



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Данијела Д. Никодијевић

**Ефекти пчелињег и змијског отрова на
сигналне путеве апоптозе и
биотрансформације у ћелијским
линијама карцинома дебелог црева**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF SCIENCE

Danijela D. Nikodijević

Effects of bee and snake venom on apoptosis and biotransformation in colon cancer cell lines

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

Аутор
Име и презиме: Данијела Д. Никодијевић
Датум и место рођења: 25.03.1991. године у Њуприји
Садашње запослење: истраживач сарадник на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Ефекти пчелињег и змијског отрова на сигналне путеве апоптозе и биотрансформације у ћелијским линијама карцинома дебелог црева
Број страница: 151
Број слика: 47 слика, 73 графикона, 14 табела
Број библиографских података: 230
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија (577.2:591.1(043.3) ; 616.348-006.6-073(043.3))
Ментор: др Милена Милутиновић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 15.05.2019. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-01-388/5; 15.05.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: - Др Снежана Марковић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; - Др Милена Милутиновић, научни сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија; - Др Милица Пешић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, научна област: Биологија.
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: - Др Милош Матић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија; - Др Ана Подолски-Ренић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић" Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду, научна област: Биологија; - Др Данијела Цветковић, научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија.
Датум одбране докторске дисертације:

Посвећено мојим родитељима...

~Захвалница~

Ова докторска дисертација реализована је оквиру Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, као део пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Највећу захвалност дугујем доц. др **Милени Милутиновић**, ментору и пријатељу, на стручној и пријатељској подршци од самог почетка мог научно истраживачког рада. Хвала ти Миле, на посвећености, охрабривању, на томе што си веровала у мене и заједно са мном истрајала у овоме. Моја захвалност теби је огромна, али је још веће задовољство што настављамо даље заједно.

Захваљујем се и члановима Комисије, др **Данијели Цветковић**, др **Ани Подолски-Ренић** и проф. др **Милошу Матићу** на професионалности, стручној помоћи и сугестијама током израде овог докторског рада.

Посебно, захвалила бих се мојој **Даци**, јер ми је од првих дана била велика подршка, како у професионалном тако и у приватном животу.

Захваљујем се др **Милици Пешић**, научном саветнику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ на стручној помоћи и учешћу у осмишљавању теме моје докторске дисертације.

Захваљујем се на сарадњи и др **Марку Анђелковићу**, научном сараднику Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ јер је заслужан за узорковање отрова поскока. Велико хвала дугујем и **Борису Илићу** и **Ненаду Прерадовићу** јер су ми били велика подршка и фотографијама врста улепