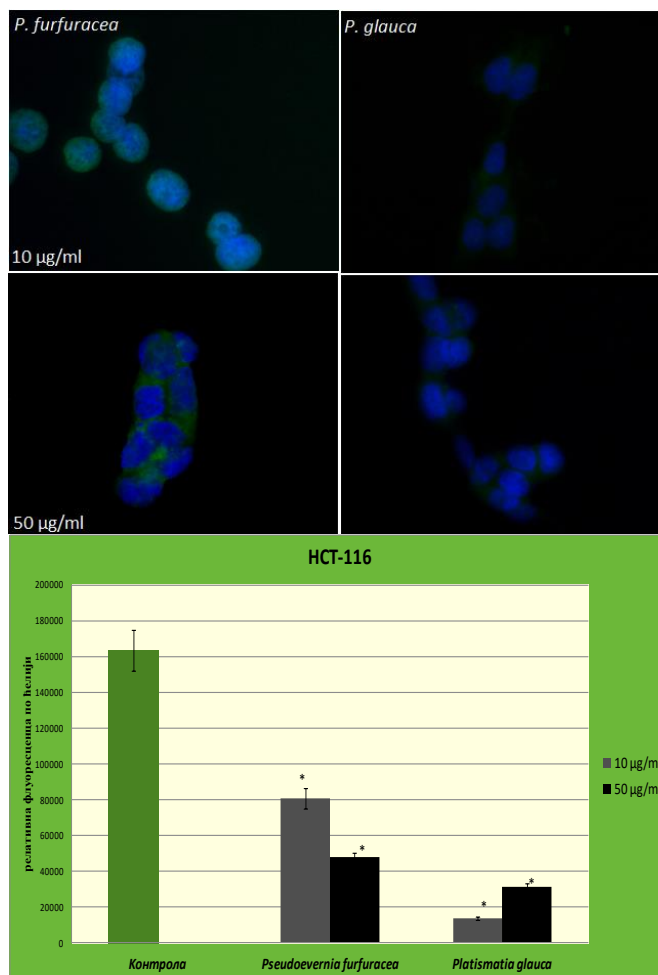
**Слика 23.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ - катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* значајно редукују протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Слика 24, графички приказ), при чему најбоље ефекте показује *P. glauca* (10  $\mu\text{g/mL}$ ). На микрографијама се уочава присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазми третираних ћелија, док је у цитоплазми ћелија третираних екстрактном *P. furfuracea* лоциран у зони око једра (Слика 24).

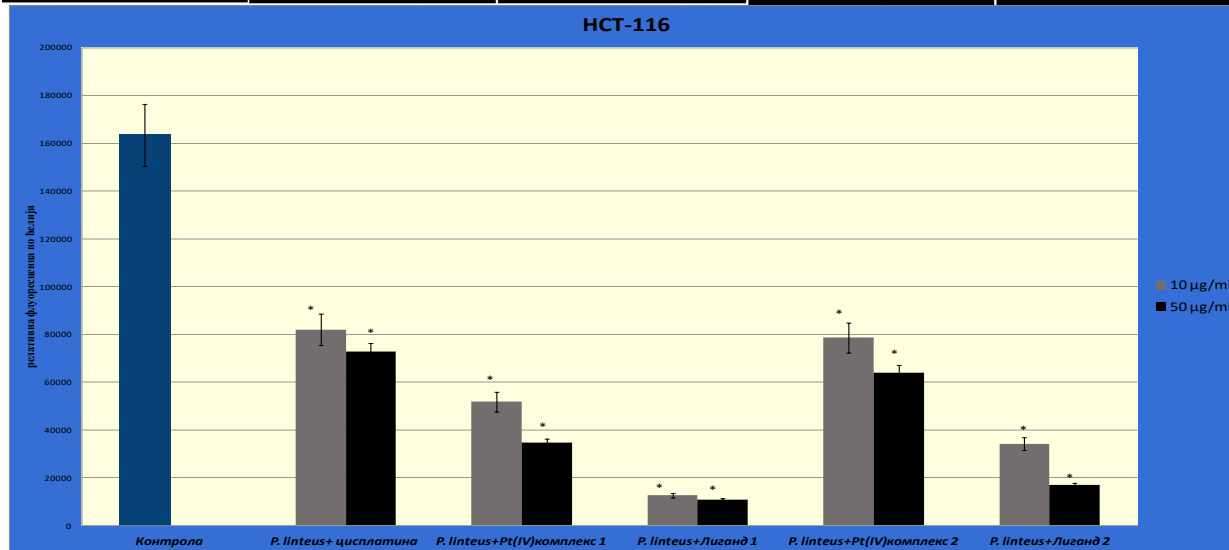
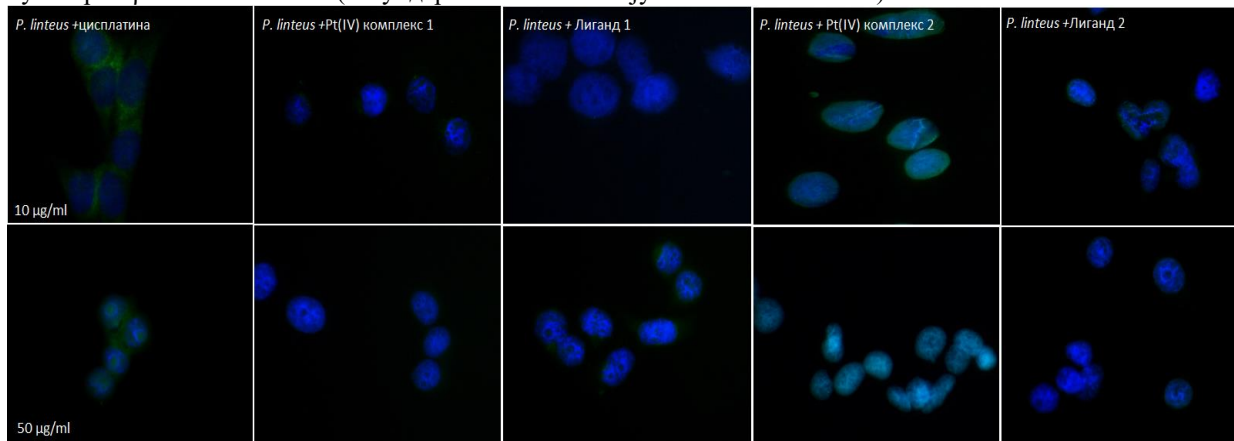
**Слика 24.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама третираним екстакатима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), а нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Нуклеарни  $\beta$ -катенин присутан је у цитоплазми и нуклеусу НСТ-116 ћелија након комбинованих третмана, КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина и Лиганд 1, док је у осталим котретманима овај протеин лоциран у једру (Слика 25). Смањење експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина изазивају сви КТ-0h у односу на нетретирание НСТ-116 ћелије (Слика 25, графички приказ). Најјачи ефекат је показао је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, 2, док је најслабији ефекат показао КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина и Pt(IV) комплекс 2 (Слика 25, графички приказ).

**Слика 25.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

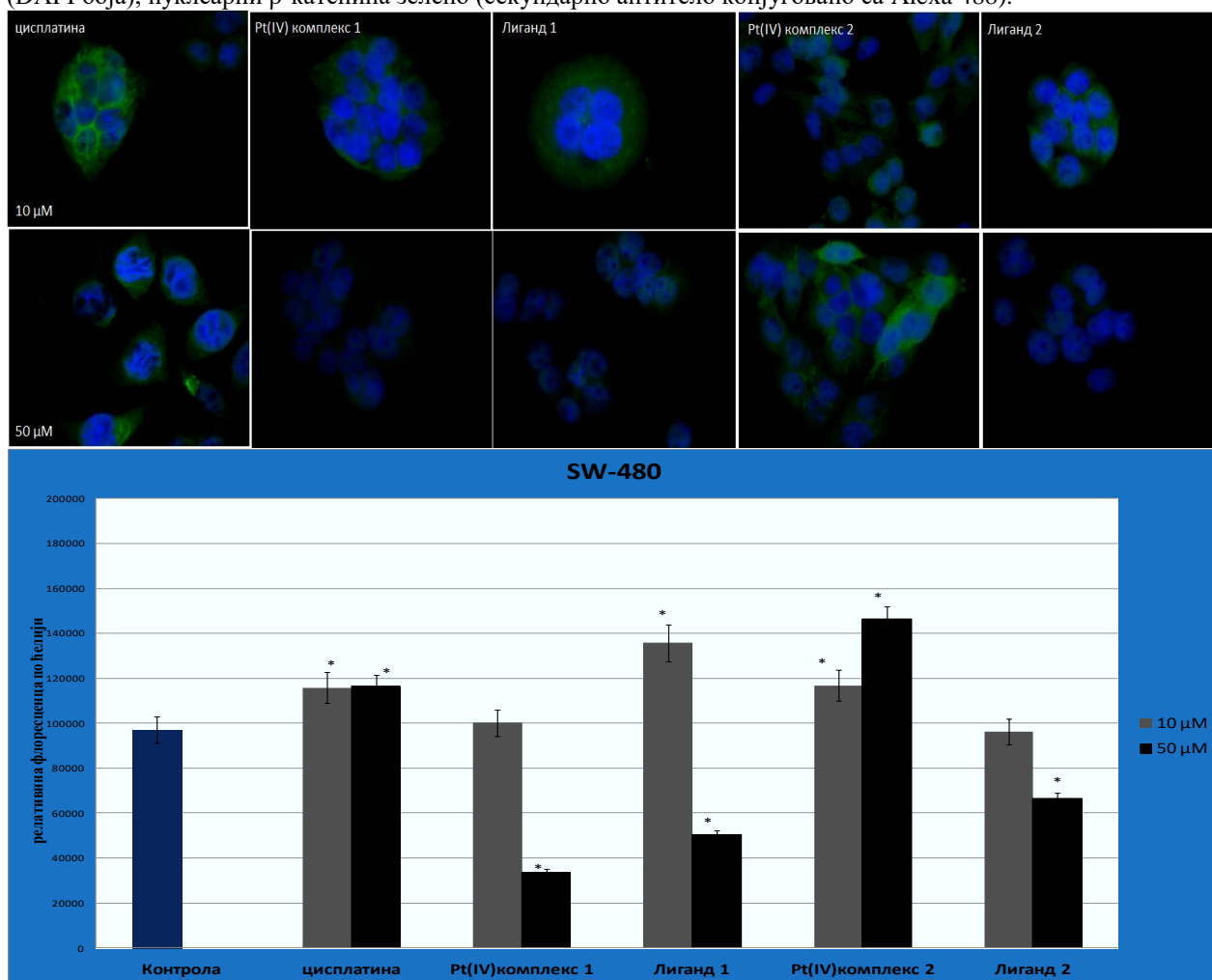
### Протеинска експресија нуклеарног $\beta$ -катенина у третираним SW-480 ћелијама

На сликама 26-29 представљена је протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина (микрографије и графички приказ квантификације флуоресценце) у SW-480 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима.

Третмани сублеталним дозама цисплатине, Лиганда 1 (концентрација 10  $\mu$ M) и Pt(IV) комплекса 2 значајно повећавају протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина, у односу на нетретиране SW-480 ћелије (Слика 26, графички приказ), са доминантном локацијом нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазми третираних ћелија (Слика 26, микрографије), што колерира са ефектима

на миграторни потенцијал ових третмана (**Графикон 14**). Третмани вишим концентрацијама Pt(IV) комплекса 1, Лигандима 1, 2 ограничавају присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина на једро, са смањењем протеинске експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина у односу на нетретирание SW-480 ћелије (**Слика 26**).

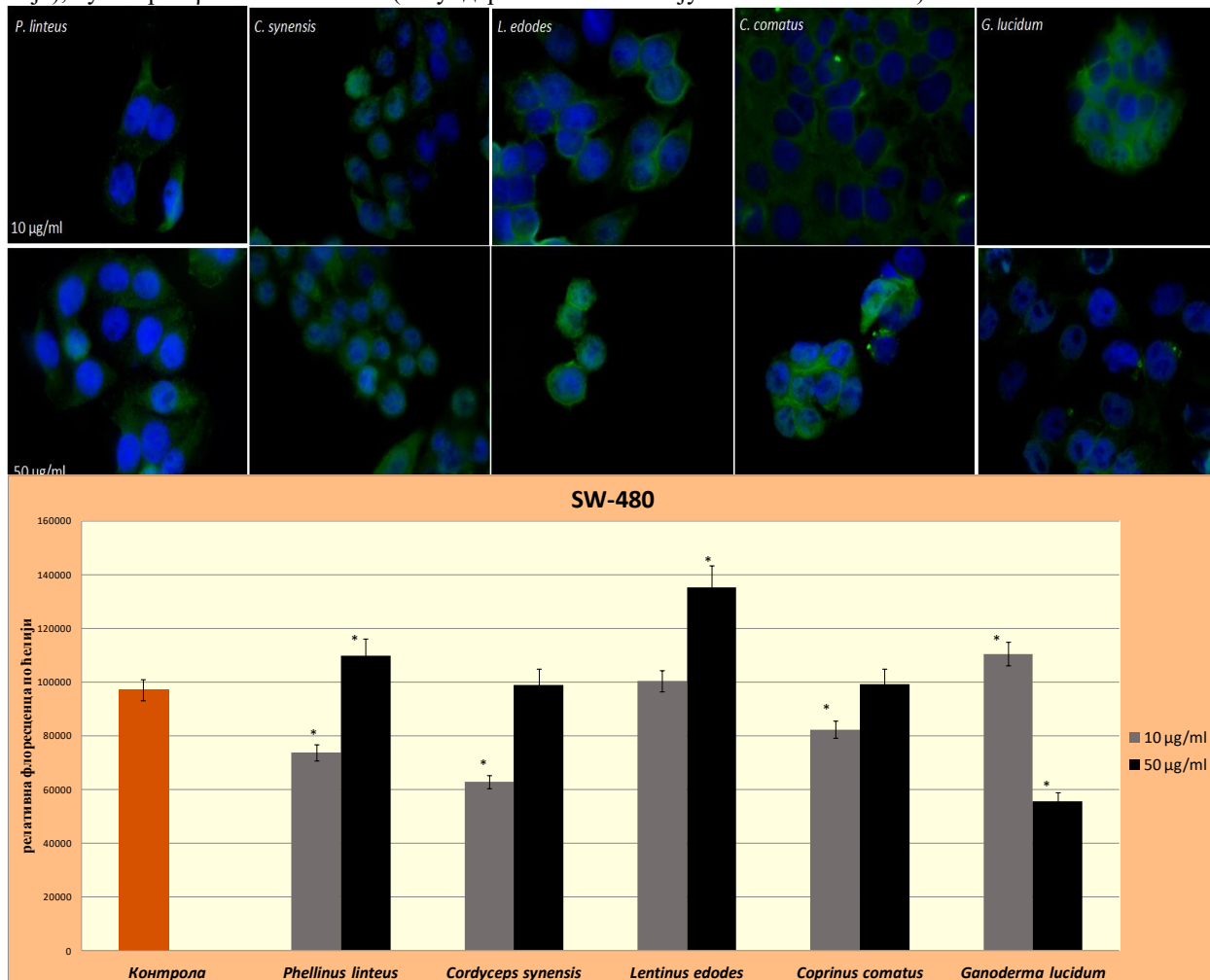
**Слика 26.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенина зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазми SW-480 ћелија индуковано је третманима испитиваним екстрактима гљива (**Слика 27**, микрографије). Екстракти гљива *P. linteus*, *C. synensis* (10  $\mu$ g/ml) и *G. lucidum* (50  $\mu$ g/ml) снижавају, док *P. linteus*, *L. edodes* (50  $\mu$ g/ml) и *G. lucidum* (10  $\mu$ g/ml) повећавају протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина, у односу на нетретирание SW-480 ћелије (**Слика 27**, графички приказ).

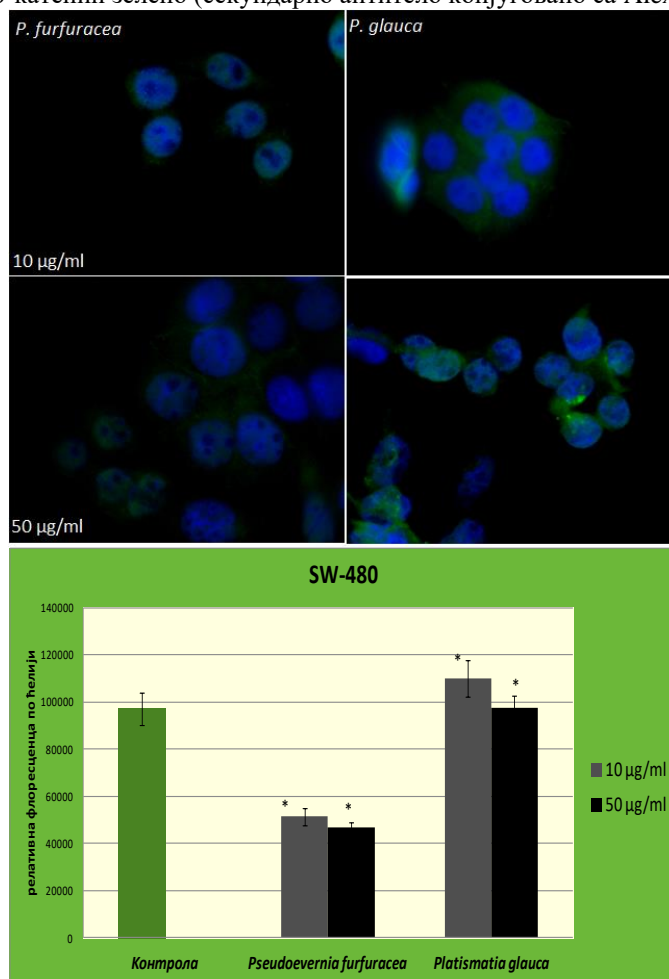
**Слика 27.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Нуклеарни  $\beta$ -катенин је лоциран и у цитоплазми SW-480 ћелија третираних екстрактима лишаја *P. furfuracea* и *P. glauca* (Слика 28). Екстракт *P. furfuracea* (нарочито у концентрацији 50  $\mu\text{g/mL}$ ) редукује протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина (Слика 28, графички приказ), што корелира са антимигранторним ефектима овог третмана (Графикон 16). Екстракт *P. glauca* у концентрацији 10  $\mu\text{g/mL}$  статистички значајно повећава протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина (Слика 28, графички приказ), што потврђује промигранторни ефекат овог третмана (Графикон 16).

**Слика 28.** Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама третираним екстакатима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).

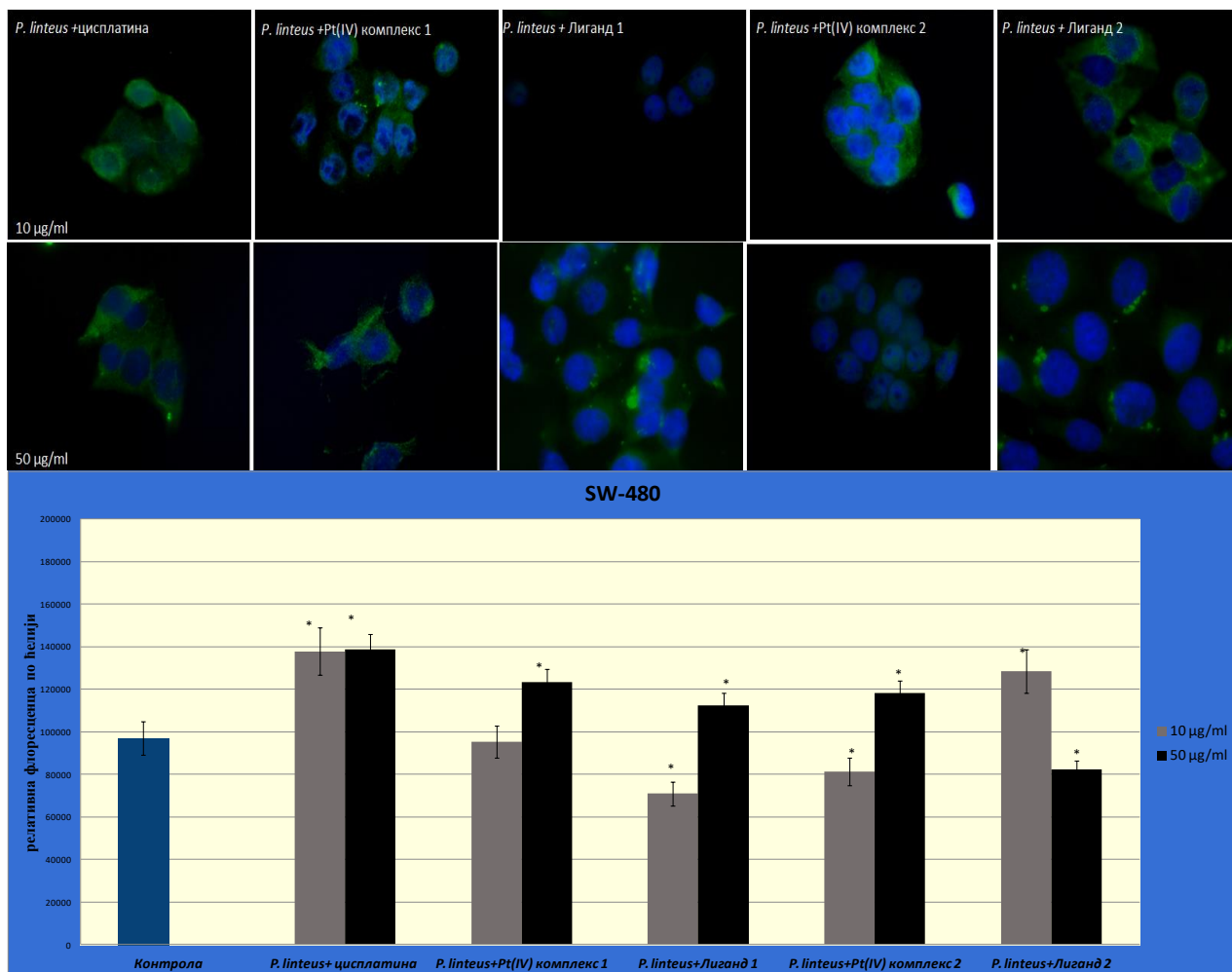


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Комбиновани третмани у високим концентрацијама (осим КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 2) повећавају протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина, у односу на нетретиране SW-480 ћелије, са присуством нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазми третираних ћелија (Слика 29). КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2 редукују протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина (Слика 29, графички приказ), док само *P. linteus* + Лиганд 1 у нижим концентрацијама нуклеарни  $\beta$ -катенин лоцира у једро (Слика 29, микрографије). Котретман са цисплатином највише повећава, а КТ-0h са Лигандом 1 највише редукује експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама (Слика 29, графички приказ).



**Слика 29.** Протеинска експресија цитоплазматског  $\beta$  катенина у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), нуклеарни  $\beta$ -катенин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

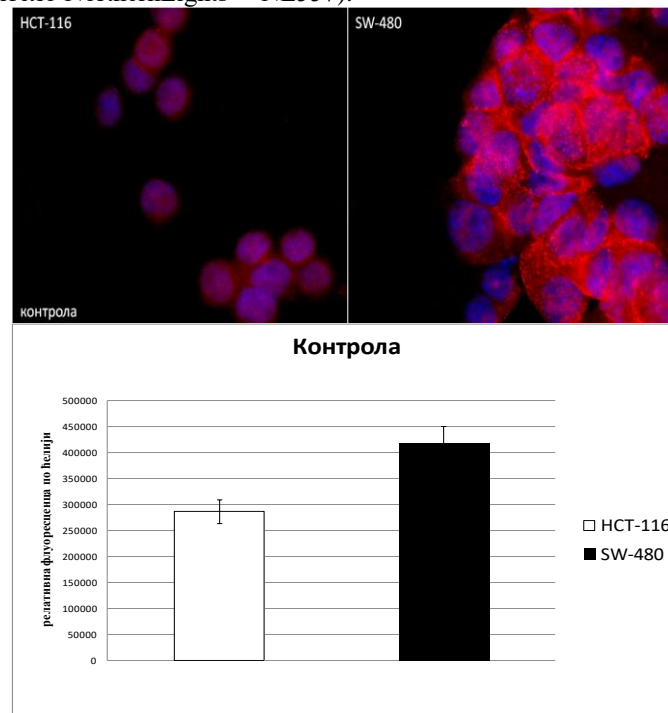
Протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина је очувана у свим третманима у обе ћелијске линије. Присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина у третираним ћелијама корелира са чињеницом да се ради о карциномским имортализованим ћелијским линијама. Поређењем добијених резултата за све испитиване третмане на обе ћелијске линије, уочава се да НСТ-116 ћелије имају значајно мању протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина у свим третманима у односу на SW-480 ћелије, сходно јачим антимигранторним ефектима испитиваних третмана на НСТ-116 ћелије. Појединачни третмани на НСТ-116 ћелијама, прате тренд: екстракти лишљајева > хемијска једињења > екстракти гљива. Ефекти третмана на SW-480 ћелијама показују да веће концентрације екстраката гљива и КТ-0h повећавају, док ниже концентрације смањују експресију нуклеарног пула  $\beta$ -катенина.

Поређењем резултата свих појединачних третмана, протеинску експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина у НСТ-116 ћелијама најјаче редукује екстракт *P. glauca*. Pt(IV) комплекс 2 најинтензивније повећава, док третман Pt(IV) комплекс 1 смањује експресију нуклеарног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама. Котретмани показују јачи ефекат у односу на појединачне третмане у НСТ-116 ћелијској линији. Најинтензивније смањење експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина показује КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 на обе ћелијске линије (ниже концентрације на SW-480, а више на НСТ-116 ћелијској линији).

### 2.2.3. Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора на ћелијској мембрани

Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора, једне од првих компоненти у Wnt сигналном путу, у здравим ћелијама је строго лимитирана, док је детектована у свим ћелијским линијама колоректалног карцинома. На **Слици 30** приказана је протеинска експресија Frizzled-7 рецептора (микрографије и графички приказ интензитета флуоресценце) у нетретираним (контролним) НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Frizzled-7 рецептор је експримиран у обе испитиване ћелијске линије, а евидентна је већа експресија у SW-480 ћелијској линији (**Слика 30**, графички приказ).

**Слика 30.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



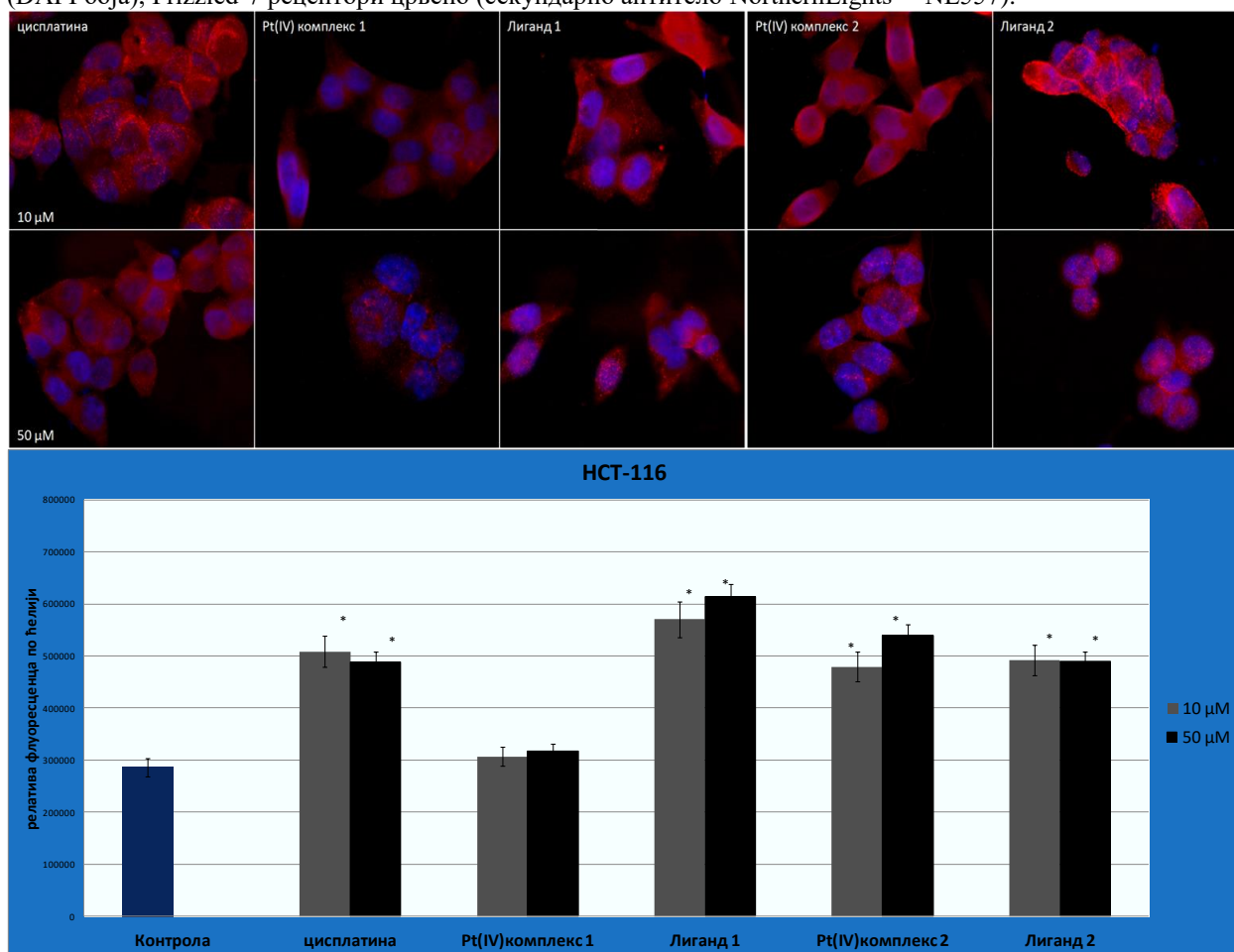
Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

### Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у третираним НСТ-116 ћелијама

На сликама 31-34 представљени су резултати протеинске експресије Frizzled-7 рецептора у појединачним и комбинованим третманима на НСТ-116 ћелијској линији.

У третманима испитиваним хемијским једињењима дошло је до повећања протеинске експресије Frizzled-7 рецептора на мембрани и у цитоплазми ћелија у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Слика 31, графички приказ). Лиганд 1 испољава најјаче, док је његов комплекс са Pt(IV) показао најслабије ефекте на експресију овог рецептора.

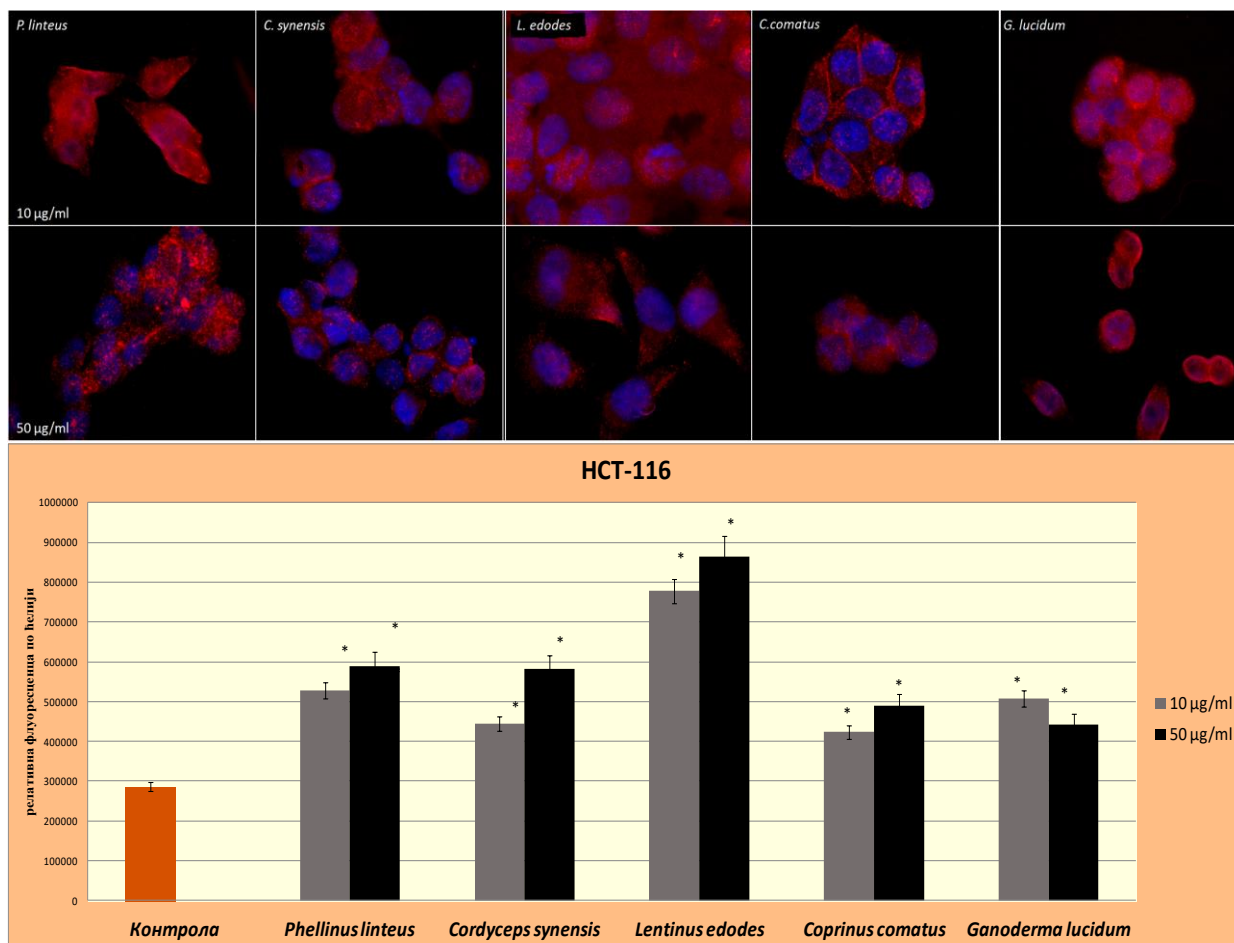
**Слика 31.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептори црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Сви третмани екстрактима гљива у обе испитиване концентрације индукују повећање протеинске експресије Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама (Слика 32, графички приказ), при чему екстракт *L. edodes* показује најјаче деловање. Рецепторни протеин је углавном распоређен у цитоплазми, док је у третману *C. sinensis* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и *C. comatus* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) у зони ћелијске мембране (Слика 32, микрографије).

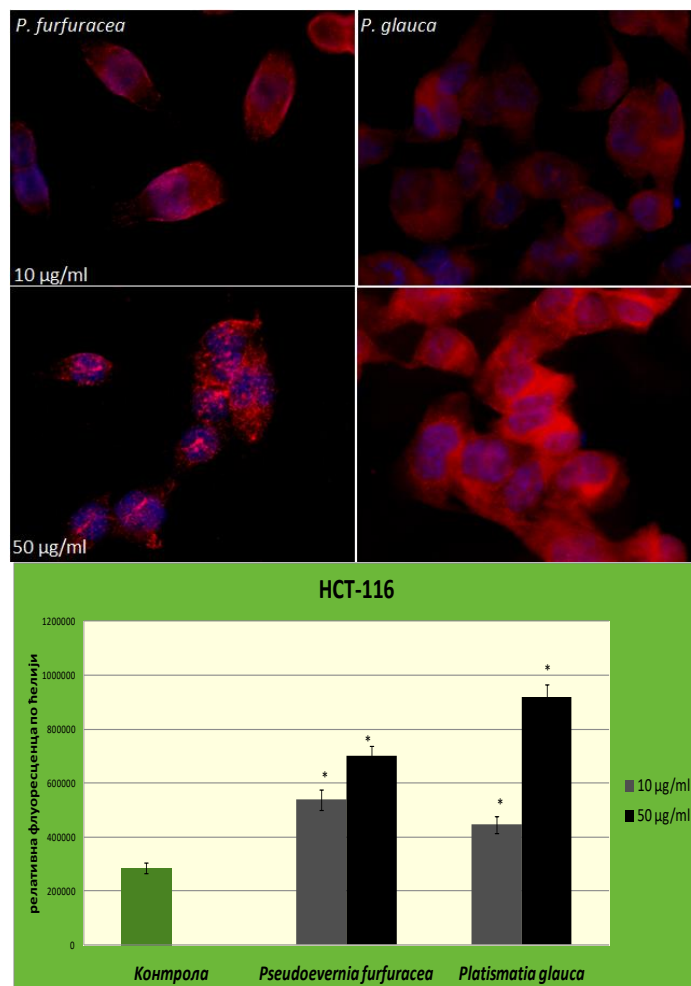
**Слика 32.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати су интензитета протеинске експресије добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Екстракти лишајева индукују статистички значајно повећање експресије Frizzled-7 рецептора у односу на нетретиране, контролне НСТ-116 ћелије (Слика 33, графички приказ), са присуством рецепторног протеина највећим делом у зони цитоплазме (микрографије). Најбољи ефекат показао је третман екстрактом *P. glauca* (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), где је доминантно присуство овог протеина у цитоплазми. У третману *P. furfuracea*, Frizzled-7 рецептор је углавном присутан у зони мембране.

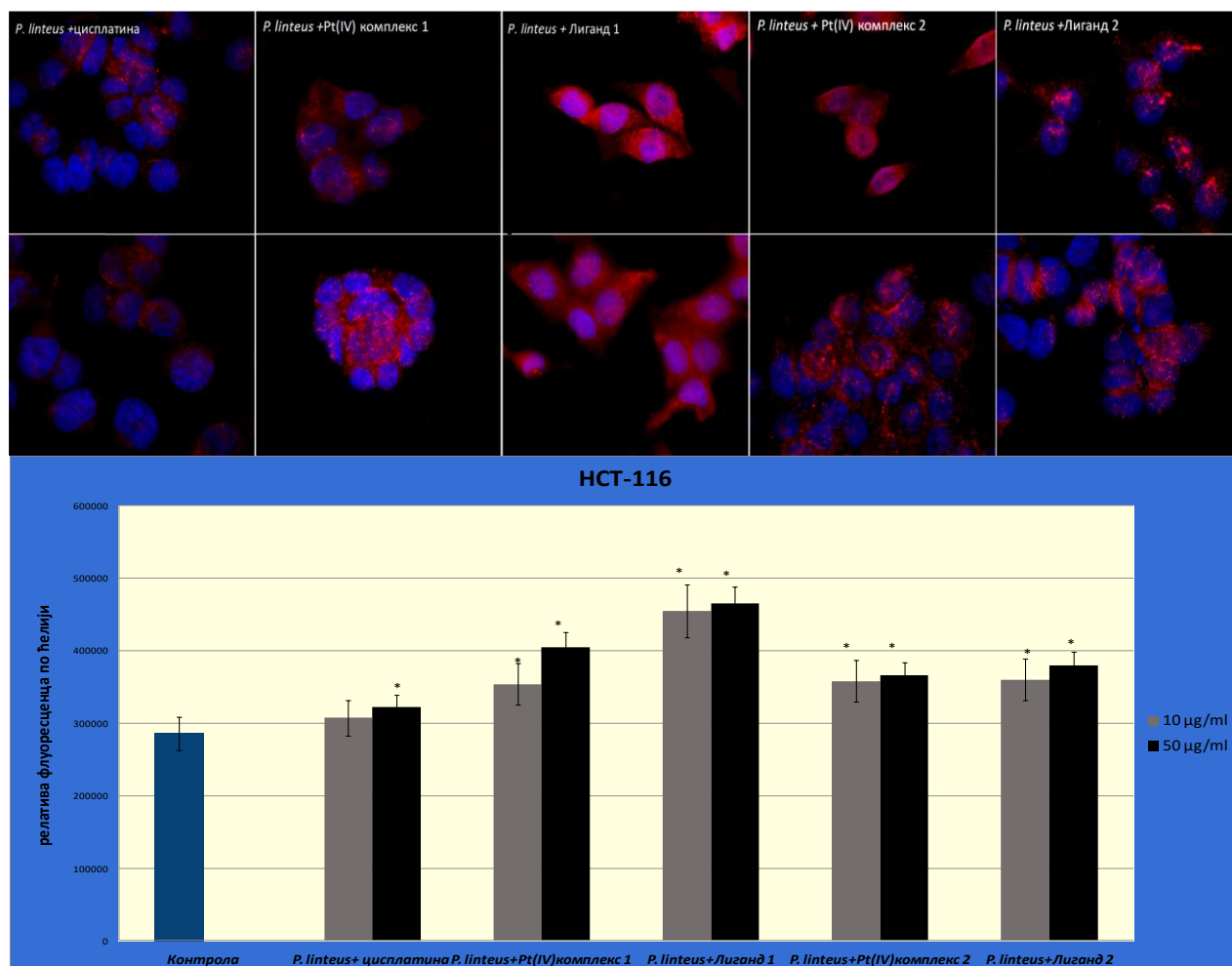
**Слика 33.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Сви комбиновани третмани индукују повећање протеинске експресије Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама (Слика 34, графички приказ). Frizzled-7 рецептор у третираним ћелијама присутан је на мембрани и у цитоплазми (Слика 34, микрографије). Већа концентрација екстракта гљиве изазива јаче ефекте, највеће повећање експресије детектовано је у КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, док је најслабији ефекат изазвао КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина (Слика 34, графички приказ), што се уочава и на микрографијама. У КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 доминантно је присуство овог рецептора у зони цитоплазме (Слика 34, микрографије).

**Слика 34.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

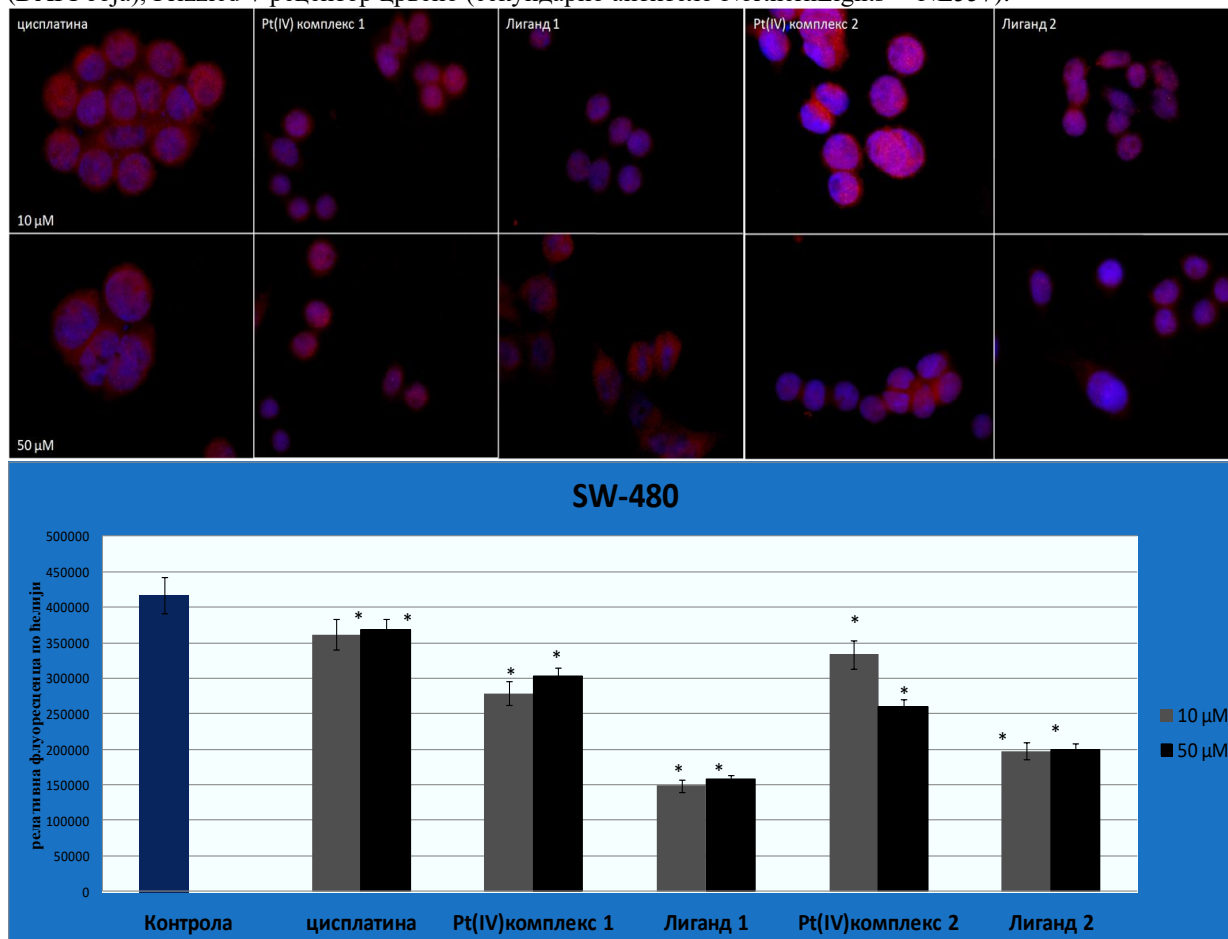
### ***Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у третираним SW-480 ћелијама***

На **сликама 35-38** представљени су резултати протеинске експресије Frizzled-7 рецептора (репрезентативне микрографије и графички приказ интензитета флуоресценце) у појединачним и котретманима (КТ-0h) на SW-480 ћелијској линији колоректалног карцинома.

Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама третираним различитим концентрацијама испитиваних хемијских једињења смањена је у односу на нетретиране SW-480 ћелије (**Слика 35**, графички приказ). Најниже вредности протеинске експресије Frizzled-7

рецептора добијене су у третманима лигандима у обе концентрације, док је третман цисплатином изазвао најслабији ефекат. Рецепторни протеин присутан је углавном у цитоплазми (Слика 35, микрографије).

**Слика 35.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).

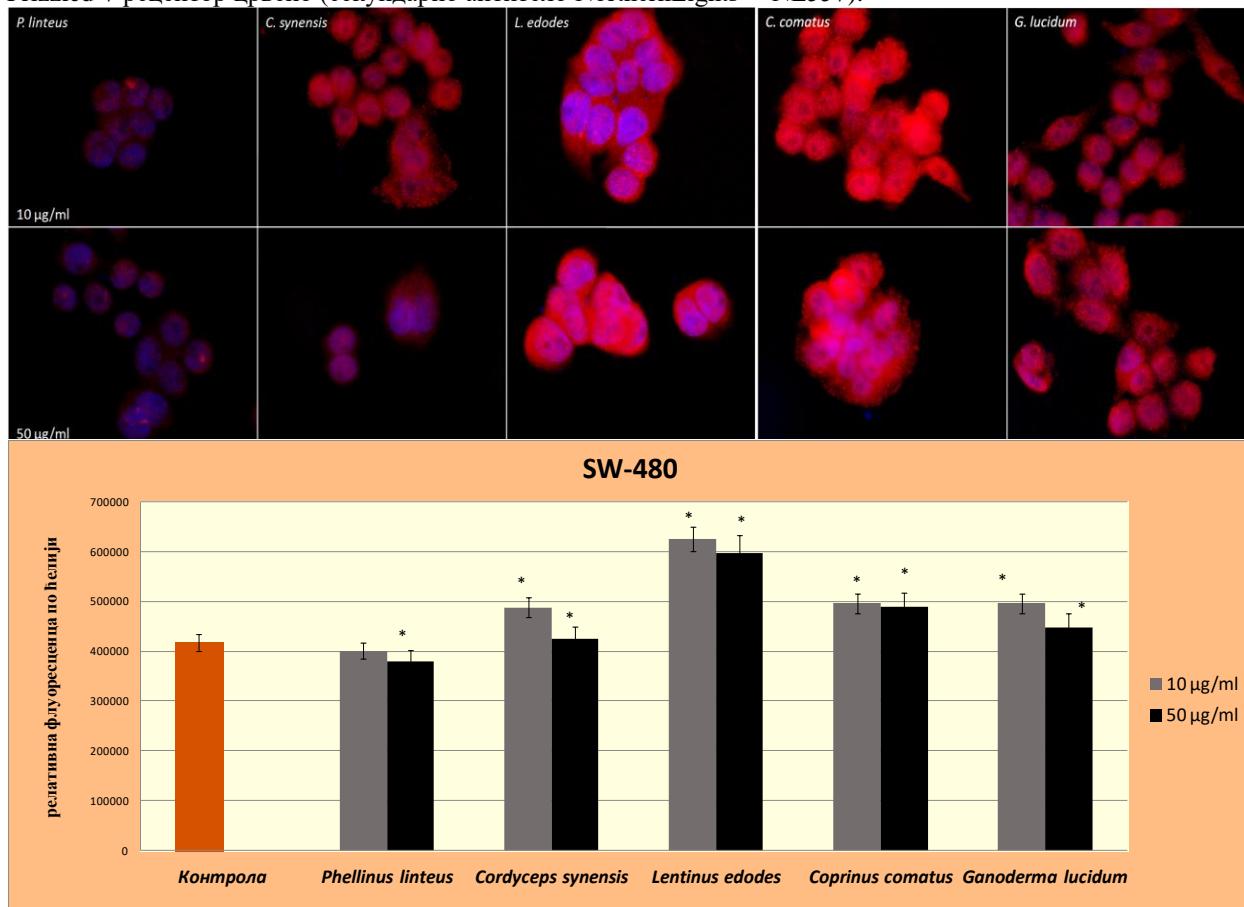


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Метанолни екстракти гљива индукују значајно повећање експресије Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама (Слика 36, графички приказ), осим третман екстрактом *P. linteus* (50 μg/mL) који смањује експресију овог протеина. У третираним ћелијама рецепторни протеин је у углавном у оквиру цитоплазме (Слика 36, микрографије). У третманима екстрактима гљива (*C. sinensis*, *L. edodes*, *C. comatus* и *G. lucidum*) који показују промиграторни ефекат на испитиваним ћелијама (Графикон 15), уочава се повећање броја протрузија и распоред рецепторних молекула по ободном делу ћелије у зони ћелијске мембране (Слика 36, микрографије).



**Слика 36.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).

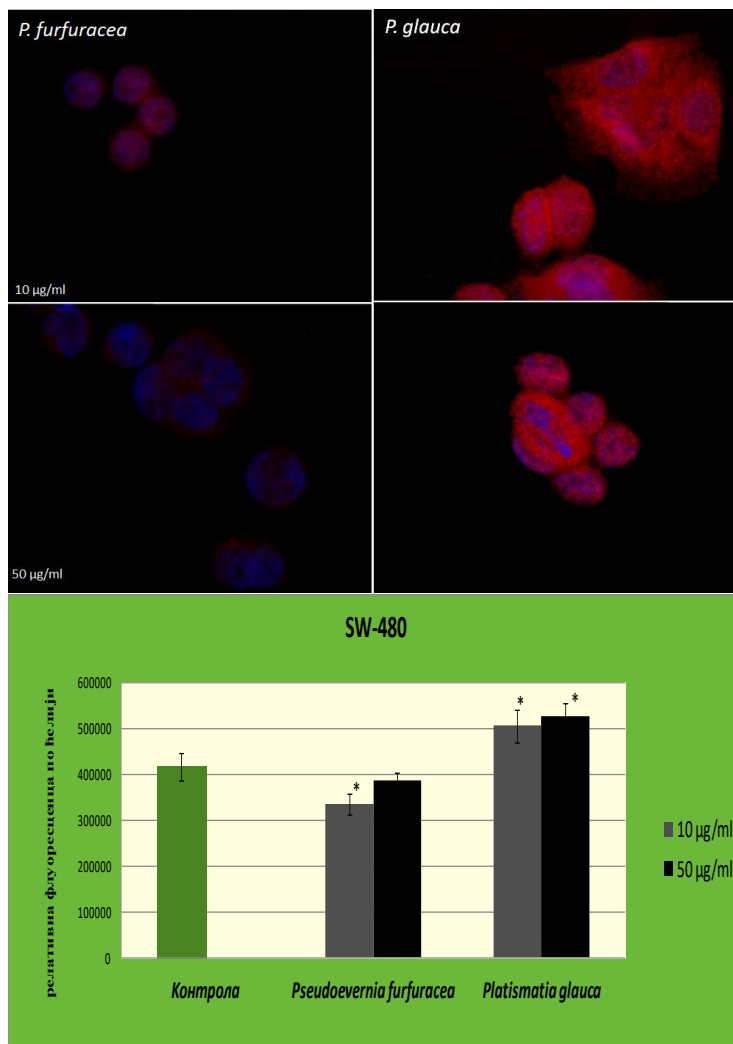


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактом лишаја *P. furfuracea* (10 µg/mL) статистички значајно снижавају, док екстракт *P. glauca* значајно повећава протеинску експресију Frizzled-7 рецептора, у односу на нетретирание SW-480 ћелије (Слика 37, графички приказ), са повећањем протрузија, нарочито у третману *P. glauca* у концентрацији 10 µg/mL (Слика 37, микрографије), што корелира са промиграторним ефектима овог третмана (Графикон 16). Са друге стране, метанолни екстракти *P. furfuracea* и *P. glauca* у концентрацији од 50 µg/mL, који показују антимиграторне ефекта (Графикон 16), Frizzled-7 рецептор је лоциран у зони око једра (Слика 37, микрографије).



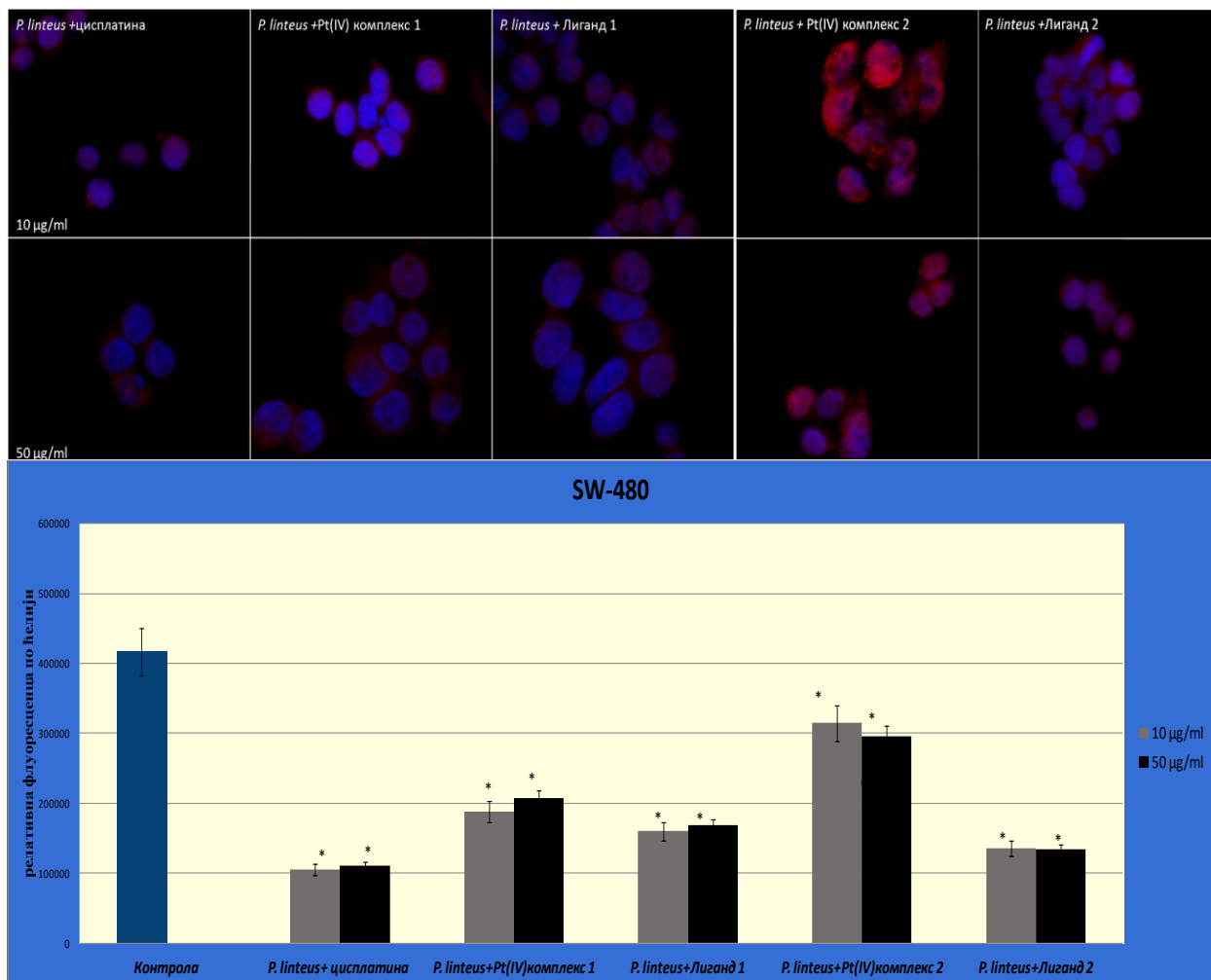
**Слика 37.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Сви котретмани значајно редукују експресију Frizzled-7 рецептора, у односу на нетретиране SW-480 ћелије (Слика 38, графички приказ). Тренд ефеката је следећи КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина > *P. linteus* + Лиганд 1 и 2 > *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 1 и 2. Frizzled-7 рецептор је лоциран у цитоплазми у зони око једра у свим котретманима (Слика 38, микрографије), што корелира са антимигранторним ефектима котретманима (Графикон 17).

**Слика 38.** Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Frizzled-7 рецептор црвено (секундарно антитело NorthernLights™ NL557).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Протеинска експресија Frizzled-7 рецептора је очувана у свим третманима у обе ћелијске линије. Присуство Frizzled-7 рецептора у третираним ћелијама корелира са чињеницом да се ради о имортализованим ћелијским линијама карцинома у којима је Wnt пут активан.

Поређењем добијених резултата за све испитиване третмане на обе ћелијске линије, уочава се да НСТ-116 ћелије имају значајно већу протеинску експресију Frizzled-7 рецептора у свим третманима у односу на SW-480 ћелије, сходно јачим ефектима испитиваних третмана на НСТ-116 ћелије, са доминантно цитоплазматском локацијом овог протеина.

Експресија Frizzled-7 рецептора у појединачним третманима на НСТ-116 ћелијама, прати тренд: екстракти лишајева > екстракти гљива > хемијска једињења, док код SW-480 ћелија тренд иде у смеру екстракти гљива > екстракти лишајева > хемијска једињења.

Сви појединачни и комбиновани третмани повећавају протеинску експресију Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијама. Најснажнији ефекат је показао екстракт *P. glauca*. Појединачни третмани испитиваним хемијским једињењима и КТ-0h редукују, док третмани екстрактима гљива и лишајева повећавају (осим екстракта *P. furfuracea*) протеинску експресију Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама. Третман цисплатином највише повећава експресију, док је у третману *P. furfuracea* најмања вредност експресије Frizzled-7 у SW-480 ћелијама.

КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина, Pt(IV) комплекси 1, 2 имају јачи ефекат у односу на појединачне третмане, док КТ-0h за *P. linteus* + Лиганди 1, 2 смањују протеинску експресију Frizzled-7 рецептора у НСТ-116 ћелијској линији. Највећу вредност за протеинску експресију Frizzled-7 рецептора показао је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 на НСТ-116 ћелијској линији. Комбиновани третмани изазивају нижу протеинску експресију Frizzled-7 рецептора у SW-480 ћелијама, у односу на појединачне третмане, а најнижа вредност је добијена у КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина.

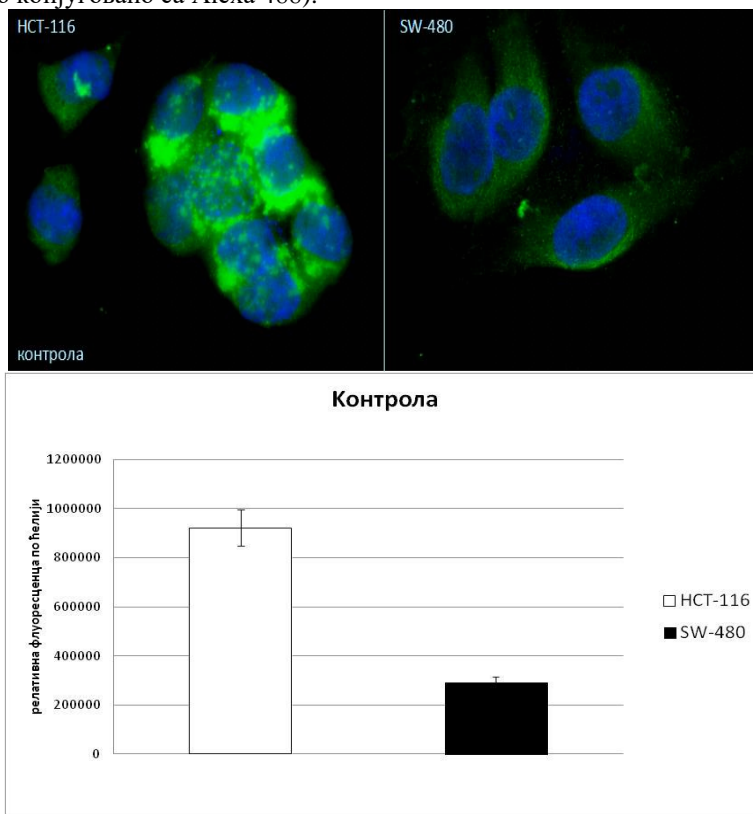
Третмани који показују антимиграторни ефекат на обе ћелијске линије, углавном индукују цитоплазматску локацију Frizzled-7 рецептора, док третмани са промиграторним ефектима лоцирају Frizzled-7 рецепторни протеин у зону ћелијске мембране.

#### 2.2.4. Протеинска експресија Н-кадхерина

Протеинска експресија Н-кадхерина, главног маркера мезенхимских ћелија и процеса ЕМТ, испитивана је у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама, као и у појединачним и комбинованим третманима (КТ-0h) у две сублеталне дозе (10 и 50  $\mu\text{M}$  за хемијске супстанце, односно 10 и 50  $\mu\text{g/mL}$  за екстракте гљива и лишајева). Време трајања третмана је 24 сата.

Ћелије здравог епитела не експримирају Н-кадхерин, а присутан је у ћелијама карцинома са израженим метастатским потенцијалом. С тим у вези, Н-кадхерин је детектован у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама (Слика 39). Протеинска експресија је већа у НСТ-116 ћелијској линији (Слика 39, графички приказ), што је у корелацији са њиховим већим миграторним потенцијалом (Графикон 9). Н-кадхерин је лоциран у цитоплазми, али га има и у зони ћелијске мембране у НСТ-116 ћелијама, док је у SW-480 ћелијама дифузно распоређен у цитоплазми (Слика 39, микрографије).

**Слика 39.** Протеинска експресија Н-кадхерина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



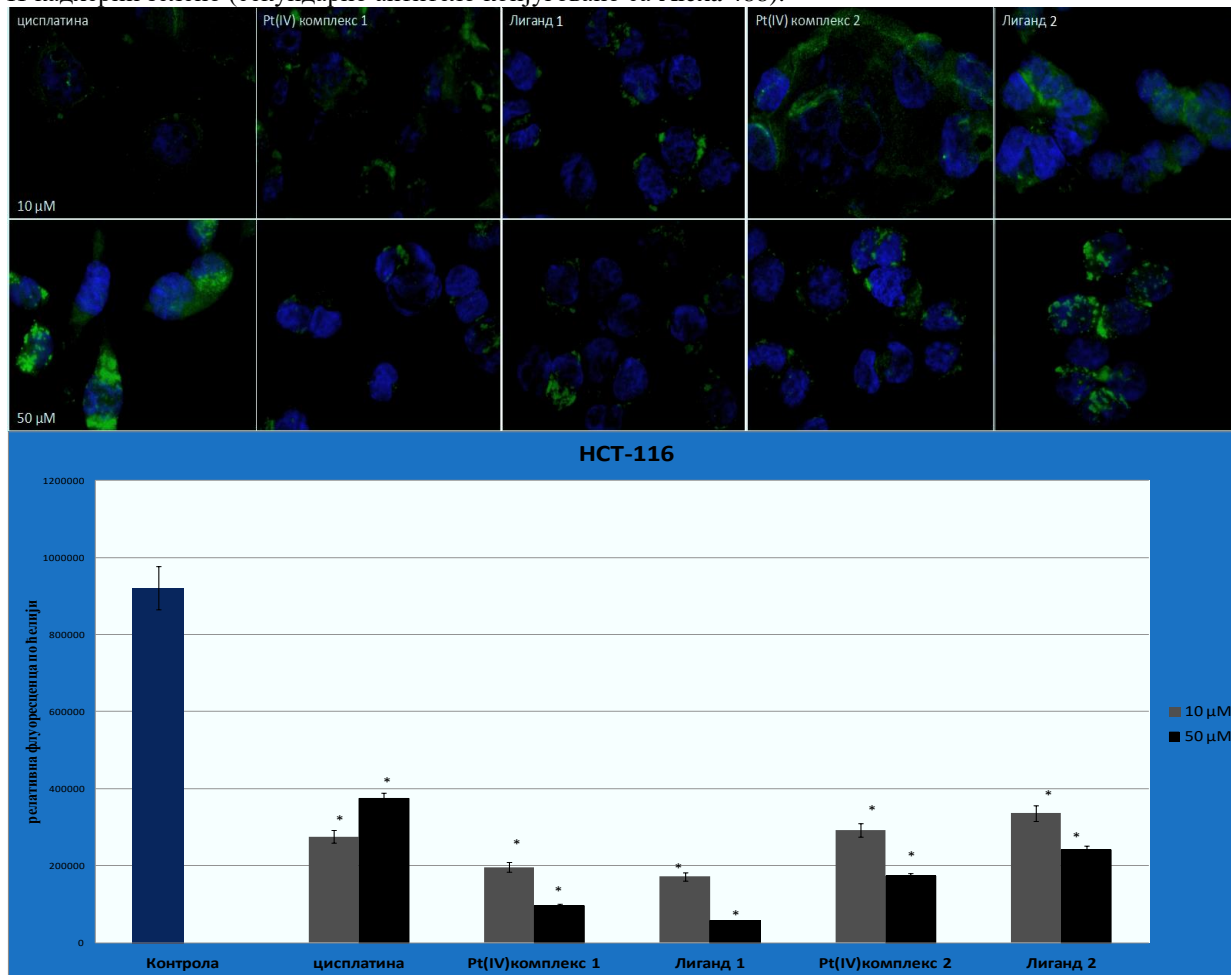
Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

### **Протеинска експресија Н-кадхерина у третираним НСТ-116 ћелијама**

На **сликама 40-43** представљене су протеинске експресије Н-кадхерина (репрезентативне микрографије и графички приказ интензитета флуоресценце) у појединачним и комбинованим третманима на НСТ-116 ћелијској линији колоректалног карцинома.

Након 24 сата третмана испитиваним хемијским једињењима, долази до значајног смањења протеинске експресије Н-кадхерина, у односу на контролне НСТ-116 ћелије (**Слика 40**, графички приказ). Третиране ћелије имају мањи број протрузија у односу на контролне (**Слика 39** и **40**, микрографије), осим у третману цисплатином 50  $\mu$ M, што је у корелацији са антимигранторним ефектом испитиваних хемијских једињења (**Графикон 10**). Најјачи ефекат добијен је у третману Лигандом 1, док је на смањење протеинске експресије Н-кадхерина најмање утицао третман цисплатином (**Слика 40**).

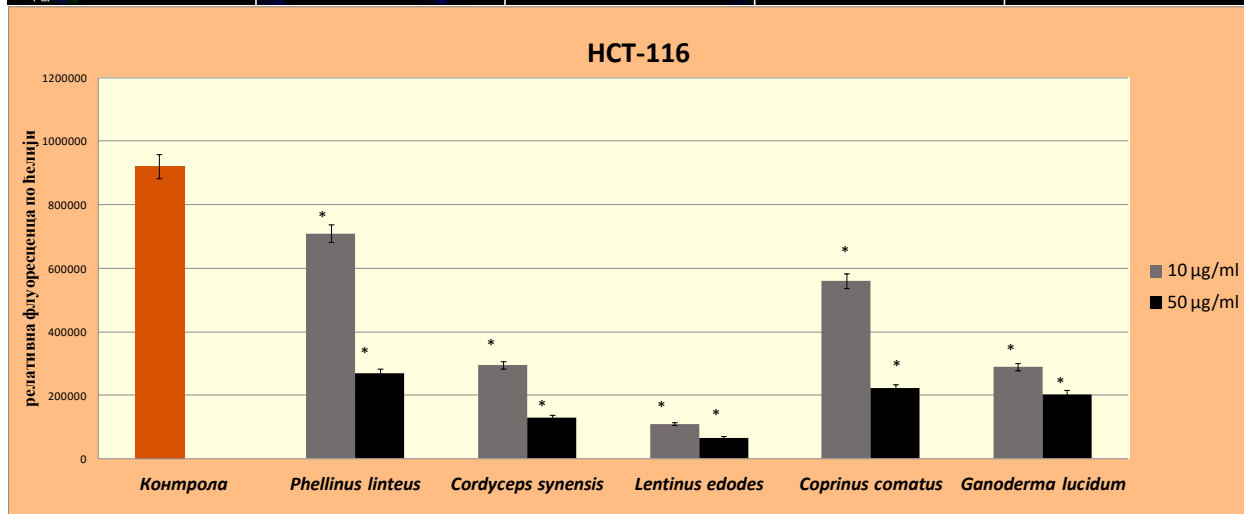
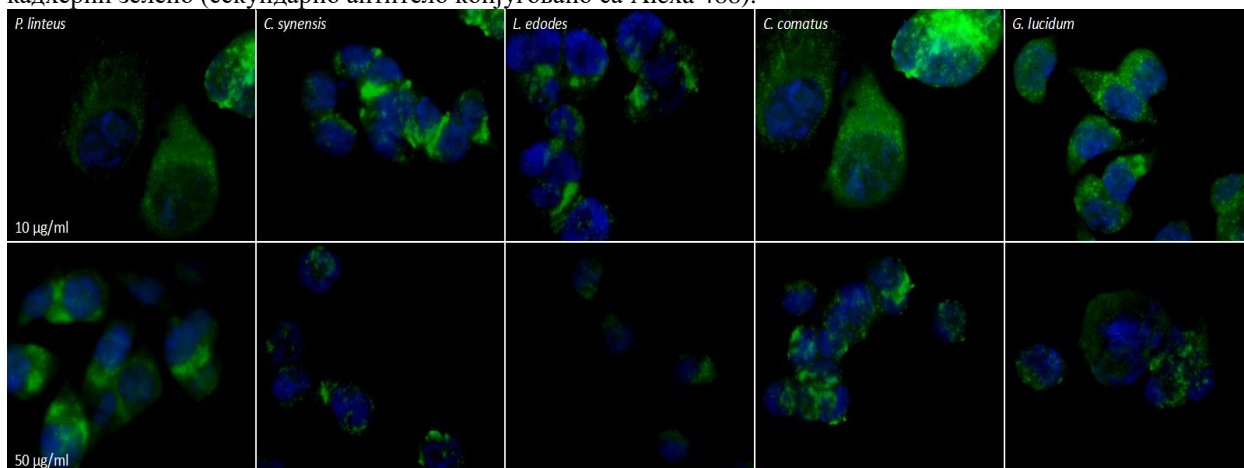
**Слика 40.** Протеинска експресија Н-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима гљива индукују дозно зависно смањење експресије Н-кадхерина у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Слика 41, графички приказ). Третман екстрактом *L. edodes* доводи до нејаче редукције Н-кадхерина, са приметном локацијом у цитоплазми, а третиране ћелије су груписане у агрегате са значајном редукцијом броја протрузија (Слика 41, микрографије), што је у корелацији са антимиграторним потенцијалом ових третмана (Графикон 11).

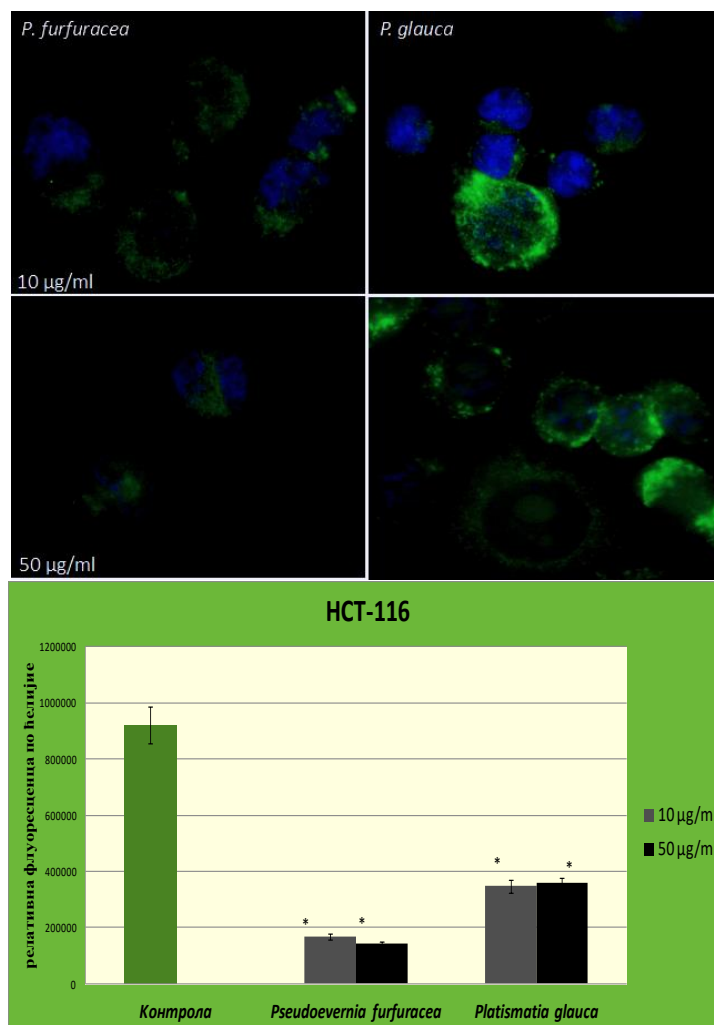
**Слика 41.** Протеинска експресија Н-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Третмани екстрактима лишајева изазивају смањење протеинске експресије Н-кадхерина, НСТ-116 ћелије имају мање протрузија и задобијају лоптаст облик, у односу на контролне ћелије (Слика 42), што је у корелацији са атимиграторним ефектом тестираних лишајева (Графикон 12). Најјачи ефекат показао је третман екстрактотом *P. furfuracea* (50 µg/mL), док је на слабији ефекат изазвао третман *P. glauca* (Слика 42, графички приказ). Доминантна је цитоплазматска локација у зони око једра без присуства у на ободима цитоплазме у зони ћелијске мембране (Слика 42, микрографије).

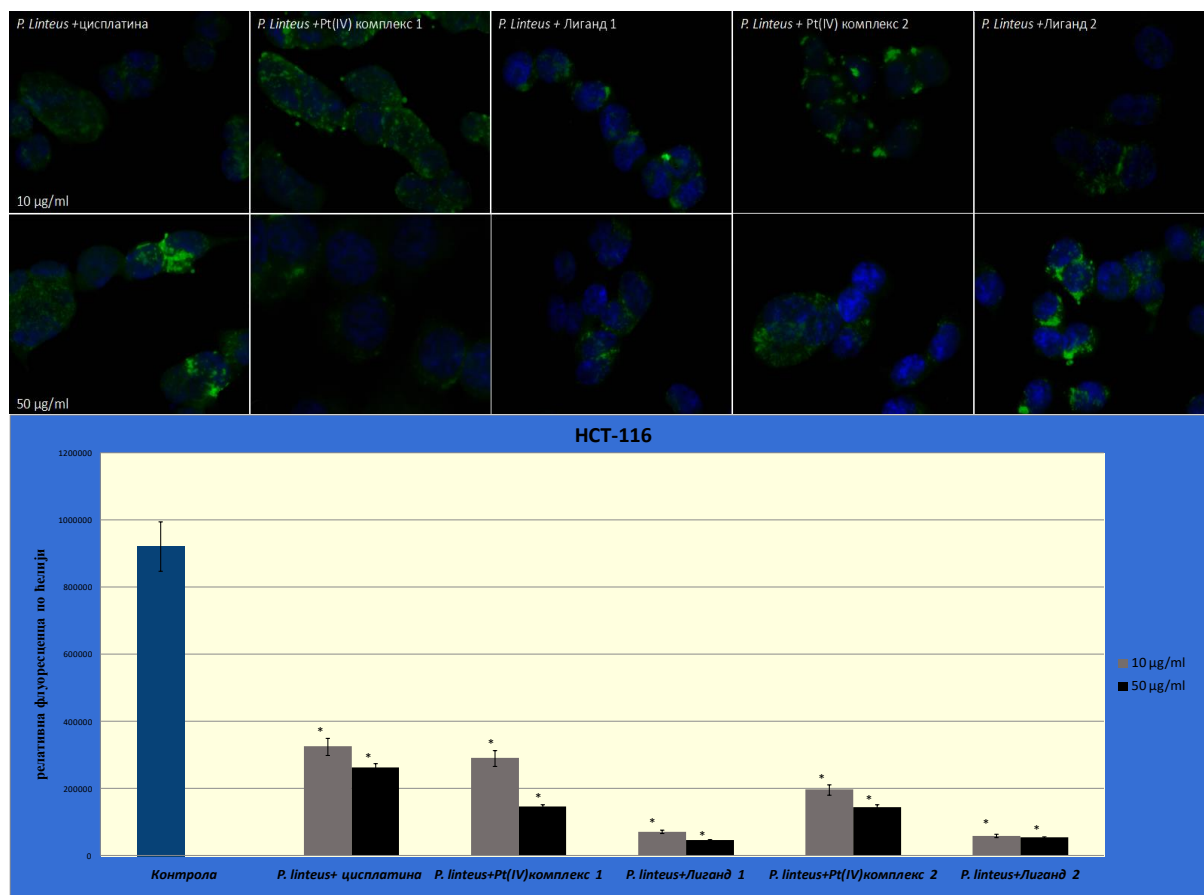
**Слика 42.** Протеинска експресија Н-кадхерина у НСТ-116 ћелијама третираним екстакатима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Комобиновани третмани у НСТ-116 ћелијама значајно редукују протеинску експресију Н-кадхерина, у односу на нетретиране ћелије (Слика 43, графички приказ). Најјачи ефекат показује КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, док је најслабији ефекат изазвао КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина и Pt(IV) комплекс 1. Распоред Н-кадхерина је у цитоплазми без значајног лоцирања у зони ћелијске мемембране (Слика 43, микрографије), што корелира са антимиграторним ефектима испитиваних котретмана (Графикон 13).

**Слика 43.** Протеинска експресија Н-кадхерина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

### **Протеинска експресија Н-кадхерина у третираним SW-480 ћелијама**

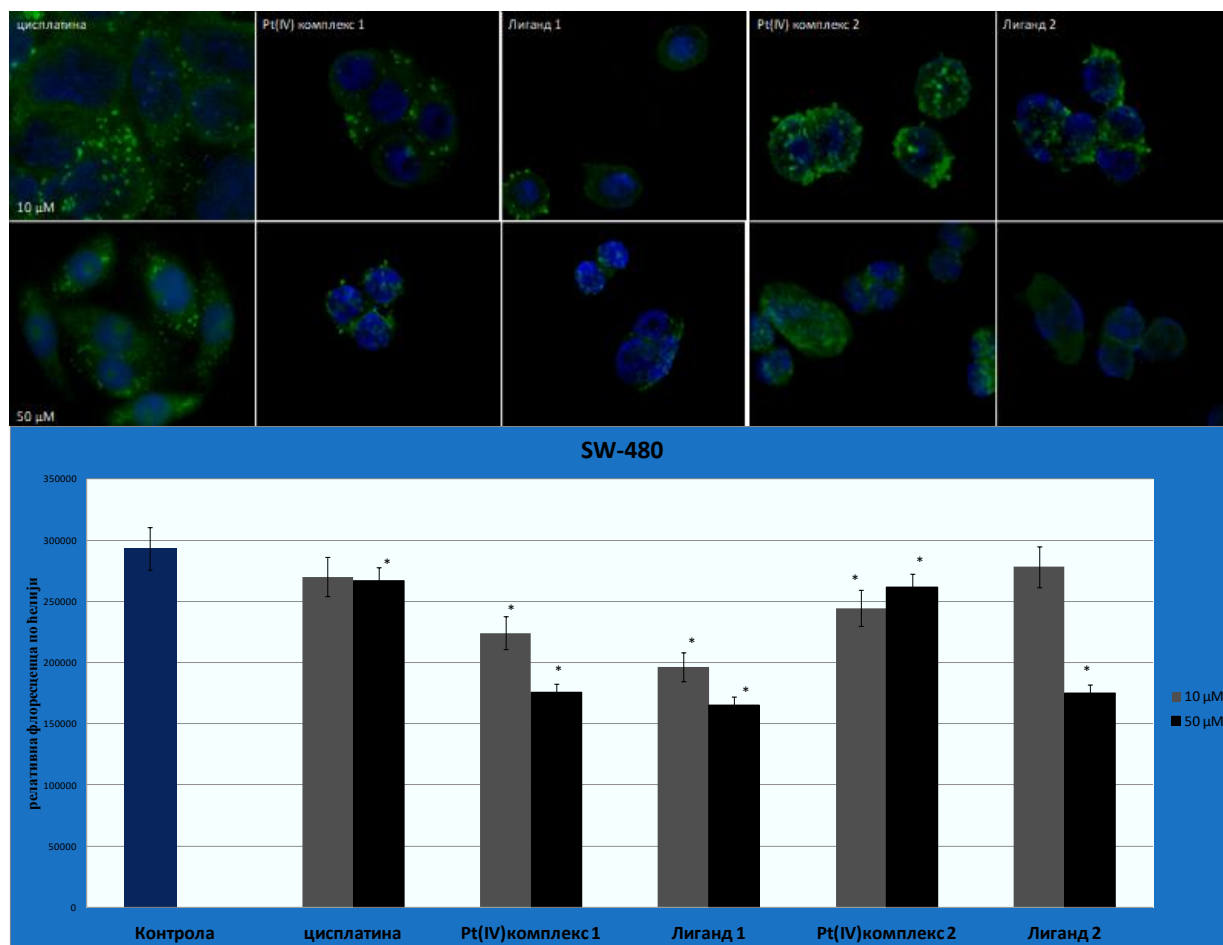
На **сликама 44-47** су представљени резултати протеинске експресије Н-кадхерина у појединачним и комбинованим третманима на SW-480 ћелијској линији.

На приказаним микрографијама (**Слика 44**, графички приказ) уочава се смањена протеинска експресија Н-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима, а значајне ефекте испољавају Pt(IV) комплекс 1, Лиганди 1 и 2 (у већим концентрацијама). У третману цисплатином ћелије задржавају протрузије, док у осталим третманима ћелије задобијају лоптаст облик са редукованим бројем протрузија (**Слика 44**, микрографије). Третман Лигандом 1 је изазвао највећу редукацију Н-кадхерина (**Слика 44**, графички приказ), што је у складу са његовим најјачим



антимиграторним ефектима (**Графикон 14**). Третамни свим испитиваним хемијским једињењима индујују агрегацију Н-кадхерина што би могло указивати на то да је овај протеин смештен у везикулама (**Слика 44**, микрографије).

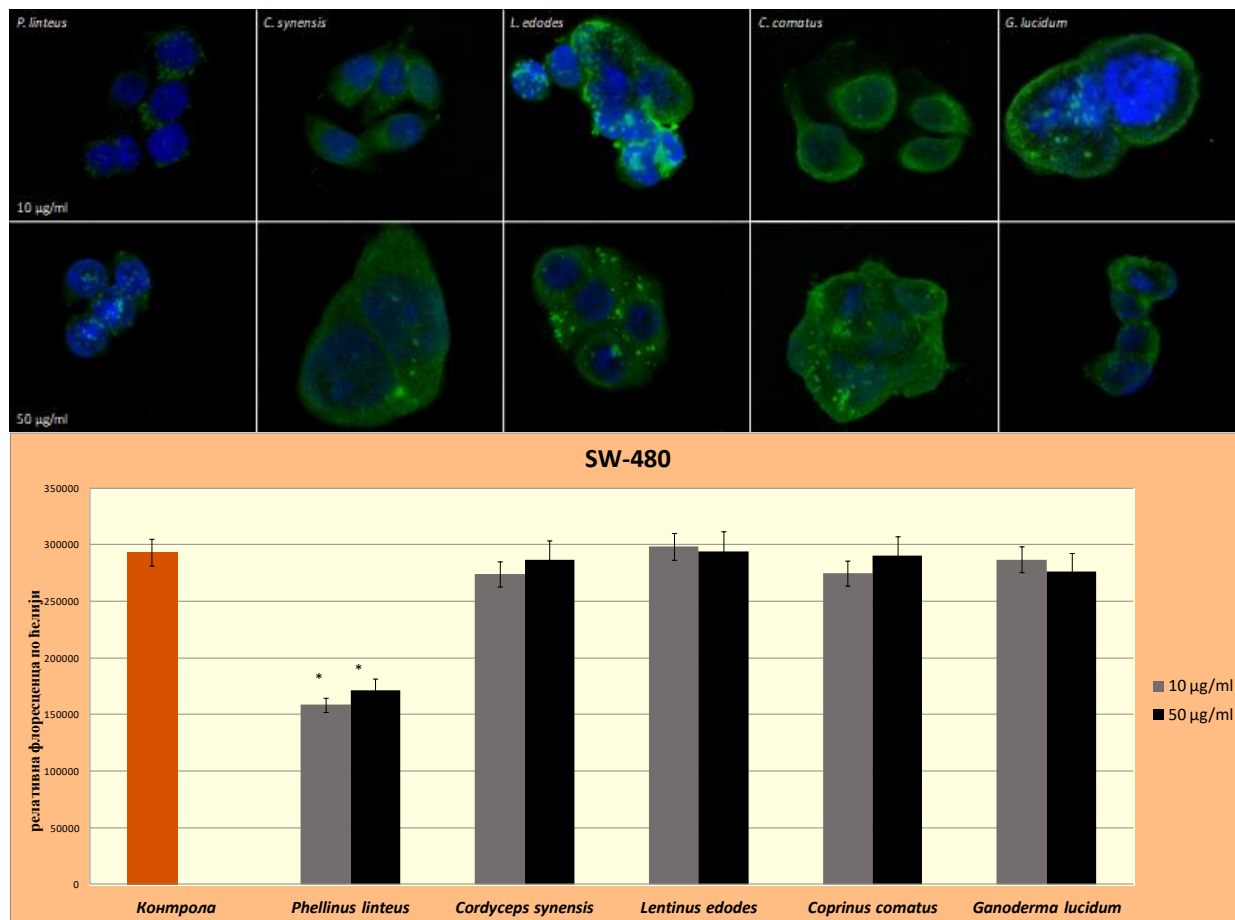
**Слика 44.** Протеинска експресија Н-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Од свих испитиваних третмана гљивама, једино екстракт *P. linteus* редукује протеинску експресију Н-кадхерина, у односу на нетретиране SW-480 ћелије (**Слика 45**, графички приказ), што корелира са ефектима третмана на миграторни потенцијал (**Графикон 15**). Дифузни распоред Н-кадхерина у цитоплазми третираних ћелија са ретким агрегацијама (микрографије), осим у третману *P. linteus* (присустан само у агрегацијама), корелира са промиграторним/антимиграторним ефектима испитиваних екстраката гљива (**Графикон 15**).

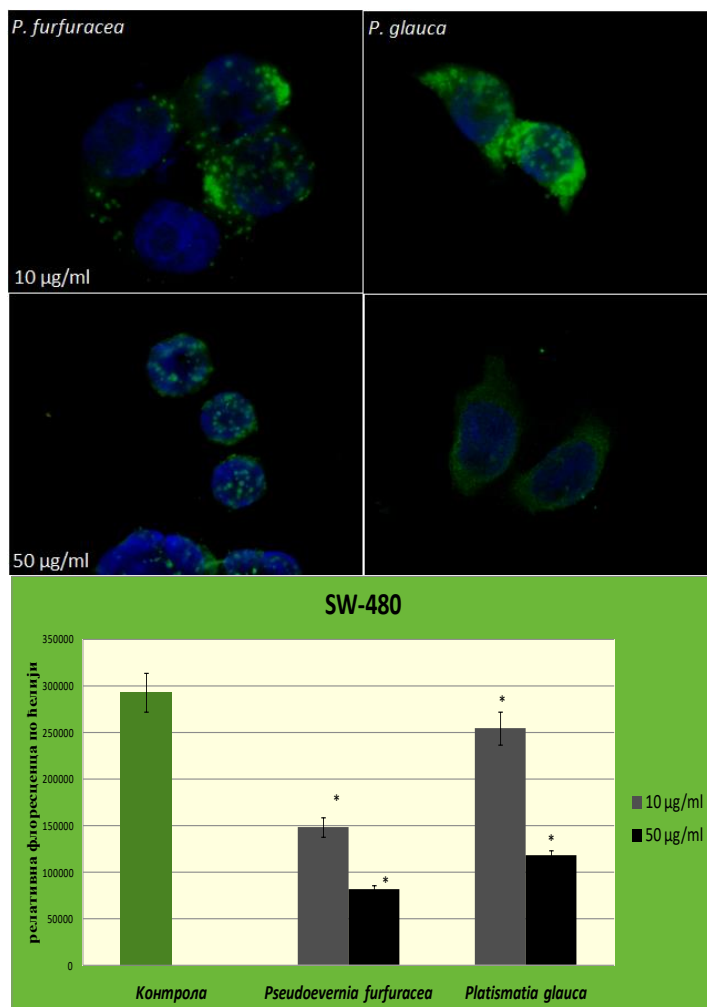
**Слика 45.** Протеинска експресија Н-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Екстракти лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* значајно редукују експресију Н-кадхерина у SW-480 ћелијама (Слика 46, графички приказ), а најјачи ефекат показује *P. furfuracea* (50 µg/mL), што корелира са смањеним миграторним потенцијалом третираних ћелија (Графикон 16). Распоред Н-кадхерина је у оквиру агрегата, само у зони око једра, без локације у зони ћелијске мембране (Слика 46, микрографије).

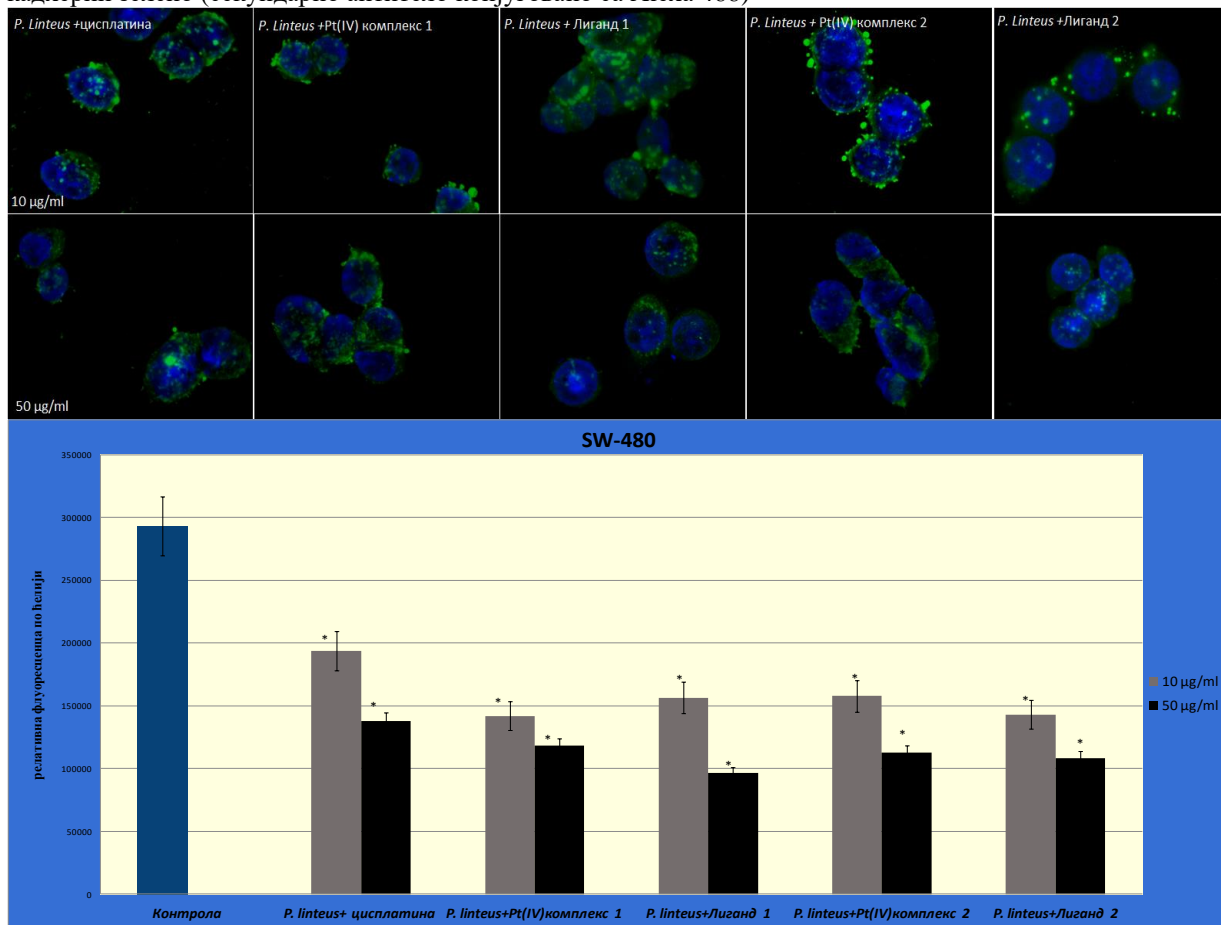
**Слика 46.** Протеинска експресија Н-кадхерина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

На микрографијама (Слика 47) се уочава да је експресија Н-кадхерина значајно смањена у свим комбинованим третманима, у односу на контролне SW-480 ћелије (графички приказ), што је у корелацији са антимигранторним ефектима (Графикон 17). Најјачи ефекат изазвано је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1, док је најслабији ефекат у КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина (Слика 47, графички приказ). Н-кадхерин присутан у агрегацијама у свим котртманима (микрографије).

**Слика 47.** Протеинска експресија Н-кадхерина у SW-480 ћелијама након третмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Н-кадхерин зелено (секундарно антитело конјуговано са Alexa 488)



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Протеинска експресија Н-кадхерина је очувана у свим третманима хемијским једињењима и екстрактима из природних извора (појединачним и КТ-0h) у обе ћелијске линије. Присуство Н-кадхерина у третираним ћелијама је у складу са чињеницом да се ради о имортелизованим ћелијским линијама карцинома. Редукција протеинске експресије Н-кадхерина са приметном агрегацијом у цитоплазми корелира са антимигранторним потенцијалом испитиваних третмана.

Поређењем добијених резултата за све третмане на обе ћелијске линије, уочава се да је протеинска експресија Н-кадхерина углавном редукована или непромењена. Ефекти појединачних третмана на НСТ-116 ћелијама прате тренд: хемијска једињења > екстракти гљива > екстракти лишћајева, док је на SW-480 ћелијама тренд: екстракти лишћајева > екстракти гљива > хемијска једињења. Лиганд 1 узрокује највећу редукцију експресије Н-кадхерина на НСТ-116 ћелијској линији, док у SW-480 ћелијама најјачи ефекат има екстракт *P. furfuracea*.

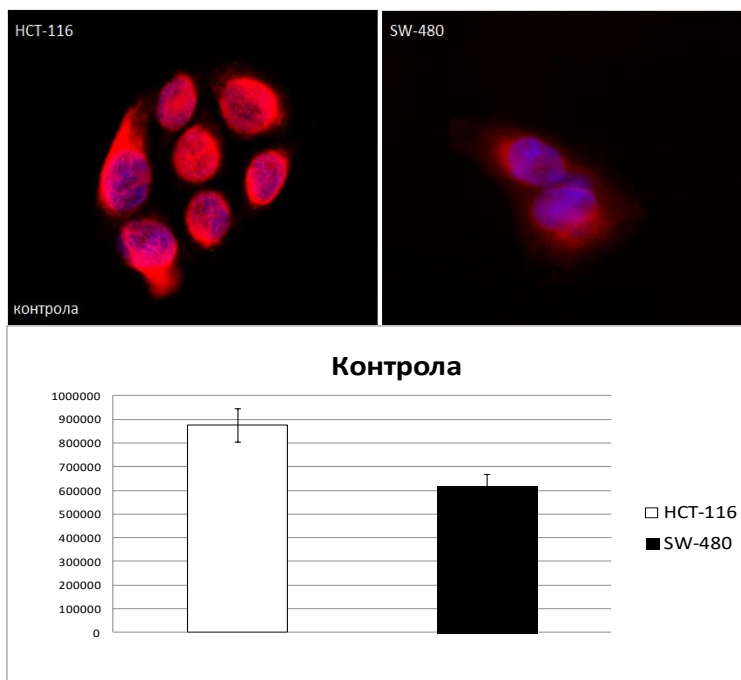
Котретмани показују јачи ефекат у односу на појединачне третмане на обе ћелијске линије. КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 испољава најјачу редукцију протеинске експресије Н-кадхерина у обе испитиване ћелијске линије.

### 2.2.5. Протеинска експресија виментина

Виментин је један од главних маркера мезенхимских ћелија и процеса ЕМТ, и као интермедијерни филамент експримира се у фибробластима и ћелијама карцинома које су у процесу ЕМТ. Протеинска експресија виментина детектована имунофлуоресценцом, испитивана је у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама, као и ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима у две сублеталне дозе, након 24 сата од третмана.

На **Слици 48** приказана је експресија виментина је у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама, и евидентно је већа је у НСТ-116 ћелијској линији, што је у корелацији са њиховим већим миграторним потенцијалом (**Графикон 9**).

**Слика 48.** Протеинска експресија виментина у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 $\times$ . Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



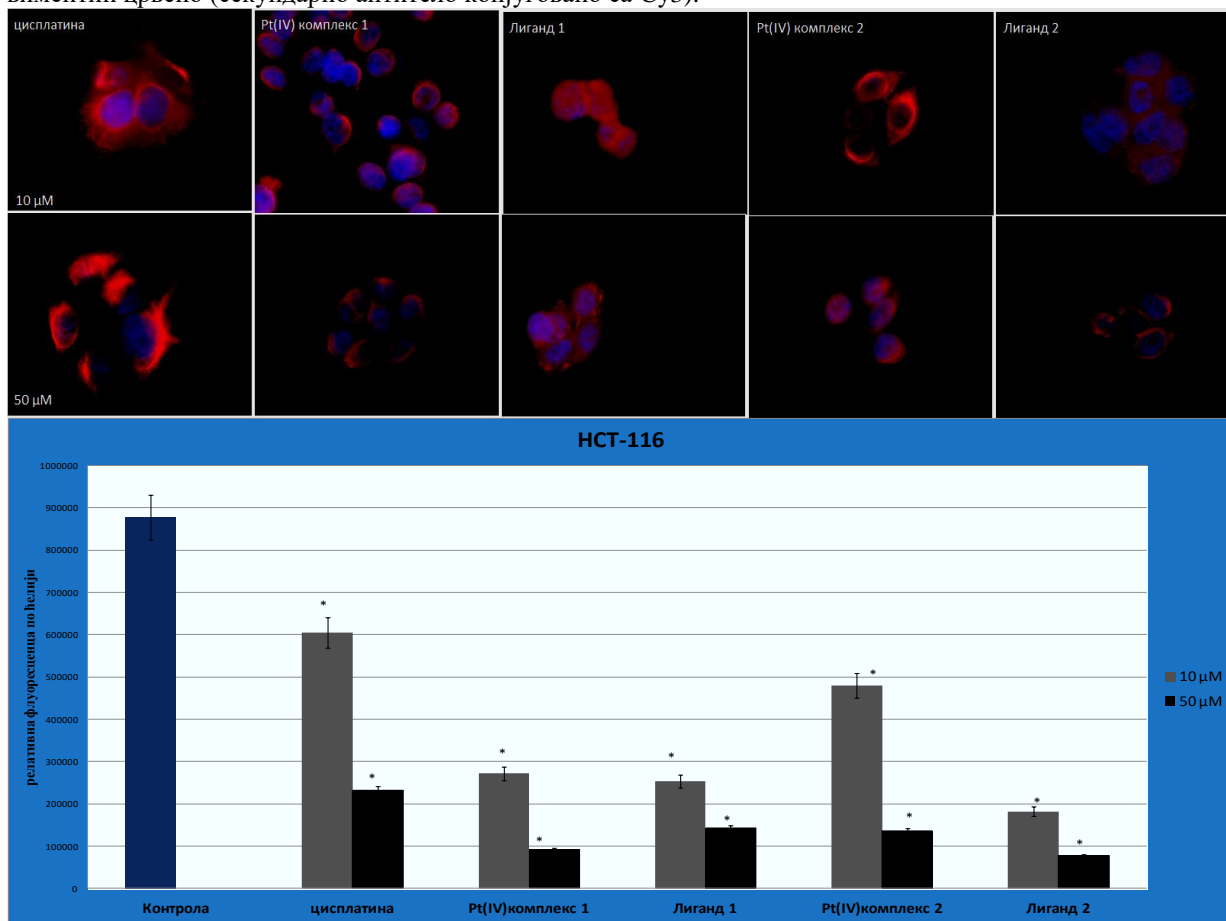
Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка.

### Протеинска експресија виментина у третираним НСТ-116 ћелијама

На сликама 49-52 приказана је експресија виментина у НСТ-116 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима.

Хемијска једињења у појединачним третманима редукују експресију виментина, ћелије задобијају лоптаст облик са редукованим бројем протрузија (осим у третману цисплатином и Pt(IV) комплексом 2) (Слика 49), што корелира са антимиграторним потенцијалом ових третмана (Графикон 10). Третмани Pt(IV) комплексом 1, Лигандом 1 и 2 најјаче редукују експресију виментина, док је ослабији ефекат показао третман цисплатином (Слика 49, графички приказ).

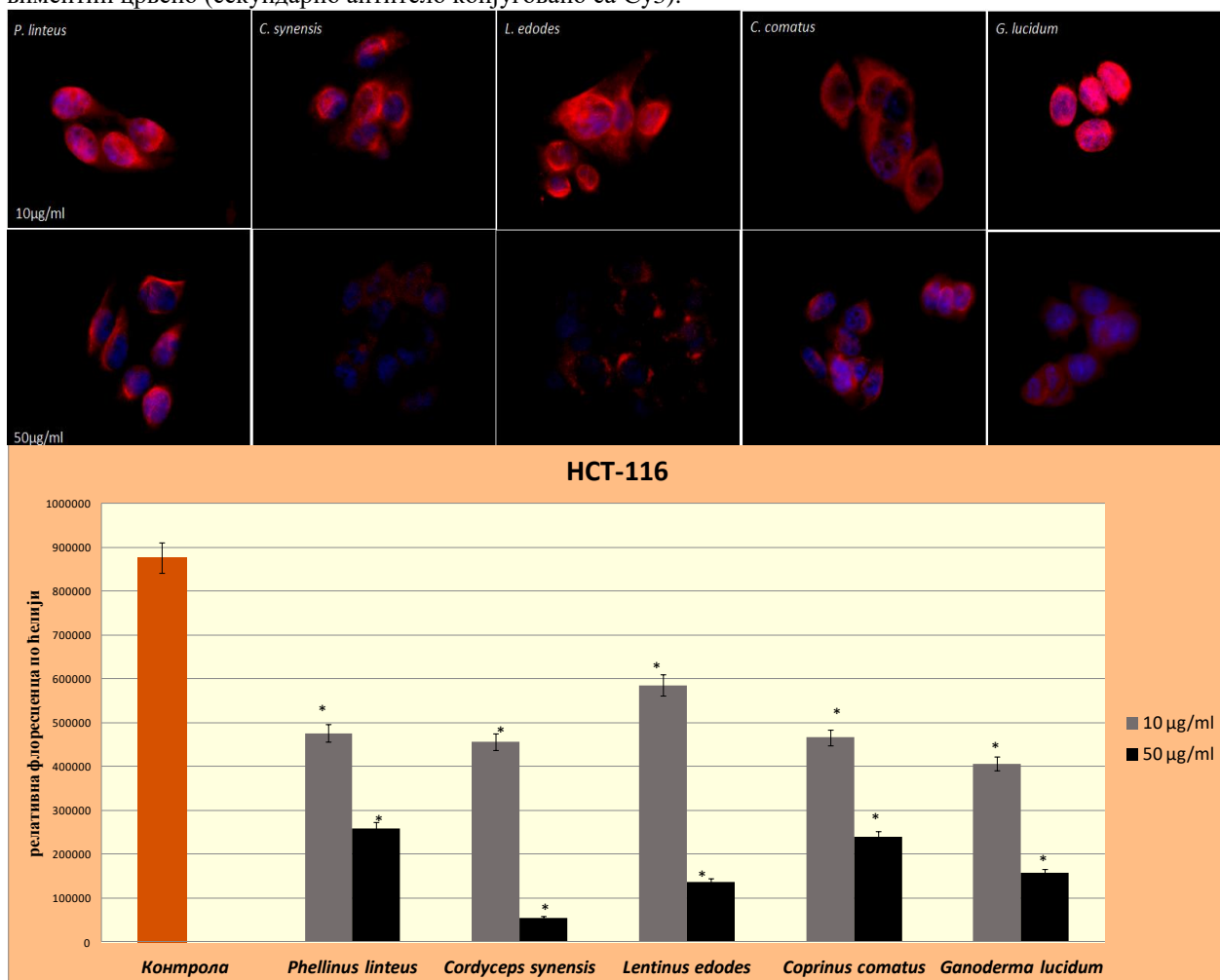
**Слика 49.** Протеинска експресија виментина у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увећању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Метанолни екстракти гљива индукују значајно смањење експресије виментина у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије (Слика 50, графички приказ). На приказаним микрографијама (Слика 50) уочава се да екстрактима *C. synensis*, *L. edodes* (50 µg/mL) и *G. lucidum* (10 µg/mL) редукују број протрузија, ћелије задобијају лоптаст облик, што је у складу са смањеним миграторним потенцијалом ћелија у овим третманима (Графикон 11). Метанолни екстракт *L. edodes* најјаче редукује експресију виментина (Слика 50).

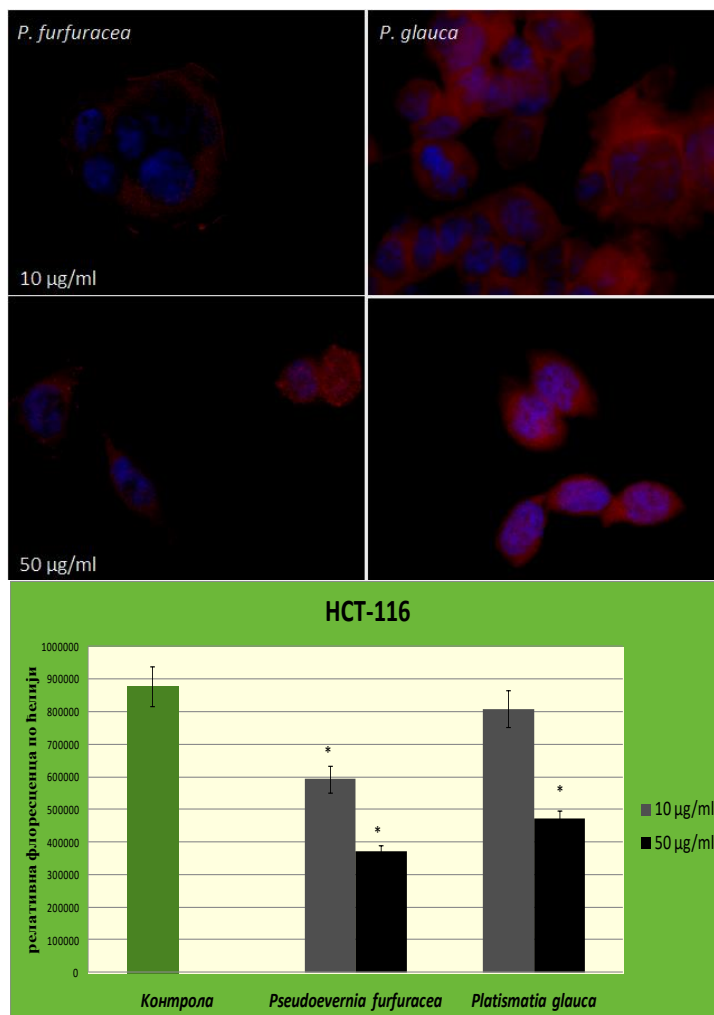
**Слика 50.** Протеинска експресија виментина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Екстракти лишајева значајно редукују експресију виментина у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Слика 51). Бољи ефекат показује екстракт *P. furfuracea*.

**Слика 51.** Протеинска експресија виментина у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).

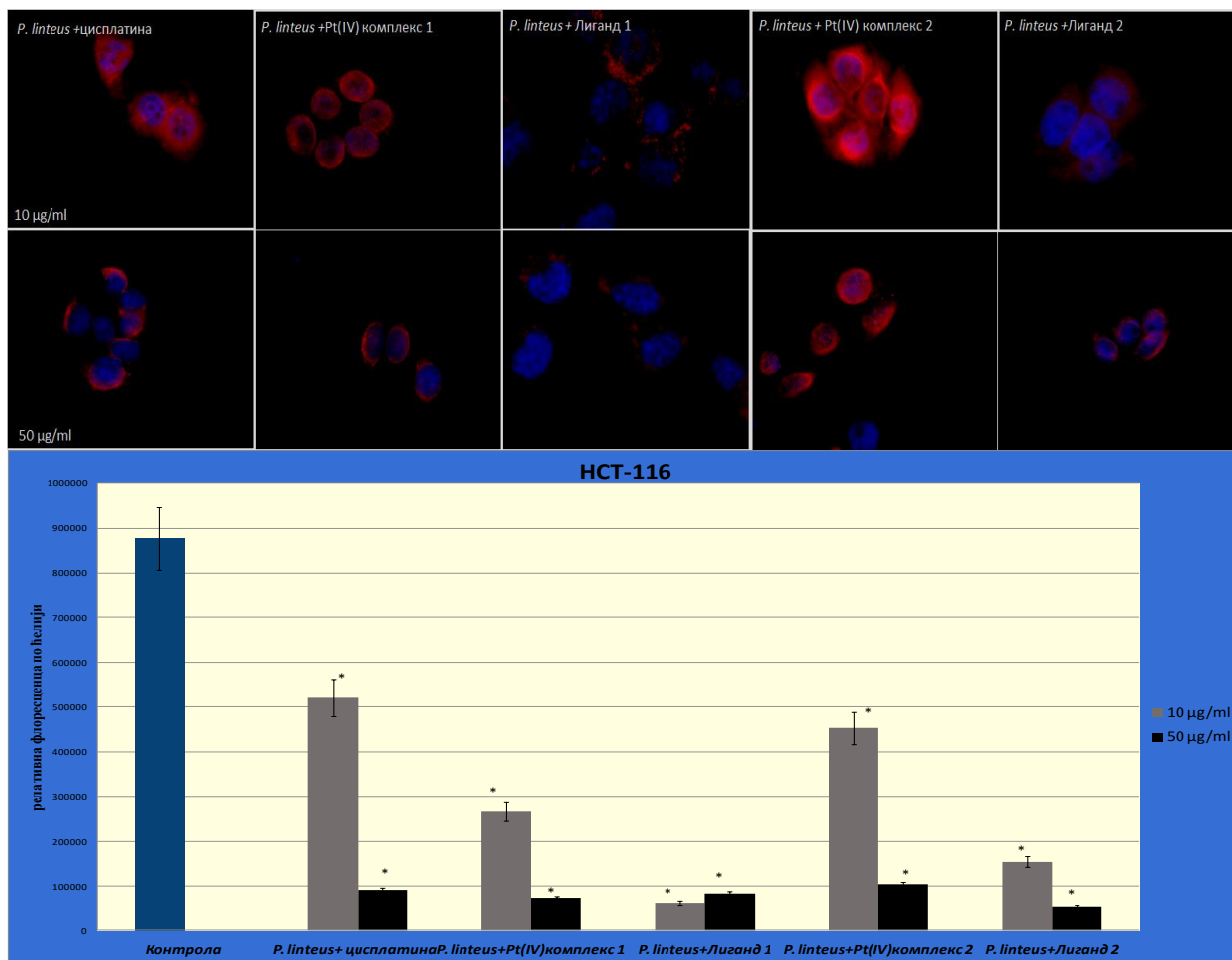


Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Котретмани дозно зависно снижавају протеинску експресију виментина у НСТ-116 ћелијама, осим КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 (Слика 52, графички приказ), што је у корелацији са смањењем мигрторног потенцијала третираних ћелија (Графикон 13). Најјачи ефекат изазвао је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1. Редукција броја протрузија је евидентна у котретманима (Слика 52, микрографије), осим у КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 (10 µg/mL+10 µM).



**Слика 52.** Протеинска експресија виментина у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (ДАПИ боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



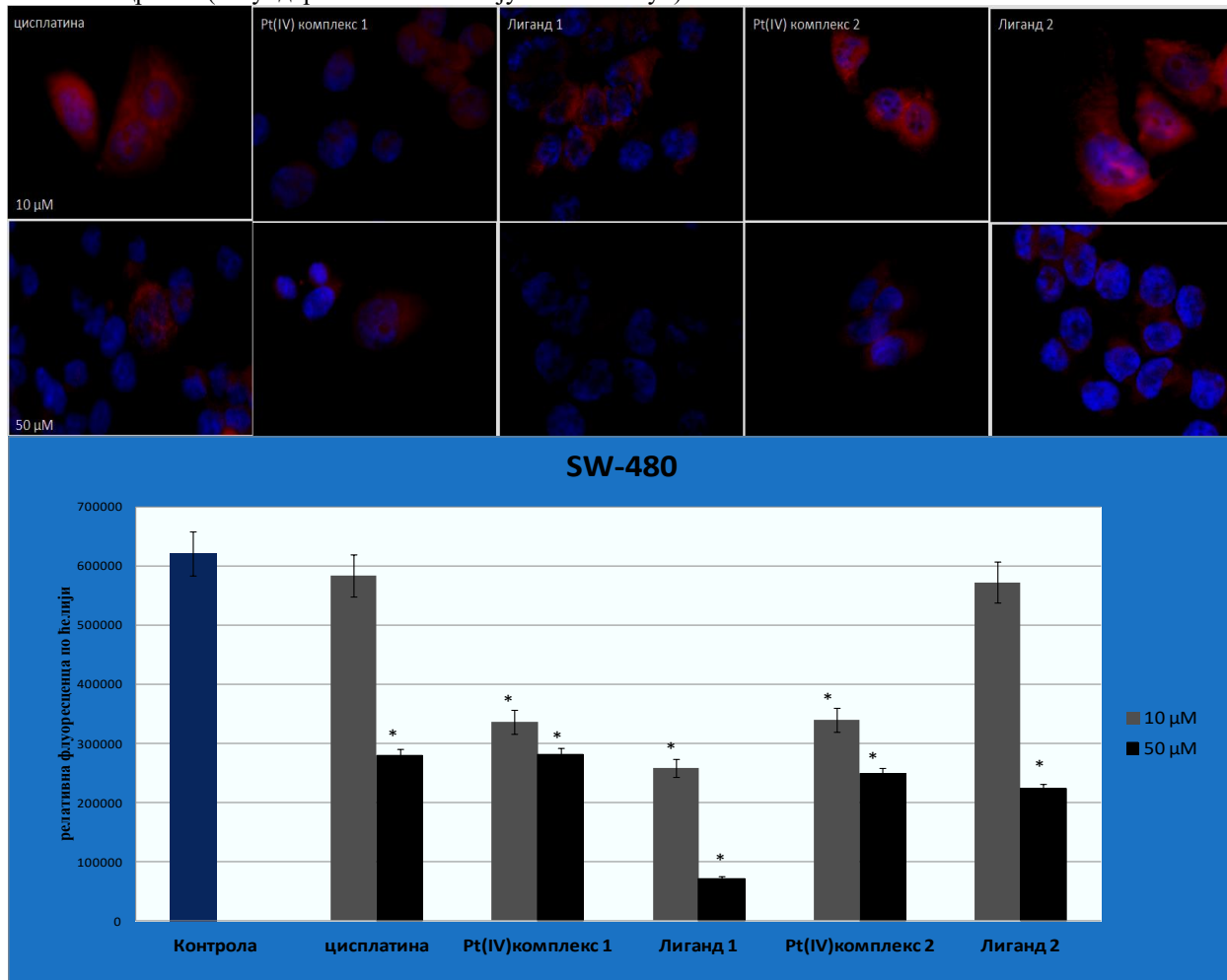
Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

### ***Протеинска експресија виментина у третираним SW-480 ћелијама***

На **сликама 53-56** приказана је експресија виментина у SW-480 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима.

Сви третмани хемијским једињењима значајно и дозно зависно снижавају протеинску експресију виментина (осим у цисплатина и Лиганд 2), у односу на нетретиране SW-480 ћелије (**Слика 53**, графички приказ). Лиганд 1 је изазвао највеће смањење виментина (**Слика 53**).

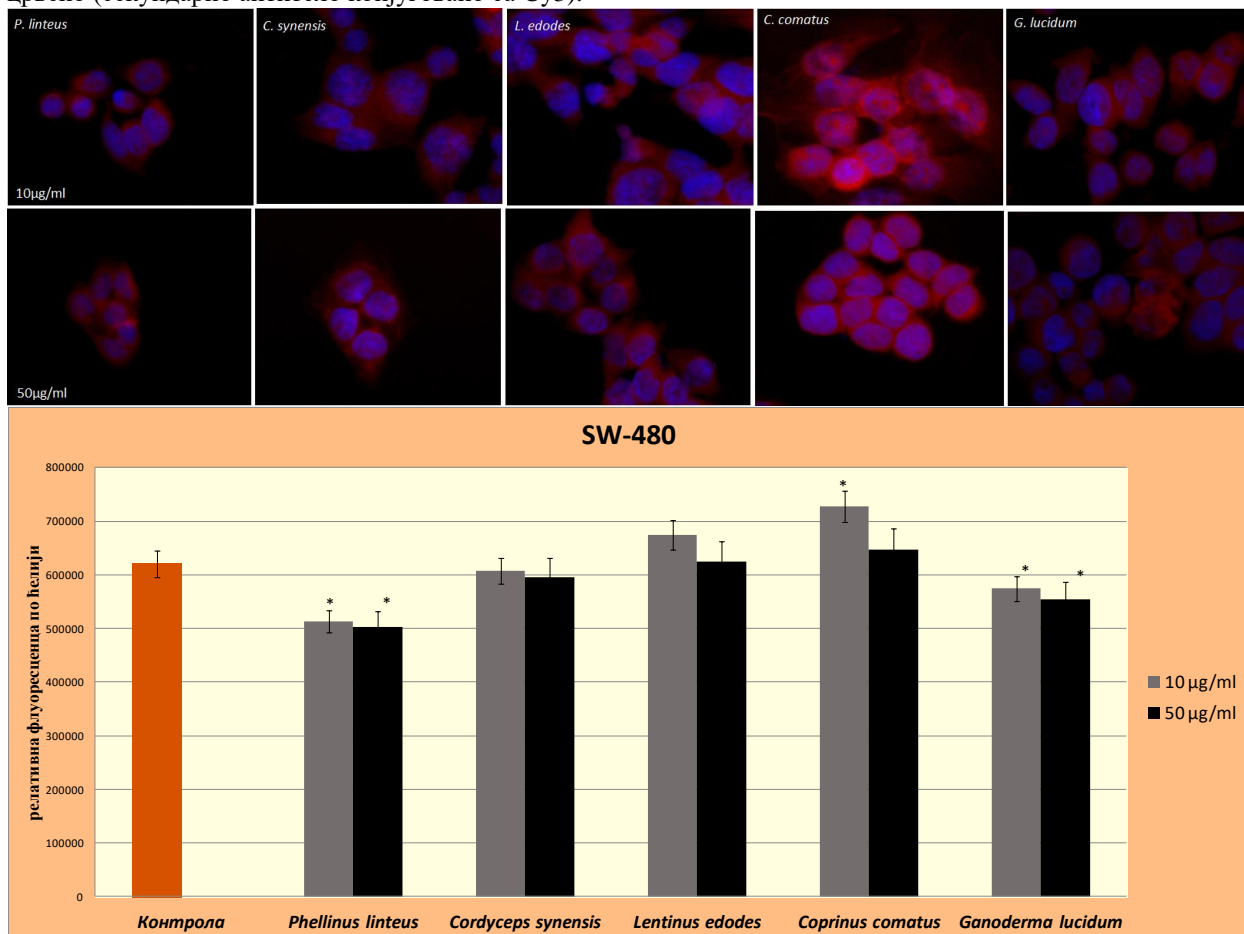
**Слика 53.** Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Метанолни екстракти гљива *P. linteus* и *G. lucidum* значајно снижавају, док екстракт *S. comatus* повећава протеинску експресију виментина, у односу на нетретиране SW-480 ћелије, без утицаја на фенотип ћелија (Слика 54).

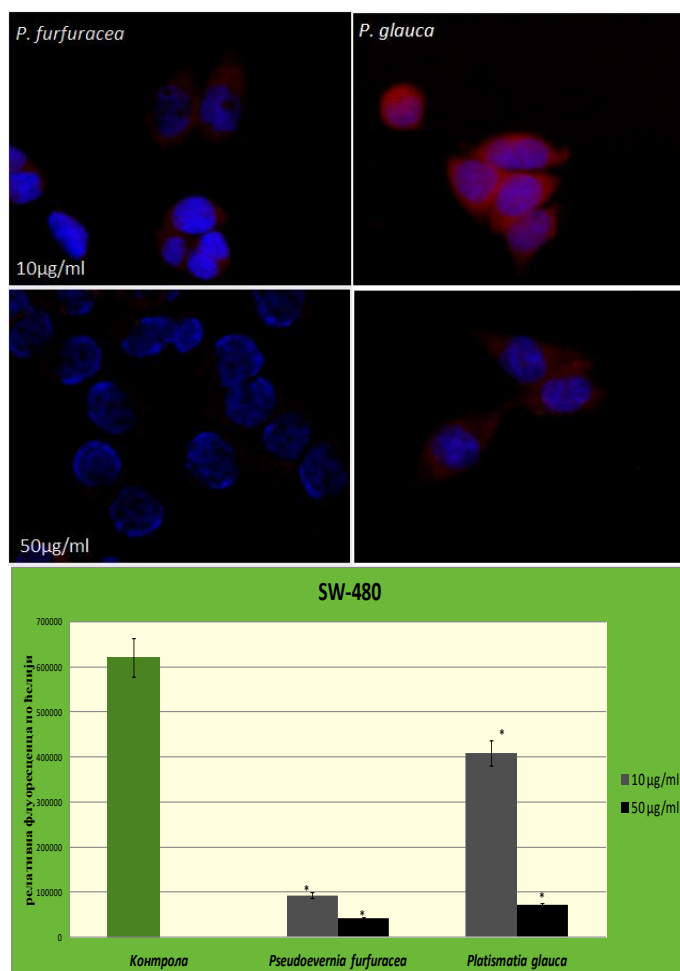
**Слика 54.** Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

На микрографијама и графичком приказу (Слика 55) се запажа да долази до значајног смањења експресије виментина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева, нарочито у третману *P. furfuracea* (50 µg/mL) (Слика 55). Са друге стране, експресија виментина је најизраженија у третману метанолним екстрактом *P. glauca* (10 µg/mL), (Слика 55, микрографија).

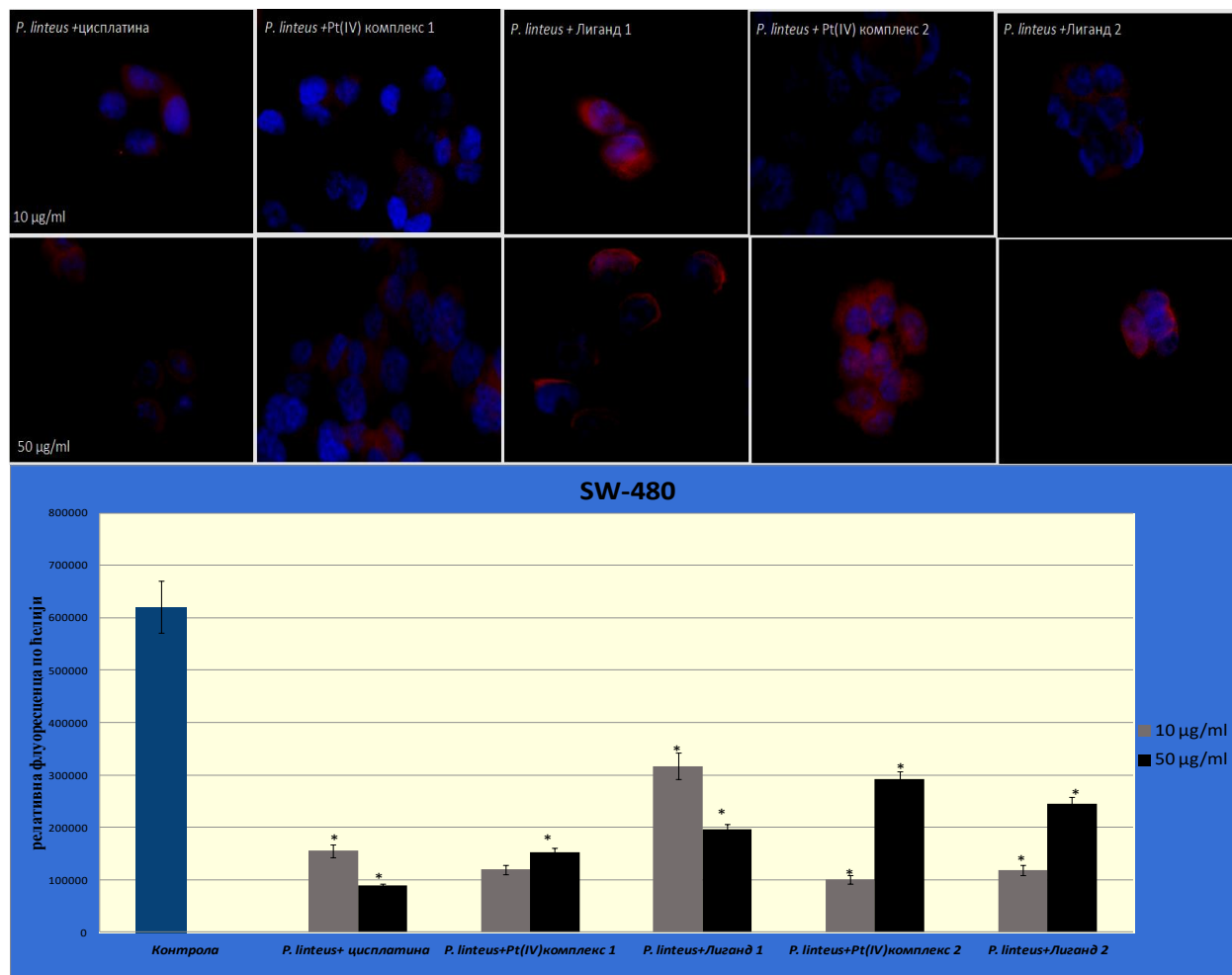
**Слика 55.** Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

У котретманима је значајно редукована протеинска експресија виментина односу на контролне SW-480 ћелије (Слика 56, графички приказ), што је у корелацији са антимигранторним ефектима котретмана (Графикон 17). Најјачи ефекат изазвао је КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина, Pt(IV) комплекс 1 и 2, док је најслабији ефекат испољио КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 (Слика 56, графички приказ).

**Слика 56.** Протеинска експресија виментина у SW-480 ћелијама након третмана (КТ-0h). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), виментин црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



Резултати интензитета протеинске експресије су добијени квантификацијом флуоресценце непосредним мерењем помоћу ImageJ програмског пакета. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Протеинска експресија виментина је очувана у свим третманима у обе ћелијске линије. Присуство виментина је у складу са чињеницом да се ради о имортализованим ћелијским линијама карцинома, а смањење протеинске експресије виментина корелира са антимигранторним потенцијалом испитиваних третмана.

Поређењем добијених резултата за испитиване третмане, на обе ћелијске линије, уочава се да је протеинска експресија виментина углавном редукована или непромењена (осим у третману *C. comatus* на SW-480 ћелијској линији). Добијени резултати у појединачним третманима на НСТ-116 ћелијама прате тренд: екстракти гљива > хемијска једињења > екстракти лишајева, док је на SW-480 ћелијама тренд: екстракти лишајева > хемијска једињења > екстракти гљива. *C. synensis* (50 µg/mL)

индукује највећу редукцију експресије виментина у НСТ-116 ћелијама, док у SW-480 ћелијама најјачи ефекат има екстракт *P. furfuracea*.

Комбиновани третмани имају јачи ефекат у односу на појединачне третмане на НСТ-116 ћелијској линији, док на SW-480 ћелијској линији КТ-0h за *P. linteus* + Лиганди 1, 2 и Pt(IV) комплекс 2 имају слабији ефекат од појединачних третмана. КТ-0 h за *P. linteus* + Лиганд 2 на НСТ-116 ћелијама, односно КТ-0h за *P. linteus* + цисплатина на SW-480 ћелијама, показују најјачу редукцију протеинске експресије виментина.

### 2.3. Концентрације металопротеиназе-9 (ММП-9)

У овом одељку представљени су резултати концентрације металопротеиназе-9 у ћелијама третираним испитиваним хемијским једињењима и екстрактима гљива и лишјајева у појединачним и комбинованим третманима. Концентрација ММП-9 у нетретираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама приказана је на **Графикону 18**. Добијени резултати показују већу концентрацију ММП-9 у НСТ-116 ћелијама, у односу на SW-480 ћелије колоректалног канцера.

**Графикон 18.** Концентрација ММП-9 у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



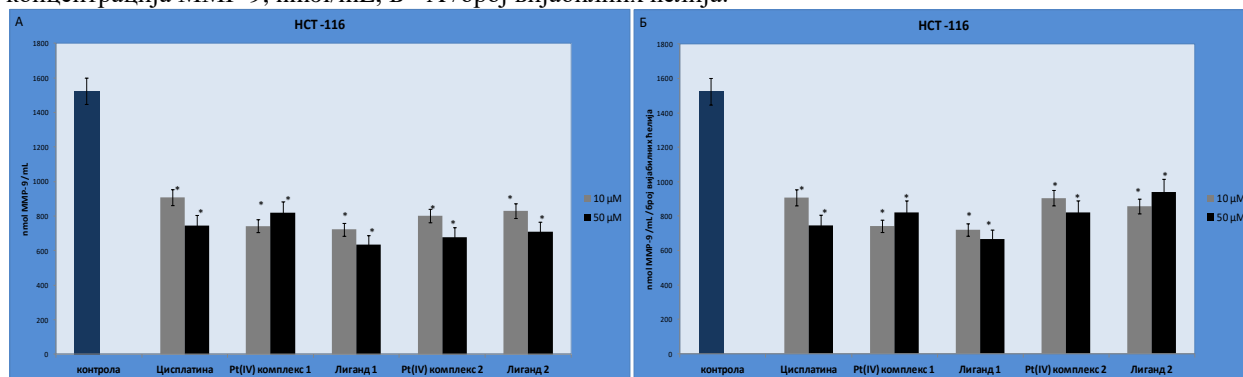
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка

### Концентрација ММР-9 у третираним НСТ-116 ћелијама

На **графиконима 19-22А** приказани су резултати концентрације ММР-9 изражени у  $\text{pmol/ml}$  у третираним НСТ-116 ћелијама, док су на **графиконима 19-22Б** представљени резултати концентрације ММР-9 прерачунате у односу на проценат вијабилних ћелија (МТТ тест).

Сва испитивана хемијска једињења значајно снижавају концентрацију ММР-9 у НСТ-116 ћелијама (**Графикон 19**), а најјачи ефекат показује Лиганд 1.

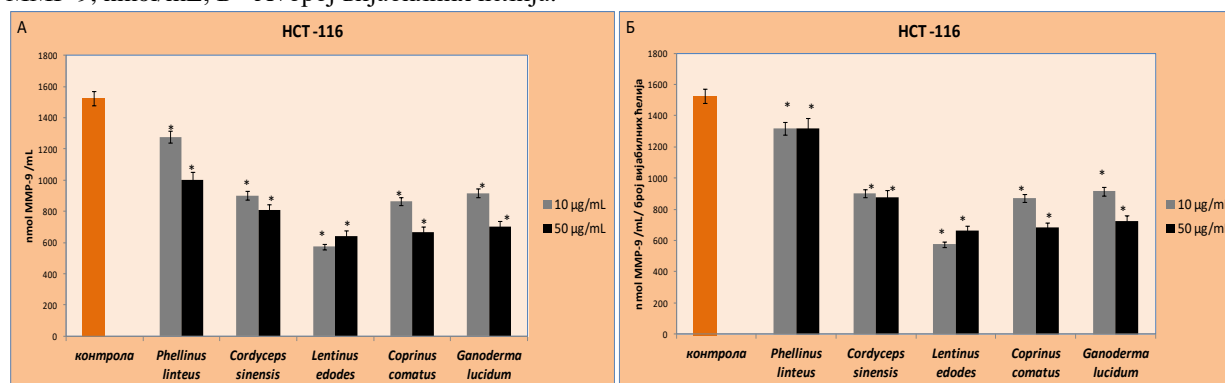
**Графикон 19.** Концентрација ММР-9 у НСТ-116 ћелијама третираним хемијским једињењима. А-концентрација ММР-9,  $\text{pmol/mL}$ ; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Концентрација ММР-9 је значајно смањена у НСТ-116 ћелијама третираним метанолним екстрактима гљива (**Графикон 20**). Најизраженији ефекте постиже екстракт *L. edodes*.

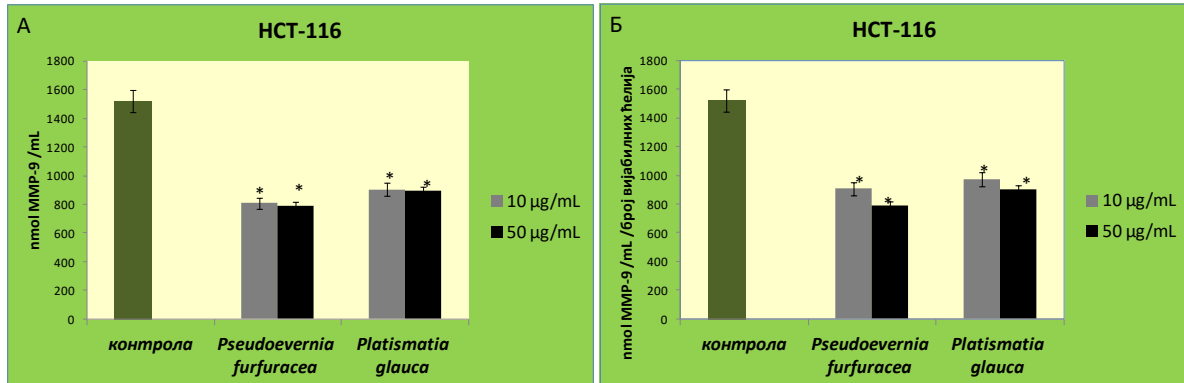
**Графикон 20.** Концентрација ММР-9 у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима гљива. А-концентрација ММР-9,  $\text{pmol/mL}$ ; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Резултати показују значајно смањење концентрације ММР-9 у НСТ-116 ћелијама третираним метанолним екстрактима лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* (**Графикон 21**).

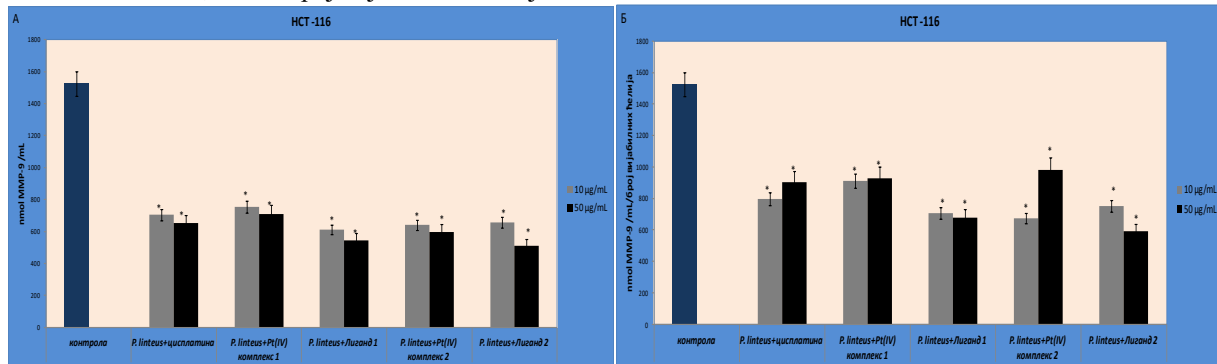
**Графикон 21.** Концентрација MMP-9 у НСТ-116 ћелијама третираним екстрактима лишјајева. А-концентрација MMP-9, pmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Котретмани значајно смањују концентрацију MMP-9 у НСТ-116 ћелијама (Графикон 22). Најјачи ефекат је показао КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 2.

**Графикон 22.** Концентрација MMP-9 у НСТ-116 ћелијама након котретмана (КТ-0h). А-концентрација MMP-9, pmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Значајно смањење концентрација MMP-9 у НСТ-116 ћелијама у свим третманима (Графикони 19-22), у складу је са антимигранторним ефектима ових третмана (Графикони 10-13).

### Концентрација MMP-9 у третираним SW-480 ћелијама

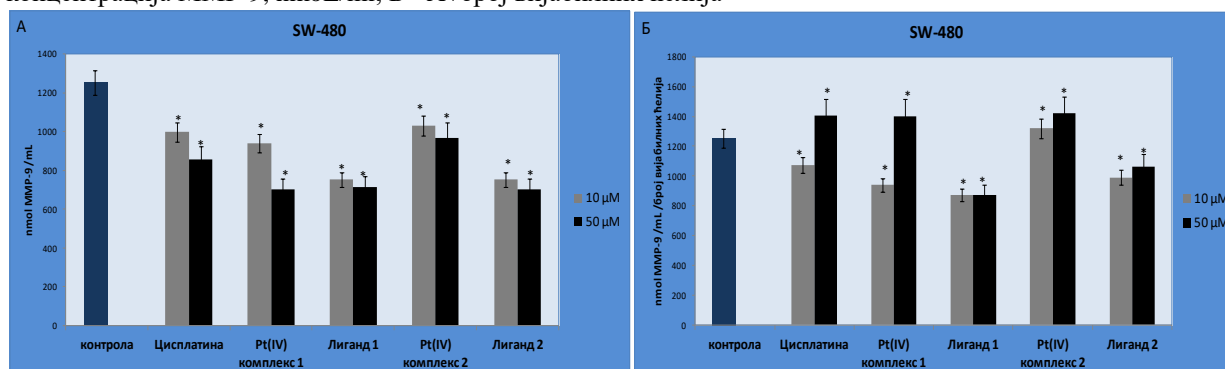
На графиконима 23-26А приказани су резултати концентрација MMP-9 у појединачним и комбинованим третманима на SW-480 ћелијској линији, док су вредности изражене у односу на проценат вијабилних ћелија приказане у графиконима 23-26Б.

Сва испитивана хемијска једињења значајно снижавају концентрацију MMP-9 у SW-480 ћелијама (Графикон 23А). Међутим, када се концентрације изразе у односу на број вијабилних



ћелија у одговарајућем третману, ниже дозе цисплатине и Pt(IV) комплекса 1, као и Лиганди 1 и 2 у обе дозе, значајно смањују, док остали третмани значајно повећавају концентрацију MMP-9 у испитиваним ћелијама (Графикон 23Б). Најнижа вредност концентрације MMP-9 је у третману Лиганодом 1, што корелира са ефектима на миграторни потенцијал SW-480 ћелија (Графикон 14).

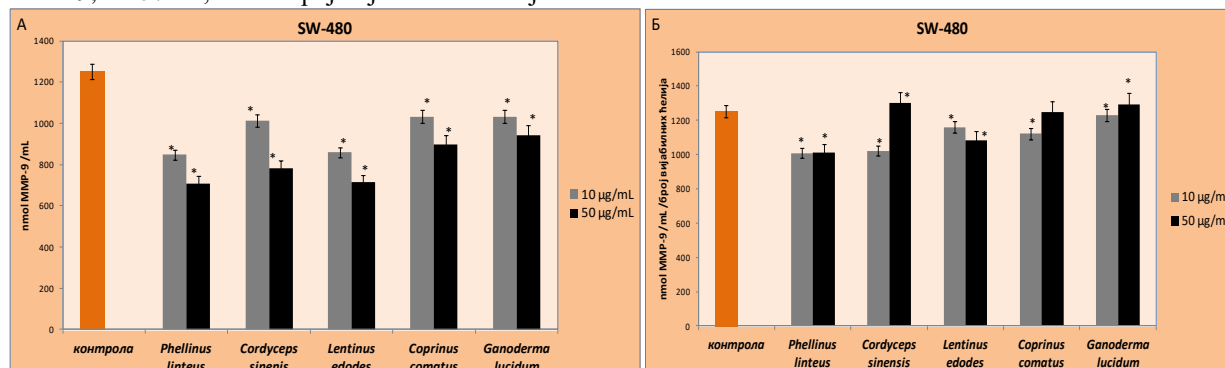
**Графикон 23.** Концентрација MMP-9 у SW-480 ћелијама третираним хемијским једињењима. А-концентрација MMP-9, nmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Концентрација MMP-9 у SW-480 ћелијама третираним метанолним екстрактима гљива је дозно зависно снижена (Графикон 24А). Вредности изражене у односу на проценат вијабилних ћелија (Графикон 24Б) показују да екстракти гљива *P. linteus*, *L. edodes* (у обе концентрације), као и *C. sinensis* и *C. comatus* (10 μg/mL) узрокују смањење, док третмани *C. sinensis* и *G. lucidum* (50 μg/mL) повећавају концентрацију MMP-9 у испитиваним ћелијама. Третман екстрактом *P. linteus* показује најниже вредности MMP-9, што је у складу са антимиграторним ефектима овог екстракта (Графикон 15).

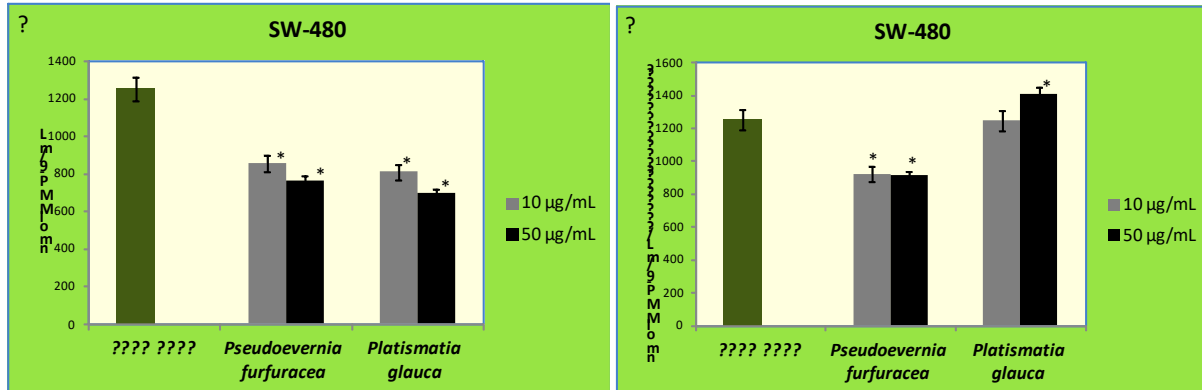
**Графикон 24.** Концентрација MMP-9 у SW-480 ћелијама третираним екстрактима гљива. А-концентрација MMP-9, nmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \* $p < 0.05$ , значајна разлика у односу на контролне вредности.

Метанолни екстракти лишајева значајано смањују концентрације MMP-9 у SW-480 ћелијама (Графикон 25А). Вредности изражене у односу на проценат вијабилних ћелија показују да екстракт *P. furfuracea* снижава, док екстракт *P. glauca* (50 µg/mL) повећава концентрацију MMP-9 у SW-480 ћелијама (Графикон 25Б).

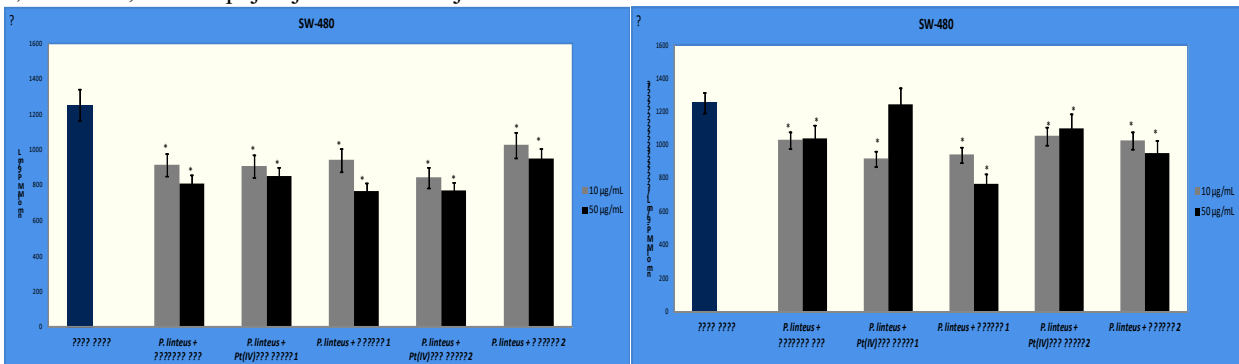
Графикон 25. Концентрација MMP-9 у SW-480 ћелијама третираним екстрактима лишајева. А-концентрација MMP-9, pmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

Котретмани значајно смањују концентрација MMP-9 у испитиваним ћелијама (Графикон 26), што је у складу са антимигранторним потенцијалом (Графикон 17). Најниже вредности MMP-9 индукује КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1 (Графикон 26Б).

Графикон 26. Концентрација MMP-9 у SW-480 ћелијама након котретмана (КТ-0h). А-концентрација MMP-9, nmol/mL; Б - А /број вијабилних ћелија.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка; \*p < 0.05, значајна разлика у односу на контролне вредности.

Концентрација MMP-9 је измерена у обе ћелијске линије након свих третмана. Присуство MMP-9 у третираним ћелијама је у складу са чињеницом да се ради о имортализованим ћелијским линијама карцинома, а смањење концентрације MMP-9 корелира са антимигранторним потенцијалом испитиваних третмана.

Ефекти појединачних третмана на концентрације ММП-9 на обе ћелијске линије, прате тренд: хемијска једињења > екстракти лишајева > екстракти гљива. Екстракт гљиве *L. edodes* најјаче редукује концентрацију ММП-9 у НСТ-116 ћелијама, док у SW-480 ћелијама најјачи ефекат има Лиганд 1.

Котретмани за *P. linteus* + Лиганди 1, 2 имају јачи ефекат у односу на појединачне третмане на НСТ-116 ћелијској линији, док остали КТ-0 h показују слабији ефекат од појединачних третмана. На SW-480 ћелијској линији, сви КТ-0 h имају бољи ефекат од појединачних третмана. Укупно, најснажнији ефекат на НСТ-116 ћелијској линији имао је екстракт *L. edodes*, док је на SW-480 ћелијама најјачи ефекат постигао КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1.

### 3. Ефекти третмана на редокс статус ћелија колоректалног карцинома

У овом одељку представљени су резултати ефеката третмана (појединачних и комбинованих) на концентрације параметара редокс статуса (супероксид анјон радикал -  $O_2^{\cdot-}$ , нитрити и GSH) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

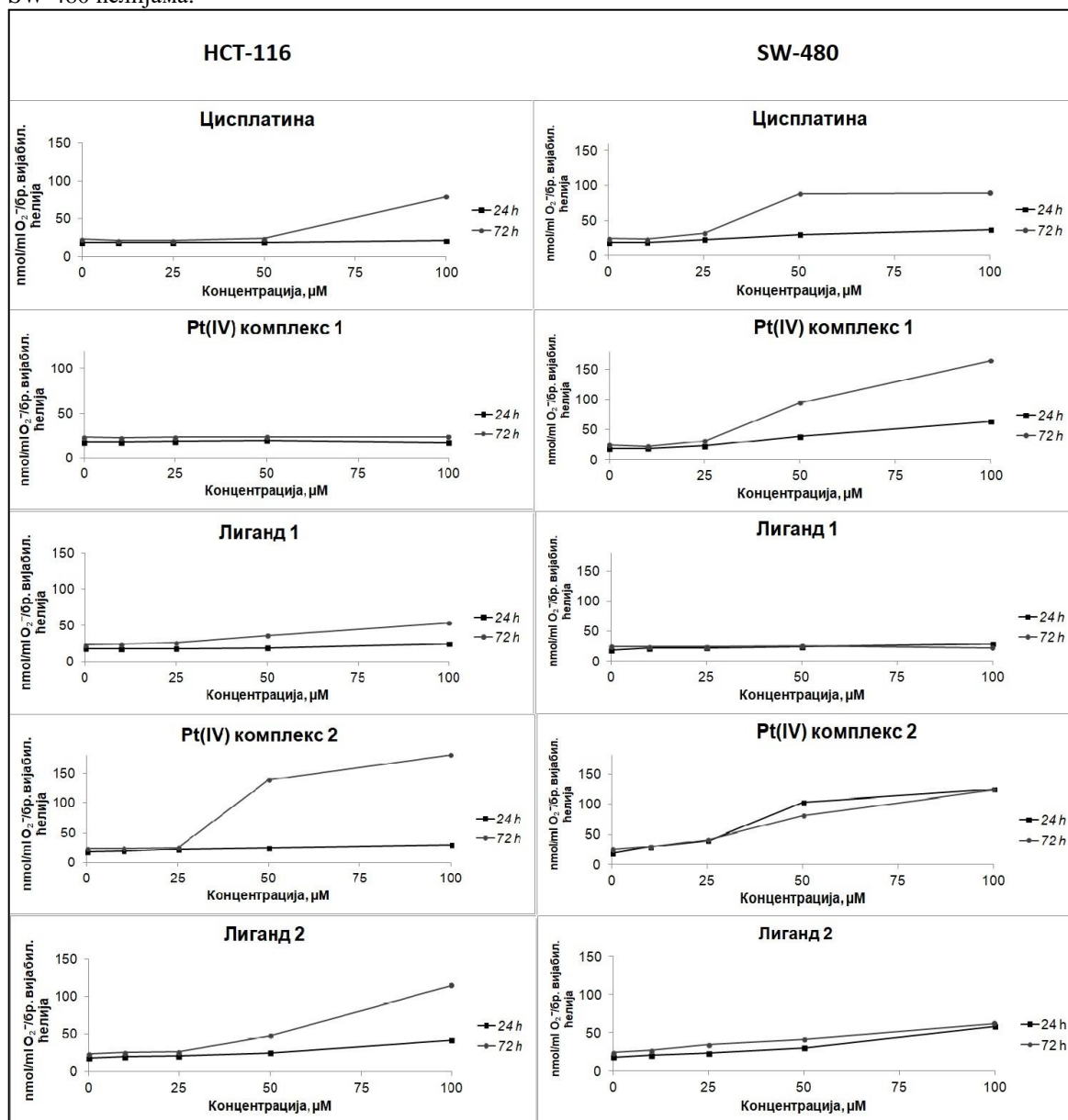
#### 3.1. Концентрација супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )

Ефекти појединачних третмана хемијским једињењима (цисплатина, Pt(IV) комплекси 1 и 2, Лиганди 1 и 2) и екстракта гљива и лишајева, као и ефекти котретмана (КТ-0h и КТ-6h за *P. linteus* и хемијска једињења) на концентрацију  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 и SW-480 ћелијама представљени су у **Прилогу 5** (вредности изражене у nmol/mL) и на **Графиконима 27-31** (вредности изражене у nmol/mL у односу на број вијабилних ћелија).

Резултати показују да, од испитиваних хемијских једињења, Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2 након 24 и 72 сата, а цисплатина након 24 сата значајно повећавају концентрације  $O_2^{\cdot-}$  у НСТ-116 ћелијама (**Прилог 5 – Табела 19**). Када се концентрације овог параметра изразе у односу на број вијабилних ћелија у третману (МТТ тест), резултати показују дозно и временски зависно повећање нивоа  $O_2^{\cdot-}$  у свим третманима, осим за Pt(IV) комплекс 1 (**Графикон 27**). Третмани Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2 делују значајно прооксидационо на НСТ-116 ћелије после 72 сата, што је у корелацији са њиховим јаким цитотоксичним ефектима.

Сви третмани испитиваним хемијским једињењима (осим Лиганда 1), на дозно и временски зависан начин, значајно повећавају концентрације  $O_2^{\cdot-}$  у SW-480 ћелијама (**Прилог 5 – Табела 20**, **Графикон 27**). Најјаче прооксидационе ефекте су показали Pt(IV) комплекси 1 и 2, у односу на контролне ћелије, као и у односу на ефекте цисплатине као позитивне контроле (**Графикон 27**).

**Графикон 27.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



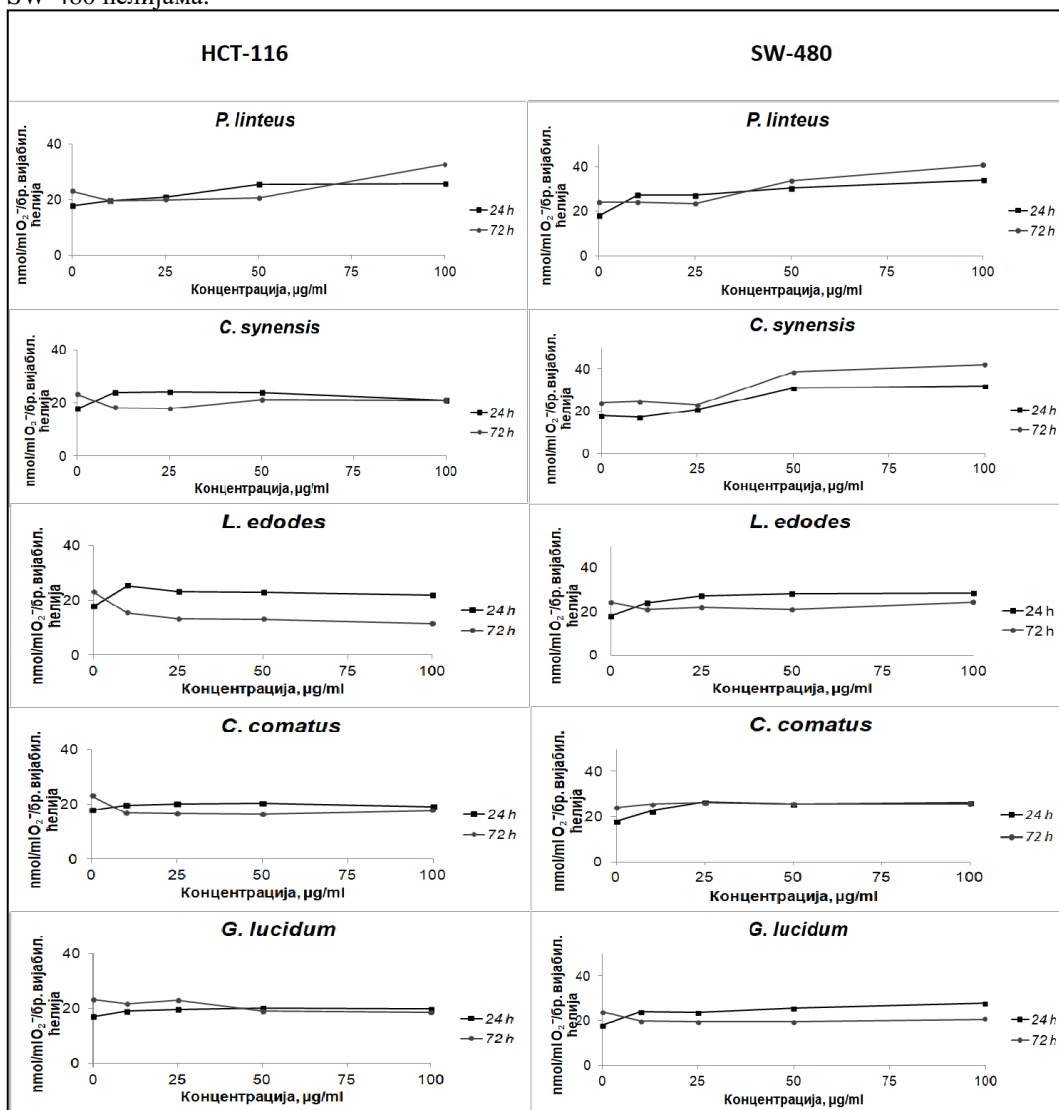
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL)  $O_2^-$  /број вијабилних ћелија.

Генерално, третмани метанолним екстрактима гљива значајно повећавају концентрацију  $O_2^-$  након 24 сата (прооксидациони ефекат), и значајно смањују ниво овог параметра након 72 сата третмана (антиоксидациони ефекат) у НСТ-116 ћелијама (Прилог 5 – Табела 21). Када се резултати изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 28), сви екстракти у ниским концентрацијама показују тренд повећања концентрације  $O_2^-$  након 24 сата, и тренд смањења нивоа овог параметра након 72 сата (Графикон 28). Метанолни екстракт *P. linteus* делује

пророксидационо на НСТ-116 ћелије, што је у корелацији са цитотоксичним ефектима овог третмана.

У SW-480 ћелијама, метанолни екстракти *P. linteus* у свим концентрацијама, и *C. comatus*, *G. lucidum* у нижим дозама, делују прооксидационо (значајно повећавају ниво  $O_2^{\cdot-}$ ) након 24 сата, док сви третмани делују антиоксидационо (значајно смањују ниво  $O_2^{\cdot-}$ ) након 72 сата третмана (Прилог 5 – Табела 22). У односу на број вијабилних ћелија, сви екстракти у ниским концентрацијама делују прооксидационо, осим *L. edodes* и *G. lucidum* који делују благо антиоксидационо, након 24 сата (Графикон 28). Највеће, дозно и временски зависно повећање концентрације  $O_2^{\cdot-}$  (прооксидационо деловање) изазвано је екстрактима *P. linteus* и *C. synensis* (Графикон 28), што је у сагласности са њиховим цитотоксичним ефектима.

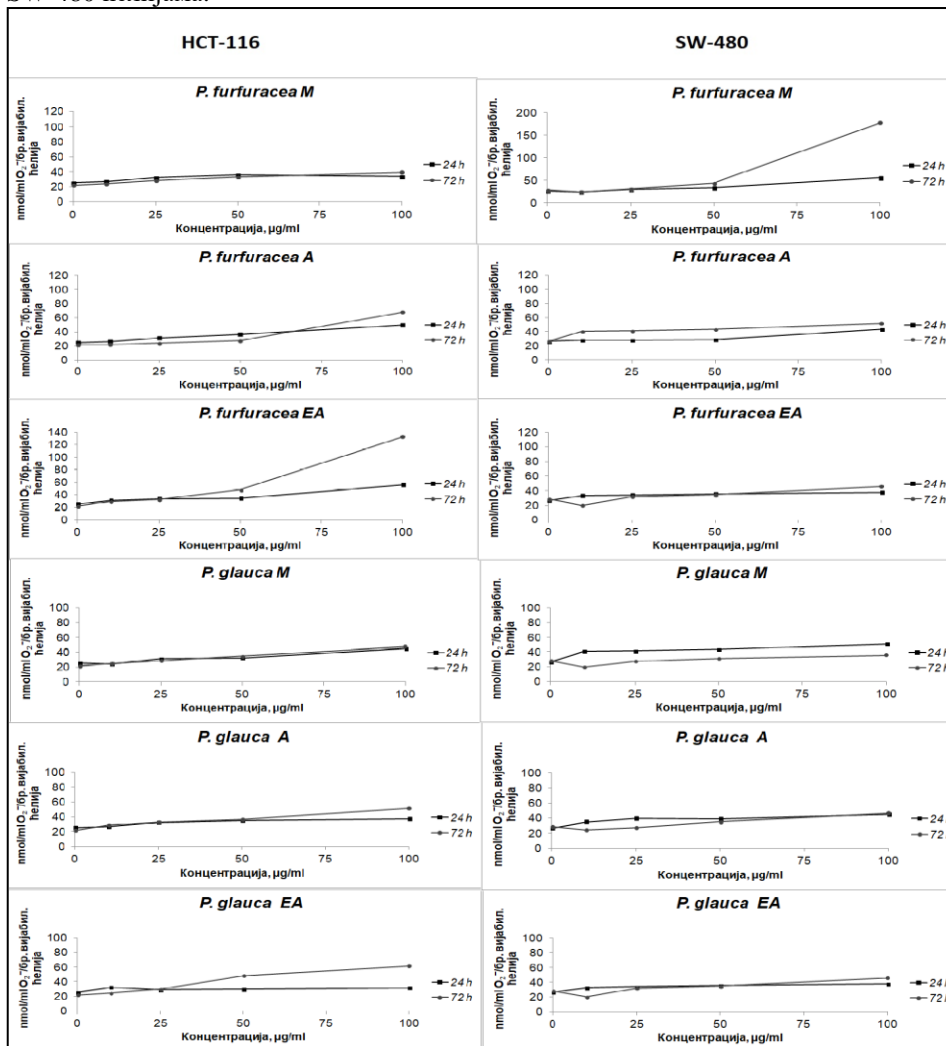
**Графикон 28.** Ефекти екстраката гљива на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (pmol/mL)  $O_2^{\cdot-}$  /број вијабилних ћелија

Метанолни, ацетонски и етилацетатни екстракти лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca*, повећавају концентрације  $O_2^-$  и делују прооксидационо у НСТ-116 ћелијама (Прилог 5 – Табела 21). Када се резултати изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 29), евидентна је дозна зависност прооксидационих ефеката, а у случају етилацетатног екстракта обе врсте лишајева, изражена је и временска зависност повећања концентрације  $O_2^-$ . Најбољи прооксидациони ефекат је показао етилацетатни екстракт *P. furfuracea* (Графикон 29). У SW-480 ћелијама, ниже дозе (10 и 25  $\mu\text{g/mL}$ ) *P. furfuracea* и *P. glauca* редукују концентрацију  $O_2^-$  (антиоксидациони ефекат), док више дозе (50 и 100  $\mu\text{g/mL}$ ) значајно повећавају ниво овог параметра (прооксидациони ефекат) (Прилог 5 – Табела 22). У односу на број вијабилних ћелија, испитивани третмани изазивају дозно зависно повећање концентрације  $O_2^-$  у SW-480 ћелијама, промене су израженије у третманима екстрактима *P. furfuracea* (посебно метанолни и етилацетатни) (Графикон 29).

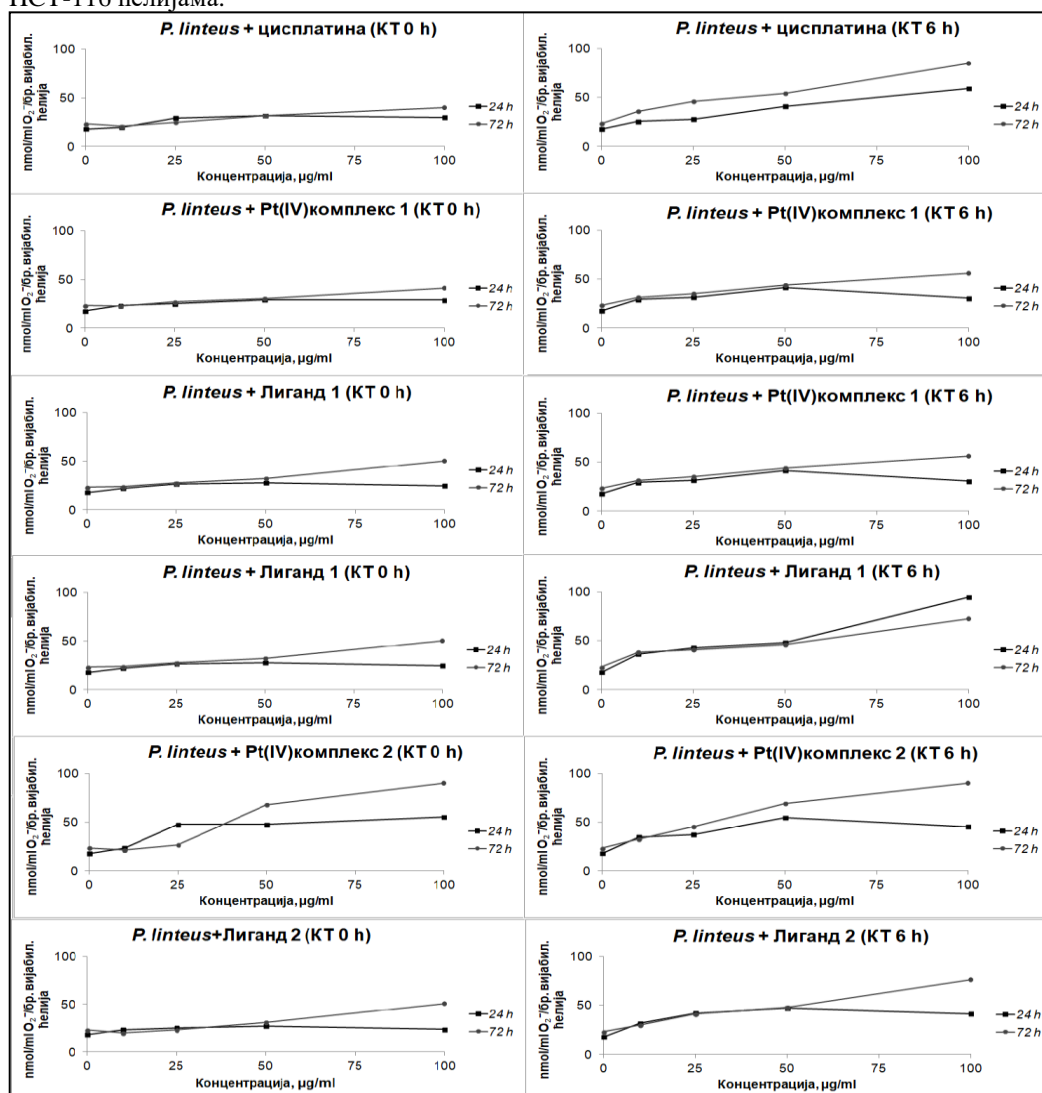
Графикон 29. Ефекти екстракта лишајева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL)  $O_2^-$  /број вијабилних ћелија.

У котретманима са *P. linteus* и хемијским једињењима (КТ-0h и КТ-6h) долази до статистички значајног повећања концентрације  $O_2^{\cdot -}$  после 24 сата (прооксидациони ефекат), док продужени третман (72 сата) доводи до смањења нивоа овог параметра (антиоксидациони ефекат) у НСТ-116 ћелијама (Прилог 5 – Табела 23). У односу на број вијабилних ћелија, сви котретмани индукују дозно зависно повећање  $O_2^{\cdot -}$ , испољавајући јак прооксидациони ефекат (Графикон 30). Ефекти су јаче изражени у КТ-6h, а генерално *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 показују најјаче прооксидационо деловање, што је у корелацији са цитотоксичношћу овог котретмана. Резултати показују да КТ изазивају већу продукцију  $O_2^{\cdot -}$  (Графикон 30) у односу на појединачне третмане испитиваним хемијским једињењима или екстрактом *P. linteus* (Графикони 27 и 28), осим Pt(IV) комплекс 2 у високим концентрацијама.

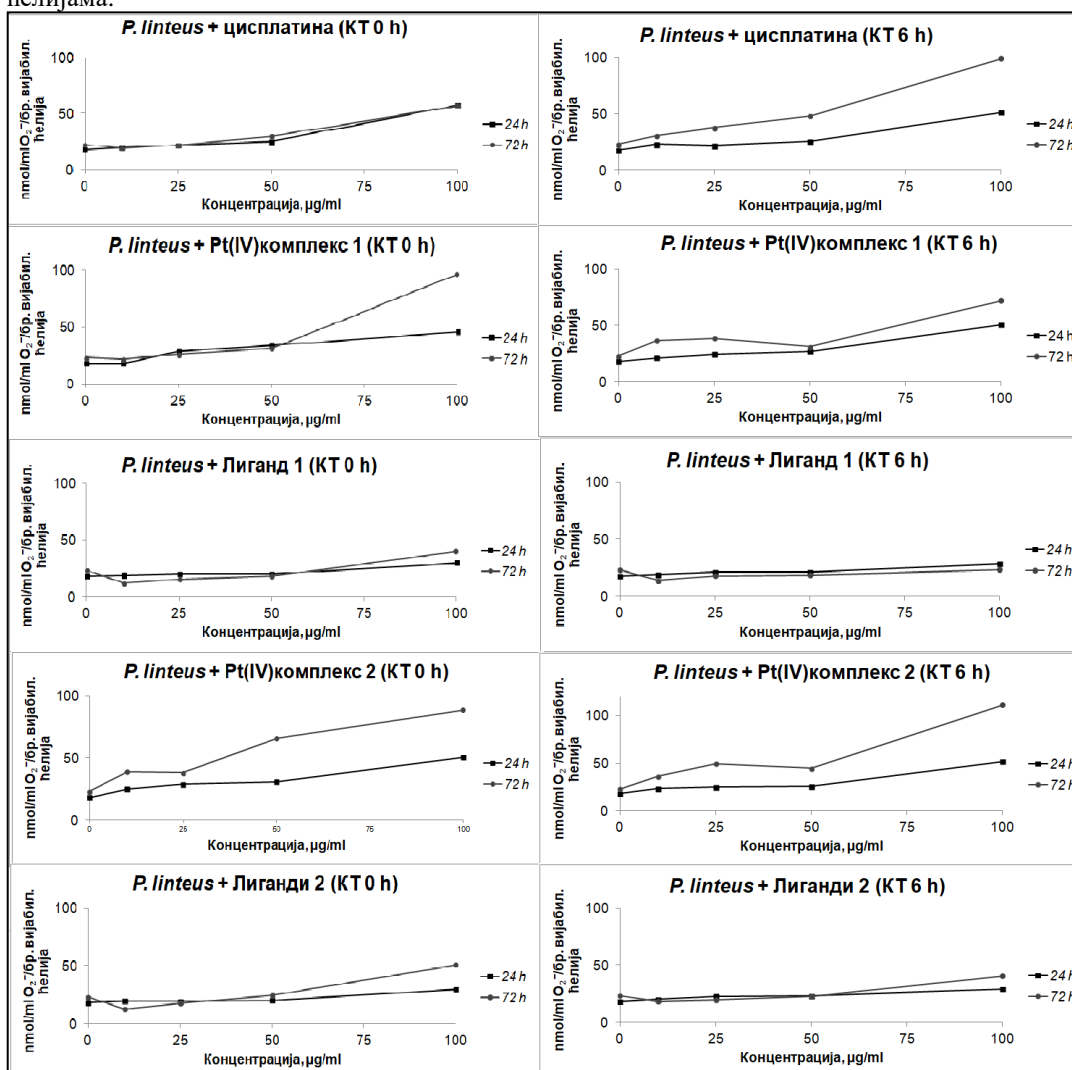
Графикон 30. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot -}$ ) у НСТ-116 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL)  $O_2^{\cdot -}$  /број вијабилних ћелија

У SW-480 ћелијама, комбиновани третмани (КТ-0h и КТ-6h) показују прооксидационе ефекте након 24 сата третмана (значајно повећање концентрације  $O_2^{\cdot-}$ ), док након 72 сата делују антиоксидационо, осим у случају котретмана *P. linteus* + Pt(IV) комплекси 1 и 2, који показују прооксидационо деловање (Прилог 5 – Табела 24). Када се концентрације  $O_2^{\cdot-}$  изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 31), котретмани углавном показују дозно зависне прооксидационе ефекте (осим *P. linteus* + Лиганд 1), најизраженије у случају *P. linteus* са цисплатином, Pt(IV) комплекс 1 и 2, што је у корелацији са значајном цитотоксичношћу ових котретмана. Веће концентрације  $O_2^{\cdot-}$  измерене су у КТ-6h. Сви котретмани су значајно повећали продукцију  $O_2^{\cdot-}$  у односу на појединачне третмане екстрактотом *P. linteus* (Графикон 28). Највећу продукцију  $O_2^{\cdot-}$  код свих испитиваних третмана изазвао је *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2.

**Графикон 31.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL)  $O_2^{\cdot-}$  /број вијабилних ћелија.



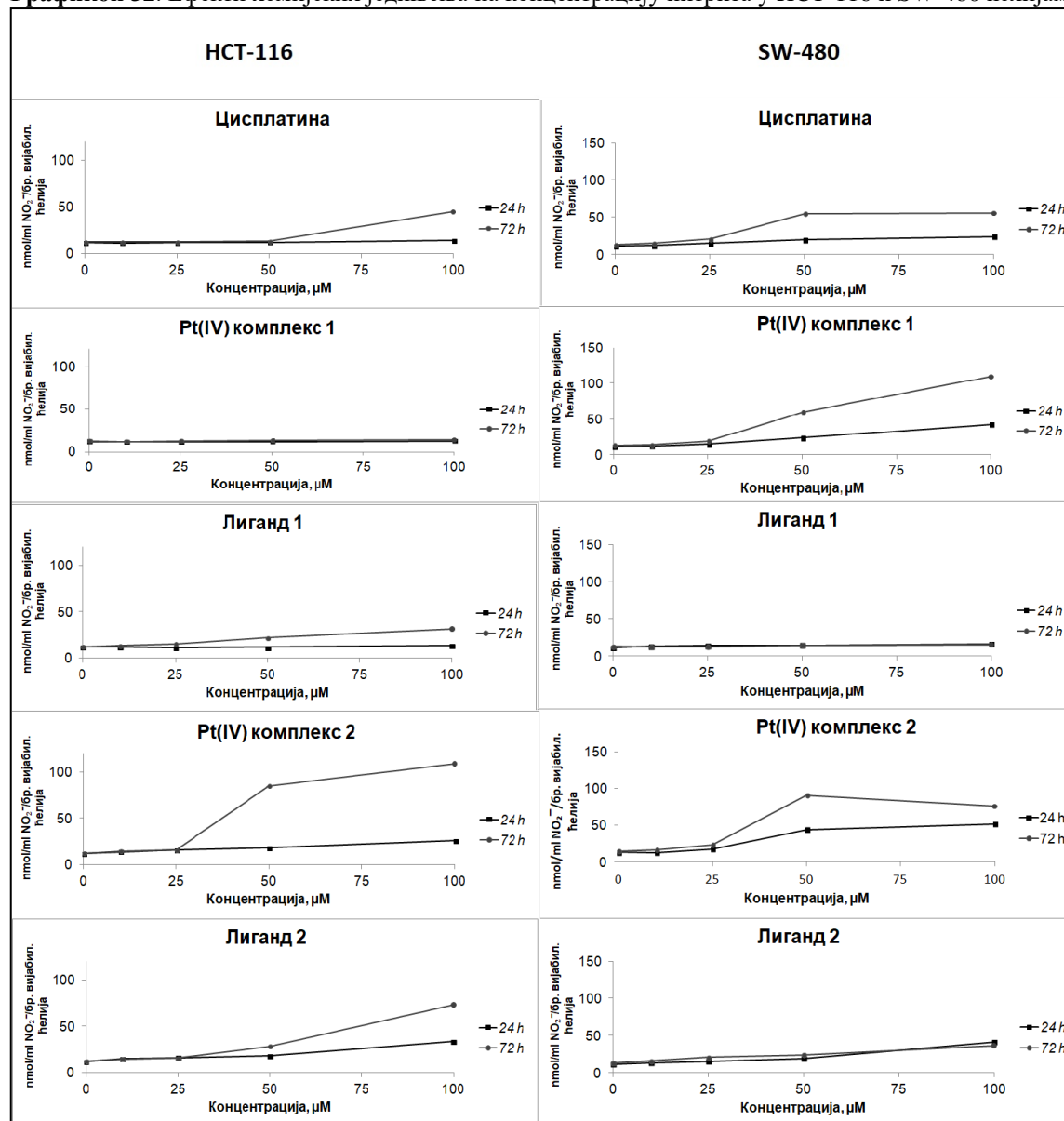
### 3.2. Концентрација нитрита

Концентрација нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) је одређивана спектрофотометријски, у контролним НСТ-116 и SW-480 ћелијама и ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима како је горе наведено. Резултати су читавани након 24 и 72 сата третмана, и представљени табеларно у **Прилогу 6** (вредности изражене у  $\text{nmol/mL}$ ) и на **Графиконима 32-36** (вредности изражене у  $\text{nmol/ml}$  у односу на број вијабилних ћелија).

Резултати показују да третмани хемијским једињењима показују исти тренд промена концентрације нитрита у обе испитиване ћелијске линије канцера колона. Значајно повећање нивоа нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, индуковали су Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2 у свим дозама и оба периода третмана, а Pt(IV) комплекс 1 и Лиганд 1 у високим дозама након 72 сата (**Прилог 6 – Табеле 25, 26**).

Када се концентрације нитрита изразе у односу на број вијабилних ћелија у третманима (**Графикон 32**), евидентно је да хемијска једињења индукују дозно зависно повећање овог параметра (осим Pt(IV) комплекс 1 у НСТ-116, и Лиганд 1 у SW-480 ћелијама), али да показују и одређене специфичности у интензитету ефекта у односу на ћелијске линије. Повећање концентрације нитрита је израженије у SW-480 ћелијама, укупно најбоље ефекте постиже Pt(IV) комплекс 2 на обе ћелијске линије, док су ефекти цисплатине и оба Pt(IV) комплекса значајни и временски зависно изражени у SW-480 ћелијама (**Графикон 32**).

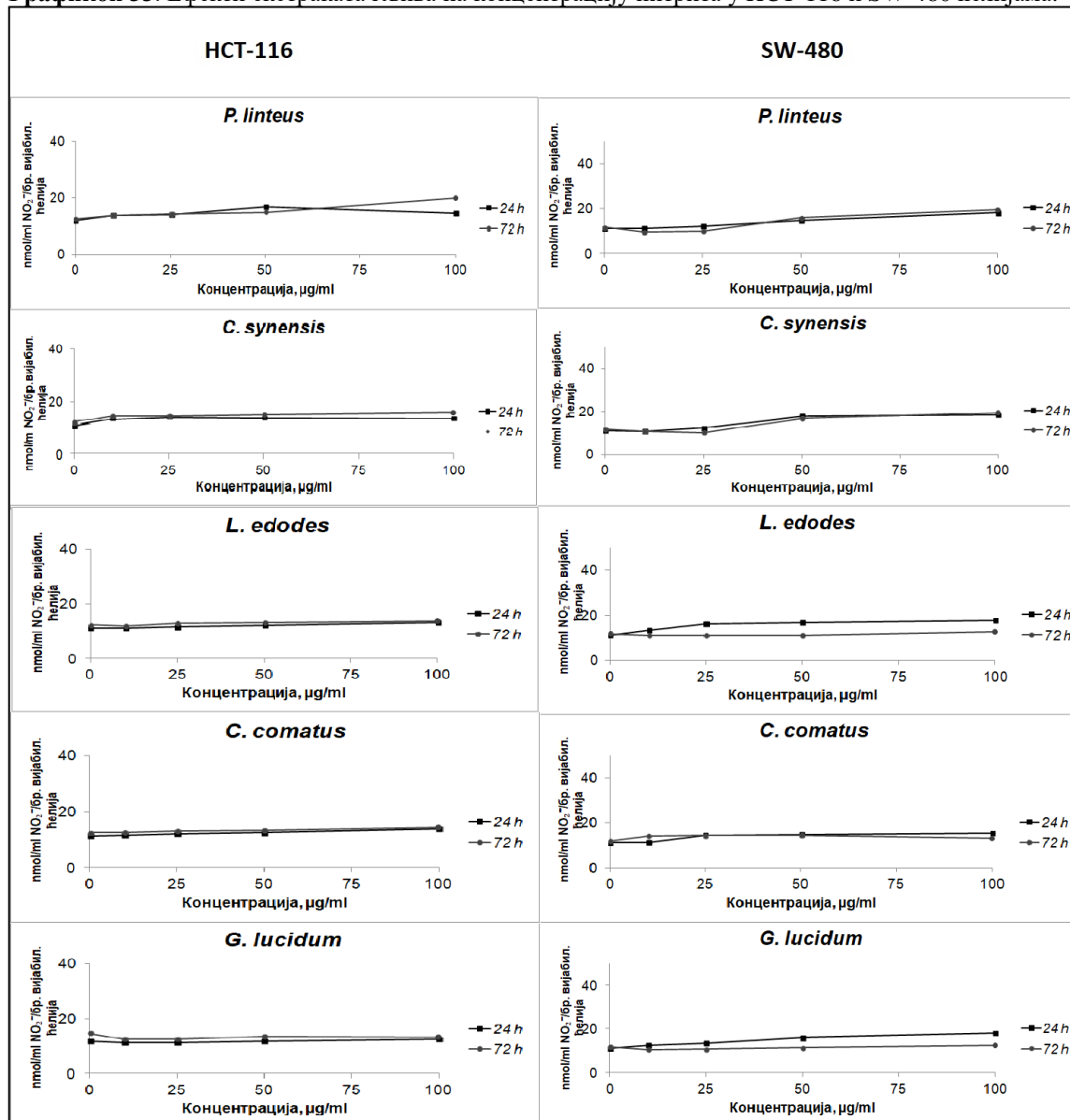
Графикон 32. Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> /број вијабилних ћелија

Третмани екстрактима гљива *P. linteus* и *C. synensis* индукују повећање концентрације NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у односу на нетретирани контролне НСТ-116 ћелије након 24 и 72 сата, док остали третмани благо снижавају или не мењају ниво овог параметра (Прилог 6 - Табела 27). Метанолни екстракти гљива значајно смањују или не мењају концентрације NO<sub>2</sub><sup>-</sup> у SW-480 ћелијама, осим *C. synensis* који значајно повећава ниво овог параметра након 72 сата третмана (Прилог 6 – Табела 28). Када се вредности изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 33), евидентно је да метанолни екстракти гљива не мењају значајније ниво овог параметра, осим *P. linteus* и *C. synensis*, који у у високим дозама повећавају концентрацију нитрита у SW-480 ћелијама.

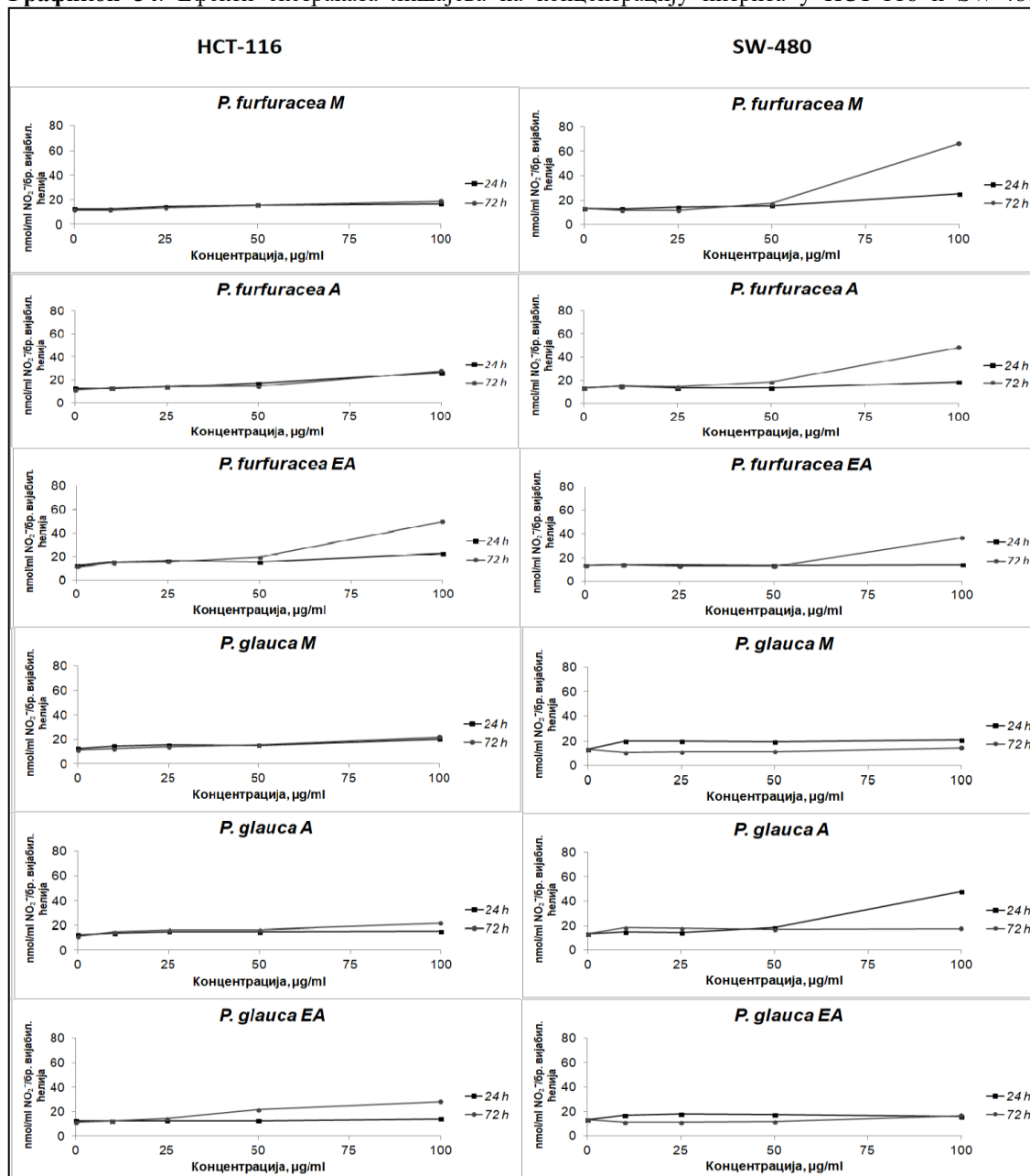
Графикон 33. Ефекти екстракта гљива на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL)  $\text{NO}_2^-$ /број вијабилних ћелија.

Третмани екстрактами лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca*, генерално, показују тренд смањења концентрација нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, при чему су ове промене стабилније након 72 сата третмана (Прилог 6 – Табеле 27, 28). Када се резултати изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 34), добија се нешто другачија ситуација. У зависности од врсте лишаја и типа екстракта, третмани не мењају, или повећавају концентрације нитрита у обе ћелијске линије, при чему су промене израженије у SW-480 ћелијама, и у третманима екстрактами *P. furfuracea*.

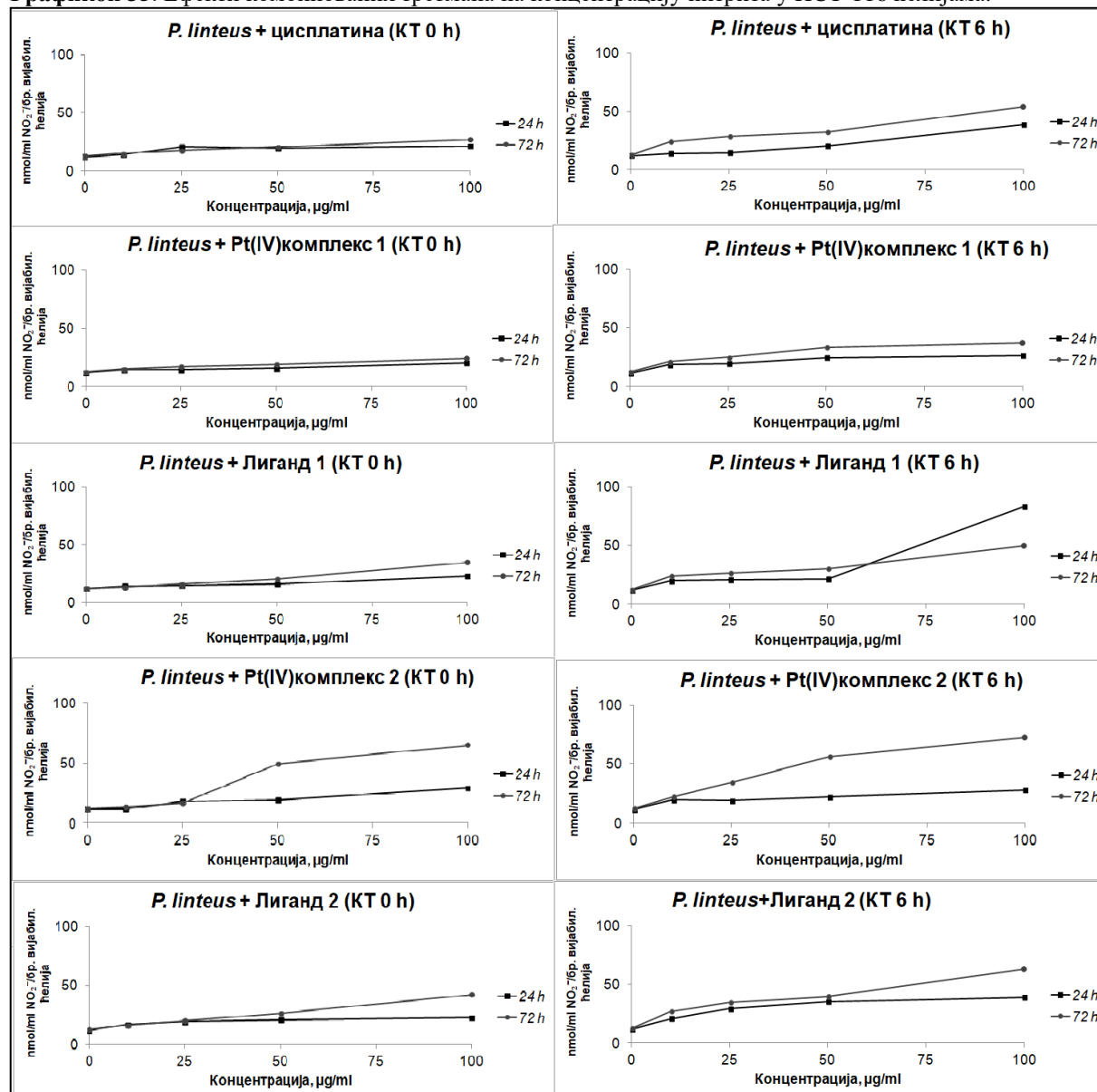
Графикон 34. Ефекти екстраката лишајева на концентрацију нитрита у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/број вијабилних ћелија.

Комбиновани третмани *P. linteus* и хемијска једињења, генерално повећавају концентрације нитрита у НСТ-116 ћелијама, при чему су промене израженије након 72 сата у односу на 24, као и у КТ-6h у односу на КТ-0h (Прилог 6 – Табела 29). Концентрације нитрита изражене у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 35), значајно се повећавају у корелацији са повећањем дозе котретмана, при чему су промене израженије у КТ-6h. Укупно најбоље ефекте показује *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 у оба котретмана (КТ-0h и КТ-6h) (Графикон 35).

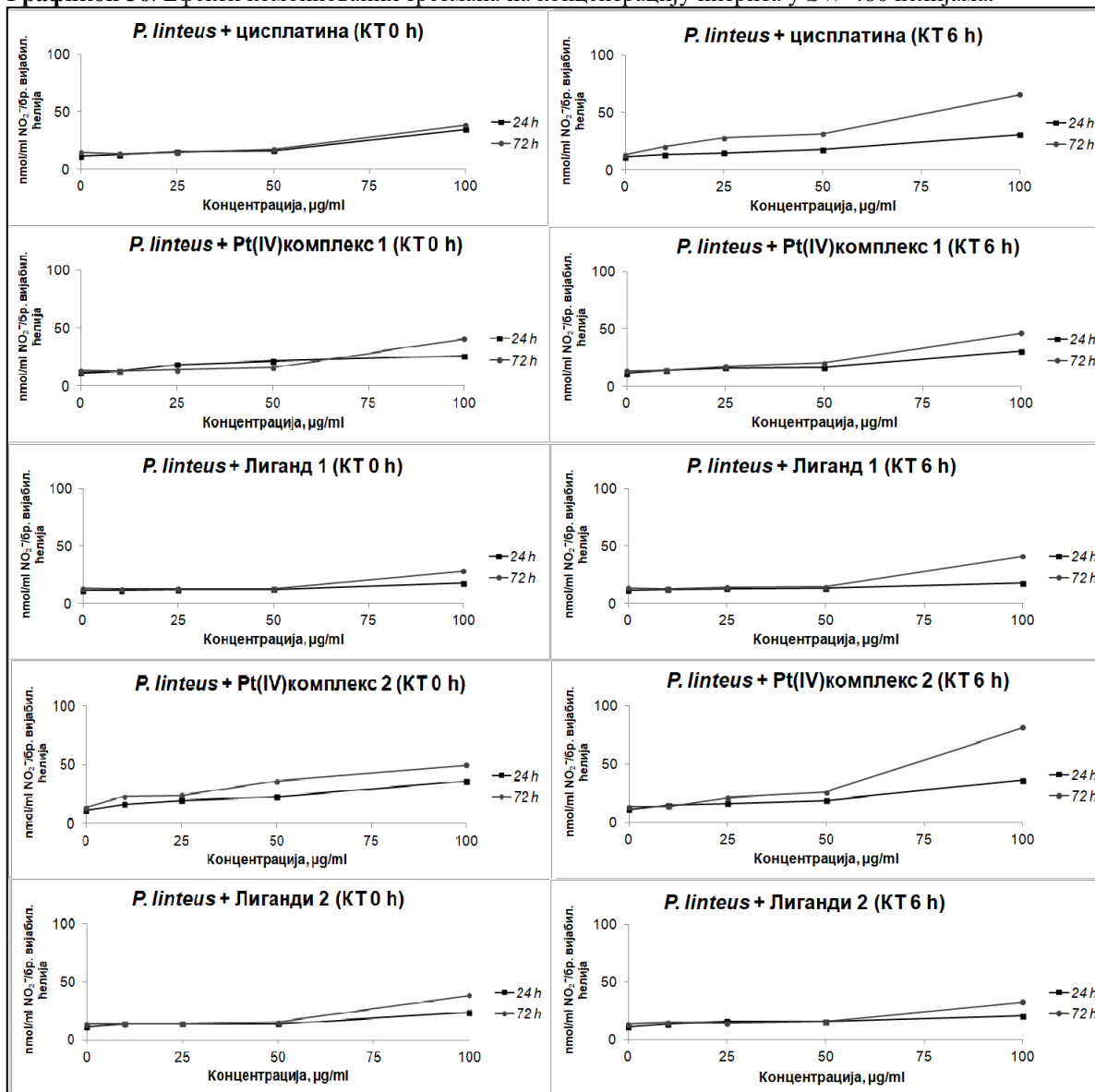
Графикон 35. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита у НСТ-116 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (pmol/mL)  $\text{NO}_2^-$ /број вијабилних ћелија.

Котретмани индукују значајно повећање концентрације  $\text{NO}_2^-$  у SW-480 ћелијама (Прилог 6 – Табела 30). У односу на број вијабилних ћелија, концентрације нитрита су повећане у свим третманима на дозно и временски зависан начин (Графикон 36). Не постоје значајније разлике у типу котретмана (КТ-0h и КТ-6h), а укупно најбоље ефекте је показао *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2. Промене (повећање) концентрације нитрита су израженије у НСТ-116 ћелијама (Графикон 35) у односу на SW-480 ћелије (Графикон 36).

Графикон 36. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита у SW-480 ћелијама.



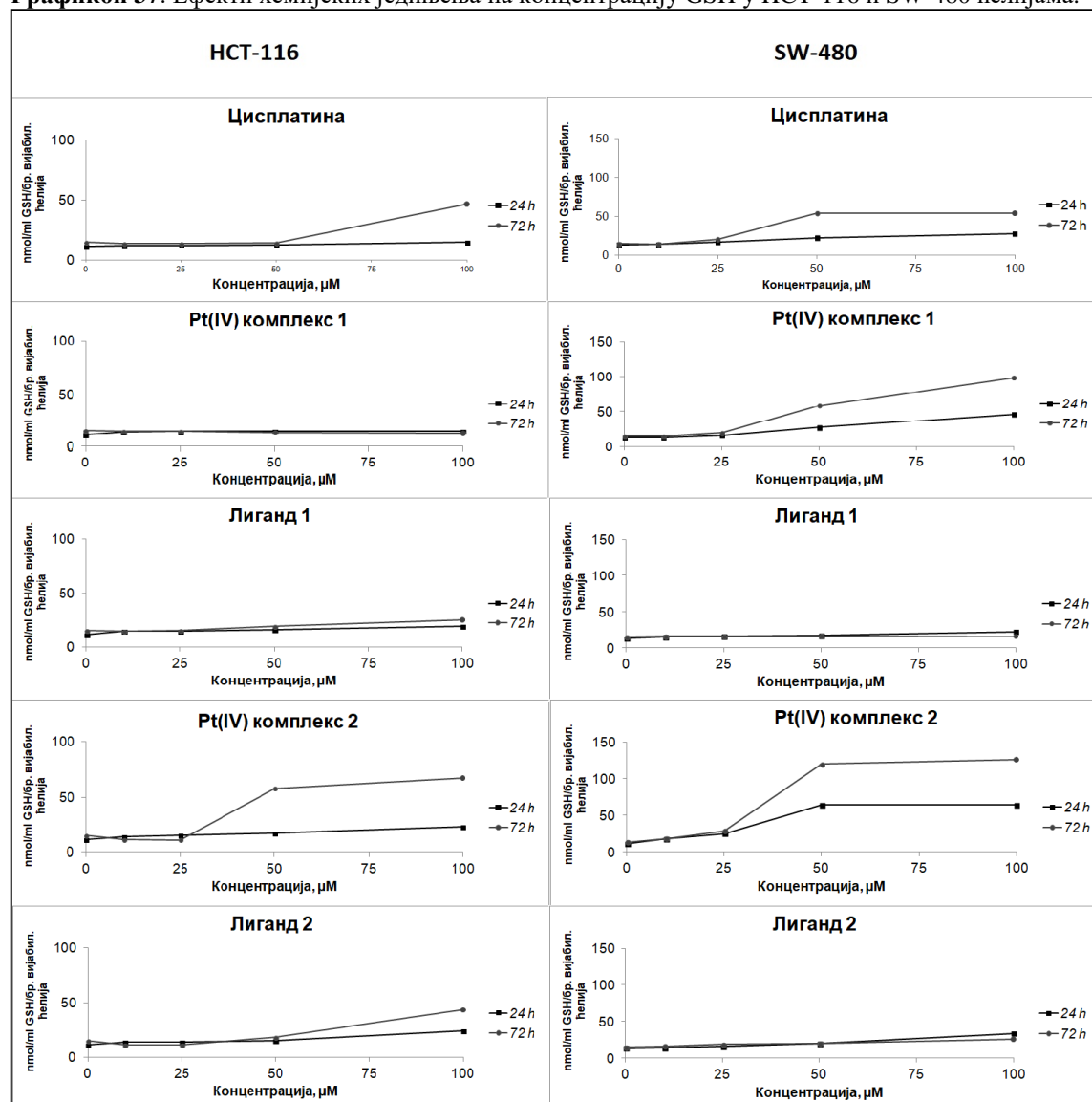
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/ml)  $\text{NO}_2^-$ /број вијабилних ћелија.

### 3.3. Концентрација глутатиона

Концентрација редукованог глутатиона (GSH) је одређивана спектрофотометријски, у контролним ћелијама и ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима. Резултати су представљени табеларно у Прилогу 7 (вредности изражене у nmol/mL) и на Графиконима 37-41 (вредности изражене у nmol/ml у односу на број вијабилних ћелија).

У НСТ-116 ћелијама, третмани хемијским једињењима, изазивају статистички значајно повећање концентрације GSH након 24 сата, док ниво овог параметра значајно опада након 72 сата третмана (Прилог 7 - Табела 31). У SW-480 ћелијама, Pt(IV) комплекс 2 значајно смањује концентрацију GSH, док остала хемијска једињења углавном немају ефекта (Прилог 7 - Табела 32). Резултати изражени у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 37), показују израженије промене (повећање) нивоа GSH у SW-480 ћелијама, значајно у присуству цисплатине и оба Pt(IV) комплекса. У НСТ-116 ћелијама, значајно повећање GSH је индуковао само Pt(IV) комплекс 2, након 72 сата (Графикон 37).

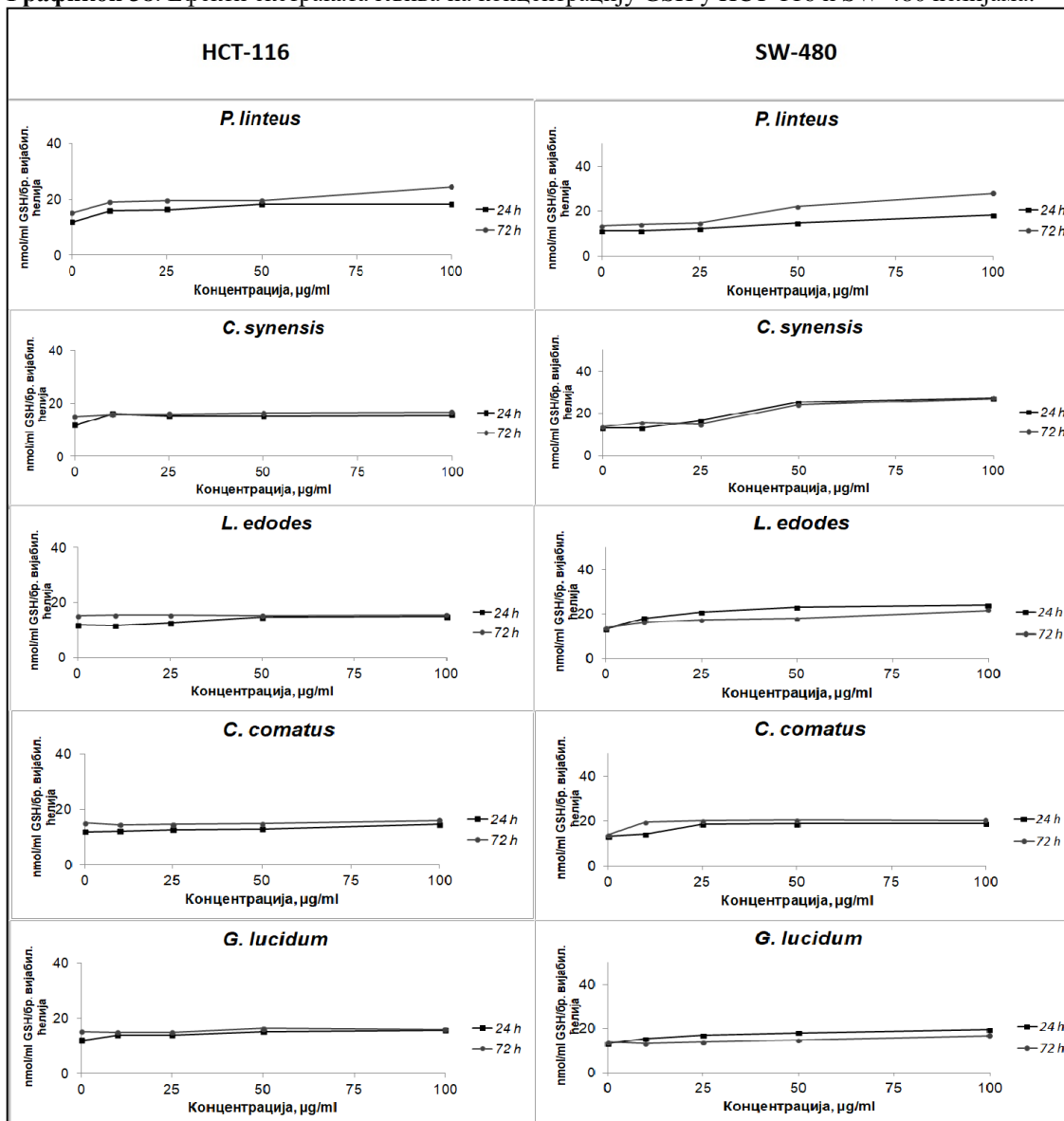
Графикон 37. Ефекти хемијских једињења на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) GSH /број вијабилних ћелија.

Третмани екстрактима гљива, генерално, повећавају концентрације GSH у НСТ-116 ћелијама након 24 сата (ефекти су значајни у свим дозама *P. linteus*, *C. synensis* и *G. lucidum*, и у високим дозама осталих гљива), док је индуковано смањење овог параметра након 72 сата, осим у третману *P. linteus* који изазива значајно повећање GSH (Прилог 7 – Табела 33). У SW-480 ћелијама, метанолни екстракти *C. synensis* и *L. edodes* значајно повећавају концентрацију GSH након 24 сата, док остали третмани не показују значајније ефекте (Прилог 7 – Табела 34). У односу на број вијабилних ћелија, евидентно је дозно зависно повећање концентрације GSH, у присуству *P. linteus* у НСТ-116 ћелијама, и у свим третманима у SW-480 ћелијама, где су значајни ефекти третмана *P. linteus*, *C. synensis*, *L. edodes* (Графикон 38).

Графикон 38. Ефекти екстраката гљива на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

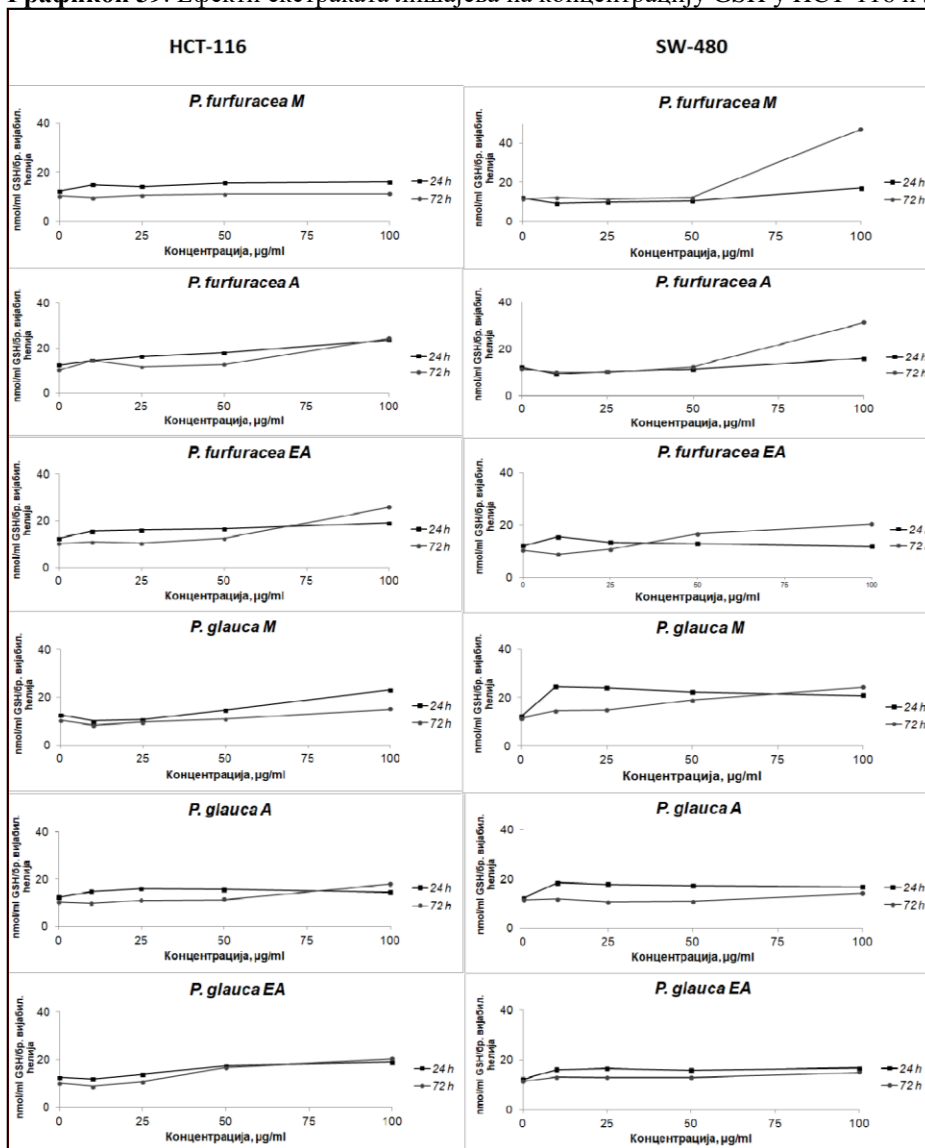


Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) GSH /број вијабилних ћелија.



Ацетонски екстракт *P. furfuracea* и етилацетатни екстракт *P. glauca* индукују значајно повећање концентрације GSH након 24 сата, у НСТ-116 ћелијама (Прилог 7 – Табела 33). Сви екстракти обе врсте лишјаја значајно смањују ниво GSH након 72 сата третмана. У SW-480 ћелијама, екстракти *P. furfuracea* имају тренд смањења концентрације GSH (осим етилацетатног екстракта који повећава GSH), а екстракти *P. glauca* повећавају ниво овог параметра (осим ацетонског екстракта *P. glauca* који смањује GSH након 72 сата) (Прилог 7 – Табела 34). Концентрације GSH у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 39) показују да сви испитивани третмани изазивају углавном повећање концентрације GSH. Екстракти *P. furfuracea* показују боље ефекте на SW-480 ћелијама, док екстракти *P. glauca* делују добро на обе ћелијске линије.

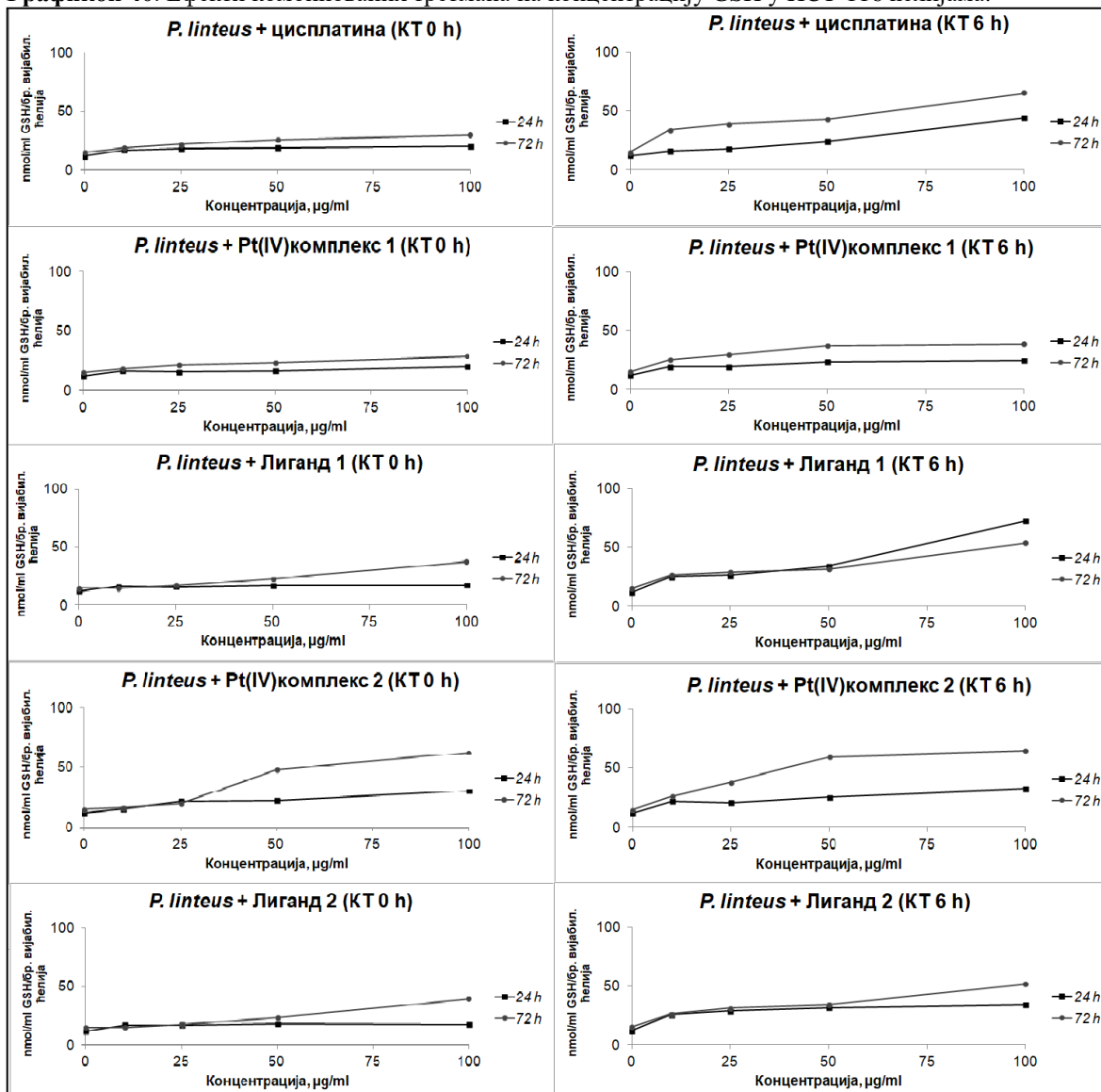
Графикон 39. Ефекти екстраката лишјајева на концентрацију GSH у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) GSH /број вијабилних ћелија.

Сви комбиновани третмани (КТ-0h и КТ-6h) индукују статистички значајно повећање концентрације GSH (осим КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 1) након 24 сата третмана, док након 72 сата, КТ-0h и КТ-6h за *P. linteus* + цисплатина повећавају, а остали котретмани углавном редукују концентрацију GSH у НСТ-116 ћелијама (Прилог 7 – Табела 35). Концентрације глутатиона у односу на број вијабилних НСТ-116 ћелија (Графикон 40), показују да ниво GSH у КТ-0h прати тренд: *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 1 и цисплатина < *P. linteus* + Лиганди < *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 (Графикон 40). Сви КТ-6h индукују значајно, дозно зависно повећање концентрације GSH, веће у односу на КТ-0h, а најјаче ефекте показују *P. linteus* + Лиганди 1 и Pt(IV) комплекс 2 (Графикон 40).

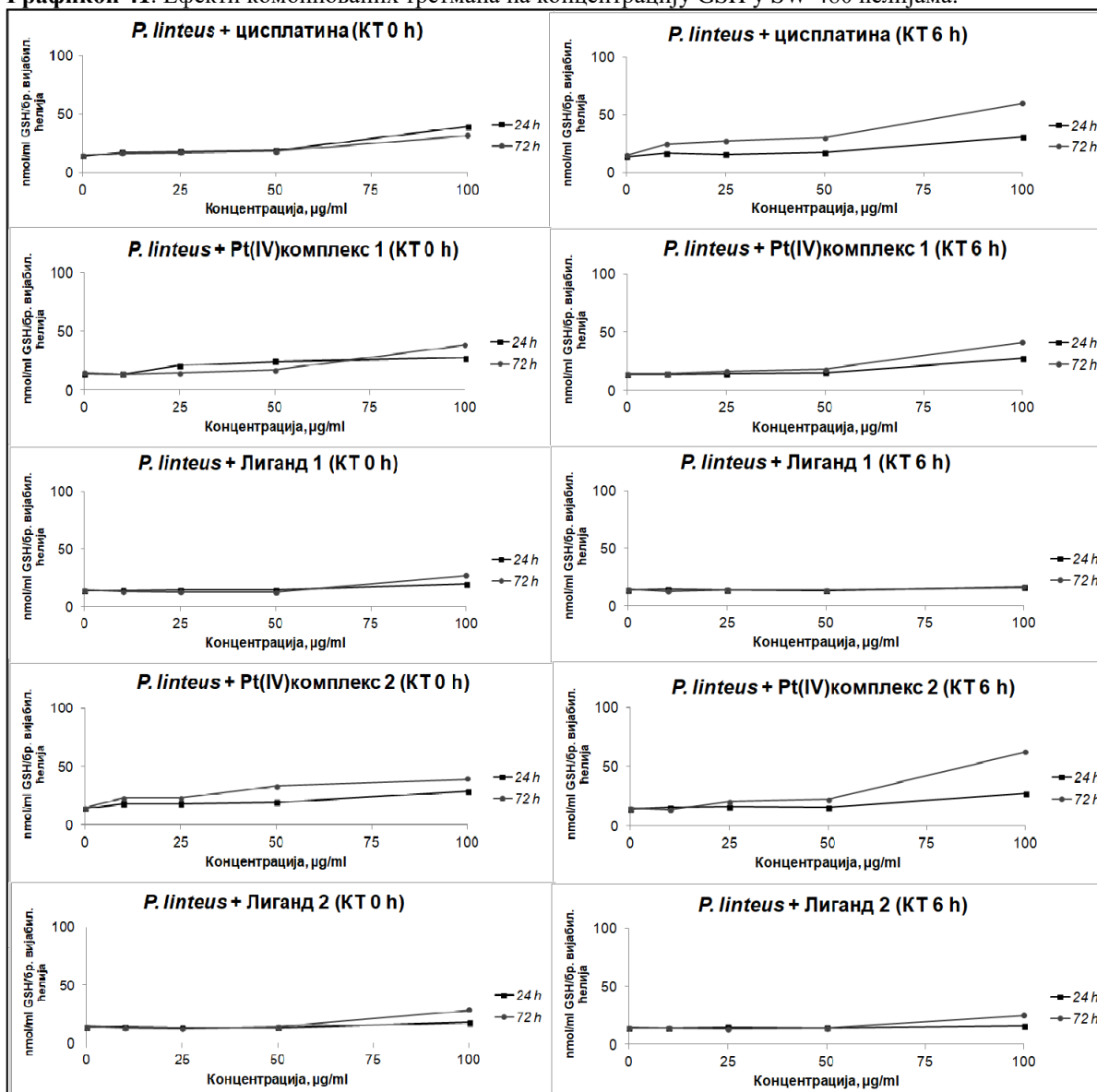
Графикон 40. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију GSH у НСТ-116 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) GSH /број вијабилних ћелија.

Комбиновани третмани углавном не мењају након 24 сата, и значајно снижавају концентрацију GSH након 72 сата третмана у SW-480 ћелијама (Прилог 7 – Табела 36). Када се концентрације глутатиона изразе у односу на број вијабилних ћелија (Графикон 41), ситуација је значајно другачија – сви котретмани, углавном, индукују дозно зависно повећање нивоа GSH у SW-480 ћелијама. Концентрација глутатиона у КТ-0h и КТ-6h је значајно виша у *P. linteus* + цисплатина и Pt(IV) комплекси 1 и 2, у односу на котретмане са Лигандима. Највећа концентрација GSH је измерена у комбинованом третману *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 у обе ћелијске линије (Графикони 40, 41).

Графикон 41. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију GSH у SW-480 ћелијама.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. Резултати су представљени као концентрација (nmol/mL) GSH /број вијабилних ћелија.

## ДИСКУСИЈА

Малигне болести данас представљају велики здравствени проблем у целом свету. Број оболелих од карцинома дебелог црева је у сталном порасту и заузима водеће место по смртности код оба пола, како у свету, тако и у Србији (Altobelli и сар., 2014; Ponz и Di, 2001). Поред хирушког лечења, које представља први избор у лечењу CRC, хемиотрапија се примењује у циљу бољег терапијског учинка (Milić и Damjanović, 2013). Код пацијената са CRC, у широкој примени хемиотерапије употребљавају се 5-флуороурацил, оксалплатина, иринотекан и доксорубицин (Milić и Damjanović, 2013). Цисплатина и оксалплатина су представници хемиотерапеутика који у својој основи имају платина(II) атом, а поред значајне акутне цитотоксичности показују многа нежељена дејства у виду токсичних ефеката на организам (Zhang и сар., 2010). Нежељени (токсични) ефекти хемиотерапеутика који у својој основи имају платина(II) јон су последица интеракције платинског лека са здравим ткивима током дистрибуције кроз организам, и у првом реду, то су нефротоксичност, неуротоксичност, ототоксичност, еметогенеза, као и развој примарне и стечене резистентности (Zhang и сар., 2010; Siddik, 2003). Ради превазилажења ових, и многих других нежељених дејстава, а у циљу постизања што боље ефикасности терапије у истраживања су укључени платински лекови који у својој основи имају платина(IV) јон. Предност платина(IV) комплекса, у односу на платина(II) комплексе, је у слабијој реактивности у организму, могућност оралне примене, што уз значајну цитотоксичност, омогућава комфорнију терапију са мање нежељених дејстава у организму (Levi и сар., 2000). Иако мање реактивна, платина(IV) интереагује са биомолекулима у организму (пептидима, протеинима и ензимима), изазивајући оштећења здравог ткива са једне стране као и појаву резистентности ћелија карцинома у дуготрајној примени, па се у том смислу, потрага за ефикаснијим и мање токсичним хемиотерапеутицима наставља. Синтетисани су многи платина(IV) комплекси и њихова цитотоксичност и антитуморска активност је потврђена у многим студијама (Stojković и сар., 2014; Chin и сар., 2012; Khokhar и сар., 1997). Значајна антитуморска активност комплекса платине(IV) је остварива уз мање токсичности за организам, као и интензивнијим ефектима на резистентним ћелијама (Stojković и сар., 2014).

## Механизми деловања Pt(IV) комплекса

### Цитотоксичност

На основу претходно изложеног, у оквиру истраживања спроведених у овој дисертацији, праћени су цитотоксични ефекти и тип смрти ћелија хуманог колоректалног карцинома, за два новосинтетисана комплекса Pt(IV) и њихове лиганде, а ефекти су упоређивани са цисплатином, Pt(II). Испитивани Pt(IV) комплекси показали су цитотоксичне, антипролифертивне и проапототске ефекте на HCT-116 и SW-480 ћелијским линијама, а најефикаснији је Pt(IV) комплекс 2. Нешто слабији ефекат, показао је његов одговарајући Лиганд 2 на обе ћелијске линије. Хемијска једињења показују значајно слабије цитотоксичне ефекте на здравим MRC-5 ћелијама, па се у том смислу може говорити о антиканцерогеним ефектима. Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2 имају боље цитотоксичне ефекте са већим процентом ћелија у апототози од цисплатине и Pt(IV) комплекса 1. Анализирајући велики број синтетисаних и тестираних нових хемијских комплекса, долази се до закључка да се повећањем броја С атома у ланцу лиганда, као и повећањем оксидационог броја са Pt(II) на Pt(IV), постижу значајно бољи цитотоксични и проапототски ефекти на ћелијским линијама канцера, што је у сагласности са добијеним резултатима (Stojković и сар., 2014).

Познато је да у основи механизма цитотоксичног дејства платинских лекова стоји интеракција са DNK, тј. ковалентнио везивање платине за суседне пуринске базе гуанин или аденин на позицији N7, при чему се граде примарно унутарланчане везе, а ређе међуланчане унакрсне везе (Sabo и сар., 2004; Boulikas и Vougiouka 2003). Оваква новонастала структура онемогућава даље репликацију и транскрипцију нуклеинских киселина, као и транслацију протеина, па ове ћелије подлежу ћелијској смрти (Boulikas и Vougiouka, 2003). Након уласка у ћелију, интеракција платинских лекова и DNK остварује се веома брзо, резултујући акутном цитотоксичношћу (после 24 сата), у веома ниским концентрацијама ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ) (Boulikas и Vougiouka 2003).

Такође је познато да платински лекови оставарују цитотоксичне ефекте и преко индукције оксидационог стреса у третираним ћелијама (Deavall и сар., 2012; Martins и сар., 2008). Цитотоксични ефекти индуковани ремећењем оксидационо/антиоксидационе равнотеже и продукцијом ROS и RNS остварују се у концентрацијама већим од  $10 \mu M$  третмана (Berndtsson и сар., 2007), што је у корелацији са нашим резултатима. Значајно повећање супероксид анион радикала, нитрита и глутатиона, нарочито у ћелијама третиранима Pt(IV) комплексом 2, у обе испитиване ћелијске линије, сугерише да су ћелије у јаком оксидационом стресу, што је могућ механизам цитотоксичног дејства испитиваних комплекса. Са друге стране, Лиганд 2

цитотоксичне ефекте остварује преко другог механизма, обзиром на знатно нижи интензитет повећања реактивних врста.

Третмани испитиваним хемијским једињењима показују антипролиферативни ефекат у нашим истраживањима посебно на НСТ-116 ћелијама, са значајним цитотоксичним ефектима после 72 сата, што говори о негативним ефектима на деобу ћелија и формирање колонија (*colony forming* ефекат), што су потврдили предходни резултати за платина(IV) комплексе (Ratzon и сар., 2016). Лиганд 1 показује значајно бољу цитотоксичност након 24 сата на SW-480 ћелијама, што указује на акутни ефекат, док антипролиферативни ефекти нису изражени. Могуће објашњење јесте да ова ћелијска линија расте у колонијама, што сугерише да су ћелије јаче повезне и да имају повећану експресију TRF2 протеина одговорног за колонизацију ћелија (Kim и сар., 2012; Dong и сар., 2009).

Третмани испитиваним хемијским једињењима индукују апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти са малим процентом некротских ћелија, што је у сагласности са ранијим истраживањима Pt(II) и Pt(IV) комплекса (Pichler и сар., 2015; Stojkovic и сар., 2014). Апоптоза, као тип ћелијске смрти, сматра се повољним ефектом хемиотерапеутског деловања цитостатика (Fayad и сар., 2009). Апоптозу карактеришу видљиве морфолошке промене у ћелији. Кондензација хроматина у једру, фрагментација једра и цепање ДНК, карактеристични су за ране стадијуме апоптозе, док у касним стадијума долази до кондензације цитозола, губљења интегритета мембране и формирања великих апоптотских тела (Milutinović и сар., 2015; Ćurčić, 2014).

Третман Pt(IV) комплексом 2 индукује највећи проценат ћелија у апоптози, па можемо посредно закључити да је цитотоксичност последица индукције апоптозе у ћелијама. Процент ћелија у касној апоптози и некрози у сагласности је са процентима невијабилних ћелија добијених МТТ тестом. Овакви резултати могу се објаснити чињеницом да у првим стадијумима апоптозе (рана апоптоза), долази до промена на нивоу једра (у виду концентрације хроматина (детектабилне АО/ЕБ методом). Према литератури, ћелије у раној апоптози још имају капацитете да метаболишу тетразолијумову со (главна компонента МТТ теста), па се према МТТ тесту детектују као живе. Такође је познато да ћелијска адхезија не мора бити нарушена у раној апоптози, па су ћелије у овом стадијуму још увек залепљене за подлогу, тј. детектоване су као живе. Промене на нивоу молекула одговорних за адхезију ћелија и дисфункција митохондрија, као одговорних за метаболизам тетразолијима, карактеристичне су за ћелије у касним стадијумима апоптозе (формирање апоптотских тела) и некрози, тако да се ове ћелије према МТТ тесту детектују као мртве (Henslee и сар., 2016; Mosmann, 1983).

Цитотоксични и проапоптотски ефекти испитиваних третмана, у првом реду Pt(IV) комплекс 2 и Лиганд 2, показали су нешто боље ефекте на SW-480 ћелијској линији у односу на НСТ-116 ћелије, што се може објаснити молекуларним карактеристикама испитиваних ћелијских линија

(Imesch и сар. 2012). MMR репаративни систем за поправку оштећења на DNK, чине два протеина MLH1 и MLH2, одговорни за иницирање апотозе у третманима хемиотерапеутицима у ћелијама CRC преко активности каспазе 3 (Hassen и сар., 2016). Пошто је HCT-116 ћелијска линија мутант за *MLH1* ген и не експримира MLH1 протеин, даје слабији одговор на третман хемиотерапеутицима, па с тим у вези можемо сматрати да овај механизам стоји у основи мање сензитивности ове ћелијске линије на третмане хемијским једињењима (Hassen и сар., 2016; Imesch и сар. 2012). Како литературни подаци показују SW-480 ћелије експримирају MLH1 и MLH2 протеине, апотоза је у овој ћелијској линији детектована преко каспазе 3, што стоји у основи бољег цитотоксичног и проапототског одговора на третмане хемиотерапеутицима (Hassen и сар., 2016).

### *Антимиграторни потенцијал*

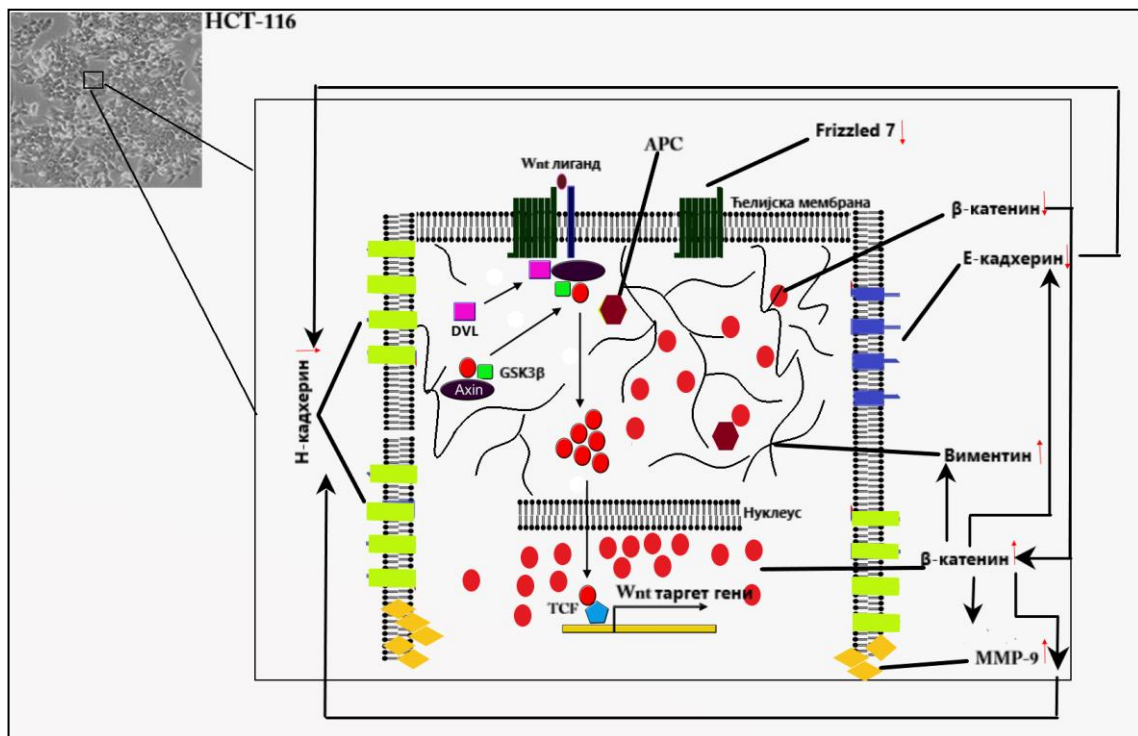
Посебан проблем у лечењу колоректаног карцинома представљају ћелије са израженим миграторним и метастатским потенцијалом (Jolly и сар., 2017; Guan, 2015; Zadran и сар., 2014; Zhang и сар., 2014; Lu и сар., 2013). Изражен миграторни потенцијал је иницијални корак у метастатском процесу, али је и у основи формирања адултних матичних ћелија и дормантних карциномских ћелија, у највећем броју случајева, одговораних за рецидив CRC. Такође, ћелије колоректалног карцинома са израженим миграторним потенцијалом могу под одређеним околностима постати „старе“ (*senescence*) карциномске ћелије са улогом у синтези различитих фактора раста и регулацији микроокружења, као и ћелије резистентне на хемиотерапеутике и имунорезистентне ћелије (Celià-Terrassa и сар., 2012; Thiery и сар., 2009). С тим у вези, постоје потребе за развојем нових лекова који поред антипролиферативног, цитостатског и цитотоксичног деловања имају и потенцијалне антимигранторне ефекте. Цитостатска терапија са побољшаним ефектима на ћелије са израженим миграторним потенцијалом, представљала би значајан помак у лечењу малгнитета уопште.

Ћелије карцинома са миграторним потенцијалом одликује редуција експресије Е-кадхерина и других протеина карактеристичних за епителне ћелије (Jiang и сар. 2007; Bates и Mercurio 2005), и повећана експресија мезенхимских протеина Н-кадхерина, виментина и осталих протеина карактеристичних за мезенхимске ћелије (Brabletz и сар. 2009). Повећана експресија MMP-9 је одлика инвазивних ћелија CRC (Das и сар., 2017). Степен губитка епителних карактеристика и нарушавања међућелијских веза, уз повећање експресије мезенхимских маркера, у корелацији је са степеном покретљивости/инвазивности ћелија CRC (Brabletz и сар. 2009). Један од главних регулаторних протеина миграторног/инвазивног фенотипа ћелије је  $\beta$ -катенин и његова прерасподела на нивоу једро/цитоплазма стоји у основи многих процеса у ћелији карцинома од

кацерогенезе до ћелијске миграције (Jiang и сар. 2007; Akiyama, 2000). Више од 80% случајева CRC је иницирано мутацијама у једном од два гена APC или  $\beta$ -катенин (Gulbake и сар, 2016; Markowitz и Bertagnolli, 2009). НСТ-116 ћелије носе мутацију у гену за  $\beta$ -катенин која спречава његову убиквитин-зависну протеолизу од стране протеозомалног система (El-Bahrawy и сар., 2004). Са друге стране, карактеристика SW-480 ћелија је да имају мутиран ген за APC што резултује накупљањем  $\beta$ -катенина у цитоплазми, релокацију у једро и онемогућава његову даљу деградацију (Ueno и сар., 2008).

Антимиграторни ефекти испитивани су на две имортализоване ћелијске линије изоловане из примарног CRC, са значајним разликама на генској и молекулској структури и миграторном потенцијалу (Schneider и сар., 2012).

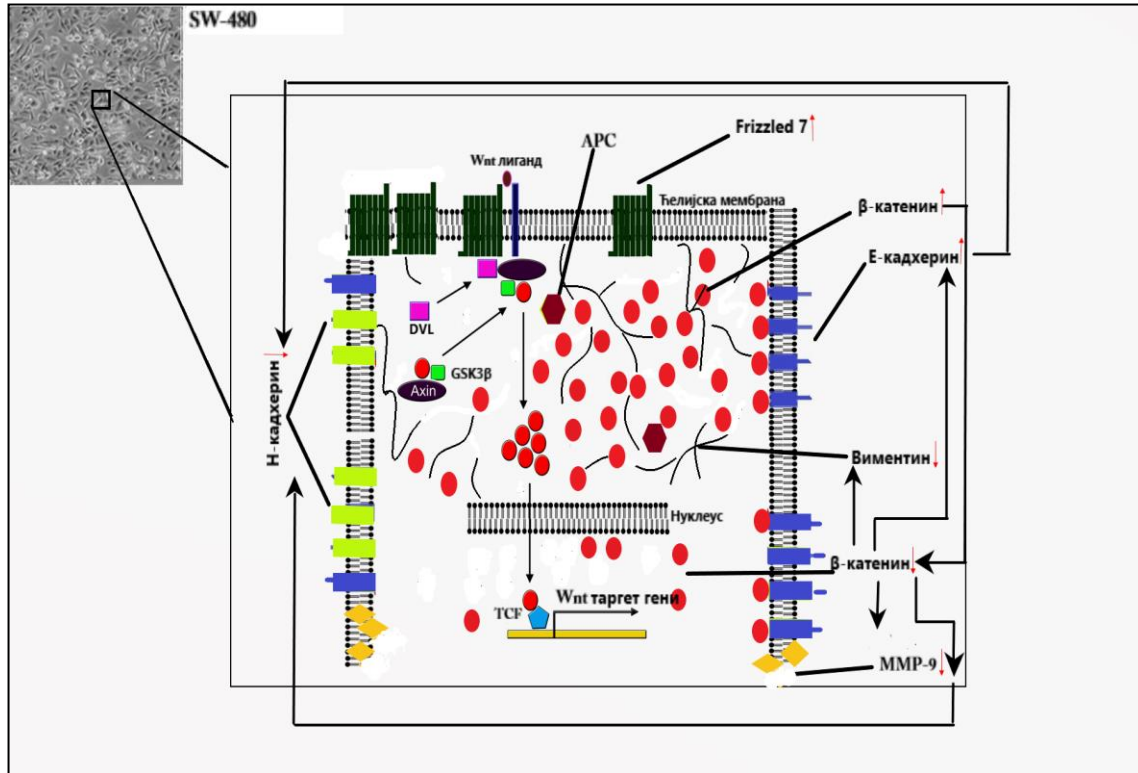
НСТ-116 ћелијска линија представља промигаторну слабо диференцирану ћелијску линију CRC, са израженијим миграторним потенцијалом у односу на SW-480 ћелијску линију која је боље диференцирана са нижим миграторним потенцијалом (Schneider и сар, 2012; Ueno и сар., 2008), што је у корелацији са нашим резултатима. Наши резултати показују да нетретиране НСТ-116 ћелије одликује мања експресија Е-кадхерина, цитоплазматског  $\beta$ -катенина и FZD7 рецептора, док су промигаторни протеински маркери (Н-кадхерин, виментин и MMP-9) више експримирани (Шема 23).



Шема 23. Протеинска експресија антимиграторних/промигаторних маркера у НСТ-116 ћелијској линији



Са друге стране, боље диференциране SW-480 ћелије, са мањим миграторним потенцијалом, расту у калстерима (Schneider и сар, 2012), и према нашим резултатима имају већу експресију Е-кадхерина, цитоплазматског  $\beta$ -катенина и FZD-7 рецептора, док су промиграторни протеински маркери мање експримирани (Шема 24).



**Шема 24.** Протеинска експресија антимиграторних/промиграторних маркера у SW-480 ћелијској линији

Новосинтетисани Pt(IV)комплекси и њихови лиганди показују значајне антимиграторне ефекте на тестираним линијама, у поређењу са цисплатином (позитивна контрола), чији су антимиграторни ефекти на канцерозне ћелије потврђени у ранијим истраживањима (Jeon и сар., 2016; Huang и сар., 2015; Sheng и сар., 2013). Значајно бољи ефекти добијени су на НСТ-116 ћелијама, док су антимиграторни ефекти на SW-480 ћелијама показани само у третману лигандима. Третман Лигандом 1 изазвао је најјачи антимиграторни ефекат на обе тестиране линије.

Испитивана хемијска једињења у НСТ-116 ћелијама доводе до повећања протеинске експресије Е-кадхерина, цитоплазматског  $\beta$ -катенина и FZD7 рецептора, док редукују промиграторне протеине (нуклеарни  $\beta$ -катенин, Н-кадхерин и виментин), и смањују концентрацију MMP-9, у односу на нетретиране ћелије. У третману хемијским једињењима, у првом реду

лигандима дошло је до агрегације ћелија и редукције броја протрузија, а ћелије у третманима задобиле су више полигоналан облик.

Третман Лигандом 1, са најјачим антимигранторним ефектима на SW-480 ћелијској линији, индукује повећање Е-кадхерина, нуклеарног  $\beta$ -катенина са приметном локацијом у цитоплазми (у нижим концентрацијама третмана), док је у већим концентрацијама третмана нуклеарни  $\beta$ -катенин редукован. Третмани хемијским једињењима доводе до смањења цитоплазматског  $\beta$ -катенина, FZD7 рецептора, Н-кадхерина, виментина и MMP-9.

Поред кључне улоге у грађи адхерентне везе у ћелији, а тиме и очувању апикално базалне поларизације ћелије, Е-кадхерин има улогу регулатора ћелијског кретања (Buda и Pignatelli, 2011). У том смислу, очувана експресија Е-кадхерин и локализација у зони међућелијских веза, основна је одлика немиграторних канцерозних ћелија CRC, док је повећани миграторни потенцијал ћелија у корелацији са смањењем Е-кадхерина (DanJuan и сар., 2015; Buda и Pignatelli, 2011). Повећана протеинска експресије Е-кадхерина и његова релокација у ободни део цитоплазме, у зону међућелијских веза, корелира са антимигранторним ефектима испитиваних третмана. Литературни подаци показују да повећање експресије Е-кадхерина може бити индуковано у третману платинским хемиотерапеутицима у ћелијама карцинома оваријума (Мише и сар., 2015). Повећање експресије Е-кадхерина уз редукцију експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина у ћелијама CRC може бити индуковано третманима са лековима на бази платине(II) (Li и сар., 2017; Rho и сар., 1999).

Повећање цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина и смањење нуклеарног пула овог протеина корелира са антимигранторним ефектима испитиваних третмана, и специфичностима везаним за НСТ-116 ћелијску линију. Наиме, НСТ-116 ћелије експримирају мутиран  $\beta$ -катенин, са једним немутираним алелом. Услед присуства немутираног APC, чија је основна улога у стабилизацији фосфорилисаног  $\beta$ -катенина, под утицајем третмана може доћи до очувања делимично фосфорилосаног  $\beta$ -катенина и његовог задржавања у цитоплазми (Wang и сар., 2003). Немутирани APC може индуковати транслокацију  $\beta$ -катенина из нуклеуса у цитоплазму (Krieghoff и сар., 2006) што доводи до редукције нуклеарног пула  $\beta$ -катенина, а повећава цитоплазматски пул, што може бити објашњење за повећање цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина у третираним НСТ-116 ћелијама. Делимично фосфорилисан  $\beta$ -катенин не може бити даље деградиран од стране протеозомалног комплекса, већ се накупља у цитоплазми третираних ћелија. Услед повећане експресије Е-кадхерина долази до интеракција између два молекула што доводи до формирања већег броја међућелијских веза и чвршћих међућелијских контаката (Chu и сар., 2006). Ово је могуће објашњење морфолошких промена третираних ћелија, а као последица антимигранторних ефеката испитиваних третмана. Одржавање нуклеарног  $\beta$ -катенина (услед извесног повратка у једро) и повећање цитоплазматског  $\beta$ -катенина, корелира са чињеницом да у НСТ-116 ћелијама не долази

до деградације  $\beta$ -катенина под дејством третмана, већ до његове релокације у цитоплазму (Li и сар., 2017; Segditsas и Tomlinson, 2006; Henderson, 2000), па је ово могуће објашњење добијених резултата.

Антимиграторни ефекти испитиваних хемијских једињења, у првом реду Лиганда 1, доводе до повећања протеинске експресије FZD7 рецептора у цитоплазми третираних ћелија. FZD7 је трансмембрански рецепторни протеин за Wnt/ $\beta$ -катенин сигнални пут, који је у ћелијама CRC доминантно активан, од канцерогенезе до формирања метастаза (Alberts и сар., 2008). FZD7 експримирају ћелије у строми тумора са малим миграторним потенцијалом, и очуваном пролиферацијом, док ћелије у инавазивном фронту, носиоци ћелијске миграције, не експримирају овај рецепторни протеин, што потврђују наши резултати о нижој експресији FZD7 у HCT-116 ћелијама, које имају већи миграторни потенцијал (Vincan и сар., 2007б). С тим у вези повећање протеинске експресије FZD7 у HCT-116 ћелијама, у корелацији је са ефектима испитиваних хемијских једињења на смањење покретљивости HCT-116 ћелија. Предходне студије су показале да ниво експресије FZD7 рецептора у ћелијама CRC корелира са стопом диференцијације ћелија (Ueno и сар., 2008). Стопа диференцијација ћелија, обрнуто је пропорционална миграторном потенцијалу ћелија (Vincan и сар., 2007б; 2010). Обзиром да HCT-116 ћелије спадају у лоше диференциране ћелијске линије (Ueno и сар., 2008), и имају нижу експресију FZD7 у нетретираним ћелијама, испитивни третмани, повећањем FZD7 рецептора могу утицати на промоцију диференцијације, а последично је могуће смањење миграторног потенцијала.

У основи антимиграторних ефеката индукованих третманима хемијским једињењима стоји смањење нуклеарног  $\beta$ -катенина што за последицу има смањење Н-кадхерина, виментина и MMP-9 (Nieto и сар., 2016; Liu и сар., 2002). Н-кадхерин је цитоскелетни протеин присутан у мезенхимским ћелијама, а експресија Н-кадхерина омогућава ћелијама тумора интеракцију са фибробластима и ендотелним ћелијама (Yilmaz и Christofori, 2009; Gumbiner, 2005). Миграторни фенотип окарактерисан Н-кадхерином омогућава расипање ћелија из примарног тумора (Yilmaz и Christofori, 2009). Редукција експресије мезенхимских маркера Н-кадхерина, виментина и MMP-9 добијена у третманима хемијским једињењима, јесте у корелацији са антимиграторним својствима третмана. Повећање протеинске експресије Е-кадхерина, индуковано третманима хемијским једињењима, као последица редукције нуклеарног  $\beta$ -катенина, могло би посредно утицати на смање протеинске експресије Н-кадхерина, што је у основи одржања кадхеринског пула у ћелији, а могућ механизам за редукцију експресије Н-кадхерина у третираним ћелијама (Yan и сар., 2015; Maeda и сар., 2006).

Виментин индукује мезенхимски облик ћелија и промовише њихову покретљивост (Mendez и сар., 2010). Повећање експресије Е-кадхерина у третираним ћелијама, може имплицирати да је под

дејством третмана дошло до редукције експресије Snail транскрипционог фактора, као главног репресора Е-кадхерина (Tsanou и сар., 2008; Kwak и сар. 2007). Претходне студије су показале да блокирање експресије Snail транскрипционог фактора ефикасно смањује секрецију MMP-9 и виментина у ћелијама карцинома, што је снажно утицало на смањење њиховог инвазивног потенцијала (Chen и сар., 2017; Salomon и сар., 2015). Експресија виментина је под регулацијом Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута (Chen и сар., 2017), па смањена експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина може утицати на смањење виментина у третираним ћелијама.

Металопротеиназе имају кључну улогу у регулацији миграције, инавазије, метастазе и ангиогенезе (Bergers и сар., 2000). Редукцијом експресије MMP-9 у ћелијама CRC, смањује се капацитет ових ћелија за деградацију желатина, а последично и инвазију. Смањење протеинске експресије MMP-9 у третираним ћелијама корелира са антимигранторним ефектима испитиваних третмана. Литературни подаци показују да се антимигранторни ефекти хемијских једињења на бази платине(IV) повезују са редукцијом виментина и MMP-9 у канцерозним ћелијским линијама (Baі и сар., 2010).

У SW-480 ћелијама под утицајем третмана лигандима дошло је до редукције цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина. У SW-480 ћелијама  $\beta$ -катенин није мутиран, а обзиром да постоји мутација у APC гену, APC протеин је дефектан, па је дефосфорилација  $\beta$ -катенина на нивоу цитоплазме извесна, а на даље  $\beta$ -катенин бива транслоциран у једру (Krieghoff и сар., 2006). Наши резултати су показали да је у третману хемијским једињењима дошло до редукције цитоплазматског  $\beta$ -катенина, па се може предпоставити да је у испитиваним ћелијама дошло до деградације цитоплазматског  $\beta$ -катенина, другим алтернативним путевима независним од APC, тј. да је омогућена деградација  $\beta$ -катенина од стране деструкционог комплекса (Dihlmann и сар., 2003). Такође, један део цитоплазматског  $\beta$ -катенина релоциран је у међућелијске везе, што може бити последица повећане протеинске експресије Е-кадхерина (Chu и сар., 2006).

Познато је да је у SW-480 ћелијама,  $\beta$ -катенин/TCF (енгл. *T-Cell Factor*) сигнализација активна због присуства високог нивоа нуклеарног  $\beta$ -катенина (Korinek и сар., 1997). Наши резултати показују да је у третману Лигандом 1 у нижој концентрацији индукују повећан ниво нуклеарног  $\beta$ -катенина, лоциран у цитоплазми третираних ћелија у зони око једра. Ово сугерише да је присутан делимични експорт нуклеарног  $\beta$ -катенина. Резултати предходних студија су показали да се релокација нуклеарног  $\beta$ -катенина у третману оксалпатином догађа путем лизозома у SW-480 ћелијама, независно од APC (Howells и сар., 2008; Yang и сар., 2006). Више концентрације третмана Лигандом 1 индукују значајно смањење нуклеарног  $\beta$ -катенина, без присуства у цитоплазми третираних ћелија што сугерише да је можда дошло до фосфорилације и деградације експортованог протеина у оквиру цитоплазме или до деструкције  $\beta$ -катенина унутар

једра (Yang и сар., 2006). Обзиром на повећање Е-кадхерина и редукцију нуклеарног  $\beta$ -катенина, као и редукцију промиграторних протеина, можемо предпоставити да је активност  $\beta$ -катенин/TCF комплекса смањена. Смањењем  $\beta$ -катенина у једру редукује се његова активност као транскрипционог фактора, услед интеракције  $\beta$ -катенина и дефектног APC у нуклеусу SW-480 ћелија. Дефектни APC неспецифично интерагује са  $\beta$ -катенином па долази до инхибиције интеракције  $\beta$ -катенина и TCF везујућих места, комплекс не бива награђен, чиме је онемогућена експресија горе наведених промиграторних таргет гена, али је омогућена експресија Е-кадхерина (Yang и сар., 2006).

Већи ниво експресије FZD7 рецептора у нетретираним SW-480 ћелијама (у односу на HCT-116 ћелије), у сагласности је са средње добром диференцијацијом ових ћелија и нижим миграторним потенцијалом (Vincan и сар., 2008; Ueno и сар., 2008). Смањење FZD7 рецептора у испитиваним третманима, може бити последица редукције нуклеарног  $\beta$ -катенина, обзиром да је експресија FZD7 под контролом Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута, а главни регулаторни механизам експресије FZD7 гена је  $\beta$ -катенин/TCF4 (енгл. *T-cell factor-4*, Tcf4) сигнализација (Kinga и сар., 2012; Yang и сар., 2006). Такође, неоспорно је да регулација експресије FZD7 стоји у основи различитих регулаторних молекуларних механизма комуникације ћелије са њеним окружењем.

Обзиром да је задржан одређени ниво експресије испитиваних промиграторних протеина, можемо закључити да је миграторни потенцијал ћелија смањен у третману хемијским једињењима. Повећање експресије Е-кадхерина и смањење експресије Н-кадхерина у испитиваним HCT-116 и SW-480 ћелијама сугерише да третман Лигандом 1 редукује напредовање процеса ЕМТ.

Опречна су мишљења о утицају ROS/RNS на миграторни потенцијал ћелија канцера (Fini и сар. 2008; Nishikawa, 2008). У том смислу, литературни подаци (Urbich и сар., 2002) говоре у прилог нашим резултатима да повећање ROS/RNS може имати антимиграторне ефекте на ћелијама CRC. Међутим, третман Лигандом 1, са најбоље показаним антимиграторним ефектима на SW-480 ћелијама, није индуковао значајно повећање ROS, па се може закључити да оксидациони стрес није у основи антимиграторног дејства Лиганда 1.

ROS имају значајну улогу у регулацији различитих сигналних путева у ћелијама, па и у ћелијама канцера (Liou и Storz, 2010), а функционисање многих протеина зависи од редокс статуса ћелије (Droge, 2002). У ћелијама третираним Pt(IV) комплексом 2 долази до повећања нивоа супероксид анјон радикала и нитрита, као и до повећања антиоксиданса GSH, што сугерише да је у испитиваним ћелијама дошло до нарушавања проксидационо/антиоксидационе равнотеже и индукције оксидационог стреса. Третмани платинским комплексима индукују јак оксидациони стрес у испитиваним ћелијама канцера, нарочито у SW-480 ћелијама, са значајним повећањем ROS и RNS, а у њиховим интеракцијама долази до формирања веома токсичног пероксинитрита

(Deavalli и сар., 2012; Droge, 2002), одговорног за цитотоксично деловање испитиваних комплекса. Очигледна је разлика у одговору две ћелијске линије на третмане једињењима која у себи садрже платину: у SW-480 ћелијама сви комплекси платине индукују јак оксидациони стрес, док је он значајно мањи у третману лигандима, нарочито Лигандом 1, што се може повезати са цитотоксичним и проапоптотским ефектима Pt(IV) комплекса и нижим IC<sub>50</sub> вредностима у односу лиганде. С друге стране, у НСТ-116 ћелијама, од свих једињења која у себи садрже платину једино Pt(IV) комплекс 2 индукује јак оксидациони стрес, па овде можемо предпоставити да је реч о специфичном одговору ове ћелијске линије на Pt(IV) комплекс 2. Ово такође иде у прилог чињеници да је НСТ-116 ћелијска линија мање осетљива на третмане једињењима платине због дефектног протеина MLH1 у репаративном систему (Hassen и сар., 2016; Imesch и сар., 2012). Веће концентрације супероксид анјон радикала и нитрита у НСТ-116 ћелијама у односу на SW-480 ћелије, као и веће концентрације GSH у SW-480 ћелијама, стоје у основи разлика у одговору ћелија на оксидациони стрес.

### **Механизми деловања биоактивних супстанци из природних извора**

Биоактивни једињења из природних извора од давнина се користе у циљу очувања и побољшања здравља људи. Биљке, гљиве и лишцајеви, као извор потенцијално биоактивних супстанци, у основи су традиционалне медицине и фармакологије и користе се за лечење различитих болести, укључујући и канцер. Биолошки активне компоненте из природних извора припадају различитим групама једињења: фенолна једињења, фитоестрогени, фитостероли, лактини, олигосахариди, полинезасићене масне киселине (Milutinović и сар., 2015; Ćurčić, 2014). Поред примарних метаболита, као што су протеини, угљени хидрати и липиди, веома значајну улогу имају одређена једињења без значајне нутритивне улоге, тзв. секундарни метаболити: полифеноли терпеноиди, акалоиди и антибиотици. Потенцијална антиканцерогена деловања биоактивних једињења широко су истражена и много је података који указују на позитивне ефекте у превенцији, појаву и смањењу ризика од CRC (Fernández и сар., 2016).

### **Механизми деловања гљива**

Одабране врсте гљива (*P. linteus*, *C. sinensis*, *L. edodes*, *C. comatus* и *G. lucidum*) комерцијално су набављене као увезени, готови препарати гајених врста, са употребом као додаци у исхрани људи. Медицинске особине гљива су познате од давнина, а њихови антиканцерогени ефекти су предмет истраживања многих студија (Li и сар. 2004; Smith и сар., 2003).

Тестирани екстракти гљива показују селективне цитотоксичне ефекте. Смањење ћелијске вијавилности са slabим цитотоксичним ефектима показали су третмани екстрактима *P. linteus*, *C. sinensis* на SW-480 ћелијама, што је у сагласности са ранијим истраживањима, која показују да су SW-480 ћелије (у односу на HCT-116 ћелије) осетљивије на третман природним екстрактима (Milutinović и сар. 2015). У третманима испитиваних екстраката гљива није дошло до пролиферације ћелија након 72 сата од третмана, па се може закључити да ови третмани имају одређени антипролиферативни ефекат, што корелира са даљим резултима за смањење нуклеарне експресије β-катенина у испитиваним ћелијама. Такође, испитивани третмани нису показали значајне цитотоксичне ефекте на MRC-5 здравим ћелијама, па се у том смислу може говорити о специфично антиканцерогеном дејству екстраката гљива.

Обзиром на то да је екстракт гљиве *P. linteus* показао одређену цитотоксичност на обе ћелијске линије канцера, може се претпоставити да је то резултат цитотоксичних ефеката високих концентрација полифенола и флавоноида детектованих у овој врсти (Šeklić и сар., 2016). Познато је да гљиве акумулирају велике количине фенолних једињења и друге активне компоненте (Song и сар., 2008). Такође не треба занемарити чињеницу да су екстракти гљива богати полисахаридима и представљају смеше различитих хемијских једињења са потенцијалним биоактивним ефектима у ћелији, па се биолошки ефекти могу приписати појединачним, али и синергистичким и антагонистичким ефектима биоактивних супстанци у екстракту (Šeklić и сар., 2016; Milutinović и сар., 2015).

Промене редокс статуса у ћелијама третираним екстрактима гљиве *P. linteus*, у првом реду су повећане продукције  $O_2^{\cdot-}$ . Полифеноли и флавоноиди су једињења са антиоксидационим карактеристикама, али могу бити и носици прооксидационе и антитуморске активности, као и друга биоактивна једињења садржана у екстрактима биљних извора (Oak и сар., 2005; Ren и сар., 2003). Обзиром да је екстракт гљиве *P. linteus* показао цитотоксичне ефекте на обе ћелијске линије, испитиван је тип ћелијске смрти, при чему је евидентирана доминатна апотоза, док се некроза јавља у значајном проценту у највишим концентрацијама третмана. Процент ћелија у раној апотози расте са повећањем концентрације и времена излагања, па се за ове екстракте може рећи да имају проапототски ефекат. Активација механизма апотозе је вероватно последица нарушене редокс равнотеже у ћелијама, у првом реду повећања  $O_2^{\cdot-}$  индукваног од стране биоактивних компоненти из природних извора са антиоксидационим својствима (Lugli и сар., 2005; Galati и сар., 2002).

На основу литературних података (Amawi и сар., 2017), може се рећи да су антимигранторна својства целих екстраката гљива а нарочито лишајева као и комбинације више различитих биоактивних компоненти из природних извора, слабо испитивани. Обзиром да је екстракт меша

различитих биоактивних компоненти који могу имати потенцијалне синергистичке ефекте, као и то да могу интераговати са различитим таргет протеинима, значајно је било испитати ефекте целог екстракта на миграторни потенцијал ћелија CRC.

На основу испитивања ефеката на миграторни потенцијал ћелија CRC, можемо закључити да екстракти гљива показују извесну селективност према ћелијским линијама - антимиграторни ефекат на HCT-116 ћелијама, док већина екстраката показује промиграторни ефекат на SW-480 ћелијској линији. Једино екстракт *P. linteus* показује значајне антимиграторне ефекте на обе ћелијске линије. Екстракти са најзначајнијим антимиграторним ефектима *P. linteus* у SW-480, као и *C. sinensis* и *L. edodes* у HCT-116 индукују благо повећање продукције  $O_2^{\cdot-}$ . Антимиграторни ефекти могу бити последица повећане продукције  $O_2^{\cdot-}$ , у ниским концентрацијама третмана, индуковане од стране биоактивних компоненти екстраката као што су полифеноли, протеини или полисахариди (Šeklić и сар., 2016). Како је претходно показано, полифенолна и друга биоактивна једињења, која у основи имају антиоксидациона својства, у ћелијском систему могу деловати прооксидационо, повећавајући ниво интрацелуларних ROS, што за последицу може имати појаву оксидационог стреса (Song и сар., 2008; Kamilya и сар., 2006; Smith и сар., 2003). Реактивне врсте кисеоника, у првом реду  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$ , као сигнални молекули за последицу могу имати антимиграторни ефекат (Luanpitrong и сар., 2010), што може стајати у основи ефеката екстраката гљива.

Резултати ових истраживања показују да третмани са најјачим антимиграторним ефектима индукују значајно повећање антимиграторних протеина (Е-кадхерина) и редукују експресију промиграторних протеина (Н-кадхерина, виментина и MMP-9), док експресија  $\beta$ -катенина показује ћелијску специфичност. Редукција промиграторних протеина је у корелацији са антимиграторним ефектима испитиваних третмана, што потврђују предходна истраживања на ћелијама CRC (Han и сар., 2016; Pan и сар., 2013; Han и сар., 1999). Познато је да кордицептин, биоактивна компонента из гљиве *C. sinensis* умањује TGF- $\beta$  сигнализацију а тиме и миграцију преко TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ RI, T $\beta$ RII и p-Smad2/3 у HCT-116 ћелијама (Pan и сар., 2013). Такође у SW-620 ћелијама долази до редукције миграторног потенцијала од стране биоактивних компоненти, путем репресије транскрипционог фактора SOX2 и активирањем ROS/AMPK/GSK3 $\beta$  сигналног пута (Han и сар., 2016).

Повећање експресије Е-кадхерина је детектовано у нашим истраживањима. Третмани са најјачим антимиграторним ефектима индукују највеће повећање Е-кадхерина и његову релокацију у ободни део цитоплазме уз ћелијску мембрану. Многе студије су показале да полифенолна једињења инхибирају EMT преко инхибиције Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута, при чему долази до смањења  $\beta$ -катенина, виментина, и Tcf4, што последично доводи до повећања протеинске експресије Е-кадхерина у ћелијским линијама CRC (Zhang и сар., 2016; Ji и сар., 2015; Gao и сар., 2015; Lin и сар., 2012). Различити су механизми смањења експресије промиграторних фактора



Н-кадхерина и Snail транскрипционог фактора, што посредно повећава експресију Е-кадхерина (Gao и сар., 2015; Varibeau и сар., 2014; Vergara и сар., 2011). Тако, на пример, инхибиција TGF- $\beta$ -индуковане ЕМТ у НСТ-116 ћелијама CRC од стране биоактивних компоненти, доводи до повећања Е-кадхерина и смањења виментина (Ји и сар., 2015). Инхибицијом EGF у ћелијама карцинома дојке може се вратити или зауставити процес ЕМТ (Vergara и сар., 2011). Генерално узевши, полифенолна једињења су показала значајне ефекте на редукцију промиграторних протеина  $\beta$ -катенина, виментина, Н-кадхерина, MMP-9, TGF- $\beta$ , и VEGF (Yang и сар., 2013), чиме долази до редукције процеса ЕМТ, што (уз повећање епителних маркера Е-кадхерина) може иницирати да ћелије задобијају епителни фенотип, са чвршћим међућелијским везама, што је у сагласности са нашим резултатима.

Такође, третмани са антимигаторним ефектима показују ћелијски специфичан одговор на експресију  $\beta$ -катенина. У НСТ-116 ћелијама долази до повећања цитоплазматског пула  $\beta$ -катенина и редукције нуклеарног  $\beta$ -катенина. Wang и сарадници (2003) су показали да полисахариди из екстракта *L. edodes* узрокују повећање цитоплазматског  $\beta$ -катенина и лоцирање уз ћелијску мембрану у НСТ-116 ћелијама, што је (уз повећање Е-кадхерина) у сагласности са антимигаторним ефектима добијеним у овим истраживањима. Повећање цитоплазматског  $\beta$ -катенина корелира и са чињеницом да је у НСТ-116 ћелијама  $\beta$ -катенин мутиран (један алел мутиран, док је други здрав), те долази до делимичне фосфорилације и релокације  $\beta$ -катенина из нуклеуса у цитоплазму, како је објашњено раније (Segditsas и Tomlinson, 2006; Пуас и сар., 1997). Биоактивне компоненте из екстракта гљива у третманима на НСТ-116 ћелијама редукују ниво нуклеарног  $\beta$ -катенина на протеинском нивоу (Kang и сар., 2012), што корелира са нашим резултатима.

У SW-480 ћелијама третираним екстрактом *P. linteus* долази до смањења укупног  $\beta$ -катенина (цитоплазматског и нуклеарног), што уз повећање експресије Е-кадхерина, и смањење промиграторних протеина (Н-кадхерина, виментина и MMP-9), корелира са антимигаторним ефектима. Како је раније наглашено, висок ниво флавоноида је детектован у овом екстракту (Šeklić и сар., 2016). Ранија истраживања (Amado и сар., 2011) су показала да флавоноиди могу имати ефекте на различите молекуле Wnt сигналног пута укључујући и редукцију  $\beta$ -катенина. Смањење нуклеарног  $\beta$ -катенина може бити последица ометања интракције лиганд рецептор (Wnt/Frizzled/LRP5/6), блокирање транспорта у једру у директној интеракцији биоактивне компоненте са  $\beta$ -катенином, као и последица метиловања гена који експримирају компоненте овог сигналног пута, у ћелијским линијама CRC (Temraz и сар., 2013; Amado и сар., 2011; 2012; Kaur и сар., 2010; Murakami и сар., 2008).

Литертурни подаци показују да смањење  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелиској линији може бити индуковано третманима екстрактом гљиве *P. linteus* (Šeklić и сар. 2016; Song и сар., 2011). Ефекти флавоноида на ниво  $\beta$ -катенина и прерасподелу између једра и цитоплазме у ћелијским линијама CRC, умогоне зависи од мутација у Wnt/ $\beta$ -катенин сигналном путу (Kaур и сар., 2010).

Очигледно, регулација  $\beta$ -катенина у третираним НСТ-116 и SW-480 ћелијама зависи од различитих механизма, али његово повећање у интрацелуларним конекцијама и смањење нуклеарног пула у обема ћелијским линијама, резултира смањењем миграторног потенцијала, што је у складу са литературним налазима (Sarkar и сар., 2010).

Повећање експресије FZD7 рецептора у НСТ-116 ћелија, може бити последица активације FZD гена у активном у Wnt/ $\beta$ -катенин сигналном путу. Обзиром на очигледно смањење активације Wnt/ $\beta$ -сигналног пута путем редукције нуклеарног  $\beta$ -катенина, можемо претпоставити да је активност FZD7 рецептора смањена у третираним ћелијама као последица ометања везивања лиганд рецептора од стране биоактивне компоненте, или везивања органске молекуле за Dish домене одговорне за интеракцију са FZD7, чиме ометају активацију и даљу Wnt сигнализацију (Shan и сар., 2005). Такође могуће је да је у третираним ћелијама повећање експресије FZD7 последица мезенхимскоепителне транзиције, при чему долази до опадања миграторног потенцијала третираних ћелија под дејством испитиваних тремана (Ueno и сар., 2008).

Мали молекули из гљива као што су PKF115-584, CGP049090, PKF222-815, PKF118-744, PKF222-310 и ZTM000990 могу ихибирати асоцијацију између Tcf4 и  $\beta$ -катенина чиме посредно доводе до смањења *c-myc* и *cyclin D1* експресије и пролиферације линија CRC (Lepourcelet и сар., 2004), као и других линија различитих врста карцинома (Wei и сар., 2010). Иномицин, мали молекул изолован из гљиве *Streptomyces conglobatus* такође инхибира  $\beta$ -катенин/Tcf4 сигнализацију, редукујући нуклеарни  $\beta$ -катенин и директно раскидајући комплекс  $\beta$ -катенин/Tcf и супримирајући везивање Tcf4 комплекса за DNA (Park и сар., 2005). Фумагилин преко метионин амилопептидазе-2 блокира Wnt неканонску сигнализацију, што говори о међусобној регулацији Wnt канонске и неканонску сигнализације (Zhang и сар., 2006). Смањење нуклеарног  $\beta$ -катенина може указивати да је последично дошло до смањења експресије таргет гена *cyclin D1*, *c-jun*, *c-myc*, чиме је ометена даља пролиферација ћелија (Issa и сар., 2007; Ju и сар., 2005; Orneg и сар., 2002), што корелира са резултатима овог истраживања (након 72 сата, антипролиферативни ефекат).

Екстракти гљива садрже многе биоактивне и медицински важне супстанце са антиоксидационим и прооксидационим карактеристикама. Многе *Basidiomycetes* садрже фенолне компоненте које су у својој основи антиоксиданси (Cheung и сар., 2003). Поред антиоксиданаса, у екстрактима гљива могу се наћи и проксиданси као што је 4-(хидроксиметил)-фенил радикал (Pirker и сар., 2004). Према резултатима наше студије, промене у редокс параметрима индуковане

третманима метанолним екстрактима гљива сугершу да је дошло до нарушавања оксидационо / антиоксидационе равнотеже и до индукције оксидационог стреса, посебно у третманима *P. linteus*, *C. sinensis* и *L. edodes* са најбољим биолошким ефектима. Фенолне компоненте којима су богати екстракти испитиваних гљива, нарочито екстракт *P. linteus*, генерално имају одлике антиоксиданаса, док неки од њих интрацелуларно могу имати прооксидациону активност генеришући ROS (Kamulya и сар., 2006; Kato, 1999).

ROS имају значајну улогу у превенцији инфекција путем деструкције интрацелуларних патогена у ћелијама имуног система (Hyslop и сар., 1995). С тим у вези је превасходна употреба тестираних препарата на бази гљива у сврху јачања и стабилизације ћелија имуног система. Третмани екстрактима гљива са цитотоксичним и проапототским ефектима, у високим концентрацијама индукују повећање концентрације  $O_2^{\cdot-}$ , као и благо повећање GSH у SW-480 и HCT-116 ћелијама. Повећање  $O_2^{\cdot-}$  у третираним ћелијама са једне стране, уз смањење нуклеарног  $\beta$ -катенина са друге стране, може деловати цитотоксично и проапототски на испитиване ћелије CRC, што уз остале ROS и RNS врсте може довести до пада ћелијске вијабилности третираних ћелија. Молекуларна оштећења изазвана ROS у здравим ћелијама доводе до активације механизма за репарацију, док велика оштећења активирају програм ћелијске смрти, апотозу или ћелијску смрт путем аутофагије (Chen и сар., 2007; Ott и сар., 2007; Ozben 2007). Туморске ћелијске линије су посебно осетљиве на промену редокс равнотеже и ROS индуковану апотозу (Mogré и сар., 1995), те многи антитуморски агенси своју активност испољавају преко ROS-зависне активације апотозе (Fang и сар., 2007). Стварање ROS у кацерозним ћелијама доводи до отпуштања цитохрома C из интермембранског простора митохондрија у цитосол, где се он везује за фактор активације апоптозе (Araf-1) и активира каскаду каспаза, што доводи до ћелијске смрти (Zou и сар., 1999; Warburg 1956). Song и сарадници (2008) су показали да само полисахариди (гљукани), као молекули велике молекулске масе, не могу генерисати ROS, већ интеракција полисахарида са полифенолима гради комплекс који продукује велику концентрацију ROS. На основу овога можемо закључити да се у ћелијској средини догађа интеракција одређених група (карбоксилне групе) полифенола присутних у екстрактима гљива у првом реду са  $\beta$ -D-гљуканом. Услед ових интеракција долази до промене конформације  $\beta$ -(1,6)-D-гљукана, при чему се генеришу ROS (Song и сар., 2008; Renard и сар., 2001; Sun и Payne, 1996).

Из овога се може закључити да промене параметара редокс статуса вероватно индукују и регулишу антимигранторну и цитотоксичну активност испитиваних третмана. Екстракти гљива показују боље антимигранторне ефекте на HCT-116 ћелијама, што се може објаснити чињеницом да су ове ћелије осетљивије на промене параметра оксидационог стреса, како је претходно објашњено.

Резултати ове студије су у складу са литературним подацима, који показују да комерцијално гајене врсте могу бити променљивог квалитета, а садржај биоактивних компонената у њима може варирати, па и ефекти на човеков организам уопште (Song и Van Griensven, 2008). Обзиром да је присуство било ког канцера у људском организму знак значајно нарушене хомеостазе, примена суплемената исхрани, као помоћна терапија оболелима од карцинома, мора бити строго контролисана, са строго провереним сертификованим препаратима и јасно назначеним садржајем и количинама биоактивних супстанци. Примена непроверених суплемената, без јасно истакнуте декларације и порекла, може довести до тога да ефекти буду недвољни или чак контрапродуктивни.

### *Механизми деловања лишајева*

Значај лишајева као антиканцерогених агенаса, потврђен је бројним студијама (Kosanić и сар., 2014; Kosanić и Ranković 2011; Mitrović и сар., 2011). У нашим истраживањима испитивани су биолошки ефекти две врсте лишајева *P. furfuracea* и *P. glauca* на ћелијским линијама CRC. Лишајеви су узорковани као самоникле врсте из природних станишта са локалитета Тара. У оквиру овог истраживања испитивани су цитотоксични и проапототски ефекти три врсте екстраката (метанолни, ацетонски и етилацетатни), док су ефекти на миграторни потенцијал ћелија испитивани једино у третманима метанолним екстрактима лишајева.

Екстракти лишајева су показали значајне цитотоксичне ефекте на ћелијским линијама CRC, док су на здравим MRC-5 линијама показали значајно слабије ефекте ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ), што ове лишаје сврстава у значајне антиканцерогене изворе биоактивних супстанци. Генерално, екстракти *P. furfuracea* показују јаче цитотоксичне ефекте, што је вероватно последица специфичних хемијских компоненти. На основу анализа екстраката гасно-спектрофотометријском анализом, гасно-масеном спектрофотометријом и нуклеарном магнетном резонацом (Mitrović и сар., 2014) показано је присуство веће концентрације фенола и фалавоноида у екстрактима *P. furfuracea*, што се може сматрати потенцијалним узроком бољих цитотоксичних ефеката екстраката ове врсте лишаја. Цитотоксични и проапототски ефекти лишајева из фамилије *Parmeliaceae*, у коју спада и врста *P. furfuracea*, су потврђени на ћелијским линијама CRC (HCT-116 и LS-174) (Kosanić и сар., 2014; 2013). Такође, наше раније студије потврђују да фенолне компоненте лишајева могу индуковати цитотоксичне и проапототске ефекте на HCT-116 ћелијама (Mitrović и сар., 2011). Етилацетатни и ацетонски екстракти *P. furfuracea* са најјачим цитотоксичним и проапототским ефектима на обе ћелијске линије, показују значајно антиоксидационо деловање у *in vitro* системима (Mitrović и сар., 2014). Атријска киселина, оливетонид, оливетол, хлороантранол и антранол који преовладавају у екстрактима *P. furfuracea* (Mitrović и сар., 2014), могу имати

значајан утицај на вијабилност ћелија канцера. Међутим, и мање заступљене компоненте, као што су метил орселинат, етил и метил хематоматер итд., не смеју се занемарити као потенцијално антиканцерогене супстанце (Shrestha и St Clair, 2013).

Екстракти *P. glauca* показују значајне цитотоксичне ефекте на НСТ-116 ћелијама, као и добру цитотоксичност на SW-480 ћелијама. Према хемијском профилу, екстракте *P. glauca* одликује присуство диметил каперата, атаринске киселине, хлоратранола и атранола као главних компоненти, али и друге мање заступљене компоненте (5,7-8 дихидрокси-6-метилфталид, изоадиантон, оливетол, метил и етил хематомет) (Mitrović и сар., 2014), могу имати потенцијално учешће у цитотоксичним ефектима испитиваних екстраката.

Екстракти лишја са најјачим цитотоксичним ефектима индукују проапоптотски ефекат на тестираним ћелијским линијама са највећим процентом ћелија у апоптози. Морфолошке промене карактеристичне за апоптозу констатоване су нарочито у третману екстрактима *P. furfuracea*. Неколико студија (Ваџкорова и сар., 2012; Russo и сар., 2012; Mitrović и сар., 2011; Bézin и сар., 2004) су показале да се индукција апоптозе може изазвати метаболитима лишја у ћелијама карцинома. Такође, Russo и сарадници (2008) су показали да третмани екстрактима лишјајева индукују фрагментацију геномске ДНК уз значајно повећање активности каспазе 3 у ћелијама карцинома. Екстракти *P. glauca* индукују апоптозу са значајним процентом некротских ћелија у обе ћелијске линије, нарочито код продуженог третмана. Према добијеним резултатима, можемо закључити да су НСТ-116 ћелије осетљивије на индукцију апоптозе у третманима екстрактима лишјајева, од SW-480 ћелија. Апоптоза, као високо регулисани процес ћелијске смрти, може се индуковати једним од два главна апоптотска пута: спољашњим или унутрашњим, што зависи од карактеристика саме ћелијске линије (Igney и Krammer, 2002).

Како је раније наглашено, оскудна су истраживања ефеката екстраката биљног порекла на миграторни потенцијал CRC, а нису пронађени подаци о ефектима екстракта тестираних лишјајева на миграцијски потенцијал ћелија канцера, па наши резултати први пут показују антимиграторни потенцијал метанолних екстраката *P. furfuracea* и *P. glauca* на НСТ-116 и SW-480 ћелијским линијама.

Метанолни екстракт *P. furfuracea* показао је бољи антимиграторни потенцијал од екстракта *P. glauca*, посебно на НСТ-116 ћелијама. Такође, резултати показују да прооксидациони ефекат (повећан  $O_2^{\cdot-}$ ) у ћелијама третираним овим екстрактима, корелира са антимиграторним деловањем. Како је раније наглашено,  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  могу имати утицаја на смањење миграторног потенцијала на ћелијске линије CRC, као и да су НСТ-116 ћелије осетљивије на промену оксидационих параметара, па с тим у вези и мање промене редокс статуса могу утицати на смањење миграторног потенцијала ове ћелијске линије (Šeklić и сар., 2016; Luanpitpong и сар., 2010).

Експресија Е-кадхерина је повећана у антимиграторним третманима екстракта лишајева у обе ћелијске линије, што корелира са смањењем експресије промиграторних протеина Н-кадхерина, виментина и MMP-9. Експресија цитоплазматског  $\beta$ -катенина је ћелијски специфична у антимиграторним третманима екстракта лишајева (повећана је у НСТ-116 ћелијама, а смањена у SW-480 ћелијама), док је протеинска експресија нуклеарног  $\beta$ -катенина редукована у обе ћелијске линије. Како је раније наглашено, у НСТ-116 ћелијама се може догодити нуклеарни експорт  $\beta$ -катенина при чему он бива делимично фосфорилисан (APC немутиран), па се сходно томе и повећава цитоплазматски, а смањује нуклеарни пул  $\beta$ -катенина, што је у сагласности са нашим резултатима. Обзиром на присуство нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазми третираних ћелија, можемо констатовати да је један део нефосфорилисаног  $\beta$ -катенина (нуклеарног, слободног) присутан у цитоплазми третираних ћелија обе ћелијске линије. У том смислу, може се претпоставити да се експорт нуклеарног  $\beta$ -катенина врши другим путевима независним од APC, или долази до пасивног излаза нуклеарног  $\beta$ -катенина у цитоплазму. Обзиром да се редукује нуклеарни  $\beta$ -катенин, његов експорт у цитоплазму може бити последица смањења транскрипционог фактора 4 (Tcf4) одговорног за задржавање  $\beta$ -катенина у једру, чиме се смањује интеракција са DNA, посредно долази до инхибиције  $\beta$ -катенин/Tcf сигнализације (Park и сар., 2005; Narayan, 2004). Можемо претпоставити да, услед смањења Tcf4, један део нуклеарног  $\beta$ -катенина бива релоциран у цитоплазму, а један део интерагује са FOXO4 што даље доводи до активације каспазе 3 и активације апотозе као доминантног типа ћелијске смрти (Brown и Attardi 2005; Essers и сар., 2005), што такође корелира са нашим резултатима на обе ћелијске линије.

Како вредности редокс параметара показују, екстракт *P. glauca* индуковао је вишеструко повећање GSH у SW-480 ћелијама, што указује на антиоксидациони ефекат. Висок ниво GSH у канцерозним ћелијама омогућава им да преживе оксидациони стрес чиме фаворизују преживљавање ћелија са високим инвазивним и метастатским потенцијалом (Carretero и сар., 2001). У том смислу, екстракти *P. glauca* у ниским концентрацијама показују промиграторни ефекат са редуkcијом епителног маркера Е-кадхерина и цитоплазматског  $\beta$ -катенина и повећањем нуклеарног  $\beta$ -катенина, што указује на нуклеарну прерасподелу  $\beta$ -катенина, који активирањем транскрипције промиграторних гена посредно утиче на смањење експресије Е-кадхерина. Повећана експресија MMP-9 је у корелацији са промиграторним ефектима екстракта, а под регулацијом експресије  $\beta$ -катенина (Olmeda и сар., 2007). Смањење протеинске експресије Н-кадхерина и виментина, повећање експресије FZD-7 рецептора вероватно је последица специфичности третмана. Обзиром да више концентрације *P. glauca* показују антимиграторни ефекат, а да промене у редокс параметрима нису значајне, можемо закључити да антимиграторни

ефекти третмана *P. glauca* у вишој концентрацији зависе од карактеристика SW-480 ћелијске линије и карактеристика самог третмана.

На основу свега изнетог, антимиграторни ефекти испитиваних третмана екстраката из природних извора зависе од финих промена у редокс статусу тј. субцитотоксичних концентрација  $O_2^{\cdot -}$  (Šeklić и сар., 2016; Luanpitrong и сар., 2010). Према добијеним резултатима можемо закључити да је антимиграторни ефекат екстракта *P. furfuracea* значајнији у односу на *P. glauca*, што је вероватно последица специфичних деловања компоненти присутних у хемијском профилу врсте *P. furfuracea*. Такође се може потврдити да су НСТ-116 ћелије осетљивије на компоненте екстраката лишајева у односу на SW-480 ћелијску линију. У оквиру овог истраживања приказане су промене параметара редокс статуса у ћелијама третираним екстрактима лишајева, које указују на чињеницу да су третиране ћелије у оксидационом стресу, што може бити узрок цитотоксичних ефеката испитиваних третмана и апотозе, а у складу са ефектима оксидационог стреса на ћелије (Ferdinandy, 2006).

### Механизми деловања комбинованих третмана

Комбинована терапија као новији приступ лечењу оболелих од канцера, омогућава комбиновање два или више цитостатика (хемијски синтетисаних или из природних извора), са различитим механизмима деловања и са различитим врстама нежељених дејстава, а све у циљу постизања синергистичких цитостатских ефеката са минималним токсичним деловањем по здраве ћелије у организму. Оваква врста терапије омогућава истовремено циљање различитих путева који су укључени у настанак и развој канцера, користећи различите механизме деловања компоненти комбиноване терапије. Један од циљева комбиноване терапије јесте смањити резистенцију туморских ћелија на хемиотерапеутике (Housman и сар., 2014), и постизање бољих антиканцерогених ефеката са што мањим дозама хемиотерапеутике. Овом стратегијом покушава се постићи одређена селективност ћелија канцера у односу на здраве ћелије како би терапија имала јаче антиканцерогено дејство а мање штетила здравим ћелијама (Redondo-Blanco и сар., 2017).

Ефекти котретмана (КТ-0h и КТ-6h) метанолног екстракта гљиве *P. linteus* са хемијским једињењима, тестирани су на ћелијским линијама канцера. Како резултати ове студије показују, котретмани гљиве са Pt(IV) комплексима и цисплатином, показују значајно боље цитотоксичне и проапототске ефекте у поређењу са појединачним третманима испитиваним хемијским једињењима и екстрактом *P. linteus*. Комбиновани третмани гљиве са лигандима нису показали значајно боље ефекте. На основу ових резултата, можемо закључити да једињења на бази платине у котретману са екстрактом *P. linteus* показују синергистичке цитотоксичне ефекте, док су ефекти

котретмана гљиве и лиганда у високим цитотоксичним концентрацијама адитивни и антагонистички. Такође можемо закључити да су обе ћелијске линије постале сензитивније на третмане Pt(IV) комплексима, док једињења која не садрже платину не показују цитотоксичне ефекте у КТ-0h на SW-480 после 72 сата.

Сензитивизација ћелија CRC од стране биоактивних молекула је позната, а у основи механизма сензитивизације стоји циљање различитих таргет молекула (Rodrigues и сар., 2012). Фитохемикалија у котретману са хемиотерапеутицима, првенствено има за циљ превазилажење хеморезистенције с једне стране, или активације и модулације сигналних путева или молекула у ћелији одговорних за резистенцију са друге стране (Redondo-Blanco и сар., 2017). Циљ хемосензитивизације на лек је повећање уноса лека и смањење експорта хемиотерапеутика из ћелије. Биоактивне компоненте могу реаговати са таргетима одговорним за ћелијску резистенцију: АТР-везујуће касете (ABC) фамилију ћелијских транспортера, најчешће присутне протеине одговорне за *multidrug* резистенцију (MDR), измене DNA репаративног система и механизме одговорне за проапоптотску резистенцију (Rodrigues и сар., 2012). Није занемарљив податак да до инактивације хемиотерапеутика долази и у ћелијском микроокружењу. У том смислу стварање повољног микроокружења које може бити постигнуто природним биоактивним супстанцама, од великог је значаја за дејство хемиотерапеутика (Galmarini и сар., 2014).

У циљу постизања бољих цитотоксичних ефеката, ћелије су третиране екстрактом *P. linteus* а након 6 сати додавано је хемијско једињење (комплекс или лиганд). Овај вид котретмана дао је најбоље цитотоксичне ефекте са најмањим IC<sub>50</sub> вредностима. КТ-6h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 са значајно високом цитотоксичношћу, показује да је у предтретману дошло до сензитивизације ћелије од стране биоактивних компоненти у екстракту на Pt(IV) комплекс 2. Fulda и Debatin, (2004), су показали да третман биоактивним компонентама сензибилише ћелије на третман цитостатицима и то много ефикасније када се апликује у предтретману, него када се апликују заједно. Доминантан тип ћелијске смрти је апотоза, док су некротске ћелије у високом проценту детектоване у највишим концентрацијама комбинованих третмана. Умирање ћелија путем некрозе је акутно и не повећава се током дужег излагања третмана, док проценат ћелија у касној апотози бива изразито повећан после 72 сата. Све ово иде у прилог чињеници да се некроза као тип ћелијске смрти дешава акутно, док је апотоза временски зависан процес.

Котретмани КТ-0h за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 показује најбоље цитотоксичне ефекте са значајним проапоптотским деловањем на обе ћелијске линије, што је најбољи цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелијама, док је на SW-480 ћелијама КТ-6h за *P. linteus* + цисплатина показао најбоље цитотоксичне и проапоптотске ефекте. Биоактивне компоненте из гљиве *P. linteus* значајно су повећале цитотоксичне ефекте на SW-480 ћелијама, уз смањење дозе цитостатика 5-



флуороурацила (Tianqi и сар., 2018). Којима-Ууаса и сарадници (2015) су показали да повећање ROS може бити у основи цитотоксичних ефекта котретмана. Повећање нивоа супероксид анјон радикала, нитрита и GSH индуковано је комбинованим третманима, али је нешто мање у односу на појединачне третмане испитиваних Pt(IV) комплекса. Обзиром на значајну цитотоксичност добијену у комбинованим у односу на појединачне третмане, може закључити да поред оксидационог стреса у ћелијама, долази и до индуковања апоптозе путем других механизма највероватније циљањем конкретних проапoptотских молекула (Ćurčić, 2014).

Котретмани нису показали цитотоксичне ефекте на здравој ћелијској линији MRC-5, што указује на антиканцерогено деловање испитиваних котретмана, а у складу је са литературним подацима (Rejhová и сар., 2018).

Значајно боље проапoptотске ефекте показали су котретмани за *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2 са мањим процентом ћелија у некрози, у односу на *P. linteus* + Лиганди, што је могућа последица сензитивизације ћелијских линија на третмане платинским комплексом. Сви КТ-6h показују значајан цитотоксични ефекат после 72 сата на НСТ-116 ћелијама, што сугерише да продужењем времена инкубације са КТ нема селективности у цитотоксичним ефектима између комплекса и лиганда. Пресудну улогу у цитотоксичности након 72 сата, може имати значајно повећање концентрације нитрита у КТ-6h на НСТ-116 ћелијама. Некротски ефекти добијени у високим концентрацијама испитиваних котретмана у корелацији су са високом продукцијом реактивних врста кисеоника и азота, и последичним стварањем пероксинитрита и других реактивних врста, како је раније објашњено.

Ефекти комбинованих третмана екстракта гљиве *P. linteus* са новосинтетисаним Pt(IV) комплексима, њиховим лигандима и цисплатином, тестирани су у ниским (нецитотоксичним) концентрацијама и на миграторни потенцијал ћелијских линија CRC. Сви котретмани су показали значајан антимиграторни потенцијал на обе ћелијске линије, а најбољи ефекат показао је КТ-0h за *P. linteus* + Лиганд 1. Новија истраживања потврђују да третмани биоактивним компонентама из природних извора могу довести до сензитизације ћелије на третман хемиотерапеутицима (Rejhová и сар., 2018; Park и сар., 2017; Nautiyal и сар., 2011), са значајним антимиграторним ефектима на НСТ-116 ћелијама, преко редукције компоненти Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализације (Nautiyal и сар., 2011). Комбиновани третмани су значајно повећали протеинску експресију Е-кадхерина и редукцију промиграторних маркера нуклеарног  $\beta$ -катенина, Н-кадхерина, виментина и MMP-9, што је у сагласности са антимиграторним ефектима испитиваних комбинованих третмана. Цитоплазматско/нуклеарна прерасподела  $\beta$ -катенина која се догађа у третираним НСТ-116 ћелијама, где је присуство цитоплазматског фосфорилисаног  $\beta$ -катенина доминантно повећано у ћелијама на рачун смањења нуклеарног слободног  $\beta$ -катенина, без присуства нуклеарног  $\beta$ -

катенина у цитоплазми ћелија, говори у прилог смањење активноти Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализације, што потврђују литературни подаци (Olmeda и сар., 2007). Смањење нуклераног  $\beta$ -катенина у комбинованим третманима интензивније је него у појединачним третманима хемијским једињењима и екстрактом гљиве *P. linteus*, па се може предопоставити да је Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализација смањена, што за последицу има антипролиферативне ефекте и смањење експресије таргет гена укључених у ћелијску пролиферацију.

У контексту специфичности ћелијских линија, у НСТ-116 ћелијама долази до повећања цитоплазматског  $\beta$ -катенина и FZD-7 рецептора, док су у SW-480 ћелијама смањења оба параметра. Редукцијом нуклераног  $\beta$ -катенина у ћелијама третираним комбинованим третманима може утицати на редукцију TGF $\beta$  сигнализације која је доминантан покретач ЕМТ у НСТ-116 ћелијама, чиме се постижу антимигранторни ефекти (Colombo и сар., 2011), што је у сагласности са нашим резултатима. TGF- $\beta$  може активирати повећану експресију интегрина ( $\alpha\beta 6$  and  $\alpha\beta 8$ ) или металопротеиназа (ММП), нарочито ММП-2 и ММП-9 (Dumitriu и сар., 2013). Антимигранторни ефекти индуковани синергистичким деловањем биоактивних молекула из екстракта *P. linteus* у комбинацији са нецитотоксичним дозама потенцијалних хемиотерпеутика могу редукovati протеинску експресију промигранторних протеина Н-кадхерина, виментина и ММП-9 (Buhrmann и сар., 2014). Директна инактивација транскрипције гена, или деструкција на нивоу протеина може бити постигнута у испитиваним ћелијским линијама CRC од стране комбиноване терапије. Смањена експресија репресора Е-кадхерина, у првом реду Н-кадхерина и виментина посредством редукције нуклераног  $\beta$ -катенина, може утицати на повећање експресије Е-кадхерина, а тиме и антимигранторне ефекте комбинованих третмана.

Редукција укупног  $\beta$ -катенина у SW-480 ћелијама, уз смањење протеинске експресије FZD-7 рецептора може указивати на смањење активноти Wnt/ $\beta$ -катенин сигнализације, што се може довести у везу са антипролиферативним ефектима комбинованих третмана. Повећана експресија FZD-7 рецептора са доминантном цитоплазматском расподелом у НСТ-116 ћелијској линији је индукована у свим испитиваним третманима (појединачним и комбинованим) са антимигранторним ефектима, па се може подвести под специфичност ове ћелијске линије, више него под ефекат конкретног третмана. Такође присуство FZD-7 рецептора у оквиру цитоплазме може сугерисати на повећану експресију, али и неактивност овог рецептор (Nishita и сар., 2010).

Литературни подаци показују да третмани ћелија карцинома комбинацијом два нецитотоксична биоактивна молекула могу довести до супресије миграције и редукције метастатског потенцијала ћелија канцера (Roomi и сар., 2005). С тим у вези, могу се и образложити наши резултати у којима Лиганд 1 као нецитотоксично једињење у комбинацији са екстрактом гљиве даје изразите антимигранторне ефекте.

## ЗАКЉУЧЦИ

На основу приказаних резултата, можемо извести следеће

### Опште закључке

- ❖ Хемијска једињења, у првом реду Pt(IV) комплекс 2, делују цитотоксично и проапоптотски на ћелијским линијама колоректалног карцинома (HCT-116 и SW-480). Аптоза као доминантан тип смрти у третману Pt(IV) комплексима, резултат је дисбаланса редокс статуса.
- ❖ Хемијска једињења, у првом реду Лиганд 1, показују антимигранторне ефекте, који су последица повећане експресије Е-кадхерина и релоцирања у међућелијске везе, стварања међућелијских контаката, као и редукције промигранторних маркера (нуклеарни  $\beta$ -катенин, Н-кадхерин, виментин и MMP-9) у ћелијским линијама колоректалног карцинома.
- ❖ Екстракти гљива, са посебним акцентом на врсту *P. linteus*, показују цитотоксичне и проапоптотске, ћелијски селективне ефекте. Екстракти гљива, *L. edodes* на HCT-116 ћелијама, односно *P. linteus* и *C. sinensis* на SW-480 ћелијама, индукују антимигранторни ефекат посредством повећања експресије Е-кадхерина и смањења нуклеарог  $\beta$ -катенина, Н-кадхерина, виментина и MMP-9.
- ❖ Екстаркти лишајева, са акцентом на врсту *P. furfuracea* показују цитотоксичне, проапоптотске и прооксидационе ефекте на ћелијским линијама колоректалног карцинома, што је резултат деловања специфичних хемијских једињења у екстракту. Метанолни екстракт *P. furfuracea* испољава антимигранторне ефекте, који су резултат повећања експресије Е-кадхерина и смањења промигранторних протеина. Екстракт *P. glauca* са антиоксидационим деловањем, испољава промигранторни ефекат на SW-480 ћелијама, смањујући експресију Е-кадхерина и цитоплазматског  $\beta$ -катенина и повећавајући нуклеарни  $\beta$ -катенин, што указује на нуклеарну прераспodelу  $\beta$ -катенина, појачану активацију Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута и активацију репресора експресије Е-кадхерина.
- ❖ Котретмани *P. linteus* са хемијским једињењима показују значајан цитотоксични и проапоптотски ефекат у односу на појединачне третмане. Најефикаснија цитотоксичност показана је применом комбинованог третмана *P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2, што указује на синергистичко деловање ових биоактивних супстанци.

- ❖ Котретмани показују ефикасније антимигранторно деловање у односу на појединачне третмане, а најефикаснији антимигранторни потенцијал показан је код КТ за *P. linteus* + Лиганд 1, уз значајно повећање експресије Е-кадхерина и смањење нуклеарог  $\beta$ -катенина, Н-кадхерина, виментина и ММП-9.
- ❖ Испитивани третмани хемијским супстанцама и екстрактима гљива и лишажјева испољавају ћелијски специфичне биолошке ефекте на НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

### Специфични закључци

- ❖ НСТ-116 ћелије су осетљивије на третмане екстрактима лишажјева и комбиноване третмане, у смислу цитотоксичних, проаптогичких, антимигранторних и прооксидационих ефеката третмана.
- ❖ SW-480 ћелије су генерално осетљивије на појединачне третмане хемијским једињењима и екстрактима гљива, у смислу цитотоксичних и проаптогичких ефеката.
- ❖ Третмани хемијским једињењима показују акутне цитотоксичне ефекте на МRC-5 здравим ћелијама, док се након продуженог третмана ћелије опорављају. Екстракти из биолошких извора и комбиновани третмани не показују значајне цитотоксичне ефекте на овој ћелијској линији, што потврђује антиканцерогено деловање испитиваних третмана.
- ❖ На основу протеинских маркера миграције у овим истраживањима, НСТ-116 ћелијска линија показује добру покретљивост и инвазивни потенцијал - нижа протеинска експресија антимигранторних маркера (Е-кадхерин, цитоплазматски  $\beta$ -катенин и Frizzled 7 рецептор), у односу на промигранторне маркере (нуклеарни  $\beta$ -катенин, Н-кадхерин, виментин, ММП-9). SW-480 ћелијска линија је слабије покретљива у односу на НСТ-116 ћелије, што је последица више експресије антимигранторних и ниже експресије промигранторних протеинских маркера.
- ❖ Сви испитивани третмани показују интензивније антимигранторне ефекте на НСТ-116 ћелијама, што је последица осетљивости на промене редокс статуса, у првом реду нивоа  $O_2^-$  који је у основи има антимигранторни ефекат.
- ❖ Антимигранторна својства испитиваних третмана мање зависе од типа третмана (хемијска једињења, природни екстракти), већ зависе од типа ћелијске линије.
- ❖ Сви третмани са антимигранторним ефектима доводе до повећања антимигранторних епителних протеин маркера (Е-кадхерина) и редукције експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина и мезенхимских маркера (Н-кадхерина, виментина и ММП-9) на обе ћелијске линије.
- ❖ Нуклеарни  $\beta$ -катенин, у овим третманима, стоји у основи регулације експресије промигранторних / антимигранторних маркера преко регулације Wnt/ $\beta$ -катенин и осталих сигналних путева укључених у регулацију ћелијског кретања.

- ❖ Промене параметара редокс статуса, у смислу повећања концентрације  $O_2^-$  у третманима екстрактима из природних извора, могу се сматрати одговорним за антимигранторни ефекат испитиваних третмана. Са друге стране, значајно нарушавање редокс статуса и индукција оксидационог стреса, могу се повезати са цитотоксичним ефектима испитиваних третмана.

### ***Коначан закључак***

На основу изнетих резултата, може се закључити да новосинтетисани Pt(IV) комплекси имају побољшана својства у виду цитотоксичних, проапототских и антимигранторних/антиинвазивних ефеката у односу на широко коришћени лек цисплатину. Извори биоактивних супстанци коришћени у традиционалној медицини са подручја на коме примарно расту (испитиване врсте лишајева) показују значајно боље биолошке ефекте у односу на комерцијално добијене врсте (испитиване врсте гљива). Комбиновани третмани Pt(IV) комплекса са природним биоактивним супстанцама дају обећавајуће резултате на ћелијама колоректалног карцинома. Обзиром на ћелијски специфичне одговоре добијене у овом истраживању, увођење у терапију и примена контролисаних доза одређених суплемената исхрани, води ка остваривању бољих антитуморских ефеката код мигранторних и инвазивних форми колоректалног карцинома.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81(2): 214-218.
2. Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 715–720.
3. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 390–397.
4. Akiyama T Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11(4): 273-282.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th Ed. Garland Science, New York, 2008.
6. Allen DD, Caviedes R, Cardenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm* 2005; 31(8): 757-768.
7. Altobelli E, Lattanzi A, Paduano R, Varassi G, di Orio F. Colorectal cancer prevention in Europe: burden of disease and status of screening programs. *Prev Med* 2014; 62: 132-141.
8. al-Tweigeri T, Nabholtz JM, Mackey JR. Ocular toxicity and cancer chemotherapy. *Cancer* 1996; 78(7): 1359-1373.
9. Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, Neto VM, Abreu JG. Flavonoids: Potential Wnt/ $\beta$ -catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci* 2011; 89: 545–554.
10. Amado NG, Fonseca BF, Cerqueira DM, Reis AH, Simas AB, Kuster RM, Mendes FA, Abreu JG. Effects of natural compounds on xenopus embryogenesis: A potential read out for functional drug discovery targeting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Curr Top Med Chem* 2012; 12: 2103–2113.
11. Amawi H, Ashby Jr CR, Samuel T, Peraman R, Tiwari AK. Polyphenolic nutrients in cancer chemoprevention and metastasis: role of the epithelial-to-mesenchymal (EMT) pathway. *Nutrients* 2017; 9: 911.
12. Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennett WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(15): 8823-8828.
13. Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25(9): 2097–2116.
14. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 11-26.
15. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70(2): 200-214.
16. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. RA Greenwald (eds), CRC Press, Inc: Boca Raton, 1985. pp 122-132.

17. Bačkorová M, Jendželovský R, Kello M, Bačkor M, Mikeš J, Fedoročko P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(3): 462-468.
18. Bai X, Yu B, Du J, Yuan S, Zuo F, Sun L. Effects of lobaplatin and oxaliplatin on biological behavior of colorectal carcinoma cell line. *JCO Clin Cancer Inform.* 2010; 9 (1): 36–39.
19. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990; 190: 360-365.
20. Baribeau S, Chaudhry P, Parent S, Asselin É. Resveratrol inhibits cisplatin-induced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines. *PLoS ONE* 2014; 9: e86987.
21. Baritaki S, Huerta-Yepes S, Sahakyan A, Karagiannides I, Bakirtzi K, Jazirehi AR, Bonavida B. Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer Inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP. *Cell Cycle* 2010; 9/24: 4931-4940.
22. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005; 132(14): 3151-3161.
23. Baskic D, Popovic S, Ristic P, Arsenijevic NN. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int* 2006; 30: 924–932.
24. Bates RC, Mercurio A. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005; 4/4: 371-376.
25. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with  $\beta$ -catenin, APC, and GSK3 $\beta$ . *Science* 1998; 280: 596–599.
26. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-744.
27. Berndtsson M, Hägg M, Panaretakis T, Havelka AM, Shoshan MC, Linder S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer* 2007; 120(1): 175-180.
28. Bézin C, Tomasi S, Rouaud I, Delcros JG, J Boustie J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute*. *Planta Med* 2004; 70(9): 874-877.
29. Bilovitz BO, Mayrhofer HA. Contribution to the lichenized fungi of Serbia. *Sauteria* 2008; 15: 79-94.
30. Blaschuk OW. N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370 (1661): 20140039.
31. Bonavida B, Baritaki S. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: downregulation of the NF- $\kappa$ B/Snail/YY1/ RKIP circuitry. *Nitric Oxide* 2011; 24: 1–7.
32. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10(6): 1663-1682.
33. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000; 321(7264): 805-808.
34. Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol* 2009; 217(2): 307-317.
35. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T.

Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(18): 10356-10361.

36. Bracke ME, Charlier C, Bruyneel EA, Labit C, Mareel MM, Castronovo V. Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. *Cancer Res* 1994; T54T: 4607-4609.

37. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 7846–7854.

38. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(3): 231-237.

39. Buda A, Pignatelli M. E-Cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. *Cell Commun Adhes* 2011; 18(6): 133-143.

40. Buhrmann C, Kraehe P, Lueders C, Shayan P, Goel A, Shakibaei M. Curcumin suppresses crosstalk between colon cancer stem cells and stromal fibroblasts in the tumor microenvironment: potential role of EMT. *PLOS ONE* 2014; 9(9): e107514.

41. Burger F, Fiebig HH. Preclinical screening for new anticancer agents. In: Figg W, McLeod HL (eds) *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Springer, New York, 2004

42. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 2015; 211(8): 557–569.

43. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 15-25

44. Carretero J, Obrador E, Esteve JM, Ortega A, Pellicer JA, Sempere FV, Estrela JIM. Tumoricidal activity of endothelial cells inhibition of endothelial nitric oxide production abrogates tumor cytotoxicity induced by hepatic sinusoidal endothelium in response to B16 melanoma adhesion in vitro. *J Biol Chem* 2001; 276: 25775-25782.

45. Celià-Terrassa T, Meca-Cortés O, Mateo F, Martínez de Paz A, Rubio N, Arnal-Estapé A, Ell BJ, Bermudo R, Díaz A, Guerra-Rebollo M, Lozano JJ, Estarás C, Ulloa C, Álvarez-Simón D, Milà J, Vilella R, Paciucci R, Martínez-Balbás M, de Herreros AG, Gomis RR, Kang Y, Blanco J, Fernández PL, Thomson TM. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells. *J Clin Invest* 2012; 122(5): 1849-1868.

46. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Jose M, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 3-18.

47. Chen HC. Boyden Chamber Assay. *Methods Mol Biol* 2005; 294: 15-22.

48. Chen JS, Huang XH, Wang Q, Huang JQ, Zhang LJ, Chen XL, Lei J, Cheng ZX. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer. *Carcinogen* 2013; 34: 10–19.

49. Chen X, Yeung TK, Wang Z. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277(3): 757-763.

50. Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels S, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* 2007; 120: 4155–4166.



51. Chen Y, Rao X, Huang K, Jiang X, Wang H, Teng L. FH535 inhibits proliferation and motility of colon cancer cells by targeting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J Cancer* 2017; 8(16): 3142-3153.
52. Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol Ther* 2010; 18: 1650–1656.
53. Cheung LM, Cheung PCK, Ooi VEC. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chem* 2003; 81: 249-255.
54. Chin CF, Tian Q, Setyawati MI, Fang W, Tan ESQ, Leong DT, Ang WH. Tuning the activity of platinum(IV) anticancer complexes through asymmetric. *J Med Chem* 2012; 55(17): 7571-7582.
55. Choy H, Park C, Yao M. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1633-1638.
56. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(17): 8319-8326.
57. Chu Q, Ling MT, Feng H, Cheung HW, Tsao SW, Wang X, Wong YC. A novel anticancer effect of garlic derivatives: inhibition of cancer cell invasion through restoration of E-cadherin expression. *Carcinogen* 2006; 27(11): 2180–2189.
58. Clark AG, Matic Vignjevic D. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 36: 13-22.
59. Clarke EJ, Allan V. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr Biol* 2002; 12: 596–599.
60. Colombo V, Lupi M, Falchetta F, Forestieri D, D'Incalci M, Ubezio P. Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells. *Cancer Chemoth Pharm* 2011; 67: 369–379.
61. Conidi A, van den Berghe V, Huylebroeck D. Aptamers and their potential to selectively target aspects of EGF, Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ -Smad family signaling. *Int J Mol* 2013; 14: 6690-6719.
62. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2): 72-79.
63. Cvetković DM, Živanović MN, Milutinović MG, Djukić TR, Radović MD, Cvetković AM, Filipović ND, Zdravković ND. Real-time monitoring of cytotoxic effects of electroporation on breast and colon cancer cell lines. *Bioelectrochemistry* 2017; 113: 85-94.
64. Cvetković DM. Uloga molekularnih markera neoangiogeneze kao tumor markra u individualizaciji terapije pecijenata sa karcinomom dojke. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2017.
65. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Banković DD, Cvetković DM, Đačić DS, Marković SD. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 2521-2534.
66. Ćurčić MG. Molekularni mehanizmi apoptoze u ćelijama karcinoma kolona nakon in vitro tretmana ekstraktima lekovitih biljaka. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2014.
67. DanJuan J, YanTian F, Zhengyang L, Zongyou C, Jianbin X. Epithelial-mesenchymal transition-associated microRNAs in colorectal cancer and drug-targeted therapies. *Oncol Per* 2015; 33: 515-525.
68. Das A, Monteiro M, Barai A, Kumar S, Sen S. MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. *Sci Rep* 2017; 7: 14219

69. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, Delrio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2015; 34(3): 1087-1096.
70. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Druginduced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012; 2012: 645460
71. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42: 317–325.
72. Dihlmann S, Klein S, Doeberitz MK. Reduction of  $\beta$ -Catenin/T-Cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated  $\beta$ -catenin. *Mol Cancer Ther* 2003; 2(6): 509-516.
73. Ding Z, Xu F, Tang J, Li G, Jiang P, Tang Z, Wu H. Phycion 8-O- $\beta$ -glucopyranoside prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer HCT116 cells by modulating EMMPRIN. *Neoplasma* 2016; 63: 351–361.
74. Dong W, Shen R, Wang Q, Gao Y, Qi X, Jiang H, Yao J, Lin X, Wu Y, Wang L. Sp1 upregulates expression of TRF2 and TRF2 inhibition reduces tumorigenesis in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(22): 2166-2174.
75. Dotan N, Wasser SP, Mahajna J. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. *Integr Cancer Ther* 2011; 10(2): 148-159.
76. Drake JM, Strohbehn G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 2207–2217.
77. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005; 123(5): 903-915.
78. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
79. Dumitriua BG, Olariua L, Enea MD, Rosoiub N. TGF- $\beta$  modulation by natural active compounds from *S. officinalis* and *C. officinalis*. *Roman Biotech Lett* 2013; 18(3): 8284- 8294.
80. Dumitru R, Navarathna DH, Semighini CP, Elowsky CG, Dumitru RV, Dignard D, Whiteway M, Atkin AL. In vivo and in vitro anaerobic mating in *Candida albicans*. Nickerson KW. *Eukaryot Cell* 2007; 6(3): 465-472.
81. Dunlop MG, Farrington SM, Nicholl I, Aaltonen L, Petersen G, Porteous M, Carothers A. Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations. *Br J Cancer* 2000; 83/12: 1643–1645.
82. Đorđević NZ, Babić GM, Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclamsia in women. *Rep Toxicol* 2008; 25: 213-218.
83. Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, Ward CM Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* 2007; 67(23): 11254-11262.
84. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA* 2010; 16(11): 2043-2050.
85. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* 2000; 113: 2455–2462.
86. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in

breast cancer cells. *Oncogene* 2005; 24: 2375–2385.

87. Eisenmann DM. TCeR. Community. Wnt signaling. *Wormbook*; 2005.

88. El-Bahrawy M, Poulson R, Rowan AJ, Tomlinson IT, Alison MR. Characterization of the E-cadherin/catenin complex in colorectal carcinoma cell lines. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 65–74.

89. Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005; 308(5725): 1181–1184.

90. Fang, J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxy stress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007; 15(7-8): 475–486.

91. Fayad W, Brnjic S, Berglind D, Blixt S, Shoshan MC, Berndtsson M, Olofsson MH, Linder S. Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model. *Int J Cancer* 2009; 125: 2450–2455.

92. Ferdinandy P. Peroxynitrite: just an oxidative/nitrosative stressor or a physiological regulator as well? *Br J Pharmacol* 2006; 148: 1–3.

93. Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: a review. *J Funct Foods* 2016; 25: 511–522.

94. Fini MA, Orchard-Webb D, Kosmider B, Amon JD, Kelland R, Shibao G, Wright RM. Migratory activity of human breast cancer cells is modulated by differential expression of xanthine oxidoreductase. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1008–1026.

95. Freshney IR. *Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique*. Alan R. Liss, New York, 1983, 293 pp.

96. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188(1): 11–19.

97. Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J BiolChem* 2004; 279: 6209–6212.

98. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 345–382.

99. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 521–534.

100. Fulda S, Debatin KM. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene* 2004; 23(40): 6702–6711.

101. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 2002; 177(1): 91–104.

102. Galmarini CM, D'Incalci M, Allavena P. Trabectedin and plitidepsin: drugs from the sea that strike the tumor microenvironment. *Mar Drugs* 2014; 12: 719–733.

103. Ganesaratnam K, Balendiran, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Function* 2004; 2(6): 343–352.

104. Gao Q, Yuan Y, Gan HZ, Peng Q. Resveratrol inhibits the hedgehog signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition and suppresses gastric cancer invasion and metastasis. *Oncol Lett* 2015; 9: 2381–2387.

105. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1205–1218.
106. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005; 129: 626–638.
107. Griess P. Bemerkungen Zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt Uebereinige Azoverbindungen. *Ber Dtsch Chem Ges* 1879; 12: 426-428.
108. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10): 922-35
109. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5(5): 402-418.
110. Gulbake A, Jain A, Jain A, Jain A, Jain SK. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 582–599.
111. Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(8): 622-634.
112. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011; 146: 633–644.
113. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679-695.
114. Gupton SL, Gertler FB. Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE* 2007; 2007(400): re5
115. Gurzu S, Turdean S, Kovecsi A, Contac AO, Jung I. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin Cases* 2015; 3: 393–404.
116. Guyton AC. *Medicinska fiziologija. Savremena administracija, Medicinska knjiga, Beograd, 2003.*
117. Hagan S, Orr MCM, Doyle B. Targeted therapies in colorectal cancer-an integrative view by PPPM. *EPMA Journal* 2013; 4: 3-7.
118. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1613–1618.
119. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine. 4rd ed. New York: Oxford Univerity Press Inc. 2006.*
120. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Int Immunopharmacol* 1999; 41: 157–164.
121. Han YT, Chen XH, Gao H, Ye JL, Wang CB. Phycion inhibits the metastatic potential of human colorectal cancer SW620 cells in vitro by suppressing the transcription factor SOX2. *Acta Pharmacol Sin* 2016; 37(2): 264–275.
122. Harrison MA, Rae IF. *General Techniques of Cell Culture. Cambridge University Press, Cambridge, US, 1997.*
123. Hassen S, Ali AA, Kilaparty SP, Al-Anbaky QA, Majeed W, Boman BM, Fields JZ, Ali N. Interdependence of DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 in apoptosis in human colorectal carcinoma cell lines. *Mol Cell Biochem* 2016; 412(1-2): 297-305.
124. Helfand BT, Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of

cellular architecture. *J Cell Sci* 2004; 117: 133–141.

125. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates  $\beta$ -catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000; 2(9): 653–660.

126. Henslee EA, Torcal Serrano RM, Labeed FH, Jabr RI, Fry CH, Hughes MP, Hoettges KF. Accurate quantification of apoptosis progression and toxicity using a dielectrophoretic approach. *Analyst* 2016; 141: 6408–6415.

127. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, el-Deirly W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 38610–38618.

128. Hoffman DL, Brookes PS. Oxygen sensitivity of mitochondrial reactive oxygen species generation depends on metabolic conditions. *J Biol Chem* 2009; 284: 16236–16245.

129. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker JC. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 2005; 87: 307–314.

130. Hosono S, Gross I, English MA, Hajra KM, Fearon ER, Licht JD. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 10943–10953.

131. Hostanska K, Jürgenliemk G, Abel G, Nahrstedt A, Saller R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detect Prev* 2007; 31(2): 129–139.

132. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)* 2014; 6(3): 1769–1792.

133. Howells LM, Neal CP, Brown MC, Berry DP, Manson MM. Indole-3-carbinol enhances anti-proliferative, and anti-invasive effects of oxaliplatin in colorectal cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1774–1782.

134. Hsieh TC, Wu JM. Targeting CWR22Rv1 prostate cancer cell proliferation and gene expression by combinations of the phytochemicals EGCG, genistein and quercetin. *Anticancer Res* 2009; 29: 4025–4032.

135. Huang J, Li H, Ren G. Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer. *Int J Oncol* 2015; 47: 840–848.

136. Huang MH, Huang YM, Wu SN. The inhibition by oxaliplatin, a platinum-based anti-neoplastic agent, of the activity of intermediate-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels in human glioma cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37: 1390–1406.

137. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997; 90(5): 871–882.

138. Hyslop PA, Hinshaw DB, Scraufstatter IU, Cochrane CG, Kunz S, Vosbeck K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 31–37.

139. Ignarro LJ. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Biosci Rep* 1999; 19(2): 51–71.

140. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 277–288.

141. Ilyas M, Straub J, Tomlinson IP, Bodmer WF. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* 1999; 35(14): 1986–2002.

142. Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF.  $\beta$ -Catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10330–10334.
143. Imesch P, Goerens A, Fink D, Fedier A. MLH1-deficient HCT116 colon tumor cells exhibit resistance to the cytostatic and cytotoxic effect of the poly(A) polymerase inhibitor cordycepin (3'-deoxyadenosine) in vitro. *Oncol Lett* 2012; 3(2): 441–444.
144. Issa AY, Volate SR, Muga SJ, Nitcheva D, Smith T, War-govich MJ. Green tea selectively targets initial stages of intestinalcarcinogenesis in the AOM-ApcMin mouse model. *Carcinogenesis* 2007; 28(9): 1978-1984.
145. Janković S. Klinčka farmakologija. Medicinski fakultet, Kragujevac, 2003.
146. Jankowski JA, Bedford FK, Kim YS. Changes in gene structure and regulation of E-cadherin during epithelial development, differentiation and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1997; 57: 187-215.
147. Jeon JH, Kim DK, Shin Y, Kim HY, Song B, Lee EY, Kim JK, You HJ, Cheong H, Shin DH, Kim ST, Cheong JH, Kim YS, Jang IH. Migration and invasion of drug-resistant lung adenocarcinoma cells are dependent on mitochondrial activity. *Exp Mol Med* 2016; 48: e277
148. Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, Jiang H, Ren J, Cai J, Li Q. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer* 2015; 15: 97.
149. Jiang C, Pecha J, Hoshino I, Ankrapp D, Xiao, H. TIP30 mutant derived from hepatocellular carcinoma specimens promotes growth of HepG2 cells through up-regulation of N-cadherin. *Cancer Res* 2007; 67: 3574-3582.
150. Jiang YG, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T, Li MC, Lin YH. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Int J Urol* 2007; 14(11): 1034-1039.
151. Jiao L, Li DD, Yang CL, Peng RQ, Guo YQ, Zhang XS, Zhu XF. Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelialmesenchymal transition and invasive potential in colon cancer. *Tumour Biol* 2016; 37: 8413-8423.
152. Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol* 2017; 11(7): 755–769.
153. Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, Yang GY, Liu YY, Hou Z, Lin Y, Ma J, Shih WJ, Carothers AM, Yang CS. Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10623-10631.
154. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous Polyposis Coli (APC) differentially regulates  $\beta$ -Catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281(26): 17751–17757.
155. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.
156. Kamilya D, Ghosh D, Bandyopadhyay S, Mal BC, Maiti TK. In vitro effects of bovine lactoferrin, mushroom glucan and Abrus agglutinin on Indian major carp, catla (*Catla catla*) head kidney leukocytes. *Aquacul* 2006; 253: 130-139.
157. Kang YJ, Park HJ, Chung HJ, Min HY, Park EJ, Lee MA, Shin Y, Lee SK. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling mediates the antitumor activity of magnolol in colorectal cancer cells. *Mol Pharmacol* 2012; 82(2): 168-177.

158. Kato J. Influence of (1-3)- $\beta$ -D-glucans and antifungal agents on the chemoluminescence response of human polymorphonuclear leucocytes. *Jpn J Chemother* 1999; 47: 152–160.
159. Kaur M, Velmurugan B, Tyagi A, Agarwal C, Singh RP, Agarwal R. Silibinin suppresses growth of human colorectal carcinoma SW480 cells in culture and xenograft through down-regulation of  $\beta$ -catenin-dependent signaling. *Neoplasia* 2010; 12: 415–424.
160. Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Radiation induces epithelialmesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 2012; 27: 51-57.
161. Kawauchi T. Cell adhesion and its endocytic regulation in cell migration during neural development and cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 2012; 13(4): 4564-4590.
162. Khokhar AR, al-Baker S, Siddik ZH. Chemical and biological studies on a series of novel (trans-(1R,2R)-, trans-(1S,2S)-, and cis-1,2-Diaminocyclohexane)platinum(IV) carboxylate complexes. *J Med Chem* 1997; 40(1): 112–116.
163. Kim D, Mollah ML, Kim K. Induction of apoptosis of SW480 human colon cancer cells by (-)-epicatechin isolated from *bulnesia sarmienti*. *Anticanc Resear* 2012; 32(12): 5353-5361.
164. Kim M, Lee HC, Tsedensodnom O, Hartley R, Lim YS, Yu E, Merle P, Wands JR. Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol* 2008; 48: 780–791.
165. Kim S. Anti-tumor effects of mesima EX in various types of cancer patients. *Cancer Res Treat* 1991; 23(2): 211-217.
166. Kinga TD, Zhangb W, Sutoa MJ, Lia Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal* 2012; 24(4): 846–851.
167. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998; 280(5366): 1036-1037.
168. Koepke J, Dresel M, Schmid S, Greulich T, Beutel B, Schmeck B, Vogelmeier CF, Janciauskiene S, Koczulla AR. Therapy with plasma purified alpha1-antitrypsin (Prolastin®) induces time-dependent changes in plasma levels of MMP-9 and MPO. *PLoSOne* 2015; 10(1): e0117497.
169. Kojima-Yuasa A, Huang X, Matsui-Yuasa I. Synergistic anticancer activities of natural substances in human hepatocellular carcinoma. *Diseases* 2015; 3: 260-281.
170. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a  $\beta$ -catenin-Tcf complex in APC $^{-/-}$  colon carcinoma. *Science (Wash. DC)* 1997; 275: 1784 –1787.
171. Kosanić M, Manojlović N, Janković S, Stanojković T, Ranković B. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Chem Toxicol* 2013; 53: 112-118.
172. Kosanić M, Ranković B. Lichen as possible sources of antioxidants. *Pak J Pharm Sci* 2011; 24: 165-170.
173. Kosanić MM, Seklić DS, Marković SD, Ranković BR. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia. *Dig J Nanomater Biostruct* 2014; 9(1): 273-287.
174. Kranner I, Grill D. Desiccation of lichens: changes in the glutathione status. In: Cram WJ, De Kok LJ, Stulen I, Brunold C, Rennenberg H (eds) *Sulphur Metabolism in Higher Plants*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 1997. pp. 253-255.
175. Kraus C, Liehr T, Hülsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG. Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor

development. *Genomics* 1994; 23 (1): 272–274.

176. Kraus S, Vay C, Baldus S, Knoefel WT, Stoecklein NH, Vallbohmer D. Expression of wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family pathway effectors in lymphatic and hepatic metastases of patients with colorectal cancer: Associations with the primary tumor. *Oncol Lett* 2015; 10: 863–868.

177. Kriehoff E, Behrens J, Mayr BJ. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *Cell Sci* 2006; 119(7): 1453-1463.

178. Kundu N, Zhang S, Fulton AM. Sublethal oxidative stress inhibits tumor cell adhesion and enhances experimental metastasis of murine mammary carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13: 16-22.

179. Kwak JM, Min BW, Lee JH, Choi JS, Lee SI, Park SS, Kim J, Um JW, Kim SH, Moon HY. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(11): 1873–1880.

180. La Rocca G, Badin M, Shi B, Xu SQ, Deangelis T, Sepp-Lorenzino L, Baserga R. Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-1 receptor signaling pathway. *J Cell Physiol* 2009; 220: 485–491.

181. Larsson A, Wilhelmsson U, Pekna M, Pekny M. Increased cell proliferation and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of old GFAP(–/–)Vim(–/–) mice. *Neurochem Res* 2004; 29: 2069–2073.

182. Lazarova DL, Bordonaro M. Vimentin, colon cancer progression and resistance to butyrate and other HDACis. *J Cell Mol Med* 2016; 20(6): 989-993.

183. Lazić MJ, Vučićević L, Grgurić-Šipka S, Janjetović K, Kaluđerović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *Chem Med Chem*. 2010; 881.

184. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973–981.

185. Lee SH, Jaganath IB, Wang SM, Sekaran SD. Antimetastatic effects of phyllanthus on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *PLoS ONE* 2011; 6: e20994.

186. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643.

187. Lennox KA, Behlke MA. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther* 2011; 18: 1111–1120.

188. Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A. Jagged 1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 2007; 204: 2935–2948.

189. Lepourcelet M, Chen YN, France DS, Wang H, Crews P, Petersen F, Bruseo C, Wood AW, Shivdasani RA. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* 2004; 5(1): 91-102.

190. Levi FG, Metzger GC, Massari CG, Milano G. Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 1–21.

191. Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JI, Na MK, Kim HC, Hong ND, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2004; 216(2): 175-181.



192. Li SWV, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck JRA, Maurice MM, Mahmoud T, Clevers H. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -Catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cel*, 2012; 149(6): 1245-1256.
193. Li J, He X, Zou Y, Chen D, Yang L, Rao J, Chen H, Michael Chan MCW, Li L, Guo Z, Zhang LW, Chen C. Mitochondria-targeted platinum(II) complexes: dual inhibitory activities on tumor cell proliferation and migration/invasion via intracellular trafficking of  $\beta$ -catenin. *Metallomics* 2017; 9, 726-733.
194. Lin CH, Shen YA, Hung PH, Yu YB, Chen YJ. Epigallocatechin gallate, polyphenol present in green tea, inhibits stem-like characteristics and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal cancer cell lines. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 201.
195. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2(3): 285–299.
196. Liochev SI, Fridovich I. The role of  $O_2^-$  in the production of HO $\cdot$ : in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994; 16(1): 29-33.
197. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44(5): 479-496.
198. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108(6): 837–847.
199. Liu L, Taverna P, Whitacre CM, Chatterjee S, Gerson SL. Pharmacologic disruption of base excision repair sensitizes mismatch repair-deficient and -proficient colon cancer cells to methylating agents. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10): 2908-2917.
200. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 2009; 1(6-7): 303-314.
201. Lu M, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Ben-Jacob E. MicroRNA-based regulation of epithelial-hybrid-mesenchymal fate determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 18144–18149.
202. Luanpitpong S, Jo Talbott S, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, Wang L, Chanvorachote P. Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *J Biol Chem* 2010; 285(50): 38832-38840.
203. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, Marra M, Lugini L, Logozzi M, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Parmiani G, Arancia G, Belardelli F, Fais S. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(22): 1702-1713.
204. Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, Roat E, Prada N, Nasi M, Pinti M, Cooper EL, Cossarizza A. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry Part A* 2005; 68(1): 28–35.
205. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases". *Developmental Cell* 2009; 17(1): 9–26.
206. MacDonald BT, He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(12). pii: a007880.
207. Maeda M, Johnson E, Mandal SH, Lawson KR, Keim SA, Svoboda RA, Caplan S, Wahl JK, 3rd, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of inappropriate cadherins by epithelial tumor cells promotes endocytosis and degradation of E-cadherin via competition for p120(ctn). *Oncogene* 2006; 25: 4595-4604.

208. Mahmood MQ, Walters EH, Shukla SD, Weston S, Muller HK, Ward C, Sohal SS.  $\beta$ -catenin, Twist and Snail: Transcriptional regulation of EMT in smokers and COPD, and relation to airflow obstruction. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10832.
209. Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 2006; 11: 1696–1701.
210. Malhotra S, Subban R, A Singh A. Lichens- role in traditional medicine and drug discovery *Internet J Alternative Med* 2007; 5: 2-4.
211. Marković SD, Đačić DS, Cvetkovic DM, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute in vivo cisplatin and selenium treatment on hematologica and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biol Trace Elem Res* 2011; 142: 660-670.
212. Marković SD, Đorđević NZ, Ćurčić MG, Štajn AŠ, Spasić MB. Biotransformation and nitroglycerin-induced effects on antioxidative defense system in rat erythrocytes and reticulocytes. *Gen Physiol Biophys* 2014; 33(4): 393-401.
213. Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Spasić MB. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol Res* 2006; 55: 389-396.
214. Marković SD, Vukajlović MD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Jones DR, Spasić MB. A comparative study of the effects of molsidomine and 3-morpholinopyridone on redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 251-258.
215. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449–2460.
216. Martin ES, Tonon G, Sinha R, Xiao Y, Feng B, Kimmelman AC, Protopopov A, Ivanova E, Brennan C, Montgomery K, Kucherlapati R, Bailey G, Redston M, Chin L, DePinho RA. Common and distinct genomic events in sporadic colorectal cancer and diverse cancer types. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10736-10743.
217. Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. *J Appl Toxicol* 2008; 28(3): 337-344.
218. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(6): 446-454.
219. Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; 168: (934): 939-949.
220. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007; 26(22): 3113-3121.
221. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-760.
222. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 2010; 24(6): 1838-1851.
223. Meyer AS, Heinonen M, Frankel EN. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry* 1998; 61: 71-75.
224. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 117–134.
225. Milić A, Damjanović I. Primena steroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji karcinoma kolona. *Racionalna Terapija* 2013; V(1): 17-20.

226. Millar AL, Pal T, Madlensky L, Sherman C, Temple L, Mitri A, Cheng H, Marcus V, Gallinger S, Redston M, Bapat B, Narod S. Mismatch repair gene defects contribute to the genetic basis of double primary cancers of the colorectum and endometrium. *Hum Mol Genet* 1999; 8(5): 823-829.
227. Milutinovic M, Stankovic M, Cvetkovic D, Maksimovic V, Smit B, Pavlovic R, Markovic S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with newly synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *J Food Biochem* 2015; 39: 238–250.
228. Miše BP, Telesmanić VD, Tomić S, Šundov D, Čapkun V, Vrdoljak E. Correlation between E-cadherin immunoexpression and efficacy of first line platinum-based chemotherapy in advanced high grade serous ovarian cancer. *Pathol Oncol Res* 2015; 21(2):347-56.
229. Mitchell E, Sullivan F. A descriptive feast but an evaluative famine: systematic review of published articles on primary care computing during 1980–97. *BMJ* 2001; 322: 279–282.
230. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Radulović N, Mladenović M, Stanković M, Topuzović M, Radojević I, Stefanović O, Vasić S, Čomić LJ. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI J* 2014; 13: 938-953.
231. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Comić Lj, Djacić D, Curčić M, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5428-5448.
232. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, et al. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5428-5448.
233. Molnár K, Farkas E. Source current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Z Naturforsch C* 2010; 65(3-4): 157-173.
234. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296(5573): 1644-1646.
235. Morré DJ, Chueh PJ, Morré DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 1831–1835.
236. Broxmeyer HE, Mor-Vaknin N, Kappes F, Legendre M, Saha AK, Ou X, O'Leary H, Capitano M, Cooper S, Markovitz DM Concise review: role of DEK in stem/progenitor cell biology. *Stem Cells*. 2013; 31(8): 1447-1453.
237. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
238. Mu Y, Gudey SK, Landström M. Non-SMAD signaling pathways. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 11–20.
239. Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 2008; 269: 315–325.
240. Najdi R, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *J Carcinog* 2011; 10: 5.
241. Narayan S. Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *J Mol Histol* 2004; 35(3): 301-307.
242. Nautiyal J, Kanwar SS, Yu Y, Adhip PN. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal* 2011; 6: 7.

243. Nawrocki-Raby B, Gilles C, Polette M, Martinella-Catusse C, Bonnet N, Puchelle E, Foidart JM, Van Roy F, Birembaut P. E-Cadherin mediates MMP down-regulation in highly invasive bronchial tumor cells. *Am J Pathol* 2003; 163(2): 653-661.
244. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85(1): 1-31.
245. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients* 2016; 8: 552.
246. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016; 166(1): 21-45.
247. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008; 266: 53-59.
248. Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, Qiao S, Takada S, Kikuchi A, Minami Y. Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* 2010 30: 3610–3619.
249. Nomura H, Isshiki Y, Sakuda K, Sakuma K, Kondo S. Effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *Legionella pneumophila*. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 833–837.
250. Nor Aini AS, Merrina A, Stanslas J, Sreeramanan S. Cytotoxic potential on breast cancer cells using selected forest species found in Malaysia. *Int J Cancer Manag* 2008; 4: 103-109.
251. Novellasdemunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the theme: Cell signaling: proteins, pathways and mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 309(8): C511-521.
252. Oak MH, Bedoui JE, Schini-Kerth VB. Anti-angiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 1-8.
253. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123): 106-110.
254. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano HA. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005; 1: 2005.0010.
255. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 2007; 26: 1862-1874.
256. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1286–1292.
257. Orner GA, Dashwood WM, Blum CA, Diaz GD, Li Q, Al-Fageeh M, Tebbutt N, Heath JK, Ernst M, Dashwood RH. Response of Apc(min) and A33 (delta N beta-cat) mutant mice totreatment with tea, sulindac, and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat Res* 2002; 506-507: 121-127.
258. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivitovski B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 913–922.
259. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007; 96: 2181–2196.
260. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1): 315-424.
261. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221–233.

262. Pallardó FV, Markovic J, Garcia JL, Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 77–85.
263. Pan MM, Zhang MH, Ni HF, Chen JF, Xu M, Phillips AO, Liu BC. Inhibition of TGF- $\beta$ 1/Smad signal pathway is involved in the effect of Cordyceps sinensis against renal fibrosis in 5/6 nephrectomy rats. *Food Chem Toxicol* 2013; 58: 487-494.
264. Park CH, Hahm ER, Lee JH, Jung KC, Rhee HS, Yang CH. Ionomycin downregulates beta-catenin/Tcf signaling in coloncancer cell line. *Carcinogenesis* 2005; 26(11): 1929-1933.
265. Park HJ, Park JB, Lee SJ, Song M. Phellinus linteus grown on germinated brown rice increases cetuximab sensitivity of KRAS-mutated colon cancer. *Int J Mol Sci* 2017; 18(8):pii: E1746
266. Park CH, Hahm ER, Park S, Kim HK, Yang CH. The inhibitory mechanism of curcumin and its derivative against beta-catenin/Tcf signaling. *FEBS Lett* 2005; 579(13): 2965-2971.
267. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell* 2016; 27(21): 3233-3244.
268. Phillips S, Prat A, Sedic M, Proia T, Wronski A, Mazumdar S, Skibinski A, Shirley SH, Perou CM, Gill G, Gupta PB, Kuperwasser C. Cell-state transitions regulated by SLUG are critical for tissue regeneration and tumor initiation. *Stem Cell Reports* 2014; 2: 633–647.
269. Pichler V, Göschl S, Schreiber-Brynzak E, Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Influence of reducing agents on the cytotoxic activity of platinum(IV) complexes: induction of G2/M arrest, apoptosis and oxidative stress in A2780 and cisplatin resistant A2780cis cell lines. *Metallomics* 2015; 7(7): 1078-1090.
270. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. An LDLreceptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 2000; 407: 535–538.
271. Pirker KF, Reichenauer TG, Goodman BA, Stolze K. Identification of oxidative processes during simulated mastication of uncooked foods using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2004; 520: 69–77.
272. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74.
273. Ponz de LM, Di GC. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001; 33(4): 372-388.
274. Quante M, Varga J, Wang TC, Greten FR. The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology* 2013; 145(1): 63–78.
275. Razon E, Najajreh Y, Salem R, Khamaisie H, Ruthardt M, Mahajna J. Platinum (IV)-fatty acid conjugates overcome inherently and acquired Cisplatin resistant cancer cell lines: an in-vitro study. *BMC Cancer* 2016; 16: 140.
276. Redondo-Blanco S, Fernández J, Gutiérrez-del-Río I, Villar CJ, Lombó F. New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds. *Front Pharmacol* 2017; 8: 109.
277. Rejhová A, Opatková A, Čumová A, Slíva D, Vodička P. Natural compounds and combination therapy in colorectal cancer treatment. *Eur J Med Chem* 2018; 20(144): 582-594.
278. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003; 23: 519-534.
279. Renard CMCG, Baron A, Guyot S, Drilleau JF. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *Int J Biol Macromol* 2001; 29: 115–125.
280. Reynolds AB. p120-catenin: past and present. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 2-7.

281. Rho YS, Lee KT, Jung JC, Yoon C, An Z, Hoffman RM, Chang SG. Efficacy of new platinum analog DPPE in anorthotopic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 157-161.
282. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6): 345-355.
283. Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol* 2011; 740: 103-114.
284. Rodrigues AS, Dinis J, Gromicho M, Martins C, Laires A, Rueff J. Genomics and cancer drug resistance. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13: 651-673.
285. Roomi MW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath MA. Antitumor effect of a combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid, and green tea extract on pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 35(2): 97-102.
286. Rowan NJ, Smith JE, Sullivan R. Immunomodulatory activities of mushroom glucans and polysaccharide-protein complexes in animals and humans. *Int J Med Mushr* 2003; 5: 95-110.
287. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta catenin. *Science* 1993; 262(5140): 1731-1734.
288. Russo SE, Brown P, Tan S, Davies SJ. Interspecific demographic trade-offs and soil-related habitat associations of tree species along resource gradients. *J Ecol* 2008; 96: 192-203.
289. Russo SE, Zhang L, Tan S. Covariation between under story light environments and soil resources in Borne and mixed dipterocarp rain forest. *J Tropical Ecol* 2012; 28: 33-44.
290. Sabo TJ, Kaluđerović GN, Grgurić-Sipka SR, Heinemann FW, Trifunovic SR. Complex compounds of platinum(IV) and O,O'-dialkyl-ethylenediamineN,N'-di-3-propanoate ligands. A structural evidence for geometry of hydrolytic product of some esters. *Inorg Chem Commu* 2004; 7(2): 241-244.
291. Saha A, Kuzuhara T, Echigo N, Suganuma M, Fujiki H. New role of (-)-epicatechin in enhancing the induction of growth inhibition and apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 953-962.
292. Salomon A, Keramidas M, Maisin C, Thomas M. Loss of  $\beta$ -catenin in adrenocortical cancer cells causes growth inhibition and reversal of epithelial-to-mesenchymal transition *Oncotarget* 2015; 6(13): 11421-11433.
293. Sanchez-Heras E, Howell FV, Williams G, Doherty P. The fibroblast growth factor receptor acid box is essential for interactions with N-Cadherin and all of the major isoforms of neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 2006; 281 (46): 35208 -35216.
294. Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A.  $\beta$ -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(48): 19204-19209.
295. Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer – An update. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4873-4878.
296. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. The role of nutraceuticals in the regulation of Wnt and hedgehog signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 383-394.
297. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9(7): 671-675.
298. Schoumacher M, Goldman RD, Louvard D, Vignjevic MD. Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia *J Cell Biol* 2010; 189(3): 541-556.

299. Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25(57): 7531-7537.
300. Shah M, Rennoll SA, Raup-Konsavage WM, Yochum GS. A dynamic exchange of TCF3 and TCF4 transcription factors controls MYC expression in colorectal cancer cells. *Cell Cycle* 2015; 14(3): 323-332.
301. Shan J, Shi DL, Wang J, Zheng J. Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain. *Biochemistry* 2005; 44: 15495-15503.
302. Sheng WJ, Jiang H, Wu DL, Zheng JH. Early responses of the STAT3 pathway to platinum drugs are associated with cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46(8): 650-658.
303. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113(6): 685-700.
304. Shrestha G, St Clair LL. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* 2013; 12: 229-244.
305. Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds. *Phytochem Rev* 2010; 9: 303-314.
306. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47): 7265-7279.
307. Singh CK, George J, Ahmad N. Resveratrol-based combinatorial strategies for cancer management. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1290: 113-121.
308. Sipos F, Galamb O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World J Gastroenterol* 2012; 18(7): 601-608.
309. Smith JE, Sullivan R, Rowan NJ. The role of polysaccharides derived from medicinal mushrooms in cancer treatment programs: current perspectives. *Int J Med Mushr* 2003; 5: 217-234.
310. Song KS, Li G, Kim JS, Jing K, Kim TD, Kim JP, Seo SB, Yoo JK, Park HD, Hwang BD, Lim K, Yoon WH. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth, invasion, and angiogenesis and alters Wnt/ $\beta$ -catenin in SW480 human colon cancer cells. *BMC Can* 2011; 11: 307.
311. Song TY, Lin HC, Yang NC, Hub ML. Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linnaeus: Fries) Quelet. *J Ethnopharmacol* 2008; 115: 50-56.
312. Song W, Helsper JPF, Van Griensven LJD. Phenolic compounds present in medicinal mushroom extracts generate reactive oxygen species in human cells in vitro. *Int J Med Mushr* 2008; 10: 1-13.
313. Song W, Van Griensven LD. Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *Int J Med Mushr* 2008; 10(4): 315-324.
314. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol* 2003; 88(1): 113-116.
315. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A. The transcriptional repressor Zeb1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 537-544.
316. Stemmer V, De Craene B, Berx G, Behrens J. Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with  $\beta$ -catenin. *Oncogene* 2008; 27: 5075-5080.
317. Stojkovic D, Jevtic V, Radic G, Đacic D, Curcic M, Markovic S, Djinovic VM, Petrovic V,

- Trifunovic S. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N, N'- di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *J Mol Struct* 2014; 1062: 21-28.
318. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Hostettmann K. (Ed.). Vol. 6. Academic Press, London, 1990. pp. 71-133.
319. Sun WQ, Payne GF. Tyrosinase containing chitosan gels: a combined catalyst and sorbent for selective phenol removal. *Biotechnol Bioeng* 1996; 51: 79-86.
320. Šeklić DS, Stanković MS, Milutinović MG, Topuzović MD, Štajn AŠ, Marković SD. Cytotoxic, antimigratory, pro-and antioxidative activities of extracts medical mushrooms on colon cancer cell lines *Arch Biol Sci* 2016; 68(1): 93-105.
321. Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. Potential targets for colorectal cancer prevention. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 17279-17303.
322. Theveneau E, Mayor R. Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24(5): 677-684.
323. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
324. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-454.
325. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(1): 18-31.
326. Tian XJ, Zhang H, Xing J. Coupled reversible and irreversible bistable switches underlying TGFβ-induced epithelial to mesenchymal transition. *Biophys J* 2013; 105(4): 1079-1089.
327. Tianqi Y, Ganapathy S, Shen L, Peng B, Kim SH, Makriyannis A, Chen C. A lethal synergy induced by phellinus linteus and camptothecin11 in colon cancer cells. *Oncotarget* 2018; 9(5): 6308-6319.
328. Todosi AM, Gavrilescu MM, Aniței GM, Filip B, Scripcariu V. Colon cancer at the molecular level--usefulness of epithelial-mesenchymal transition analysis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2012; 116(4): 1106-1111.
329. Traverso J, Pulido A, Rodríguez-García MI, Alché JD. Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives. *Front Plant Sci* 2013; 4: 465.
330. Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res* 2008; 28(6A): 3815-3826.
331. Ueno H, Shinto E, Kajiwara Y, Fukazawa S, Shimazaki H, Yamamoto J, Hase K. Prognostic impact of histological categorisation of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014; 111: 2082-2090.
332. Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, Hazama S, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Neoplasia* 2008; 10(7): 697-705.
333. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002; 106: 981-986.



334. Vahora H, Ali Khan M, Alalami U, Hussain A. The potential role of nitric oxide in halting cancer progression through chemoprevention. *J Cancer Prev* 2016; 21(1): 1–12.
335. Valenta T, Hausmann G, Baslera K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J* 2012; 31(12): 2714–2736.
336. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(23): 3756–3788.
337. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 2015; 6: 334–343.
338. Vergara D, Valente CM, Tinelli A, Siciliano C, Lorusso V, Acierno R, Giovinazzo G, Santino A, Storelli C, Maffia M. Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells. *Cancer Lett* 2011; 310: 1–8.
339. Vincan E, Barker N. The upstream components of the Wnt signalling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 657–663.
340. Vincan E, Brabletz T, Faux MC, Ramsay RG. A human three-dimensional cell line model allows the study of dynamic and reversible epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition that underpins colorectal carcinogenesis. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 20–28.6
341. Vincan E, Darcy PK, Farrelly CA, Faux MC, Brabletz T, Ramsay RG. Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids. *Oncogene* 2007; 26(16): 2340–2352.a
342. Vincan E, Flanagan DJ, Pouliot N, Brabletz T, Spaderna S. Variable FZD7 expression in colorectal cancers indicates regulation by the tumour microenvironment. *Dev Dyn* 2010; 239(1): 311–317.
343. Wallis J, Fox MF, Walsh FS. Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2. *Genomics* 1994; 22: 172–179.
344. Wang Z, Vogelstein B, Kinzler KW. Phosphorylation of beta-catenin at S33, S37, or T41 can occur in the absence of phosphorylation at T45 in colon cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5234–5235.
345. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309–411.
346. Wasser SP. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Microbiol Biotechnol* 2011; 89(5): 1323–1332.
347. Wei W, Chua MS, Grepper S, So S. Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2010; 126(10): 2426–2436.
348. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2<sup>nd</sup> ed., Garland Science, New York and London, 2014
349. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 1<sup>st</sup> ed. Chapter 14: Moving Out: Invasion and Metastasis. Garland Science 2007.
350. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365(9454): 153–165.
351. Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaidler H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the EMT like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131(9): 1877–1885.
352. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 6): 727–735.
353. White BD, Chien AJ, Dawson DW. Dysregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 2012; 142(2): 219–232.

354. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
355. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8): 2145-2154.
356. Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 2010; 35(3): 161-168.
357. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(4): 695-705.
358. Walker A, Frei R, Lawson KR. The cytoplasmic domain of N-cadherin modulates MMP-9 induction in oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 2014; 45(4): 1699-1706.
359. Bai X, Yu B, Du J, Yuan S, Sun L. Effects of lobaplatin and oxaliplatin on biological behavior of colorectal carcinoma cell line. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 9/1: P36-P39.
360. Yan X, Yan L, Liu S, Shan Z, Tian Y, Jin Z. N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Mol Med Rep* 2015; 12: 2999-3006.
361. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; 14(6): 818-829.
362. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2006; 281(26): 17751-17757.
363. Yang Y, Li Y, Wang K, Wang Y, Yin W, Li L. P38/NF-kb-/Snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. *PLoS ONE* 2013; 8:e58915.
364. Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, Feng J, Yang D, Liu F, Yan X. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. *Nat Communications* 2013; 4: 2803
365. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28(1-2): 15-33.
366. Yu Y, Xiao CH, Tan LD, Wang QS, Li XQ, Feng YM. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- $\beta$  signaling. *Br J Cancer* 2014; 110: 724-732.
367. Yu S, Weaver V, Martin K, Cantorna MT. The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC Immunol* 2009; 10: 12.
368. Zadran S, Arumugam R, Herschman H, Phelps ME, Levine RD. Surprisal analysis characterizes the free energy time course of cancer cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 13235-13240.
369. Zhang GZ, Jiao SC, Meng ZT. Pemetrexed plus cisplatin/carboplatin in previously treated locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29(1):38.
370. Zhang S, Chung W, Wu G, Egan SE, Xu K. Tumor-suppressive activity of lunatic fringe in prostate through differential modulation of notch receptor activation. *Neoplasia* 2014; 16, 158-167.
371. Zhang Y, Yeh JR, Mara A, Ju R, Hines JF, Cirone P, Griesbach HL, Schneider I, Slusarski DC, Holley SA, Crews CM. A chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin. *Chem Biol* 2006; 13(9): 1001-1009.

372. Zhang Z, Chen H, Xu C, Song L, Huang L, Lai Y, Wang Y, Chen H, Gu D, Ren L. Curcumin inhibits tumor epithelial-mesenchymal transition by downregulating the Wnt signaling pathway and upregulating NKD2 expression in colon cancer cells. *Oncol Rep* 2016; 35: 2615–2623.
373. Zhu T, Kim SH, Chen CY. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Curr Med Chem* 2008; 15(13): 1330–1335.
374. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999; 274: 11549–11556.
375. Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija. Prirodno-matematički fakultet Kragujevac, Institut za biološka istraživanja “Siniša Stanković” Beograd, Vojnomedicinska akademija, Beograd 2000, str. 1-150.
376. Živanović MN, Košarić JV, Šmit B, Šeklić DS, Pavlović RZ, Marković SD. Novel selenohydantoin palladium(II) complex - antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *Gen Physiol Biophys* 2017; 36(2): 187-196.

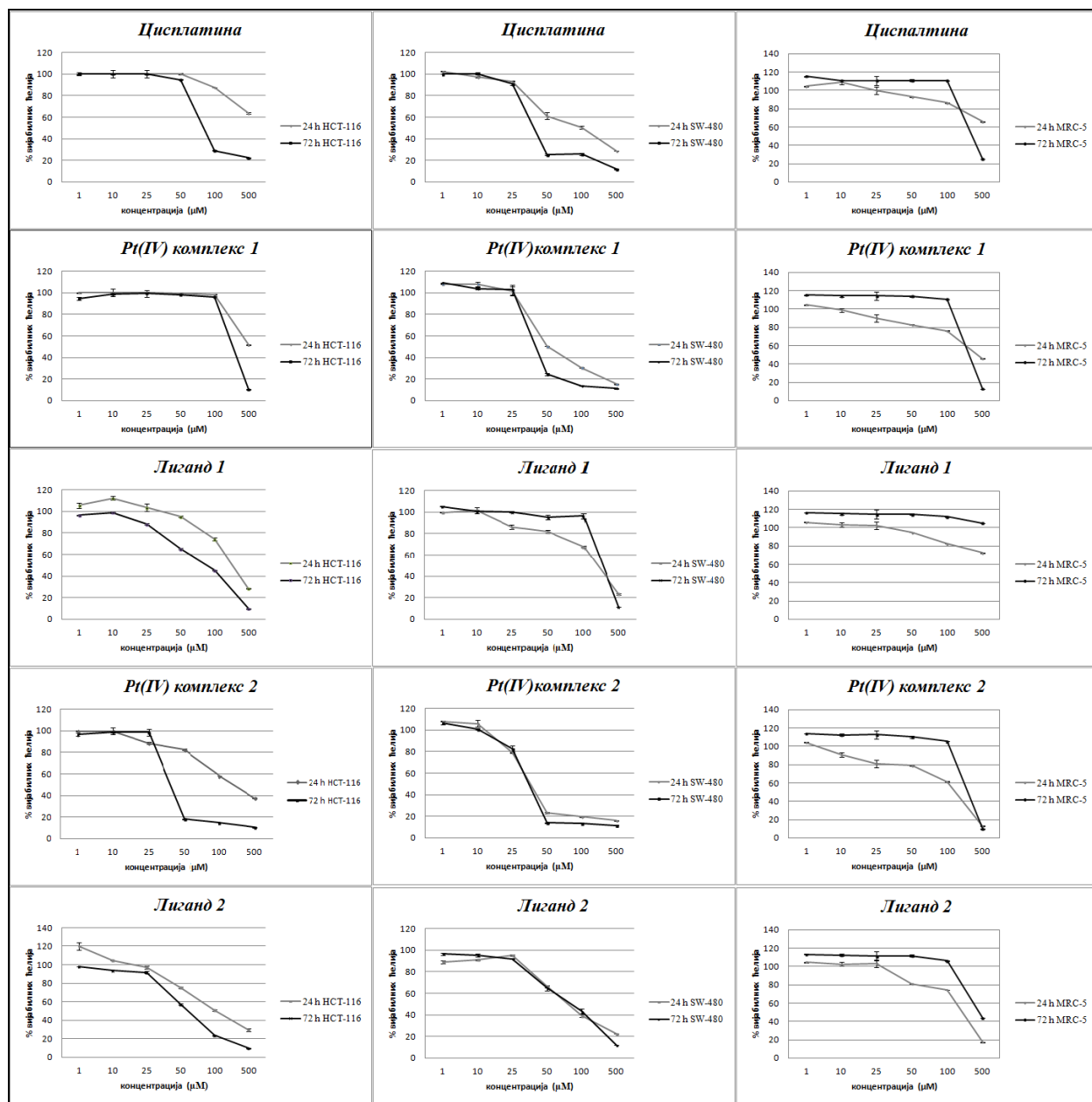
#### КОРИШЋЕНЕ ИНТЕРНЕТ СТРАНИЦЕ

1. <http://www.gistsupport.org>
2. <http://www.acgaec.com/colon-polyps?lightbox=imageyip>
3. <http://www.healthwarehouse.co/mesimakobu-phellinus-linteus-experiencing-the-benefits/>
4. <http://www.dr-fungus.com/ljekovite-gljive/cordyceps-opcenito>
5. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Schopftintling-Coprinus-comatus.jpg>
6. [http://www.morningstarherbalextracts.com/Lentinus-Edodes-Shiitake-Beta-Glucans-Extract\\_p-133.aspx](http://www.morningstarherbalextracts.com/Lentinus-Edodes-Shiitake-Beta-Glucans-Extract_p-133.aspx)
7. <https://www.google.rs/search?q=ganoderma+lucidum>
8. <http://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=67680>
9. [https://www.nahuby.sk/obrazok\\_detail.php?obrazok\\_id=348978](https://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=348978)
10. <https://www.lgcstandards-atcc.org>
11. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

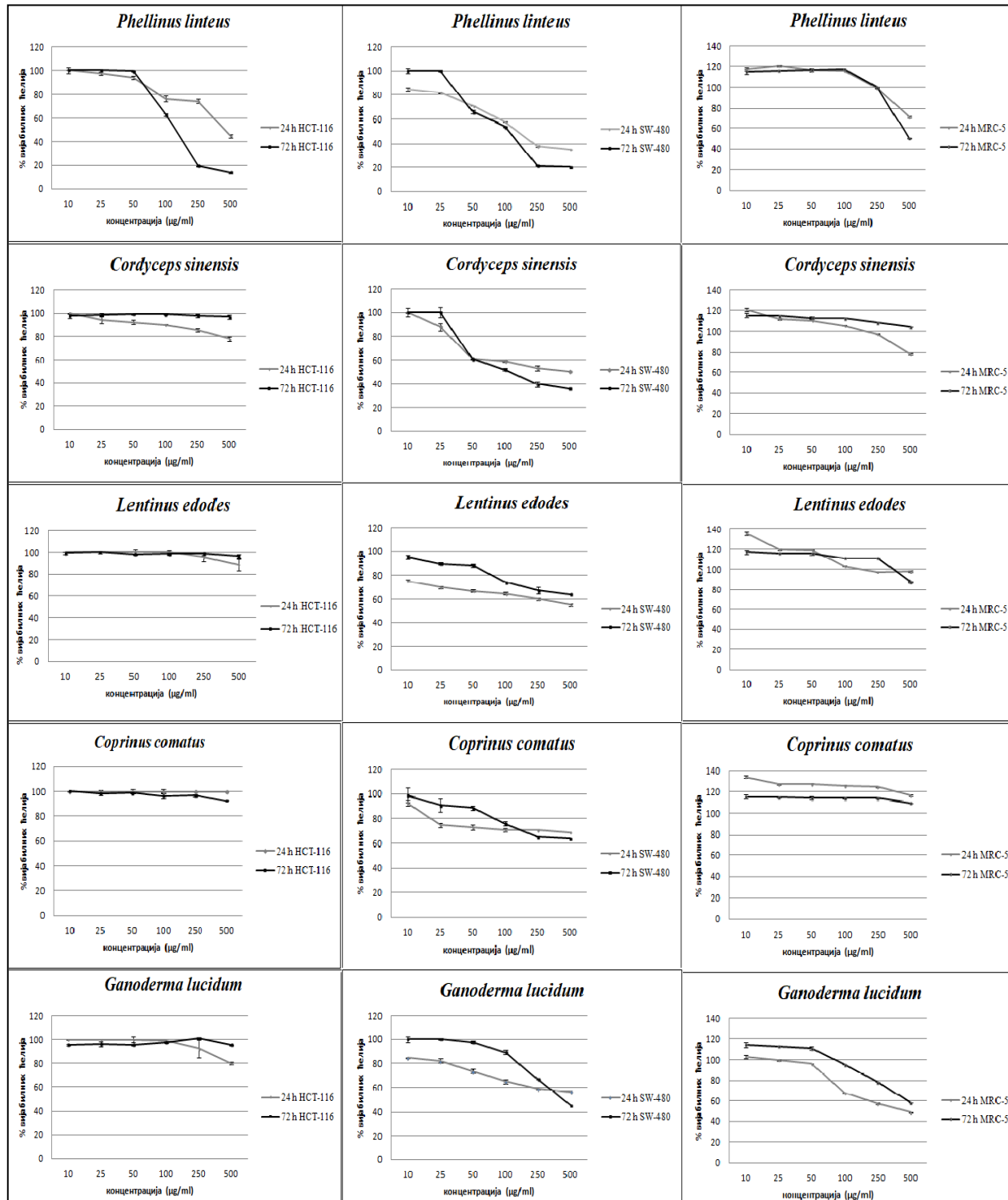
## ПРИЛОЗИ

### Прилог 1. Вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија у појединачним третманима.

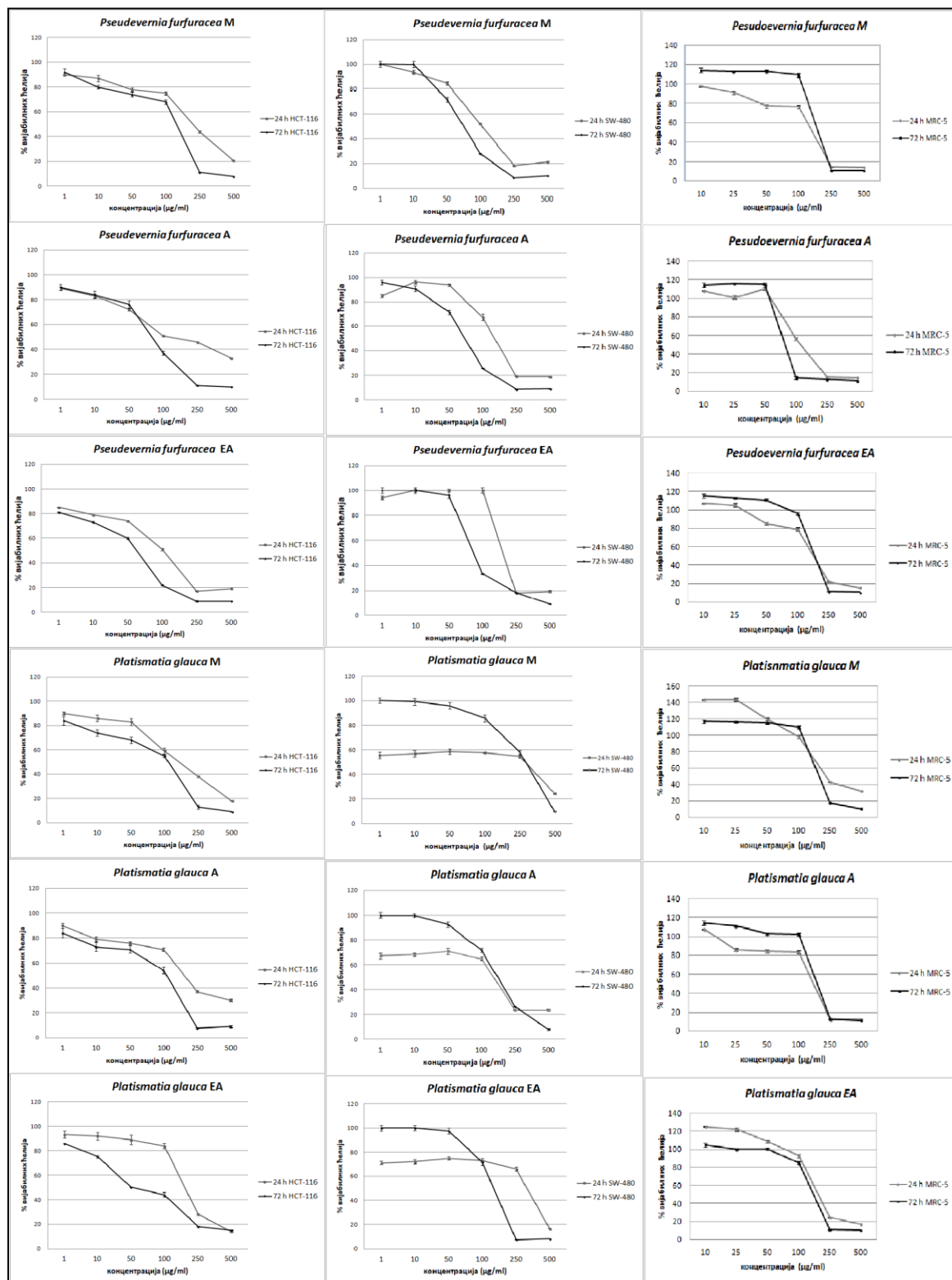
Графикон 1. Ефекти хемијских једињења на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија.



Графикон 2. Ефекти екстраката гљива на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија.



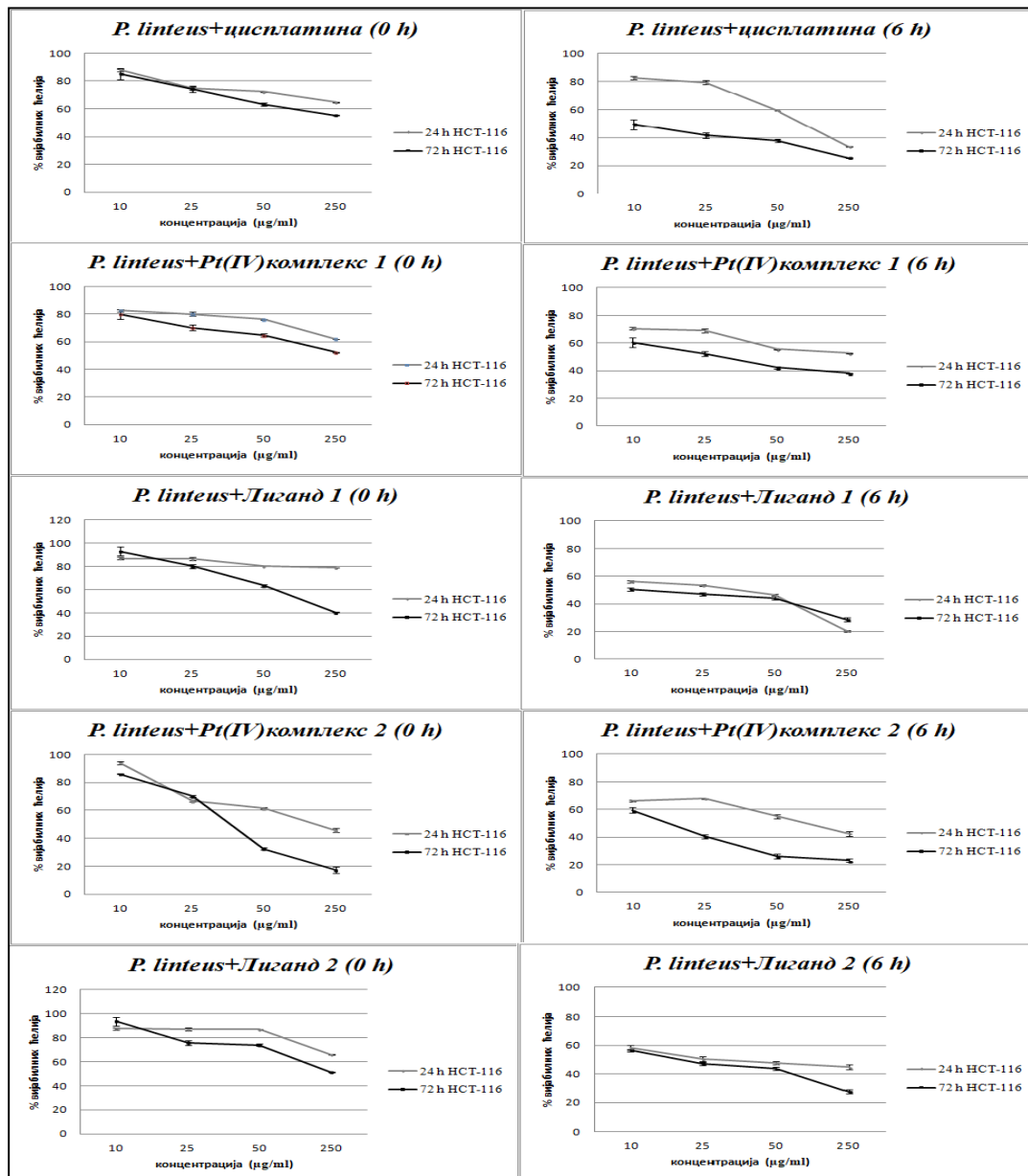
Графикон 3. Ефекти екстраката лишајева на вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија.



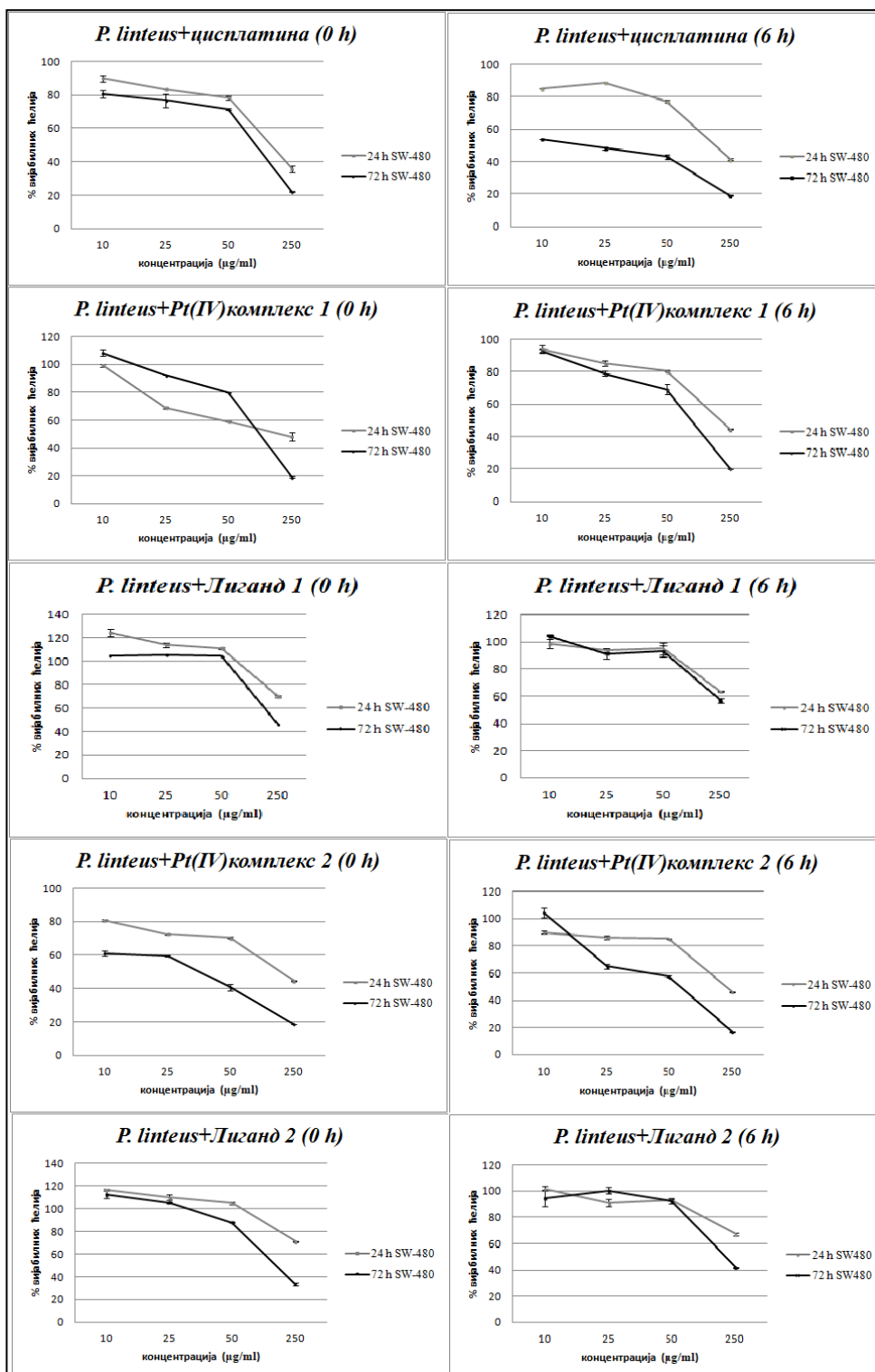
## Прилог 2. Вијабилност НСТ-116, SW-480 и MRC-5 ћелија у комбинованим третманима

Комбиновани третмани су извођени тако што су идентичне концентрације екстракта гљиве *P. linteus* које су коришћене у појединачним третманима (10, 25, 50, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) и 10  $\mu\text{M}$  концентрација испитиваних хемијских једињења (цисплатина, Pt(IV) комплекс или лиганд) додавани истовремено (КТ-0h), или је хемијско једињење додавано 6 сати након третмана гљивом (КТ-6h). Ефекти су читавани након 24 и 72 сата од третмана екстрактом.

Графикон 4. Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност НСТ-116 ћелија.

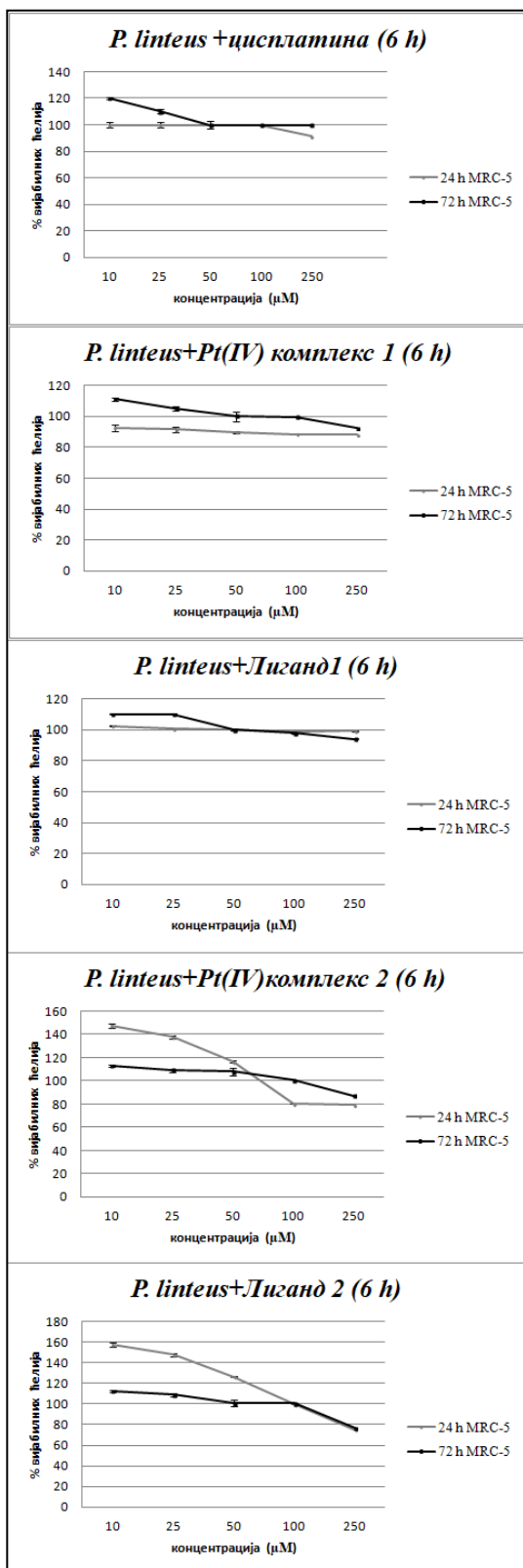


Графикон 5. Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност SW-480 ћелија.





**Графикон 6.** Ефекти комбинованих третмана екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на вијабилност MRC-5 ћелија.



### Прилог 3. Тип интеракције (синергизам, адитивни и антагонистички ефекти ) у комбинованим третманима на НСТ-116 и SW-480 ћелијским линијама.

Синергистички, адитивни или антагонистички ефекти у комбинованим третманима екстраката гљиве *P. linteus* и тестираних хемијских једињења су добијени поређењем ефеката добијених у комбинованим третманима (МТТ тест вијабилности ћелија) са збирним ефектима добијеним у појединачним третманима (МТТ тест вијабилности ћелија).

**Табела 7.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-0h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на НСТ-116 ћелијској линији.

Третмани/ КТ-0h		Вијабилне ћелије (%)	Ихибиција ћелијског раста (%) <sup>a</sup>	Очекивана цитотоксичност (%) <sup>b</sup>	Тип интеракциј <sup>b</sup>	СИ индекс <sup>г</sup>	
Нетретиране ћелије-контрола	24 h	100	0	-	-	-	
	72 h	100	0	-	-	-	
CisPt	24 h	99.99±0.15	0.01±0.002	-	-	-	
	72 h	99.99±1.25	0.01±0.001	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 1	24 h	99.99± 0.01	0.01±0.002	-	-	-	
	72 h	99.22±4.12	0.78±0.05	-	-	-	
Лиганд 1	24 h	99.99± 3.50	0.01±0.002	-	-	-	
	72 h	88.05±0.49	11.95±0.25	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 2	24 h	88.50±1.59	11.50±0.35	-	-	-	
	72 h	98.34±3.15	1.66±0.02	-	-	-	
Лиганд 2	24 h	96.90± 1.70	3.10±0.48	-	-	-	
	72 h	98.61±1.11	1.39±0.55	-	-	-	
<i>P. linteus</i> (µg/ml)	10	24 h	97.15±1.30	2.85±0.32	-	-	-
		72 h	99.84±0.01	0.16±0.005	-	-	-
	25	24 h	93.94±1.58	6.06±0.12	-	-	-
		72 h	99.84±0.45	0.16±0.002	-	-	-
	50	24 h	76.33±1.58	23.67±0.90	-	-	-
		72 h	99.27±1.23	0.73±0.01	-	-	-
	250	24 h	47.24±1.67	52.76±0.28	-	-	-
		72 h	19.37±0.29	80.63±0.36	-	-	-
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Цисплатина	24 h	99.99±3.42	0.01±0.001	2.86±0.322	Антагонизам	0.003
		72 h	84.93±0.45	15.07±0.25	0.17±0.006	Синергизам	88.64
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	Цисплатина	24 h	97.92±5.62	2.08±0.98	6.07±0.122	Антагонизам	0.34
		72 h	76.12±0.38	23.88±0.15	0.17±0.003	Синергизам	140.47
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	Цисплатина	24 h	83.22±1.05	16.78±0.50	23.68±0.902	Адитивни	0.70
		72 h	64.70±6.50	35.30±3.25	0.74±0.11	Синергизам	47.70
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	Цисплатина	24 h	61.06±0.48	38.94±0.24	52.77±0.282	Адитивни	0.73
		72 h	56.25±3.02	43.75±1.51	80.64±0.361	Адитивни	0.54
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Pt(IV) Комплекс 1	24 h	94.96 ±1.48	5.04±0.74	2.86±0.32	Синергизам	1.76
		72 h	96.83±2.36	3.17±1.07	0.95±0.002	Синергизам	3.32
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	Pt(IV) Комплекс 1	24 h	89.95±0.06	10.05±0.03	7.07±0.12	Синергизам	1.42
		72 h	88.76±3.65	11.24±1.33	0.95±0.22	Синергизам	11.83
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	Pt(IV) Комплекс 1	24 h	80.99±0.23	19.01±0.11	23.68±0.98	Адитивни	0.80
		72 h	79.05±2.23	20.95±1.11	1.51±0.40	Синергизам	13.87
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	Pt(IV) Комплекс 1	24 h	66.27±1.56	33.73±0.53	52.77±0.22	Адитивни	0.63
		72 h	40.33±0.95	59.67±0.47	81.41±0.29	Адитивни	0.73

<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 1	24 h	86.68±0.08	13.32±0.04	2.86±0.32	Синергизам	4.65	
		72 h	92.93±0.54	7.07±0.25	12.11±0.25	Адитивни	0.58	
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	86.37±2.07	13.63±1.03	6.07±0.08	Синергизам	2.24	
		72 h	80.02±3.70	19.98±1.51	12.11±1.25	Синергизам	1.64	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	80.29±2.49	19.71±0.12	23.68±0.06	Адитивни	0.83	
		72 h	63.49±1.31	36.51±0.67	12.68±0.37	Синергизам	2.87	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	78.89±1.06	21.11±0.06	52.77±0.03	Антагонизам	0.40	
		72 h	40.36±3.58	49.64±1.25	92.58±0.62	Адитивни	0.53	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL		Pt(IV) комплекс 2	24 h	93.93±0.95	6.07±0.42	14.35±1.67	Синергизам	0.42
			72 h	96.99±0.36	3.01±0.15	1.82±0.025	Синергизам	1.65
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	24 h		66.87±0.59	33.13±0.24	17.56±0.47	Синергизам	1.88	
	72 h		70.26±0.45	29.74±0.22	1.82±0.022	Синергизам	16.34	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	24 h		61.48±0.63	38.52±0.32	35.17±1.25	Синергизам	1.09	
	72 h		32.53±0.85	67.47±0.42	2.39±0.03	Синергизам	28.23	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	24 h		45.83±1.48	54.17±0.26	64.26±0.63	Адитивни	0.84	
	72 h		17.42±2.26	82.58±1.13	82.29±0.38	Синергизам	1.00	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 2		24 h	87.53±2.06	12.47±1.03	5.95±0.56	Синергизам	2.09
			72 h	93.37±0.02	6.63±0.01	1.55±0.01	Синергизам	4.27
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	89.39±0.64	10.61±0.32	9.16±0.15	Синергизам	1.15	
		72 h	75.81±1.01	24.19±0.05	1.55±0.02	Синергизам	15.60	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	87.76±0.00	14.24±0.00	26.77±0.00	Адитивни	0.53	
		72 h	73.72±0.95	26.28±0.45	2.12±0.20	Синергизам	12.39	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	65.85±0.00	34.15±0.00	55.86±0.00	Адитивни	0.61	
		72 h	51.07±3.30	34.15±1.50	82.02±0.75	Антагонизам	0.41	

Табела 8. Интеракције комбинованих третмана (КТ-6h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на НСТ-116 ћелијској линији.

Третмани/ КТ-6h		Вијабилне ћелије (%)	Ихибиција ћелијског раста (%) <sup>a</sup>	Очекивана цитотоксичност (%) <sup>b</sup>	Тип интеракције <sup>b</sup>	СИ индекс <sup>г</sup>	
Нетретиране ћелије-контрола	24 h	100	0	-	-	-	
	72 h	100	0	-	-	-	
CisPt	24 h	99.99±0.15	0.01±0.002	-	-	-	
	72 h	99.99±1.25	0.01±0.001	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 1	24 h	88.50±1.66	11.50±0.83	-	-	-	
	72 h	98.33±6.32	0.01±0.001	-	-	-	
Лиганд 1	24 h	99.99±1.38	0.01±0.007	-	-	-	
	72 h	99.99±0.31	0.01±0.001	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 2	24 h	88.50±1.59	11.50±0.35	-	-	-	
	72 h	98.34±3.15	1.66±0.02	-	-	-	
Лиганд 2	24 h	70.12±2.50	29.88±1.25	-	-	-	
	72 h	90.69±1.39	9.31±0.75	-	-	-	
<i>P. linteus</i> (µg/ml)	10	24 h	97.15±1.30	2.85±0.32	-	-	-
		72 h	99.84±0.01	0.16±0.005	-	-	-
	25	24 h	93.94±1.58	6.06±0.12	-	-	-
		72 h	99.84±0.45	0.16±0.002	-	-	-
	50	24 h	76.33±1.58	23.67±0.90	-	-	-
		72 h	99.27±1.23	0.73±0.01	-	-	-
	250	24 h	47.24±1.67	52.76±0.28	-	-	-
		72 h	19.37±0.29	80.63±0.36	-	-	-

<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Цисплатина	24 h	82.57±2.36	17.43±0.13	2.86±0.32	Синергизам	6.09	
		72 h	65.43±1.56	34.57±0.54	0.17±0.006	Синергизам	203.35	
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	79.41±1.12	20.59±0.98	6.07±0.12	Синергизам	3.39	
		72 h	41.8±1.93	58.20±0.02	0.17±0.003	Синергизам	323.33	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	59.24±2.05	40.76±0.41	23.68±0.90	Синергизам	1.72	
		72 h	37.79±1.85	62.21±0.01	0.74±0.11	Синергизам	84.06	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	33.70±1.92	66.30±0.15	52.77±0.28	Синергизам	1.25	
		72 h	25.71±1.78	47.29±0.09	80.64±0.36	Адитивни	0.82	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL		Pt(IV) комплекс 1	24 h	98.09 ±1.58	1.91±0.85	14.35±0.58	Антагонизам	0.13
			72 h	99.99±0.51	0.01±0.002	0.26±0.01	Антагонизам	0.03
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	24 h		94.09±1.64	5.91±0.85	17.56±0.21	Антагонизам	0.33	
	72 h		97.96±0.89	2.04±0.42	0.26±0.02	Синергизам	7.84	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	24 h		84.46±4.15	15.54±2.6	35.17±0.89	Антагонизам	0.44	
	72 h		89.64±0.33	10.36±0.15	0.83±0.40	Синергизам	12.48	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	24 h		49.36±0.46	50.64±0.23	64.26±0.22	Адитивни	0.78	
	72 h		22.34±0.08	77.66±0.04	80.73±0.29	Адитивни	0.96	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 1		24 h	56.14±2.13	43.86±1.07	2.86±0.32	Синергизам	15.33
			72 h	50.43±0.32	49.57±0.16	0.17±0.01	Синергизам	291.58
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	53.44±0.33	46.56±0.15	6.07±0.7	Синергизам	7.67	
		72 h	47.05±2.54	52.95±1.25	0.17±0.02	Синергизам	311.47	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	46.32±0.45	53.68±0.27	23.68±0.12	Синергизам	2.26	
		72 h	48.27±0.92	51.73±0.45	0.74±0.03	Синергизам	69.90	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	20.42±0.05	79.58±0.02	52.77±0.01	Синергизам	1.50	
		72 h	8.6±0.81	91.40±0.41	80.64±0.20	Синергизам	1.50	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL		Pt(IV) комплекс 2	24 h	66.45±3.6	33.55±0.10	14.35±1.67	Синергизам	2.3
			72 h	59.39±2.45	40.61±0.82	1.82±0.025	Синергизам	22.31
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	24 h		67.77±2.3	32.23±0.09	17.56±0.47	Синергизам	1.83	
	72 h		40.63±1.98	59.37±0.37	1.82±0.022	Синергизам	32.62	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	24 h		54.95±1.12	45.05±0.19	35.17±1.25	Синергизам	1.28	
	72 h		26.10±1.04	73.90±0.01	2.39±0.03	Синергизам	30.92	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	24 h		42.49±3.07	57.51±0.26	64.26±0.63	Адитивни	0.89	
	72 h		23.03±0.97	76.97±0.59	82.29±0.38	Адитивни	0.93	
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 2		24 h	58.23±1.86	41.77±0.98	32.73±0.12	Синергизам	1.27
			72 h	56.43±3.61	43.57±1.85	9.47±0.94	Синергизам	4.60
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	50.41±2.39	49.59±1.17	35.94±0.23	Синергизам	1.37	
		72 h	47.21±1.51	52.79±0.75	9.47±0.25	Синергизам	5.57	
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	47.71±0.33	52.29±0.18	53.55±0.46	Адитивни	0.97	
		72 h	43.60±1.95	56.40±0.92	10.04±0.42	Синергизам	5.61	
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	44.92±2.39	55.08±1.17	82.64±0.26	Адитивни	0.66	
		72 h	7.63±1.38	92.37±0.78	89.94±0.99	Синергизам	1.03	

**Табела 9.** Интеракције комбинованих третмана (КТ-0h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на SW-480 ћелијској линији.

Третмани/ КТ-0h	Време	Вијабилне ћелије (%)	Ихибиција ћелијског раста (%) <sup>a</sup>	Очекивана цитотоксичност (%) <sup>b</sup>	Тип интеракције <sup>b</sup>	СИ индекс <sup>c</sup>
Нетретиране ћелије-контрола	24 h	100	0	-	-	-
	72 h	100	0	-	-	-

CisPt	10 $\mu$ M	24 h	93.24 $\pm$ 0.49	6.73 $\pm$ 0.12	-	-	-	
		72 h	91.12 $\pm$ 1.71	8.88 $\pm$ 0.01	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 1		24 h	99.99 $\pm$ 4.09	0.01 $\pm$ 0.002	-	-	-	
		72 h	99.99 $\pm$ 4.74	0.01 $\pm$ 0.001	-	-	-	
Лиганд 1		24 h	96.08 $\pm$ 2.18	3.92 $\pm$ 1.42	-	-	-	
		72 h	99.99 $\pm$ 0.50	0.01 $\pm$ 0.001	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 2		24 h	78.98 $\pm$ 0.87	21.02 $\pm$ 0.43	-	-	-	
		72 h	82.29 $\pm$ 3.25	17.71 $\pm$ 0.13	-	-	-	
Лиганд 2		24 h	95.10 $\pm$ 0.80	4.90 $\pm$ 0.48	-	-	-	
		72 h	91.97 $\pm$ 0.60	8.03 $\pm$ 0.33	-	-	-	
<i>P. linteus</i> ( $\mu$ g/mL)	10	24 h	84.83 $\pm$ 1.53	15.17 $\pm$ 0.32	-	-	-	
		72 h	99.99 $\pm$ 2.14	0.01 $\pm$ 0.003	-	-	-	
	25	24 h	82.05 $\pm$ 0.67	17.95 $\pm$ 0.12	-	-	-	
		72 h	99.99 $\pm$ 0.39	0.01 $\pm$ 0.001	-	-	-	
	50	24 h	70.77 $\pm$ 0.21	29.23 $\pm$ 0.98	-	-	-	
		72 h	65.73 $\pm$ 1.38	34.27 $\pm$ 0.4	-	-	-	
	250	24 h	37.90 $\pm$ 0.46	62.10 $\pm$ 0.22	-	-	-	
		72 h	21.48 $\pm$ 0.24	78.52 $\pm$ 0.29	-	-	-	
<i>P. linteus</i> 10 $\mu$ g/mL	Цисплатина	24 h	89.65 $\pm$ 2.36	10.35 $\pm$ 0.76	21.90 $\pm$ 0.44	Адитивни	0.49	
		72 h	80.75 $\pm$ 0.56	19.25 $\pm$ 0.04	8.89 $\pm$ 0.01	Синергизам	2.16	
<i>P. linteus</i> 25 $\mu$ g/mL		24 h	83.5 $\pm$ 0.12	16.5 $\pm$ 0.86	24.68 $\pm$ 0.24	Адитивни	0.66	
		72 h	76.64 $\pm$ 0.93	23.36 $\pm$ 0.02	8.89 $\pm$ 0.01	Синергизам	2.62	
<i>P. linteus</i> 50 $\mu$ g/mL		24 h	78.41 $\pm$ 0.05	21.59 $\pm$ 0.11	35.96 $\pm$ 1.1	Адитивни	0.60	
		72 h	71.48 $\pm$ 0.85	28.52 $\pm$ 0.01	43.15 $\pm$ 0.41	Адитивни	0.66	
<i>P. linteus</i> 250 $\mu$ g/mL		24 h	35.8 $\pm$ 0.92	64.2 $\pm$ 0.34	68.83 $\pm$ 0.34	Адитивни	0.93	
		72 h	22.13 $\pm$ 1.78	77.87 $\pm$ 0.09	87.4 $\pm$ 0.30	Адитивни	0.89	
<i>P. linteus</i> 10 $\mu$ g/mL		Pt(IV) комплекс	24 h	99.09 $\pm$ 2.6	0.91 $\pm$ 0.17	15.18 $\pm$ 0.32	Антагонизам	0.05
			72 h	99.99 $\pm$ 1.45	0.01 $\pm$ 0.22	0.02 $\pm$ 0.002	Адитивни	0.5
<i>P. linteus</i> 25 $\mu$ g/mL	24 h		88.57 $\pm$ 2.31	11.43 $\pm$ 0.09	17.96 $\pm$ 0.12	Адитивни	0.63	
	72 h		92.15 $\pm$ 1.98	7.85 $\pm$ 0.59	0.02 $\pm$ 0.002	Синергизам	392.5	
<i>P. linteus</i> 50 $\mu$ g/mL	24 h		79.21 $\pm$ 1.45	20.79 $\pm$ 0.19	29.24 $\pm$ 0.98	Адитивни	0.71	
	72 h		79.83 $\pm$ 1.00	20.17 $\pm$ 0.08	34.28 $\pm$ 0.40	Адитивни	0.58	
<i>P. linteus</i> 250 $\mu$ g/mL	24 h		48.02 $\pm$ 0.01	51.98 $\pm$ 0.21	62.11 $\pm$ 0.22	Адитивни	0.83	
	72 h		19.05 $\pm$ 0.07	80.95 $\pm$ 0.72	78.53 $\pm$ 0.29	Синергизам	1.03	
<i>P. linteus</i> 10 $\mu$ g/mL	Лиганд 1		24 h	99.99 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.001	19.09 $\pm$ 0.02	Антагонизам	0.0005
			72 h	99.99 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.001	0.02 $\pm$ 0.01	Адитивни	0.5
<i>P. linteus</i> 25 $\mu$ g/mL		24 h	99.99 $\pm$ 0.56	0.01 $\pm$ 0.001	21.87 $\pm$ 0.08	Антагонизам	0.0004	
		72 h	99.99 $\pm$ 0.78	0.01 $\pm$ 0.021	0.02 $\pm$ 0.00	Адитивни	0.5	
<i>P. linteus</i> 50 $\mu$ g/mL		24 h	99.99 $\pm$ 0.36	0.01 $\pm$ 0.051	33.15 $\pm$ 0.09	Антагонизам	0.0003	
		72 h	99.99 $\pm$ 0.14	0.01 $\pm$ 0.011	34.28 $\pm$ 0.04	Антагонизам	0.0002	
<i>P. linteus</i> 250 $\mu$ g/mL		24 h	69.86 $\pm$ 0.67	0.01 $\pm$ 0.011	66.02 $\pm$ 0.00	Антагонизам	0.0001	
		72 h	46.21 $\pm$ 1.66	0.01 $\pm$ 0.001	78.53 $\pm$ 0.29	Антагонизам	0.0001	
<i>P. linteus</i> 10 $\mu$ g/mL		Pt(IV) комплекс 2	24 h	74.69 $\pm$ 0.12	25.31 $\pm$ 0.08	36.19 $\pm$ 0.75	Адитивни	0.69
			72 h	61.07 $\pm$ 0.65	38.93 $\pm$ 0.001	17.72 $\pm$ 0.45	Синергизам	2.19
<i>P. linteus</i> 25 $\mu$ g/mL	24 h		72.54 $\pm$ 0.90	27.46 $\pm$ 0.76	38.97 $\pm$ 0.55	Адитивни	0.70	
	72 h		59.44 $\pm$ 0.57	40.56 $\pm$ 0.51	17.72 $\pm$ 0.13	Синергизам	2.28	
<i>P. linteus</i> 50 $\mu$ g/mL	24 h		70.29 $\pm$ 0.47	29.71 $\pm$ 0.01	50.25 $\pm$ 1.41	Адитивни	0.59	
	72 h		40.74 $\pm$ 0.09	59.26 $\pm$ 0.11	51.98 $\pm$ 0.53	Синергизам	1.14	
<i>P. linteus</i> 250 $\mu$ g/mL	24 h		44.49 $\pm$ 0.10	55.51 $\pm$ 0.84	83.12 $\pm$ 0.65	Адитивни	0.66	
	72 h		18.86 $\pm$ 0.82	81.14 $\pm$ 0.39	96.23 $\pm$ 0.42	Адитивни	0.84	
<i>P. linteus</i> 10 $\mu$ g/mL	Лиганд 2		24 h	99.99 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.001	20.07 $\pm$ 0.56	Антагонизам	0.0004
			72 h	99.99 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.001	8.04 $\pm$ 0.94	Антагонизам	0.001

<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	24 h	99.99±0.56	0.01±0.001	22.85±0.23	Антагонизам	0.0004
	72 h	99.99±0.78	0.01±0.021	8.04±0.52	Антагонизам	0.001
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	24 h	99.99±0.56	0.01±0.006	34.13±0.64	Антагонизам	0.0002
	72 h	87.73±0.33	12.27±0.15	42.30±0.24	Антагонизам	0.29
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	24 h	71.20±0.67	28.80±0.34	67.00±0.62	Антагонизам	0.49
	72 h	33.29±1.07	66.71±0.56	86.55±0.99	Адитивни	0.77

**Табела 10.** Интеракције комбинованих третманима (КТ-6h) екстракта *Phellinus linteus* са хемијским једињењима на SW-480 ћелијској линији.

Третмани/ КТ-6h		Вијабилне ћелије (%)	Ихибиција ћелијског раста (%) <sup>a</sup>	Очекивана цитотоксичност (%) <sup>b</sup>	Тип интеракције <sup>b</sup>	СИ индекс <sup>c</sup>	
Нетретирание ћелије/контрола	24 h	100	0	-	-	-	
	72 h	100	0	-	-	-	
CisPt	24 h	93.24± 0.49	6.73± 0.12	-	-	-	
	72 h	91.12±1.71	8.88± 0.01	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 1	24 h	99.99± 4.09	0.01±0.002	-	-	-	
	72 h	99.99±4.74	0.01±0.001	-	-	-	
Лиганд 1	24 h	96.08± 2.18	3.92±1.42	-	-	-	
	72 h	99.99±0.50	0.01±0.001	-	-	-	
Pt(IV) комплекс 2	24 h	78.98±0.87	21.02±0.43	-	-	-	
	72 h	82.29±3.25	17.71±0.13	-	-	-	
Лиганд 2	24 h	95.10± 0.80	4.90±0.48	-	-	-	
	72 h	91.97±0.60	8.03±0.33	-	-	-	
<i>P. linteus</i> (µg/mL)	10	24 h	84.83 ± 1.53	15.17±0.32	-	-	-
		72 h	99.99± 2.14	0.01±0.003	-	-	-
	25	24 h	82.05 ± 0.67	17.95±0.12	-	-	-
		72 h	99.99± 0.39	0.01±0.001	-	-	-
	50	24 h	70.77 ± 0.21	29.23±0.98	-	-	-
		72 h	65.73 ±1.38	34.27±0.4	-	-	-
	250	24 h	37.90±0.46	62.10±0.22	-	-	-
		72 h	21.48 ±0.24	78.52±0.29	-	-	-
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Цисплатина	24 h	84.92±0.13	15.08±0.07	21.90±0.44	Адитивни	0.68
		72 h	53.85±0.12	46.15±0.06	8.89±0.01	Синергизам	5.19
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	Цисплатина	24 h	88.67±0.98	11.33±0.46	24.68±0.24	Антагонизам	0.45
		72 h	48.27±0.72	51.73±0.36	8.89±0.01	Синергизам	5.81
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	Цисплатина	24 h	77.15±0.62	22.85±0.32	35.96±1.1	Адитивни	0.63
		72 h	43.15±1.46	56.85±0.74	43.15±0.41	Синергизам	1.31
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	Цисплатина	24 h	41.24±1.64	58.76±0.67	68.83±0.34	Адитивни	0.85
		72 h	18.95±0.34	81.05±0.15	87.4±0.30	Адитивни	0.92
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Pt(IV) комплекс 1	24 h	94.09 ±1.97	5.91±0.85	15.18±0.32	Антагонизам	0.38
		72 h	92.77±1.10	7.23±0.59	0.02±0.002	Синергизам	361.5
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL	Pt(IV) комплекс 1	24 h	84.95±1.72	15.05±0.85	17.96±0.12	Адитивни	0.83
		72 h	78.76±1.49	21.24±0.76	0.02±0.002	Синергизам	1026
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL	Pt(IV) комплекс 1	24 h	80.45±0.72	19.55±0.36	29.24±0.98	Адитивни	0.66
		72 h	69.05±3.12	30.95±1.52	34.28±0.40	Адитивни	0.90
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL	Pt(IV) комплекс 1	24 h	44.64±0.12	55.36±0.06	62.11±0.22	Адитивни	0.89
		72 h	20.07±0.02	79.93±0.01	78.53±0.29	Синергизам	1.03
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 1	24 h	98.56±3.24	1.44±0.56	19.09±0.02	Антагонизам	0.07
		72 h	99.99±0.36	0.01±0.005	0.02±0.01	Адитивни	0.5
<i>P. linteus</i>	Лиганд 1	24 h	94.04±1.35	5.96±0.75	21.87±0.08	Антагонизам	0.27

25 µg/ml		72 h	91.28±3.54	8.72±1.51	0.02±0.00	Синергизам	436
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	95.02±4.44	4.98±0.251	33.15±0.09	Антагонизам	0.15
		72 h	92.94±2.56	7.06±1.25	34.28±0.04	Антагонизам	0.20
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	63.33±0.12	36.67±0.06	66.02±0.00	Адитивни	0.55
		72 h	56.76±1.36	43.24±0.76	78.53±0.29	Адитивни	0.55
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Pt(IV) комплекс 2	24 h	89.64±1.03	10.36±0.76	36.19±0.75	Антагонизам	0.28
		72 h	99.99±3.6	0.01±0.009	17.72±0.45	Антагонизам	0.0005
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	86.05±1.50	13.95±0.76	38.97±0.55	Антагонизам	0.35
		72 h	64.81±1.94	35.19±0.87	17.72±0.13	Синергизам	1.98
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	85.04±0.12	14.96±0.06	50.25±1.41	Антагонизам	0.29
		72 h	57.45±0.97	42.55±0.45	51.98±0.53	Адитивни	0.81
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	46.02±0.10	53.98±0.84	83.12±0.65	Адитивни	0.64
		72 h	16.79±0.82	83.21±0.39	96.23±0.42	Адитивни	0.86
<i>P. linteus</i> 10 µg/mL	Лиганд 2	24 h	99.99±1.60	0.01±0.001	20.07±0.56	Антагонизам	0.0004
		72 h	94.61±6.3	5.36±0.001	8.04±0.94	Адитивни	0.66
<i>P. linteus</i> 25 µg/mL		24 h	91.06±2.6	8.94±1.35	22.85±0.23	Антагонизам	0.39
		72 h	99.99±2.56	0.01±0.036	8.04±0.52	Антагонизам	0.001
<i>P. linteus</i> 50 µg/mL		24 h	92.83±0.75	7.17±0.036	34.13±0.64	Антагонизам	0.21
		72 h	92.37±2.3	7.63±1.20	42.30±0.24	Антагонизам	0.18
<i>P. linteus</i> 250 µg/mL		24 h	67.02±1.16	32.98±0.66	67.00±0.62	Антагонизам	0.49
		72 h	41.97±0.30	58.03±0.15	86.55±0.99	Адитивни	0.67

**Прилог 4. Ефекти третмана на тип ћелијске смрти НСТ-116 и SW-480 ћелија у комбинованим третманима.**

**Табела 13.** Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија након комбинованих третмана КТ-0h.

Време третмана	Ћлива	Концентрације (µg/mL)	10 µM	В	РА	КА	Н
		Контролне ћелије	0	97.42±3.65	2.58±0.41	0	0
24 h	<i>Phellinus linteus</i>	10	Цисплатина	63.99±0.48	24.22±0.72	9.8±0.82	1.99±0.18
		25		48.80±2.08	26.19±1.11	22.92±0.98	2.09±0.88
		50		40.21±1.28	29.01±0.13	24.79±0.99	5.99±0.73
		250		29.39±0.45	30.31±0.32	29.83±0.44	10.47±0.79
		10	Pt(IV) комплекс 1	62.17±3.08	30.38±0.99	6.93±0.56	0.52±0.08
		25		52.46±2.88	37.59±0.23	8.37±0.23	1.58±0.09
		50		47.48±1.01	38.64±0.52	11.88±0.12	2.00±0.21
		250		26.54±0.13	38.34±0.45	31.57±0.10	3.55±0.45
		10	Лиганд 1	66.68±4.01	20.00±0.22	10.77±0.72	2.55±0.00
		25		51.55±2.07	34.82±0.14	9.64±0.92	3.99±0.07
		50		35.71±1.55	44.58±2.88	12.23±0.99	7.48±0.78
		250		32.66±1.99	46.23±2.28	12.55±0.56	8.56±0.88
		10	Pt(IV) комплекс 2	58.08±4.08	35.85±1.00	5.07±0.55	1.00±0.00
		25		25.91±2.44	40.96±1.79	31.57±1.99	1.56±0.88
		50		18.38±1.08	43.10±1.99	36.64±1.00	1.88±0.99
		250		12.48±0.98	33.35±1.55	43.48±2.98	10.69±1.00
		10	Лиганд 2	57.56±4.99	29.88±1.77	10.92±0.99	1.64±0.55
		25		53.35±4.00	33.04±1.88	13.61±0.00	1.99±0.23
		50		47.84±3.01	38.92±2.55	11.16±0.19	2.08±0.99
		250		23.66±1.55	42.19±3.00	22.97±1.82	11.18±0.99
72 h	<i>Phellinus linteus</i>	Контролне ћелије	0	95.44±1.36	4.56±0.03	0	0
		10	Цисплатина	50.18±4.08	30.81±2.00	12.02±0.93	6.99±0.07
		25		48.80±2.11	35.21±1.88	13.81±0.47	2.18±0.11
		50		25.24±1.99	37.98±1.76	27.79±0.88	8.99±0.29
		250		16.47±0.99	38.94±1.46	32.96±0.99	11.63±0.41
		10	Pt(IV) комплекс 1	57.59±3.08	32.42±1.07	8.43±0.99	1.56±1.08
		25		40.10±2.81	48.12±1.44	8.79±1.99	3.00±0.49
		50		30.67±2.59	44.07±2.00	21.39±3.85	3.87±0.99
		250		22.26±2.10	30.12±2.77	31.63±2.56	15.99±1.98
		10	Лиганд 1	62.95±4.28	29.98±1.08	4.08±0.38	2.99±0.98
		25		41.02±5.15	37.49±1.45	13.73±0.99	7.76±0.79
		50		24.01±0.14	39.48±0.59	28.02±0.46	8.49±0.75
		250		15.73±0.88	24.63±0.45	44.17±0.75	15.47±0.11
		10	Pt(IV) комплекс 2	42.00±0.45	52.99±3.08	2.03±0.11	3.98±0.09
		25		13.39±0.18	56.87±0.13	17.96±0.08	11.78±0.07
		50		10.25±0.99	22.28±0.46	55.27±0.79	12.20±0.11
		250		8.22±0.01	10.22±0.23	60.53±0.94	21.04±0.08
		10	Лиганд 2	43.78±0.79	39.14±0.08	13.61±0.83	3.47±0.01
		25		18.62±0.51	59.19±0.73	18.05±0.59	4.14±0.02
		50		13.72±0.19	60.00±0.51	18.39±0.79	7.89±0.00
250	11.23±0.16	38.84±0.99		26.92±0.54	23.01±0.46		

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка



Табела 14. Проенти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија након комбинованих третмана КТ-6h.

Време третмана	Гљива	Концентрације (µg/mL)	10 µM	В	РА	КА	Н
		Контролне ћелије	0	97.42±3.65	2.58±0.41	0	0
24 h	<i>Phellinus linteus</i>	10	Цисплатина	53.50±4.55	29.07±1.44	16.61±0.99	0.82±0.00
		25		45.44±3.99	33.97±1.88	19.63±0.89	0.96±0.00
		50		23.68±2.00	35.56±2.55	34.21±2.61	6.55±0.00
		250		20.88±1.09	12.82±0.99	58.09±3.76	8.21±0.00
		10	Pt(IV) комплекс 1	48.66±3.56	21.89±1.19	24.36±1.46	4.09±0.01
		25		42.39±2.38	26.57±1.88	25.05±1.23	5.99±0.04
		50		20.50±1.56	33.51±1.43	35.02±2.76	10.97±0.08
		250		19.89±1.08	32.77±2.14	34.38±2.10	12.96±0.99
		10	Лиганд 1	36.40±2.56	19.74±1.01	40.30±3.88	3.56±0.00
		25		26.85±1.12	26.59±1.99	41.23±3.44	5.33±0.59
		50		22.60±1.00	29.08±2.43	41.54±3.59	6.14±0.06
		250		10.53±0.99	9.89±0.02	60.64±4.51	18.94±1.08
		10	Pt(IV) комплекс 2	37.44±0.08	29.01±0.08	31.77±0.08	1.78±0.08
		25		31.99±0.08	33.78±0.08	31.80±0.08	2.43±0.08
		50		20.07±0.08	34.88±0.08	39.28±0.08	5.78±0.08
		250		9.02±0.08	23.47±0.08	53.77±0.08	13.74±0.08
		10	Лиганд 2	22.21±2.00	36.02±2.07	37.05±2.11	4.72±0.49
		25		20.17±1.47	30.24±1.56	41.59±4.00	8.00±0.58
		50		19.56±1.00	28.15±1.50	41.10±1.55	11.19±0.91
		250		10.01±0.99	34.91±2.77	40.12±2.11	14.96±0.99
72 h	<i>Phellinus linteus</i>	Контролне ћелије	0	95.44±1.36	4.56±0.03	0	0
		10	Цисплатина	27.54±0.77	21.89±0.73	48.88±0.88	1.69±0.00
		25		16.82±0.19	23.96±0.59	55.21±1.83	4.01±0.01
		50		12.81±0.72	24.98±0.48	55.15±2.09	7.06±0.09
		250		10.71±0.82	15.00±0.78	65.19±3.75	9.10±0.88
		10	Pt(IV) комплекс 1	28.51±0.88	32.04±0.08	30.86±0.83	8.59±0.54
		25		24.36±0.79	27.96±0.16	38.55±0.29	9.13±0.07
		50		19.26±0.12	22.89±0.07	45.89±0.75	11.96±0.99
		250		15.17±0.12	23.05±0.56	45.22±0.44	16.59±0.39
		10	Лиганд 1	27.35±1.55	23.08±1.77	43.06±2.11	6.51±0.06
		25		25.10±1.00	21.95±1.99	44.83±3.99	8.12±0.88
		50		20.14±0.99	23.16±2.55	45.77±2.08	10.96±0.92
		250		8.60±0.53	20.00±1.14	31.42±0.56	24.49±0.79
		10	Pt(IV) комплекс 2	17.53±0.99	32.59±1.00	45.89±1.88	3.99±0.01
		25		7.62±0.79	33.01±1.01	51.36±1.66	5.01±0.05
		50		5.93±0.59	20.17±1.77	64.45±1.99	9.45±0.99
		250		4.11±0.46	6.92±0.00	65.08±1.79	23.89±1.45
		10	Лиганд 2	21.00±1.22	35.43±0.86	36.68±1.56	6.89±0.66
		25		19.51±0.99	27.70±0.99	43.56±2.99	9.23±0.99
		50		15.52±0.95	32.08±1.08	45.11±2.55	11.29±0.15
250	7.12±0.07	20.42±1.55		47.23±2.08	25.23±1.99		

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табела 17. Проенти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након комбинованих третмана КТ-0h.

Време третмана	Ѓљива	Концентрације (µg/mL)	10 µM	В	РА	КА	Н
		Контролне ћелије	0	97.09±2.41	2.91±0.08	0	0
24 h	<i>Phellinus linteus</i>	10	Цисплатина	61.23±5.99	28.42±1.00	9.26±0.98	1.09±0.07
		25		52.28±3.18	29.12±1.98	14.90±0.44	3.70±0.00
		50		47.21±3.00	31.20±2.45	16.60±0.33	4.99±0.94
		250		19.88±1.11	15.92±0.99	58.21±4.66	5.99±1.81
		10	Pt(IV) комплекс 1	55.69±3.38	44.21±3.73	0	0
		25		39.39±2.29	49.18±2.47	10.44±1.00	0.99±0.00
		50		28.13±1.64	51.08±3.05	19.01±1.72	1.78±0.00
		250		15.02±1.00	33.00±2.77	49.89±3.99	2.09±0.98
		10	Лиганд 1	88.78±6.59	11.22±1.00	0	0
		25		72.59±5.00	27.41±1.02	0	0
		50		68.83±6.57	31.17±1.00	0	0
		250		29.98±1.83	33.89±2.53	33.14±2.00	2.99±0.99
		10	Pt(IV) комплекс 2	62.97±5.08	21.72±1.08	14.53±0.98	0.78±0.00
		25		47.55±2.08	34.99±2.08	14.91±0.58	2.55±0.29
		50		40.06±2.08	38.23±2.08	17.62±0.44	4.09±0.22
		250		20.10±1.08	24.39±1.08	49.51±3.59	6.00±0.66
		10	Лиганд 2	80.99±7.39	19.01±1.59	0	0
		25		72.96±5.19	27.04±1.43	0	0
		50		68.09±4.44	31.91±1.00	0	0
		250		37.62±2.93	33.58±1.49	21.90±0.88	6.90±0.08
72 h	<i>Phellinus linteus</i>	Контролне ћелије	0	94.00±2.59	6.00±0.03	0	0
		10	Цисплатина	51.09±4.08	29.66±1.54	18.20±0.98	1.05±0.08
		25		44.50±4.66	32.14±2.33	19.81±0.08	3.55±0.48
		50		35.47±2.43	36.01±2.88	22.45±0.28	6.07±0.55
		250		4.69±0.09	17.44±0.18	60.98±4.11	16.89±0.50
		10	Pt(IV) комплекс 1	48.55±4.96	51.45±3.85	0	0
		25		39.46±1.60	52.69±3.11	5.86±0.56	1.99±0.00
		50		24.76±1.72	55.07±1.07	17.18±0.99	2.99±0.00
		250		10.80±0.56	8.25±0.45	61.90±5.22	19.05±0.48
		10	Лиганд 1	87.01±0.18	12.99±0.53	0	0
		25		68.94±2.00	31.06±0.49	0	0
		50		59.07±1.00	40.93±0.66	0	0
		250		23.86±0.01	22.35±0.41	35.2±0.49	18.59±0.18
		10	Pt(IV) комплекс 2	38.19±1.66	22.88±0.78	35.92±0.91	3.01±0.00
		25		29.56±1.49	29.88±0.55	33.59±0.24	6.97±0.00
		50		20.56±1.00	20.18±0.56	45.36±0.56	13.90±0.55
		250		8.86±0.00	10.00±0.00	58.41±0.44	22.70±0.80
		10	Лиганд 2	72.10±0.99	27.90±0.50	0	0
		25		68.26±0.47	31.74±0.33	0	0
		50		49.72±0.82	38.01±0.49	10.18±0.19	2.09±0.45
250	8.29±0.00	25.00±0.56		50.83±0.00	15.88±0.10		

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табела 18. Проенти живих, апоптотских и некротских SW-480 ћелија након комбинованих третмана КТ-6h.

Време третмана	Гљива	Концентрације (µg/mL)	10 µM	В	РА	КА	Н
		Контролне ћелије	0	97.09±2.41	2.91±0.08	0	0
24 h	<i>Phellinus linteus</i>	10	Цисплатина	54.67±4.09	30.25±2.79	12.99±0.99	2.09±0.00
		25		52.66±3.01	36.01±2.18	8.45±0.08	2.88±0.00
		50		35.90±2.59	41.25±1.09	18.82±0.78	4.03±0.01
		250		21.24±1.82	20.00±0.99	50.67±1.18	8.09±0.68
		10	Pt(IV) комплекс 1	47.51±3.53	46.89±3.08	5.6±0.58	0
		25		35.94±2.59	49.01±3.59	11.90±0.99	3.15±0.02
		50		29.45±1.00	51.00±4.86	15.80±0.56	3.75±0.28
		250		19.39±0.99	25.25±1.53	46.32±3.25	9.04±0.98
		10	Лиганд 1	82.24±6.82	15.76±0.55	2.00±0.00	0
		25		70.91±6.73	23.09±0.26	5.03±0.58	0.97±0.00
		50		62.35±5.24	28.00±0.82	7.88±0.99	1.77±0.08
		250		38.64±2.53	31.23±2.56	19.12±1.00	10.99±0.74
		10	Pt(IV) комплекс 2	53.75±4.58	35.89±1.55	10.00±0.99	0.36±0.08
		25		46.90±3.88	39.15±1.08	11.90±0.18	2.05±0.18
		50		36.88±2.18	48.12±2.51	10.76±0.12	4.20±0.58
		250		26.02±1.58	20.00±1.00	44.93±2.45	9.05±0.99
		10	Лиганд 2	75.00±6.09	25.00±1.29	0	0
		25		52.07±4.00	38.99±1.85	7.94±0.96	1.00±0.08
		50		50.82±4.68	42.01±2.13	5.16±0.05	2.01±0.02
		250		37.02±2.18	30.00±2.86	21.66±1.85	11.32±0.99
72 h	<i>Phellinus linteus</i>	Контролне ћелије	0	94.00±2.59	6.00±0.03	0	0
		10	Цисплатина	20.64±0.58	33.21±0.93	43.37±0.46	2.78±0.01
		25		18.12±0.21	30.16±0.88	47.50±0.88	4.22±0.00
		50		13.15±0.63	30.00±0.14	51.85±0.23	5.00±0.01
		250		8.45±0.00	10.50±0.00	65.15±0.49	15.90±0.72
		10	Pt(IV) комплекс 1	41.86±0.08	50.91±0.75	6.00±0.63	1.23±0.88
		25		26.17±0.42	52.59±0.82	16.23±0.49	5.01±0.91
		50		17.01±0.42	52.04±0.55	24.22±0.58	6.73±0.36
		250		9.83±0.17	10.24±0.49	62.93±0.74	17.00±0.52
		10	Лиганд 1	75.99±0.47	24.01±0.08	0	0
		25		60.4±0.82	30.88±0.19	6.72±0.00	2.00±0.00
		50		55.85±0.59	37.09±0.21	4.18±0.10	2.88±0.00
		250		18.86±0.46	37.60±0.46	23.23±0.47	20.01±0.58
		10	Pt(IV) комплекс 2	57.34±0.04	42.66±0.74	0	0
		25		19.82±0.19	44.99±0.22	30.29±0.85	4.90±0.19
		50		17.45±0.85	40.00±0.46	34.55±0.66	8.00±0.64
		250		9.87±0.99	6.92±0.53	60.59±0.19	22.62±0.32
		10	Лиганд 2	63.09±0.48	31.56±0.49	4.39±0.23	1.00±0.00
		25		56.70±0.42	36.30±0.31	5.91±0.08	1.09±0.00
		50		45.25±0.96	47.12±0.59	4.86±0.00	2.77±0.08
250	17.35±0.80	24.62±0.50		32.73±0.79	25.30±0.57		

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка.

### Прилог 5. Концентрација супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама у појединачним и комбинованим третманима после 24 и 72 сата

**Табела 19.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

Хемијско једињење	24 h				
	Концентрација ( $\mu$ M)				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	17.80±0.09	17.99±0.01	18.06±0.98	18.46±0.04*	18.22±0.80*
Pt(IV) комплекс 1		17.66±0.95	18.42±0.38*	19.69±0.47*	17.27±0.01
Лиганд 1		17.26±0.82	18.02±0.12	18.13±0.11	18.11±0.25
Pt(IV) комплекс 2		19.25±0.08*	19.62±0.02*	19.99±0.01*	17.07±0.03
Лиганд 2		19.66±0.77*	19.88±0.00*	21.09±0.12*	21.27±0.19*
72 h					
Цисплатина	23.02±0.01	20.89±0.00	20.97±0.85*	22.51±0.09	22.98±0.16
Pt(IV) комплекс 1		22.15±0.48	22.93±0.14	22.98±0.14	22.49±0.85
Лиганд 1		23.66±0.01	23.47±0.08	23.59±0.12	23.96±0.06
Pt(IV) комплекс 2		23.52±0.14	24.59±0.17*	25.11±0.25*	26.59±0.23*
Лиганд 2		24.84±0.16*	25.77±0.49*	26.96±0.11*	27.01±0.49*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 20.** Ефекти испитиваних хемијских једињења на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

Хемијско једињење	24 h				
	Концентрација ( $\mu$ M)				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	18.04±0.08	17.12±0.00	17.89±0.00*	18.17±0.19	18.55±0.59
Pt(IV) комплекс 1		18.24±0.59	18.01±0.25	19.36±0.14*	19.27±0.71*
Лиганд 1		18.26±0.01	18.85±0.87	19.18±0.14*	19.24±0.02*
Pt(IV) комплекс 2		22.25±0.08*	23.62±0.02*	23.99±0.01*	24.07±0.03*
Лиганд 2		19.26±0.77*	19.55±0.00*	20.09±0.87*	22.87±0.01*
72 h					
Цисплатина	24.02±0.01	20.89±0.00	20.97±0.85*	22.51±0.09	22.98±0.16
Pt(IV) комплекс 1		22.15±0.48	22.93±0.14	22.98±0.14	22.49±0.85
Лиганд 1		23.66±0.01	23.47±0.08	23.59±0.12	23.96±0.06
Pt(IV) комплекс 2		23.52±0.14	24.59±0.17*	25.11±0.25*	26.59±0.23*
Лиганд 2		24.84±0.16*	25.77±0.49*	26.96±0.11*	27.01±0.49*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 21.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	17.80±0.89	19.02±0.17*	19.61±0.12*	19.48±0.32*	18.98±0.28*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		23.79±0.16*	22.63±0.10*	21.96±0.09*	18.81±0.36*
<i>Lentinus edodes</i>	М		25.38±0.35*	23.20±0.23*	22.31±0.05*	21.05±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		19.66±0.38*	19.62±0.22*	19.59±0.11*	17.27±0.13
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		21.26±0.83*	20.74±0.17*	18.42±0.09*	18.34±0.74*
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	24.99±0.28	24.08±0.77	27.74±0.77*	27.86±0.91*	25.50±0.35
	А		23.55±0.05*	25.87±0.45	25.90±0.65	25.92±0.33
	ЕА		26.34±0.77*	26.45±0.87*	26.48±0.81*	29.21±0.35*
<i>Platismatia glauca</i>	М		22.00±0.52*	26.52±0.27*	26.72±0.66*	26.56±0.44*
	А		24.13±0.47	25.54±0.40	27.29±0.43*	28.28±0.36*
	ЕА		26.32±0.08*	26.52±0.17*	26.72±0.41*	26.56±0.27*
Гљива	Врста екстракта		72 h			
<i>Phellinus linteus</i>	М	23.02±0.01	19.56±0.27*	19.96±0.04*	20.52±0.69*	20.45±0.13*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		17.79±0.16*	17.63±0.10*	20.96±0.09*	20.81±0.36*
<i>Lentinus edodes</i>	М		15.39±0.85*	13.28±0.03*	12.86±0.81*	11.23±0.78*
<i>Coprinus comatus</i>	М		16.82±0.13*	16.29±0.26*	16.09±0.16*	17.07±0.99*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		20.06±0.99*	19.99±0.12*	18.01±0.81*	17.96±0.24*
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	21.66±0.37	21.86±0.48	22.50±0.33	25.06±0.22*	26.94±0.35*
	А		19.92±0.38*	19.96±0.26*	20.90±0.40	25.66±0.30*
	ЕА		23.76±0.48*	24.68±0.33*	28.98±0.22*	29.18±0.35*
<i>Platismatia glauca</i>	М		20.60±0.25*	21.94±0.38	24.22±0.11*	26.38±0.34*
	А		23.74±0.40*	24.34±0.56*	26.74±0.26*	27.16±0.35*
	ЕА		20.60±0.44*	21.94±0.31	24.22±0.20*	26.38±0.08*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 22.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^-$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	18.04±0.08	23.26±0.74*	22.37±1.12*	21.51±0.56*	19.65±0.08*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		17.38±0.15	18.28±0.11	18.87±0.26	18.97±0.11
<i>Lentinus edodes</i>	М		17.97±0.30	18.92±0.17	18.80±0.01	18.25±0.09
<i>Coprinus comatus</i>	М		20.92±0.30*	19.92±0.34*	18.72±0.00	18.60±0.21
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		20.33±0.47*	19.39±0.08*	18.96±0.15	18.11±0.14
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	26.74±0.17	23.99±0.73*	27.99±0.65*	28.23±0.80*	29.33±0.03*
	А		23.68±0.70*	27.22±0.28	27.30±0.84	30.17±0.77*
	ЕА		24.12±0.32*	24.68±0.55*	25.96±0.42	34.29±1.01*
<i>Platismatia glauca</i>	М		22.78±0.08*	23.48±0.36*	25.62±0.35*	29.74±0.65*
	А		23.68±0.70	27.22±0.28	27.30±0.84	30.17±0.77*
	ЕА		23.72±0.67*	24.65±0.35*	27.21±0.88	28.78±0.35*

Гљива	Врста екстракта	72 h				
<i>Phellinus linteus</i>	М	24.02±0.01	24.01±0.38	23.58±0.17	22.09±0.02*	21.90±0.04*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		24.59±0.81	23.71±1.98	23.51±0.59	21.82±0.12*
<i>Lentinus edodes</i>	М		19.83±0.78*	19.58±0.47*	18.51±0.00*	18.00±0.00*
<i>Coprinus comatus</i>	М		19.07±0.11*	18.99±0.17*	18.20±0.09*	18.05±0.37*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		20.00±0.01*	19.51±0.67*	19.02±0.46*	18.33±0.59*
Лишај	Врста екстракта	28.57±0.37				
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М		24.00±0.25*	30.96±0.06*	30.77±0.80*	33.83±0.71*
	А		24.18±0.85*	27.20±0.28*	32.24±0.75*	32.50±0.09*
	ЕА		25.63±0.41*	25.95±0.77*	33.60±0.42*	34.38±0.89*
<i>Platismatia glauca</i>	М		19.76±0.01*	27.24±0.60*	30.25±0.40*	30.53±0.47*
	А		24.18±0.85	27.20±0.28*	32.24±0.75*	32.50±0.09*
	ЕА	15.02±0.49*	32.11±0.72*	33.93±0.82*	34.35±0.49*	

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 23.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анион радикала ( $O_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

		24 h				
Хемијско једињење (10 $\mu$ M)		<i>Phellinus linteus</i> ( $\mu$ g/mL)				
		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	17.80±0.89	17.02±0.17	21.64±0.04*	22.57±0.10*	19.28±0.66*
	Pt(IV) комплекс 1		19.37±0.10*	20.28±0.23*	22.18±0.45*	17.77±0.45
	Лиганд 1		18.98±0.75*	22.83±0.19*	22.09±0.10*	19.50±0.62*
	Pt(IV) комплекс 2		22.18±0.45*	30.86±1.53*	29.09±0.41*	24.34±0.45*
	Лиганд 2		19.93±0.36*	21.66±0.15*	21.38±0.21*	18.42±0.36
КТ 6 h	Цисплатина		21.34±0.67*	22.14±0.06*	24.32±0.04*	19.98±0.32*
	Pt(IV) комплекс 1		20.69±0.95*	21.79±0.19*	23.11±0.56*	16.20±0.56*
	Лиганд 1		20.47±0.00*	22.76±0.08*	22.14±0.15*	19.24±0.32*
	Pt(IV) комплекс 2		23.11±0.08*	25.16±0.32*	30.02±0.04*	19.28±0.36*
	Лиганд 2		18.59±0.28	21.25±0.56*	22.46±1.12*	18.77±0.79
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	23.02±0.00	17.70±0.27*	18.28±0.12*	19.98±0.45*	21.98±0.15*
	Pt(IV) комплекс 1		18.01±0.12*	18.86±0.32*	19.54±0.08*	21.28±0.08*
	Лиганд 1		22.33±0.51	22.22±0.62	20.53±0.17*	20.26±0.23*
	Pt(IV) комплекс 2		17.90±0.15*	18.85±0.23*	20.30±0.19*	22.44±0.28
	Лиганд 2		18.18±0.12*	18.29±0.15*	19.69±0.60*	20.49±0.17*
КТ 6 h	Цисплатина		17.85±0.21*	19.22±0.15*	20.32±0.04*	21.77±0.36*
	Pt(IV) комплекс 1		18.90±0.19*	18.34±0.97	18.42±0.08*	21.26±0.67*
	Лиганд 1		19.33±0.15*	19.25±0.06*	20.25±0.15*	20.70±0.06*
	Pt(IV) комплекс 2		19.34±0.15*	18.48±0.04*	18.07±0.28*	20.70±0.28*
	Лиганд 2		17.12±0.32*	19.63±0.61*	20.93±0.49*	21.01±0.79*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

Табела 24. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију супероксид анјон радикала ( $O_2^{\cdot-}$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

		24 h				
Хемијско једињење (10 $\mu$ M)		<i>Phellinus linteus</i> ( $\mu$ g/mL)				
		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	18.04±0.08	17.70±0.11	18.41±0.12	19.94±0.06*	20.69±0.08*
	Pt(IV) комплекс 1		18.00±0.28	19.44±0.08*	19.85±0.159*	21.89±0.06*
	Лиганд 1		18.90±0.23	19.81±0.28*	19.94±0.23*	21.26±0.08*
	Pt(IV) комплекс 2		20.18±0.73*	20.88±0.00*	21.53±0.21*	22.39±0.04*
	Лиганд 2		19.73±0.43*	19.32±0.00*	20.43±0.32*	21.01±0.21*
КТ 6 h	Цисплатина		19.41±0.23*	19.26±0.00*	19.61±0.43*	21.26±0.04*
	Pt(IV) комплекс 1		19.85±0.10*	20.85±0.15*	21.66±0.12*	22.60±0.28*
	Лиганд 1		18.40±0.04*	19.73±0.06*	19.95±0.23*	20.78±0.12*
	Pt(IV) комплекс 2		20.71±0.23*	21.33±0.02*	21.73±0.06*	23.82±0.10*
	Лиганд 2		19.86±0.10*	20.77±0.10*	21.38±0.23*	22.21±1.03*
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	23.02±0.01	15.46±0.34*	17.19±0.08*	21.57±0.45*	22.85±0.86
	Pt(IV) комплекс 1		21.81±0.30*	23.86±0.70	24.66±1.70*	30.93±0.00*
	Лиганд 1		12.05±0.38*	15.66±0.69*	18.18±0.18*	18.46±0.58*
	Pt(IV) комплекс 2		23.93±0.30	22.63±0.43	26.71±0.66*	29.05±0.23*
	Лиганд 2		12.65±0.38*	17.79±0.00*	21.38±0.08*	21.88±0.84
КТ 6 h	Цисплатина		16.48±0.23*	18.12±0.41*	20.77±0.12*	20.67±0.10*
	Pt(IV) комплекс 1		34.02±0.54*	30.30±0.32*	21.51±0.25*	21.62±0.19*
	Лиганд 1		13.91±0.12*	16.52±0.32*	17.30±0.57*	17.79±0.17*
	Pt(IV) комплекс 2		36.20±0.04*	31.86±0.28*	25.55±0.49*	23.11±0.56
	Лиганд 2		17.12±0.32*	19.63±0.61*	20.93±0.49*	21.01±0.79*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

### Прилог 6. Концентрација нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима

**Табела 25.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ , nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

24 h					
Хемијско једињење	Концентрација ( $\mu\text{M}$ )				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	11.83±0.06	11.49±0.12	11.66±0.98	12.04±0.82	12.22±0.80
Pt(IV) комплекс 1		11.66±0.38	11.62±0.32	11.99±0.01	12.27±0.03
Лиганд 1		12.06±0.13	11.12±0.22	11.09±0.11	10.15±0.00*
Pt(IV) комплекс 2		13.66±0.07*	13.82±0.54*	14.89±0.47*	14.97±0.89*
Лиганд 2		15.06±0.86*	15.57±0.85*	15.59±0.78*	16.99±0.04*
72 h					
Цисплатина	12.38±0.00	12.47±0.47	12.66±0.04	12.77±0.28	13.00±0.00*
Pt(IV) комплекс 1		12.05±0.12	12.44±0.78	12.87±0.14	13.33±0.25*
Лиганд 1		13.13±0.96	13.45±0.49*	14.13±0.47*	14.16±0.85*
Pt(IV) комплекс 2		14.25±0.16*	15.31±0.85*	15.48±0.47*	16.16±0.14*
Лиганд 2		14.44±0.86*	15.29±0.47*	16.32±0.45*	17.25±0.25*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 26.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ , nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

24 h					
Хемијско једињење	Концентрација ( $\mu\text{M}$ )				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	11.14±0.28	11.54±0.02	12.00±0.11	12.07±0.08	12.10±0.00
Pt(IV) комплекс 1		11.94±0.22	12.02±0.22	12.19±0.21	10.96±0.24
Лиганд 1		11.06±0.03	11.78±0.12	11.85±0.45*	10.89±0.00
Pt(IV) комплекс 2		13.96±0.07*	14.82±0.54*	15.09±0.47*	15.97±0.89*
Лиганд 2		12.82±0.71*	12.57±0.28*	12.49±0.23*	15.97±0.89*
72 h					
Цисплатина	13.32±0.00	13.49±0.85	13.91±0.05	14.06±0.99	14.19±0.82
Pt(IV) комплекс 1		14.09±0.48	14.11±0.65	14.46±0.59*	14.99±0.21*
Лиганд 1		12.40±0.58	12.45±0.26	13.58±0.95	14.59±0.69*
Pt(IV) комплекс 2		15.06±0.58*	16.11±0.45*	16.69±0.17*	16.99±0.98*
Лиганд 2		14.89±0.08*	15.52±0.23*	15.76±0.95*	15.91±0.54*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.



**Табела 27.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ ) у НСТ-116 хелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	11.83±0.06	13.26±0.00*	13.14±0.49*	12.71±1.00	10.65±0.06*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		13.62±0.16*	13.60±0.10*	12.99±0.09*	12.31±0.34
<i>Lentinus edodes</i>	М		11.10±0.35	11.59±0.23	11.91±0.05	12.65±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		11.58±0.71	11.76±0.01	12.19±0.99	12.41±0.00
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		11.73±0.16	11.65±0.10	12.27±0.09	12.33±0.36
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	12.60±0.12	10.83±0.10*	12.24±0.57	12.06±0.25	12.56±0.12
	А		11.31±0.22*	11.44±0.36*	11.97±0.53	13.67±0.35*
	ЕА		14.23±0.28*	13.14±0.43*	11.76±0.07*	11.76±0.05*
<i>Platismatia glauca</i>	М		13.19±0.38	13.22±0.91	12.65±0.68	12.02±0.08
	А		12.75±0.06	11.97±0.13	11.53±0.10*	11.50±0.10*
	ЕА		11.28±0.16*	11.33±0.24*	11.39±0.27*	11.99±0.07
Гљива	Врста екстракта		72 h			
<i>Phellinus linteus</i>	М	12.38±0.00	13.59±0.16*	14.04±0.10*	14.74±0.09*	12.48±0.36
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		14.56±0.28*	14.69±0.91*	15.09±0.24*	15.81±0.85*
<i>Lentinus edodes</i>	М		11.89±0.35	12.82±0.23	12.91±0.05	13.47±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		12.56±0.38	12.85±0.22	12.99±0.11	13.71±0.13*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		11.87±0.71	11.95±0.59	12.77±0.08	12.99±0.04
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	13.17±0.16	10.52±0.47*	10.61±0.30*	11.90±0.25	12.95±0.29*
	А		11.92±0.21	11.79±0.24	10.98±0.50	10.50±0.13*
	ЕА		12.09±0.62	11.83±0.10	11.66±0.28	10.89±0.38
<i>Platismatia glauca</i>	М		10.17±0.13*	10.69±0.29*	10.84±0.39*	12.09±0.25
	А		12.65±0.48*	12.11±0.15	11.79±0.24	11.41±0.03
	ЕА		10.61±0.21*	10.83±0.21*	10.90±0.22	11.95±0.19

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 28.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ ) у SW-480 хелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	11.83±0.06	9.56±0.27*	9.96±0.04*	10.52±0.69	10.45±0.13
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		10.70±0.00	10.25±0.10	10.20±0.09	10.15±0.59*
<i>Lentinus edodes</i>	М		10.51±0.35	10.04±0.23*	9.65±0.05*	9.36±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		10.54±0.30	10.44±0.71	10.18±0.58*	9.21±0.12*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		10.59±0.82	10.77±0.19	11.07±0.04	11.09±0.14
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	12.60±0.12	12.85±0.17	13.08±0.16	13.03±0.01	13.02±0.01
	А		12.35±0.10*	12.60±0.22	12.74±0.16	17.71±0.15*
	ЕА		13.09±0.51	13.79±0.30	14.19±0.28*	15.89±0.57*
<i>Platismatia glauca</i>	М		11.35±0.25*	11.46±0.15*	11.50±0.14*	12.33±0.04*
	А		12.49±0.12	12.43±0.17	11.76±0.10*	11.50±0.10*
	ЕА		12.13±0.41*	13.13±0.16	13.38±0.25	12.19±0.14*

Гљива	Врста екстракта	72 h				
<i>Phellinus linteus</i>	М	13.32±0.00	13.59±0.16	14.04±0.10	14.74±0.09*	12.48±0.36
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		14.56±0.28*	14.69±0.91*	15.09±0.24*	15.81±0.85*
<i>Lentinus edodes</i>	М		11.89±0.35*	12.82±0.23	12.91±0.05	13.47±0.28
<i>Coprinus comatus</i>	М		12.56±0.38	12.85±0.22	12.99±0.11	13.71±0.13
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		11.87±0.71*	11.95±0.59*	12.77±0.08	12.99±0.04
Лишај	Врста екстракта	13.35±0.16				
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М		10.52±0.47*	10.61±0.30*	11.90±0.25	12.95±0.29*
	А		11.92±0.21	11.79±0.24	10.98±0.50	10.50±0.13*
	ЕА		12.09±0.62	11.83±0.10	11.66±0.28	10.89±0.38
<i>Platismatia glauca</i>	М		10.17±0.13*	10.69±0.29*	10.84±0.39*	12.09±0.25
	А		12.65±0.48*	12.11±0.15	11.79±0.24	11.41±0.03
	ЕА	10.61±0.21*	10.83±0.21*	10.90±0.22	11.95±0.19	

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 29.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ ) у НСТ-116 ћелијама.

		24 h				
		<i>Phellinus linteus</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )				
Хемијско једињење (10 $\mu\text{M}$ )		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	11.83±0.06	12.11±0.04	15.65±0.76*	14.21±0.13*	13.76±0.04*
	Pt(IV) комплекс 1		11.88±0.17	11.70±0.04	12.06±0.06	12.58±0.07
	Лиганд 1		12.02±0.00	12.69±0.49	12.82±0.02	17.81±0.11*
	Pt(IV) комплекс 2		11.59±0.11	11.77±0.00	11.97±0.00	12.85±0.02*
	Лиганд 2		14.57±0.40*	16.71±0.76*	16.81±0.89*	17.99±0.67*
КТ 6 h	Цисплатина		11.32±0.02	11.64±0.15	11.97±0.17	12.87±0.31*
	Pt(IV) комплекс 1		13.11±0.15*	13.39±0.09*	13.73±0.02*	13.81±0.49*
	Лиганд 1		11.23±0.15	11.23±0.02	14.01±0.34*	16.99±0.09*
	Pt(IV) комплекс 2		13.43±0.02*	13.00±0.04*	12.46±0.04	12.12±0.29
	Лиганд 2		12.19±0.07	14.86±0.02*	16.90±0.09*	17.51±0.71*
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	12.38±0.00	12.78±0.04	12.84±0.09	13.16±0.02	15.04±0.20*
	Pt(IV) комплекс 1		11.92±0.06	11.94±0.08	12.17±0.00	12.44±0.02
	Лиганд 1		12.42±0.00	12.65±0.13	12.91±0.08	13.93±0.06*
	Pt(IV) комплекс 2		11.83±0.08*	12.19±0.02	14.88±0.20*	16.26±0.02*
	Лиганд 2		14.93±0.04*	15.93±0.63*	16.60±0.13*	17.05±0.11*
КТ 6 h	Цисплатина		11.76±0.13	11.88±0.13	12.01±0.04	13.94±0.49*
	Pt(IV) комплекс 1		12.78±0.22	13.06±0.04	14.08±0.24*	14.12±0.07*
	Лиганд 1		12.08±0.06	12.44±0.00	13.30±0.04*	14.19±0.04*
	Pt(IV) комплекс 2		13.60±0.38*	14.06±0.31*	14.55±0.22*	16.68±0.00*
	Лиганд 2		15.63±0.45*	16.39±0.18*	17.17±0.09*	17.39±0.13*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

Табела 30. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\mu\text{mol/mL}$ ) у SW-480 ћелијама.

		24 h				
Хемијско једињење (10 $\mu\text{M}$ )		<i>Phellinus linteus</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	11.14±0.28	11.39±0.31	12.53±0.02*	12.65±0.06*	12.44±0.45*
	Pt(IV) комплекс 1		12.37±0.04*	12.77±0.11*	12.71±0.09*	12.56±0.09*
	Лиганд 1		11.30±0.45	11.90±0.20	12.27±0.09*	12.50±0.15*
	Pt(IV) комплекс 2		13.26±0.24*	14.30±0.13*	15.99±0.09*	16.03±0.26*
	Лиганд 2		13.52±0.07*	13.89±0.5*	13.95±0.09*	16.79±0.16*
КТ 6 h	Цисплатина		11.46±0.20*	13.12±0.20*	13.56±0.29*	12.72±0.22*
	Pt(IV) комплекс 1		13.01±0.24*	13.72±0.09*	13.25±0.02*	13.79±0.70*
	Лиганд 1		11.79±0.11	11.89±0.11	12.44±0.00*	12.96±0.22*
	Pt(IV) комплекс 2		13.17±0.09*	13.96±0.09*	16.14±0.22*	16.54±0.00*
	Лиганд 2		13.79±0.11*	14.38±0.02*	14.45±0.13*	16.10±0.11*
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	13.32±0.00	12.42±0.04	12.73±0.16	12.83±0.02	12.59±0.11
	Pt(IV) комплекс 1		12.49±0.09	12.80±0.04	12.77±0.24	12.89±0.48
	Лиганд 1		12.42±0.09	12.71±0.02	12.75±0.02	12.85±0.02
	Pt(IV) комплекс 2		14.14±0.02	14.32±0.06*	14.70±0.04*	16.24±0.22*
	Лиганд 2		13.59±0.18	13.90±0.18	13.78±0.48	16.39±0.09*
КТ 6 h	Цисплатина		11.03±0.08*	13.50±0.09	13.58±0.04	13.70±0.22
	Pt(IV) комплекс 1		13.10±0.24	13.43±0.20	13.88±0.20	13.92±0.02
	Лиганд 1		12.86±0.00	12.96±0.82	13.35±0.00	13.21±0.13
	Pt(IV) комплекс 2		13.59±0.18	13.68±0.09	14.79±0.07*	16.81±0.22*
	Лиганд 2		13.82±0.04	14.18±0.13	14.63±0.13*	16.70±0.07*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

### Прилог 7. Концентрација редукованог глутатиона (GSH) у НСТ-116 и SW-480 ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима

**Табела 31.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

Хемијско једињење	24 h				
	Концентрација (μM)				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	11.83±0.25	12.00±0.11	12.28±0.83	12.86±0.08	12.99±0.00*
Pt(IV) комплекс 1		14.09±0.45*	14.28±0.58*	14.56±0.77*	14.07±0.14*
Лиганд 1		14.66±0.78*	14.72±0.62*	14.89±0.14*	14.27±0.11*
Pt(IV) комплекс 2		13.86±0.39*	13.44±0.26*	13.99±0.63*	13.21±0.19*
Лиганд 2		13.95±0.96*	13.52±0.41*	13.09±0.92*	12.27±0.04
72 h					
Цисплатина	15.03±0.09	14.06±0.00	14.11±0.01	13.88±0.00*	13.60±0.99*
Pt(IV) комплекс 1		14.26±0.01	14.18±0.07	13.21±0.15*	11.90±0.21*
Лиганд 1		14.26±0.98	13.36±0.12*	12.41±0.54*	11.33±0.14*
Pt(IV) комплекс 2		10.93±0.11*	10.77±0.02*	10.55±0.17*	10.01±0.07*
Лиганд 2		10.92±0.14*	10.84±0.01	10.46±0.03*	10.24±0.14*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли.

**Табела 32.** Ефекти хемијских једињења на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

Хемијско једињење	24 h				
	Концентрација (μM)				
	0	10	25	50	100
Цисплатина	13.38±0.17	13.06±0.00	13.51±0.85	13.78±0.11	13.99±0.19
Pt(IV) комплекс 1		13.09±0.45	13.28±0.12	13.75±0.00	14.07±0.00
Лиганд 1		13.14±0.78	13.47±0.16	13.89±0.21	14.97±0.11
Pt(IV) комплекс 2		10.56±0.12*	10.44±0.59*	10.29±0.03*	10.01±0.02*
Лиганд 2		13.11±0.51	13.45±0.52	13.09±0.15	13.01±0.31
72 h					
Цисплатина	14.80±0.09	13.06±0.00	13.51±0.85	13.78±0.11	13.99±0.19
Pt(IV) комплекс 1		14.85±0.15	14.59±0.17	14.18±0.25	13.50±1.09*
Лиганд 1		15.96±0.38*	15.72±0.12	15.60±0.03	14.99±0.48
Pt(IV) комплекс 2		13.56±0.14*	13.22±0.48*	12.59±0.40*	10.20±0.29*
Лиганд 2		15.05±0.85	14.05±0.04	13.07±0.78	11.20±0.45*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли.

**Табела 33.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација (µg/mL)				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	11.83±0.25	15.91±0.50*	15.28±0.60*	13.98±1.05*	13.53±0.06*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		16.09±0.16*	14.38±0.10*	14.10±0.09*	14.08±0.36*
<i>Lentinus edodes</i>	М		11.60±0.35	12.51±0.23	14.60±0.05*	14.66±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		12.07±0.38	12.57±0.22	12.74±0.11	14.43±0.13*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		13.68±0.83*	13.76±0.17*	15.05±0.09*	15.03±0.74*
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	12.48±0.13	13.42±0.91	12.29±0.27	12.17±0.58	12.11±0.34
	А		31.14±0.50*	26.53±0.06*	24.71±0.82*	22.31±0.99*
	ЕА		12.96±0.61	12.61±0.56	12.91±0.24	9.92±0.31
<i>Platismatia glauca</i>	М		8.97±0.11*	9.02±0.40*	12.05±0.24	13.96±0.00
	А		13.51±0.66*	12.08±0.44	12.08±0.29	10.89±0.31*
	ЕА		11.05±0.79*	12.68±0.19	15.89±0.36*	16.13±0.93*
Гљива	Врста екстракта		72 h			
<i>Phellinus linteus</i>	М	15.03±0.09	19.02±0.17*	19.61±0.12*	19.48±0.32*	18.98±0.28*
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		15.45±0.16	15.68±0.10	16.26±0.09	16.36±0.36
<i>Lentinus edodes</i>	М		15.33±0.35	15.20±0.23	15.11±0.05	15.05±0.28
<i>Coprinus comatus</i>	М		14.31±0.38	14.42±0.22	14.59±0.11	15.27±0.13
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		14.22±0.83	14.30±0.17	15.42±0.09	15.34±0.74
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	10.32±0.16	8.85±0.07*	8.50±0.25*	8.43±0.07*	7.74±0.34*
	А		13.26±0.54*	9.77±0.23*	9.72±0.30	9.25±0.27*
	ЕА		8.78±0.34*	7.94±0.32*	7.45±0.21*	5.64±0.23*
<i>Platismatia glauca</i>	М		6.82±0.09*	7.27±0.25*	7.53±0.29*	8.33±0.26*
	А		8.00±0.09*	8.04±0.17*	8.23±0.34*	9.45±0.36*
	ЕА		7.40±0.60*	7.91±0.10*	8.35±0.40*	8.75±0.41*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли.

**Табела 34.** Ефекти екстракта гљива и лишајева на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

Гљива	Врста екстракта	24 h				
		Концентрација (µg/mL)				
		0	10	25	50	100
<i>Phellinus linteus</i>	М	13.38±0.17	13.94±0.17	13.85±0.12	13.31±0.32	12.64±0.28
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		13.05±0.16	14.79±0.10*	15.38±0.09*	16.11±0.36*
<i>Lentinus edodes</i>	М		13.52±0.35	14.54±0.23*	15.39±0.05*	15.44±0.28*
<i>Coprinus comatus</i>	М		13.10±0.38	13.88±0.22	13.67±0.11	13.46±0.13
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		13.05±0.83	13.85±0.17	13.31±0.09	12.64±0.74
Лишај	Врста екстракта					
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М	12.13±0.15	9.19±0.29*	9.18±0.40*	8.91±0.43*	8.96±0.32*
	А		7.70±0.16*	9.77±0.45*	10.73±0.70*	10.96±0.35*
	ЕА		14.47±0.21*	13.43±0.43*	13.19±0.43*	11.83±0.20
<i>Platismatia glauca</i>	М		13.74±0.39*	13.64±0.27*	13.13±0.47*	12.08±0.19
	А		12.49±0.27	12.24±0.18	12.05±0.13	11.29±0.38
	ЕА		11.57±0.32	12.03±0.32	12.13±0.26	12.64±0.56

Гљива	Врста екстракта	72 h				
<i>Phellinus linteus</i>	М	14.80±0.09	13.06±0.00	13.51±0.85	13.78±0.11	13.99±0.19
<i>Cordyceps sinensis</i>	М		14.85±0.15	14.59±0.17	14.18±0.25	13.50±1.09*
<i>Lentinus edodes</i>	М		15.96±0.38*	15.72±0.12	15.60±0.03	14.99±0.48
<i>Coprinus comatus</i>	М		13.56±0.14*	13.22±0.48*	12.59±0.40*	10.20±0.29*
<i>Ganoderma lucidum</i>	М		15.05±0.85	14.05±0.04	13.07±0.78	11.20±0.45*
Лишај	Врста екстракта	11.47±0.11				
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	М		12.25±0.65*	11.33±0.02	8.76±0.68*	8.15±0.61*
	А		9.57±0.25*	8.95±0.53*	8.72±0.51*	7.79±0.27*
	ЕА		13.10±0.04*	13.15±0.83*	11.33±0.82	9.29±0.41*
<i>Platismatia glauca</i>	М		14.43±0.66*	14.68±0.22*	18.15±0.89*	20.59±0.26*
	А		11.91±0.49	10.54±0.33	10.04±0.36*	9.82±0.70*
	ЕА	13.05±0.80*	12.91±0.36*	12.67±0.97*	11.16±0.22	

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

**Табела 35.** Ефекти комбинованих третмана на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у НСТ-116 ћелијама.

		24 h				
Хемијско једињење (10 μM)		<i>Phellinus linteus</i> (μg/mL)				
		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	11.83±0.25	15.12±0.60*	13.50±0.00*	13.69±0.06*	13.00±0.12*
	Pt(IV) комплекс 1		13.43±0.25*	12.29±0.31	12.45±0.03	12.23±0.03
	Лиганд 1		14.01±0.06*	13.59±0.35*	13.37±0.19*	13.29±0.06*
	Pt(IV) комплекс 2		14.49±0.41*	13.88±0.41*	13.56±0.31*	13.22±0.31*
	Лиганд 2		14.94±0.09*	14.45±0.25*	14.42±0.03*	13.92±0.06*
КТ 6 h	Цисплатина		13.12±0.00*	14.01±0.00*	14.29±0.49*	14.80±0.40*
	Pt(IV) комплекс 1		13.53±0.25*	13.29±0.31*	13.05±0.03*	12.83±0.03
	Лиганд 1		14.07±0.25*	14.23±0.41*	15.76±0.03*	14.83±0.03*
	Pt(IV) комплекс 2		14.63±0.12*	13.95±0.06*	13.99±0.12*	13.78±0.15*
	Лиганд 2		14.91±0.03*	14.46±0.03*	15.03±0.06*	15.22±0.06*
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	15.03±0.06	16.03±0.38*	16.16±0.15*	16.21±0.09*	16.46±0.15*
	Pt(IV) комплекс 1		14.80±0.54	14.94±0.15	14.98±0.09	14.90±0.06
	Лиганд 1		13.63±0.25*	13.72±0.28*	14.39±0.19	14.90±0.00
	Pt(IV) комплекс 2		13.82±0.06*	14.26±0.00	14.42±0.22	15.52±0.03
	Лиганд 2		13.98±0.03*	13.94±0.12*	14.64±0.50	15.70±0.03
КТ 6 h	Цисплатина		16.82±0.03*	16.20±0.15*	16.27±0.12*	16.71±0.19*
	Pt(IV) комплекс 1		15.25±0.09	15.40±0.09	15.54±0.12	14.61±0.15
	Лиганд 1		13.18±0.06*	13.63±0.19*	13.78±0.09*	15.26±0.00
	Pt(IV) комплекс 2		15.76±0.22	15.54±0.38	15.44±0.22	14.71±0.12
	Лиганд 2		14.80±0.03	14.73±0.03	14.77±0.12	14.17±0.03

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

Табела 36. Ефекти комбинованих третмана на концентрацију редукованог глутатиона (GSH, nmol/mL) у SW-480 ћелијама.

		24 h				
Хемијско једињење (10 $\mu$ M)		<i>Phellinus linteus</i> ( $\mu$ g/mL)				
		0	10	25	50	100
КТ 0 h	Цисплатина	13.78 $\pm$ 0.09	15.12 $\pm$ 0.60*	14.50 $\pm$ 0.00	14.69 $\pm$ 0.06	13.96 $\pm$ 0.12
	Pt(IV) комплекс 1		13.43 $\pm$ 0.25	14.29 $\pm$ 0.31	14.45 $\pm$ 0.03	13.23 $\pm$ 0.03
	Лиганд 1		14.01 $\pm$ 0.06	14.59 $\pm$ 0.35	14.37 $\pm$ 0.19	13.79 $\pm$ 0.06
	Pt(IV) комплекс 2		14.49 $\pm$ 0.41	13.08 $\pm$ 0.41	13.56 $\pm$ 0.31	12.82 $\pm$ 0.31
	Лиганд 2		14.04 $\pm$ 0.09	14.45 $\pm$ 0.25	14.52 $\pm$ 0.03	12.92 $\pm$ 0.06
КТ 6 h	Цисплатина		14.12 $\pm$ 0.00	14.01 $\pm$ 0.00	13.29 $\pm$ 0.49	12.80 $\pm$ 0.40
	Pt(IV) комплекс 1		13.43 $\pm$ 0.47	12.29 $\pm$ 0.19*	12.45 $\pm$ 0.00*	12.23 $\pm$ 0.29*
	Лиганд 1		14.07 $\pm$ 0.25	13.23 $\pm$ 0.41	12.76 $\pm$ 0.03*	12.29 $\pm$ 0.03*
	Pt(IV) комплекс 2		13.63 $\pm$ 0.12	13.45 $\pm$ 0.06	13.05 $\pm$ 0.12	12.78 $\pm$ 0.18*
	Лиганд 2		13.91 $\pm$ 0.03	13.42 $\pm$ 0.03	13.03 $\pm$ 0.06	12.22 $\pm$ 0.06*
		72 h				
КТ 0 h	Цисплатина	14.80 $\pm$ 0.09	13.21 $\pm$ 0.06*	13.05 $\pm$ 0.11*	12.96 $\pm$ 0.85*	12.69 $\pm$ 0.33*
	Pt(IV) комплекс 1		13.43 $\pm$ 0.25*	13.29 $\pm$ 0.19*	13.54 $\pm$ 0.30*	12.23 $\pm$ 0.03*
	Лиганд 1		13.10 $\pm$ 0.81*	12.95 $\pm$ 0.35*	12.72 $\pm$ 0.14*	12.39 $\pm$ 0.81*
	Pt(IV) комплекс 2		13.94 $\pm$ 0.41	13.80 $\pm$ 0.74*	13.65 $\pm$ 0.00*	12.93 $\pm$ 0.59*
	Лиганд 2		13.04 $\pm$ 0.09*	12.54 $\pm$ 0.11*	12.52 $\pm$ 0.78*	12.29 $\pm$ 0.85*
КТ 6 h	Цисплатина		13.12 $\pm$ 0.00*	13.01 $\pm$ 0.88*	12.99 $\pm$ 0.82*	12.50 $\pm$ 0.04*
	Pt(IV) комплекс 1		13.34 $\pm$ 0.52*	13.29 $\pm$ 0.14*	12.95 $\pm$ 0.85*	12.32 $\pm$ 0.92*
	Лиганд 1		13.00 $\pm$ 0.99*	12.93 $\pm$ 0.00*	12.76 $\pm$ 0.00*	12.39 $\pm$ 0.03*
	Pt(IV) комплекс 2		13.39 $\pm$ 0.85*	13.08 $\pm$ 0.35*	13.01 $\pm$ 0.12*	12.87 $\pm$ 0.45*
	Лиганд 2		13.40 $\pm$ 0.81*	13.12 $\pm$ 0.14*	13.01 $\pm$ 0.78*	12.93 $\pm$ 0.06*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента  $\pm$  стандардна грешка. \*статистички значајна разлика ( $p < 0.05$ ) у односу на вредности у контроли.

## БИОГРАФИЈА

**Драгана С. Шеклић** рођена је 09.12.1981. године у Чачку. Основну школу „Др Драгиша Мишовић“ и медицинску школу „Надежда Вилимановић-Јанковић“ завршила је у Чачку, као одличан ученик. Школске 2001/2002 године уписала је Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, у Институту за биологију и екологију, смер Биологија. Студије је завршила 2008. године, са просечном оценом 8,00 (осам 00/100) и положеним дипломским испитом – оцена 10 (десет), на тему „Ефекти цисплатине, витамина Ц и селена на хематолошке параметре пацова“, чиме је стекла звање дипломирани биолог. Последипломске - докторске академске студије Биологије уписала је школске 2008/09. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу на смеру Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија.

Од септембра 2008. до јануара 2011. године, ангажована је као истраживач на ФП7 пројекту *СРСТАС (Centre for Pre-Clinical Testing of Active Substances, GA 206809)* на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. У оквиру овог пројекта успешно имплементирала рад са културама ћелија у Лабораторију за ћелијску и молекуларну биологију. Од јануара 2011. године ангажована је на пројекту „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ (41010) финансираним од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (2011-2018. године).

У периоду 2013/14 и 2016/17. је била на породилском одсуству и мајка је две девојчице. Драгана Шеклић, се успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу, где је овладала савременим техникама и методама физиолошко-биохемијских, хематолошких и молекуларно-биолошких анализа које су заступљене у овим лабораторијама. Способна је да самостално планира и изводи експерименте, обрађује и презентује резултате. Део метода истраживања у оквиру своје дисертације увела је у редовну лабораторијску праксу.

Током протеклих година Драгана Шеклић је била ангажована у извођењу практичног дела наставе на предметима: Основи екологије на основним академским студијама, као и на предметима Биологија човека и Токсикологија на мастер студијама Биологије.

Од 2011-2014. године ангажована је за потребе акредитације Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију (SRPS ISO/IEC 17025:2006, акредитациони број 01-367) на ПМФ-у у Крагујевцу.

У периоду од 2.11.2008-24.12.2008 године била је на стручном усавршавању у Институту Кири у Паризу, у лабораторији за проучавање молекуларних механизма ћелијског кретања а у периоду од 01-16.04.2011 била је на стручном усавршавању на Природно-математичком факултету у Скопљу на Одсеку за експерименталну физиологију и биохемију.

Учествује у организацији и презентацији матичног факултета на разним фестивалима.



## БИБЛИОГРАФИЈА

У току свог научно-истраживачког рада, Драгана Шеклић (девојачко Ђачић) је публиковала укупно 38 библиографских јединица, од чега 14 радова у међународним часописима са SCI листе (M21-2, M22-1, M23-11) и 1 рад у националном часопису (1-M53), презентovala 13 радова на конференцијама међународног значаја (M34-14) и 10 радова на конференцијама националног значаја (M63-1, M64-9).

### А. Радови у научним часописима међународног значаја (M20)

#### Радови у научним часописима врхунског међународног значаја – кат. M21

1. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, Banković DD, Cvetković DM, **Đačić DS**, Marković SD. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *International Journal of Molecular Sciences* 2012, 13: 2521-2534. doi:10.3390/ijms13022521, ISSN: 1422-0067, IF<sub>2011</sub>: 2.598, IF<sub>2012</sub>: 2.464.
2. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Ćomić Lj, **Đačić D**, Ćurčić M, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, 12(8): 5428-5448. doi:10.3390/ijms12085428. ISSN: 1422-0067, IF<sub>2011</sub>: 2.598.

#### Радови у научним часописима истакнутог међународног значаја – кат. M22

3. Ćurčić MG, Stanković MS, Radojević ID, Stefanović OD, Ćomić LjR, Topuzović MD, **Đačić DS**, Marković SD. Biological effects, total phenolic content and flavonoid concentrations of fragrant yellow onion (*Allium flavum* L.). *Medicinal Chemistry* 2012, 8(1): 46-51. ISSN: 1573-4064, IF<sub>2010</sub>: 1.603, IF<sub>2012</sub>: 1.373

#### Радови у научним часописима међународног значаја – кат. M23

4. Tošić-Pajić J, **Šeklić D**, Radenković J, Marković S, Ćukić J, Baskić D, Popović S, Todorović M, Sazanović P. Augmented oxidative stress in infertile women with persistent chlamydial infection. *Reproductive Biology* 2017, 17(2): 120-125. ISSN: 1642-431X. IF<sub>2016</sub> 1.513
5. Živanović MN, Košarić JV, Šmit B, **Šeklić DS**, Pavlović RZ, Marković SD. Novel seleno-hydantoin palladium(II) complex - antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *General Physiology and Biophysics* 2017, 36(2): 187-196. ISSN: 0231-5882. IF<sub>2016</sub> 1.170
6. **Šeklić D**, Stanković M, Milutinović M, Topuzović M, Štajn A, Marković S. Cytotoxic, antimigratory and pro/antioxidative activities of extracts from medicinal mushrooms on colon cancer cell lines. *Archives of Biological Science* 2016, 68(1): 93-105. ISSN: 0354-4664. IF<sub>2016</sub> 0.352
7. Milutinović MG, Stanković MS, Cvetković DM, Šeklić DS, Topuzović MD, Mihailović VB, Marković SD. Antioxidant and anticancer properties of leaves and seed cones from European yew (*Taxus baccata* L.). *Archives of Biological Sciences* 2015, 67(2): 525-534. ISSN: 0354-4664. IF<sub>2015</sub> 0.367
8. Stojković DLj, Jevtić VV, Radić GP, **Đačić DS**, Ćurčić MG, Marković SD, Đinović VM, Petrović VP, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer

(MDA-MB-231) cell lines. *Journal of Molecular Structure* 2014, 1062: 21-28. ISSN: 0022-2860. IF<sub>2014</sub>: 1.602

9. Jevtić VV, Radić GP, **Šeklić D**, Živanović MN, Marković SD, Trifunović SR. Part XVI - stereospecific ligands and their complexes. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of new platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)- ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against breast cancer (MDA-MB-231) and colon cancer (HCT-116 and SW-480) cell lines. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2014, 9(1): 273-287. ISSN: 1857-5552 IF<sub>2014</sub>: 0.533
10. Kosanić M, **Šeklić D**, Marković SD, Ranković B. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of selected lichens from Serbia. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2014, 9 (1): 273-287. ISSN: 1842-3582. IF<sub>2014</sub>: 0.945
11. Košarić JV, Cvetković DM, Živanović MN, Ćurčić MG, **Šeklić DS**, Bugarčić ZM, Marković SD. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2 (phenylselenomethyl) tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl) tetrahydropyran. *Journal of the Balkan Oncology* 2014, 19 (1): 283-290. ISSN: 1107-0625. IF<sub>2014</sub>: 0.741
12. Šmit B, Pavlović R, Radosavljević-Mihajlović A, Došen A, Ćurčić M, **Šeklić D**, Živanović M. Synthesis, characterization and cytotoxicity of palladium(II) complex of 3-[(2-hydroxy-benzylidene)-amino]-2-thioxo-imidazolidin-4-one. *Journal of Serbian Chemical Society* 2013, 78(2): 217-227. doi: 10.1002/jsfa.6132, ISSN: 0352-5139, IF<sub>2013</sub>: 0.889
13. Marković SD, **Đačić DS**, Cvetković DM, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biological Trace Element Research* 2011, 142 (3): 660-670. doi: 10.1007/s12011-010-8788-9, ISSN: 0163-4984. IF<sub>2011</sub>: 1.923
14. Marković SD, Žižić JB, **Đačić DS**, Obradović AD, Ćurčić MG, Cvetković DM, Đorđević NZ, Ognjanović BI and Štajn AŠ. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vivo* treatment with cisplatin and selenium. *Archives of Biological Science* 2011, 63(4): 991-999. doi:10.2298/ABS1104991M. ISSN: 0354-4664, IF<sub>2011</sub>: 0.360

**Рад на рецензији:** **Šeklić DS**, Obradović AD, Stanković MS, Živanović MN, Mitrović TLj, Stamenković SM, Marković SD. Proapoptotic and antimigratory effects of *Pseudoevernia furfuracea* and *Platismatia glauca* on colon cancer cell lines. *Under review in Food Technology and Biotechnology*

#### **Б. Научни радови објављени у научним часописима националног значаја (M50)**

15. Marković SD, **Đačić DS**, Cvetković DM, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB. Effects of acute treatment of vitamin C on redox and antioxidative metabolism in plasma and red blood cells of rats. *Kragujevac Journal of Science* 2010; 32: 109-116. ISSN: 1450-9636. **M53**

#### **В. Саопштења на научним конференцијама међународног значаја (M30)**

##### **Саопштења на међународним научним скуповима штампана у изводу – кат. M34**

16. Živanović MN, Cvetković DM, Košarić JV, Ćurčić MG, **Šeklić DS**, Bugarčić ZM, Marković SD. Antioxidative effects of novel selenium compounds (Meeting Abstract). *FEBS Journal*. 2012; 279: 197-197. ISSN: 1742-464X.
17. Ćurčić M, Stanković M, **Šeklić D**, Živanović M, Cvetković D, Marković S. Total phenolic content and in vitro antioxidant/prooxidant properties of leaves and fruits from *Ligustrum vulgare* L (Meeting Abstract). *FEBS Journal*. 2012; 279:216-216. ISSN: 1742-464-X.
18. **Đačić D**, Cvetković V, Stanković M, Ćurčić M, Mitrović T, Stamenković S, Marković S. In vitro antiproliferative activity of five lichens species on HCT-116 human colon cell line. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, pp. 64. ISBN: 978-86-7760-064-8.

19. **Đačić D**, Kosanić M, Ćurčić M, Ranković B, Marković S. Cytotoxic activities of *Umbilicaria crustulosa*, *Parmeliopsis ambigua*, *Umbilicaria polyphylla*, *Lecanora muralis* and *Parmelia saxatilis* methanol extracts on human colon cancer cell line. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac, 2011, pp. 65. ISBN: 978-86-7760-064-8.
20. **Đačić D**, Glođović V, Radić G, Trifunović S, Marković S. The antiproliferative effects of cisplatin and butyl and pentil esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic and corresponding platinum(IV) complexes on human colon and breast cancer cell lines. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac 2011, pp. 12. ISBN: 978-86-7760-064-8.
21. Stanković M, Ćurčić M, **Đačić D**, Topuzović M, Marković SD. Phenolic content in vitro antiproliferative and apoptotic activity of *Teucrium* species from Serbian flora on HCT-116 cell line. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac, 2011, pp. 21. ISBN 978-86-7760-064-8.
22. Stanković M, Ćurčić M, **Đačić D**, Žižić J, Topuzović M, Marković S. Free-radical scavenging capacity and total phenolic content of Fragrant yellow onion (*Allium flavum* L.). Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac, 2011, pp. 62. ISBN 978-86-7760-064-8.
23. Ćurčić M, Stanković M, **Đačić D**, Topuzović M, Marković S. Antioxidant, antiproliferative and apoptotic activity of different extracts of leaves and seed cones from european yew (*Taxus baccata* L.). Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac, 2011, pp. 63. ISBN 978-86-7760-064-8.
24. Žižić J, Ćurčić M, **Đačić D**, Obradović A, Stanković M, Mitrović T, Kosanić M, Ranković B, Marković SD. Evaluation of redox status of HCT-116 cell line treated with various lichen and plant extracts. Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac, 2011, pp. 66. ISBN 978-86-7760-064-8.
25. **Đačić D**, Žižić J, Ilić A, Ognjanović B, Štajn A, Marković S. The protective effects of selenium on hematological parameters in rats. 2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences", September 17-20, 2009, Kragujevac, Serbia, Abstract book pp. 189. ISBN 987-86-904799-5-5
26. Žižić J, Cvetanović A, Radulović A, **Đačić D**, Obradović A, Ognjanović B, Štajn A, Marković S. Effects of chronic treatment of cisplatin and selenium on antioxidative enzyme activities in red blood cells of rats. 2nd Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation "Current trends in physiological sciences", September 17-20, 2009, Kragujevac, Serbia, Abstract book pp. 199. ISBN 987-86-904799-5-5
27. **Đačić D**, Đuričić D, Žižić J, Milošević M, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Marković SD. Effects of cisplatin, vitamin C and selenium co-treatment on hematological parameters in rats. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences "Physiology from experiment to medical practice". June 5-7, 2008, Cluj-Napoca, Romania. Physiology, 2008.18.2(58): 23
28. Đuričić D, **Đačić D**, Obradović A, Đorđević N, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Marković SD. Effects of cisplatin, vitamin C and selenium co-treatment on redox status in plasma and red blood cells of rats. X Congress of Romanian Society of Physiological Sciences "Physiology from experiment to medical practice". June 5-7, 2008, Cluj-Napoca, Romania. Physiology, 2008.18.2(58): 25.

## **Г. Саопштења на научним конференцијама националног значаја (М60)**

### **Саопштења на националним научним скуповима штампана у целини– кат. М63**

29. Ćurčić MG, Stanković MS, **Đačić DS**, Topuzović MD, Marković SD. Antiproliferativna aktivnost metanolnog ekstrakta biljke *Teucrium scordium* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji. XI savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 2011. Zbornik radova, 497-501.

**Саопштења на националним научним скуповима штампана у изводу– кат. М64**

30. **Šeklić D**, Jevtić V, Trifunović S, Živanović M, Marković S. Cytotoxic, proapoptotic, prooxidant and antimigratory effects of two newly synthesized Pt(IV) complexes and their respective ligand on colon cancer cell lines. Kongres „REDOX MEDICINE: Reactive species signaling, analytical methods, phytopharmacy, molecular mechanisms of disease”. Beograd, 2015. Knjiga sažetaka, str. 42. [ISBN: 978-86-912893-3-1](#)
31. **Šeklić DS**, Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Radenković J, Ćurčić MG, Živanović MN, Cvetković D, Marković SD. Citotoksični i prooksidacioni efekti ekstrakata lišajeva (*Pseudoevernia furfuracea* i *Platismatia glauca*) na ćelijskim linijama humanog kolon kancera (HCT-116 i SW-480). Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013. Knjiga sažetaka, str. 53. [ISBN: 978-86-912893-2-4](#).
32. **Šeklić D**, Stanković M, Topuzović M, Ćurčić M, Živanović M, Cvetković D, Marković S. Prooksidativni i antimigratorni efekti ekstrakata medicinski značajnih gljiva u tretmanu ćelijskih linija humanog kolon kancera. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013. Knjiga sažetaka, str. 54. [ISBN: 978-86-912893-2-4](#).
33. Ćurčić MG, Stanković MS, Cvetković DM, **Šeklić DS**, Marković SD. Efekti ekstrakata biljke *Teucrium chamaedrys* L. na apoptotski signalni put i redoks status ćelija karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013. Knjiga sažetaka, str. 64. [ISBN: 978-86-912893-2-4](#).
34. Živanović MN, Košarić JV, **Šeklić DS**, Cvetković D, Ćurčić MG, Sukdolak S, Marković SD. Citotoksični i antioksidativni-prooksidativni efekti derivata kumarina na ćelijskoj liniji humanog kolon kancera HCT-116. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013. Knjiga sažetaka, str. 68. [ISBN: 978-86-912893-2-4](#).
35. Marković S, Žižić J, Obradović A, **Đačić D**, Ognjanović B, Štajn A, Petronijević M, Saičić Z, Spasić M. Retikulociti kao jednostavan model sistem za proučavanje redoks procesa u mitohondrijama. Uпоредni pregled različitih tretmana koriscenih za izazivanje retikulocitoze kod pacova. Mitohondrije i slobodni radikali, Beograd, 2009. Knjiga sažetaka, str. 76. [ISBN: 978-86-912893-0-0](#)
36. **Đačić D**, Stanković M, Glođović V, Radić G, Trifunović S, Ćurčić M, Cvetković D, Živanović M i Marković S. Sinergistička antiproliferativna aktivnost gljive *Phellinus linteus* i kompleksa platine(IV) [Pt(dp-(S,S)-eddp)] na ćelijsku liniju humanog kolon kancera (HCT-116). Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011. Knjiga sažetaka, str. 37. [ISBN:978-86-912893-1-7](#)
37. Ćurčić MG, Stanković MS, Mrkalić EM, Matović ZD, **Đačić DS**, Cvetković DM, Živanović MN, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativne i apoptotske aktivnosti metanolnih ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji u zavisnosti od vremena izlaganja i u kotretmanu sa kompleksom paladijuma. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011. Knjiga sažetaka, str. 72. [ISBN:978-86-912893-1-7](#)
38. Cvetković DM, Ćurčić MG, **Đačić DS**, Stanković MS, Marković SD. Ispitivanje antiproliferativnih i antioksidacionih svojstava metanolnih ekstrakata dobijenih iz listova i plodova biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011. Knjiga sažetaka, str. 48. [ISBN:978-86-912893-1-7](#)

# БИБЛИОТЕЧКА ДОКУМЕНТАЦИЈА



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ  
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ

Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија



## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈА

Редни број	
Тип записа	Текстуални штампани материјал
Врста рада	Докторска дисертација
Аутор	<b>Драгана Шеклић</b>
Ментор	Доц. др Снежана Марковић
Наслов рада	<b>Молекуларни механизми миграције ћелија карцинома колоне у антитуморском деловању новосинтетисаних платина(IV) комплекса и природних биоактивних супстанци</b>
Језик публикација	Српски (ћирилица)
Језик извода	Српски
Земља публикавања	Србија
Година публикације	2018.
Издавач	Ауторски репринт
Место и адреса	34 000 Крагујевац, Радоја Домановића 12
Научна област	Биологија
Научна дисциплина	Физиологија животиња и молекуларна биологија
Предметна одредница/кључне речи	Платина(IV), биоактивне супстанце, цитотоксичност, апоптоза, миграција, оксидациони стрес
Чува се	У библиотеци Природно-математичког факултета у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34000 Крагујевац, Србија

## РЕЗИМЕ

Колоректални карцином представља другу најчешћи малигни тумор дигестивног тракта и узрок смртности код људи, тако да су истраживања антиканцерогених биоактивних супстанци од великог значаја за терапију ове болести. Разумевање механизма миграције, инвазије, метастазе и испитивање нових биоактивних супстанци са антимигранторним деловањем, представља једну од стратегија у терапији карцинома. Реактивне врсте кисеоника и азота представљају базу регулације низа молекуларно-физиолошких функција у организму, укључујући генезу и прогресију карцинома. Стога је познавање међузависности молекуларних механизма редокс статуса и сигналних путева миграције ћелија карцинома колона од великог значаја. Комплекси платине(IV) имају ефикасније антитуморско деловање у односу на циспалтину, са мањом токсичношћу а већом ефикасношћу у третману резистентних тумора. Тестирани екстракти гљива и лишајева се користе у традиционалној медицини и њихови ефекти на миграцију ћелија колоректалног карцинома нису довољно испитани. Примена котретмана, природних биоактивних супстанца и хемиотерапеутика (цисплатина), као и новосинтетисаних комплекса платина(IV), кроз синергистичко антиканцерогено деловање, доприноси смањењу негативних ефекта хемиотерапеутика.

**Циљ** дисертације је да се испита потенцијално антиканцерогено деловање (цитотоксичност и антимигранторни потенцијал) новосинтетисаних комплекса платине(IV) и биоактивних супстанци из природних извора (екстракти лековитих гљива и лишајева), са акцентом на молекуларне механизме и кључне протеине сигналних путева миграције, као и на параметре редокс статуса у ћелијама колоректалног карцинома. **Специфични циљеви и методологија:** (1) тестирати антиканцерогене ефекте биоактивних супстанци, хемијски новосинтетисаних и екстрахованих из природних извора на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480) у третманима (а) Pt(IV) комплекси: [PtCl<sub>4</sub>(dbu-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс1**, [PtCl<sub>4</sub>(dpe-S,S-eddp)] - **Pt(IV) комплекс2**, одговарајући лиганди (**Лиганд 1** и **Лиганд 2**), **цисплатина** (позитивна контрола); (б) **екстракти гљива** (*Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*) и **лишајева** (*Platismatia glauca*, *Pseudoevernia furfuraceae*); (в) **котретман** Pt(IV) комплекси са екстрактом *Phellinus linteus*, са акцентом на тип интерреакције компоненети у котретману; (2) испитати цитотоксичност третмана (МТТ тест) и тип ћелијске смрти (акридин оранж/етидијум бромид микроскопска метода) ћелија канцера и здравих ћелија фибробласта (MRC-5); (3) испитати промене миграаторног потенцијала HCT-116 и SW-480 ћелија, Transwell миграаторним тестом и дефинисањем локализације и квантификацијом кључних протеина сигналних путева миграције и међућелијске комуникације, помоћу имунофлуоресцентне микроскопске методе (Е-кадхерин и цитоплазматски β-катенин, као маркери међућелијских веза; Frizzled-7-рецептор и нуклеарни β-катенин, као маркери Wnt сигналног пута; Н-кадхерин и виментин, као компоненте цитоскелета миграаторних ћелија); (4) одредити концентрацију металопроотеиназе 9, колориметријском методом (ELISA); (5) одредити промене параметара редокс статуса (спектрофотометријско одређивање концентрације супероксид анјон радикала, нитрита и редукованог глутатиона).

**Резултати дисертације:** Хемијска једињења, у првом реду Pt(IV) комплекс 2, делују цитотоксично и проапоптотски на HCT-116 и SW-480 ћелијама. Апоптоза као доминантан тип ћелијске смрти у третману Pt(IV) комплексима, резултат је дисбаланса редокс статуса. Хемијска једињења, у првом реду Лиганд 1, показују антимигранторне ефекте, који су последица повећане експресије Е-кадхерина и релоцирања у међућелијске везе, стварања међућелијских контаката, као и редуције промигранторних маркера (нуклеарни β-катенин, Н-кадхерин, виментин и MMP-9). Екстракти гљива, са посебним акцентом на врсту *P. linteus*, показују цитотоксичне и проапоптотске, ћелијски селективне ефекте. Екстракти гљива, *L. edodes* на HCT-116 ћелијама, односно *P. linteus* и *C. sinensis* на SW-480 ћелијама, показују антимигранторни потенцијал посредством повећања експресије Е-кадхерина и редуције промигранторних маркера. Екстракти лишајева, са акцентом на врсту *P. furfuraceae*, показују цитотоксичне, проапоптотске и

прооксидационе ефекте на ћелијама колоректалног карцинома, док метанолни екстракт испољава антимиграторне ефекте, који су резултат повећања експресије E-кадхерина и смањења промиграторних протеина. Екстракт *P. glauca* са антиоксидационим деловањем, испољава промиграторни ефекат на SW-480 ћелијама, смањујући експресију E-кадхерина и цитоплазматског  $\beta$ -катенина и повећавајући нуклерани  $\beta$ -катенин, што указује на нуклерану прераспodelу  $\beta$ -катенина, појачану активацију Wnt/ $\beta$ -катенин сигналног пута и активацију репресора експресије E-кадхерина. Котретмани *P. linteus* са хемијским једињењима (*P. linteus* + Pt(IV) комплекс 2) показују значајан цитотоксични и проапоптотски ефекат у односу на појединачне третмане, што указује на синергистичко деловање ових биоактивних супстанци. Котретмани (са нагласком на *P. linteus* + Лиганд 1) показују ефикасније антимиграторно деловање у односу на појединачне третмане, уз значајно повећање експресије E-кадхерина и смањење промиграторних протеина. Испитивани третмани хемијским супстанцама и екстрактима гљива и лишајева испољавају ћелијски специфичне биолошке ефекте на НСТ-116 и SW-480 ћелијама.

**Закључци дисертације:** НСТ-116 ћелије су осетљивије на третмане екстрактима лишајева и комбиноване третмане, у смислу цитотоксичних, проапоптотских, антимиграторних и прооксидационих ефеката третмана. SW-480 ћелије су генерално осетљивије на појединачне третмане хемијским једињењима и екстрактима гљива, у смислу цитотоксичних и проапоптотских ефеката. Третмани хемијским једињењима показују акутне цитотоксичне ефекте на MRC-5 здравим ћелијама, а након продуженог третмана ћелије се опорављају, док екстракти из природних извора и комбиновани третмани не показују значајне цитотоксичне ефекте на здравим ћелијама, што потврђује њихово антиканцерогено деловање. Сви испитивани третмани показују боље антимиграторне ефекте на НСТ-116 ћелијама, што је последица осетљивости на промене редокс статуса, у првом реду нивоа  $O_2^-$ . Антимиграторна својства испитиваних третмана мање зависе од типа третмана, већ зависе од типа ћелијске линије. Сви третмани са антимиграторним ефектима доводе до повећања антимиграторних епителних протеин маркера (E-кадхерина) и редукције експресије нуклеарног  $\beta$ -катенина и мезенхимских маркера (H-кадхерина, виментина и MMP-9) на обе ћелијске линије. Промене параметара редокс статуса, у смислу повећања концентрације  $O_2^-$  у третманима екстрактима из природних извора, могу се сматрати одговорним за антимиграторни ефекат третмана. Са друге стране, индукција оксидационог стреса, може се повезати са цитотоксичним ефектима третмана.

**Коначан закључак:** Новосинтетисани Pt(IV) комплекси имају побољшана својства у виду цитотоксичних, проапоптотских и антимиграторних/антиинвазивних ефеката у односу на широко коришћени лек цисплатину. Извори биоактивних супстанци коришћени у традиционалној медицини са подручја на коме примарно расту (испитиване врсте лишајева) показују значајно боље биолошке ефекте у односу на комерцијално добијене врсте (испитиване врсте гљива). Комбиновани третмани Pt(IV) комплекса са природним биоактивним супстанцама дају обећавајуће резултате на ћелијама колоректалног карцинома. Обзиром на ћелијски специфичне одговоре добијене у овом истраживању, увођење у терапију и примена контролисаних доза одређених суплемената исхрани, води ка остваривању бољих антитуморских ефеката код инвазивних форми колоректалног карцинома.

Датум прихватања теме од стране ННВ Факултета	08.07.2015. године
Датум одбране	
Чланови комисије	Др Татајана Митровић, редовни професор Др Наташа Ђорђевић, ванредни професор Др Милош Матић, доцент Др Верица Јевтић, доцент Др Милена Милутиновић, научни сарадник



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE  
INSTITUTE OF BIOLOGY AND ECOLOGY

Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia



**KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number	
Type of record	Textual material, printed
Contents code	PhD thesis
Author	<b>Dragana Šeklić</b>
Mentor	Dr Snežana Marković, assistant professor
Title	<b>Molecular mechanisms of colorectal cells migration in antitumor action of new-synthesized platina(IV) complex and natural bioactive substances</b>
Language of text	Serbian (Roman) (scr)
Language of abstract	Serbian (Roman) / English
Country of publication	Serbia
Publication year	2018.
Publisher	Copyright reprint
Publisher place	Radoja Domanovića 12 34000 Kragujevac, Serbia
Scientific field	Biology
Scientific discipline	Animal physiology and molecular biology
Key words	Platinum(IV), bioactive substances, cytotoxicity, apoptosis, migration, oxidative stress
Holding data	In library of Faculty of Science, 34 000 Kragujevac, Serbia, R. Domanovića 12
Note	



## Abstract

Colorectal carcinoma is the second most common malignant tumor of the digestive tract and cause of mortality in humans, so research of anti-cancer bioactive substances is of great importance for the treatment of this disease. Understanding the mechanisms of migration, invasion, metastasis, and the testing of new bioactive substances with anti-migratory activity is one of the strategies in the treatment of cancer. Reactive oxygen and nitrogen species represent the basis for regulation of molecular-physiological functions in the body, including genesis and progression of the cancer. Therefore, the knowledge of the interdependence of molecular mechanisms of redox status and signaling pathways of migration of colon carcinoma cells is of great importance. Platinum(IV) complexes have more effective anti-tumor activity compared to cisplatin, with lower toxicity and greater efficacy in the treatment of resistant tumors. Tested extracts of mushrooms and lichen are used in traditional medicine and their effects on the migration of colorectal carcinoma cells have not been particularly tested. The use of natural bioactive substances and chemotherapeutics (cisplatin, as well as newly synthesized platinum(IV) complexes) in co-treatment, through synergistic anticancer activity, contributes to the reduction of the negative effects of chemotherapeutics.

The **aim** of the dissertation is to investigate the possible anticancer activity (cytotoxicity and anti-migratory potential) of newly synthesized platinum(IV) complexes and bioactive substances from natural sources (extracts of medicinal mushrooms and lichen), with emphasis on molecular mechanisms and key proteins for migration signaling pathways, as well as on parameters of redox status in colorectal carcinoma cells. **Specific objectives and methodology:** (1) to test the anticancer effects of bioactive substances, chemically newly synthesized substances and those extracted from natural sources on colon carcinoma cell lines (HCT-116, SW-480) in treatments with (a) Pt(IV) complexes: [PtCl<sub>4</sub>(dbu-S,S-eddp)] - **Pt(IV) complex 1**, [PtCl<sub>4</sub>(dpe-S,S-eddp)] - **Pt(IV) complex 2**, corresponding ligands (**Ligand 1** and **Ligand 2**), **cisplatin** (positive control); (b) mushrooms extracts (*Phellinus linteus*, *Cordyceps sinensis*, *Lentinus edodes*, *Coprinus comatus*, *Ganoderma lucidum*) and **lichens** (*Platismatia glauca*, *Pseudoevernia furfuraceae*); (v) **co-treatment** of Pt(IV) complexes with the extract of *Phellinus linteus*, with an emphasis on the type of interreaction; (2) to examine the cytotoxicity of the treatments (MTT assay) and the type of cell death (acridine orange/ethidium bromide microscopic method) for cancer cells and healthy fibroblast cells (MRC-5); (3) to examine changes in the migratory potential of HCT-116 and SW-480 cells, the *Transwell* migration assay, and the definition of localization and the quantification of key proteins of migration signaling pathways and intercellular communication using an immunofluorescence microscopic method (E-cadherin and cytoplasmic  $\beta$ -catenin as markers of intercellular connections; Frizzled-7 receptor and nuclear  $\beta$ -catenin, as markers of Wnt signaling pathway; N-cadherin and vimentin, as components of cytoskeleton of migratory cells); (4) to determine the concentration of metalloproteinase 9 by colorimetric method (ELISA); (5) to determine the changes in redox status parameters (spectrophotometric determination of the concentration of superoxide anion radical, nitrites and reduced glutathione).

**Results of the dissertation:** Chemical compounds, primarily Pt(IV) complex 2, act cytotoxic and pro-apoptotic on HCT-116 and SW-480 cells. Apoptosis as the dominant type of cell death in the treatment with Pt(IV) complexes is the result of a redox imbalance. The chemical compounds, in particular Ligand 1, show anti-migratory effects due to increased expression of E-cadherin and relocation to intercellular bonds, the formation of cellular contacts, and the reduction of pro-migratory markers (nuclear  $\beta$ -catenin, N-cadherin, vimentin and MMP- 9). Mushroom extracts, with a special emphasis on *P. linteus*, show cytotoxic and pro-apoptotic, cell-selective effects. Mushroom extracts, *L. edodes* on HCT-116 cells, or *P. linteus* and *C. sinensis* on SW-480 cells, show anti-migratory potential by increasing the expression of E-cadherin and reducing pro-migratory markers. The lichen extracts, with the emphasis on *P. furfuracea*, show cytotoxic, pro-apoptotic and pro-oxidative effects on colorectal carcinoma cells, while the methanol extract exhibits anti-migratory effects, which are the result of an increase in E-cadherin expression and a

decrease in pro-migratory proteins. *P. glauca* extract with anti-oxidative action, exhibits a pro-migratory effect on SW-480 cells, reducing the expression of E-cadherin and cytoplasmic  $\beta$ -catenin and increasing nuclear  $\beta$ -catenin, indicating a nuclear redistribution of  $\beta$ -catenin, enhanced Wnt/ $\beta$ -catenin activation signaling pathway and activation of E-cadherin expression repressor. Co-treatment of *P. linteus* with chemical compounds (*P. linteus* + Pt(IV) complex 2) show significant cytotoxic and pro-apoptotic effects related to individual treatments, indicating the synergistic action of these bioactive substances. Co-treatments (with emphasis on *P. linteus* + Ligand 1) show more effective anti-migratory action related to individual treatments, with a significant increase in E-cadherin expression and reduction in pro-migratory proteins. The examined treatments with chemical substances and extracts of fungi and lichen express cellular specific biological effects on HCT-116 and SW-480 cells.

**Conclusions of the dissertation:** HCT-116 cells are more susceptible to treatments with lichen extracts and co-treatments, in terms of cytotoxic, pro-apoptotic, anti-migratory and pro-oxidative effects. The SW-480 cells are generally more sensitive to individual treatments with chemical compounds and mushroom extracts, in terms of cytotoxic and pro-apoptotic effects. Treatments with chemical compounds show acute cytotoxic effects on MRC-5 healthy cells, with certain recovery of cells after prolonged treatment, while extracts from natural sources and combined treatments do not show significant cytotoxic effects on healthy cells, which confirm their anticancer activity. All examined treatments show better anti-migratory effects on HCT-116 cells, which is a consequence of sensitivity to the redox status changes, especially in relation with  $O_2^-$  levels. The anti-migratory properties of the examined treatments are less dependent on the type of treatment but depend on the type of cell line. All treatments with anti-migratory effects lead to an increase in anti-migratory epithelial protein markers (E-cadherin) and the reduction of the expression of nuclear  $\beta$ -catenin and mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin and MMP-9) on both cell lines. Changes in redox status parameters, in terms of increased  $O_2^-$  concentration, in treatments with extracts from natural sources, can be considered responsible for the anti-migratory effect of treatment. On the other hand, induction of oxidative stress can be associated with cytotoxic effects of treatment.

**The final conclusion:** The newly synthesized Pt(IV) complexes possess improved properties in the form of cytotoxic, pro-apoptotic and anti-migratory/anti-invasive effects compared to the widely used cisplatin drug. Sources of bioactive substances used in traditional medicine from the area where they primarily grow (investigated lichens species) show significantly better biological effects than commercially obtained species (investigated mushroom species). Combined treatments of the Pt(IV) complex with natural bioactive substances provide promising results on colorectal carcinoma cells. Given the cell-specific responses obtained in this study, the introduction into therapy and the application of controlled doses of certain nutritional supplements lead to the achievement of better antitumor effects in invasive forms of colorectal carcinoma.

Accepted by scientific board on	08.07.2015.
Defended on	
Commission	<b>Dr Tatjana Mitrović, Full professor</b> <b>Dr Nataša Đorđević, Associate professor</b> <b>Dr Miloš Matić, Assistant professor</b> <b>Dr Verica Jevtić, Assistant professor</b> <b>Dr Milena Milutinović, Research Associate</b>

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Драгана Шеклић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**Молекуларни механизми миграције ћелија карцинома колона у антитуморском деловању новосинтетисаних платина(IV) комплекса и природних биоактивних супстанци**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету** Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ 2018. године,

Драгана Шеклић  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Драгана Шеклић**

дозвољавам

не дозвољавам

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

**Молекуларни механизми миграције хелија карцинома колона у антитуморском деловању новосинтетисаних платина(IV) комплекса и природних биоактивних супстанци**

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

Овом Изјавом такође

Дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- (5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима**
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ 2018. године,

  
\_\_\_\_\_

потпис аутора

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

## CYTOTOXIC, ANTIMIGRATORY, PRO-AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM MEDICINAL MUSHROOMS ON COLON CANCER CELL LINES

Dragana S. Šeklić\*, Milan S. Stanković, Milena G. Milutinović, Marina D. Topuzović, Andraš Š. Štajn and Snežana D. Marković

Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia.

\*Corresponding author: draganadjacic@kg.ac.rs

Received: April 27, 2015; Revised: July 1, 2015; Accepted: July 13, 2015; Published online: November 27, 2015

**Abstract:** Methanol extracts of five commercially available mushroom species (*Phellinus linteus* (Berk. et Curt) Teng, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler, *Coprinus comatus* (O. F. Müll.) Pers. and *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst), traditionally used as anticancer agents, were evaluated *in vitro* for their total phenol and flavonoid contents, cytotoxic and antimigratory activities and antioxidant/prooxidant effects on colon cancer cell lines (HCT-116 and SW-480). Spectrophotometric methods were used for the determination of total phenol content, flavonoid concentrations and DPPH activity of the extracts. Cytotoxic activity was measured by the MTT assay. The antimigratory activity of extracts was determined using the Transwell assay and immunofluorescence staining of  $\beta$ -catenin. The prooxidant/antioxidant status was followed by measuring the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), nitrite and reduced glutathione (GSH) concentrations. Our results show that the highest phenolic and flavonoid content was found in *P. linteus*, and its DPPH-scavenging capacity was significantly higher than in other samples. The *P. linteus* extract significantly decreased cell viability of both tested cancer cell lines. All other extracts selectively inhibited SW-480 cell viability, but did not show significant cytotoxic activity. The mushroom extracts caused changes in the prooxidant/antioxidant status of cells, inducing oxidative stress. All extracts tested on HCT-116 cells demonstrated significant antimigratory effects, which correlated with increased production of  $O_2^{\cdot-}$  and a reduced level of  $\beta$ -catenin protein expression, while only *P. linteus* showed the same effect on SW-480 cells. The results of the present research indicate that the mushroom extracts causes oxidative stress which has a pronounced impact on the migratory status of colon cancer cell lines.

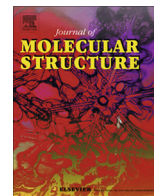
**Key words:** colon cancer; cytotoxicity; migration; mushrooms extracts; oxidative stress

### INTRODUCTION

Cancer is a major health problem in the world. In this context, some prized mushrooms with cytotoxic properties and their compounds are interesting for research. Meshima (*Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng) – PL, caterpillar fungus (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.) – CS, Shiitake mushrooms (*Lentinus edodes* (Berk.) Pegler) – LE, shaggy ink cap (*Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers.) – CC, and lingzhi/reishi (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst) – GL, are just some of the many mushrooms that have played an important role in the treatment of ailments. Medicinal properties of mushrooms included their antitumor,

proapoptotic (Wasser, 2010), immunomodulating (Rowan et al., 2003), antiviral (Cheung et al., 2003), antioxidant and free radical scavenging (Kamilya et al., 2006) effects. Mushrooms accumulate a variety of bioactive primary and secondary metabolites, including mineral compounds, organic acids, vitamins, polysaccharides, proteins, fats, oils, phenols like flavonoids and phenolic acids (Wasser, 2010). Mushrooms prevent cancer genesis, show direct antitumor activity and prevent tumor metastasis (Wasser, 2010).

Phenolic compounds or polyphenols are one of the most widely distributed secondary metabolites present in mushrooms. The ability of these com-



## Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines <sup>☆</sup>



Danijela Lj. Stojković <sup>a</sup>, Verica V. Jevtić <sup>a</sup>, Gordana P. Radić <sup>b</sup>, Dragana S. Đačić <sup>c</sup>, Milena G. Ćurčić <sup>c</sup>, Snežana D. Marković <sup>c</sup>, Vesna M. Đinović <sup>d</sup>, Vladimir P. Petrović <sup>a</sup>, Srećko R. Trifunović <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

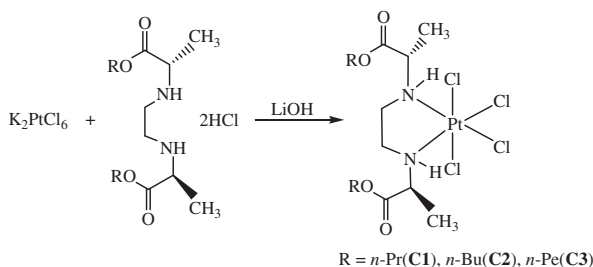
<sup>d</sup> Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

### HIGHLIGHTS

- Synthesis of three new platinum(IV) complexes with bidentate *N,N'*-ligand.
- Complexes were characterized by infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.
- *In vitro* antiproliferative activity on tumor cell lines: HCT-116 and MDA-MB-231.

### GRAPHICAL ABSTRACT

The complexes have been obtained by direct reaction of potassium-hexachloridoplatinate(IV) with corresponding esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid.



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 September 2013

Received in revised form 9 December 2013

Accepted 13 January 2014

Available online 22 January 2014

#### Keywords:

Platinum(IV) complexes  
Antiproliferative activity  
HCT-116 cells  
MDA-MB-231 cells  
MTT test  
Apoptosis

### ABSTRACT

Synthesis of three new platinum(IV) complexes **C1–C3**, with bidentate *N,N'*-ligand precursors, *O,O'*-dialkyl esters (alkyl = propyl, butyl and pentyl), of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid, H<sub>2</sub>-*S,S*-eddp were reported. The reported platinum(IV) complexes characterized by elemental analysis and their structures were discussed on the bases of their infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *In vitro* antiproliferative activity was determined on tumor cell lines: human colon carcinoma HCT-116 and human breast carcinoma MDA-MB-231, using MTT test.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

<sup>☆</sup> Part XI, G.P. Radić, V.V. Glođović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, V.M. Đinović, S.R. Trifunović, *Inorganica Chimica Acta* 391 (2012) 44–49.

\* Corresponding author. Tel.: +381 34 300263; fax: +381 34 335040.

E-mail address: [srecko@kg.ac.rs](mailto:srecko@kg.ac.rs) (S.R. Trifunović).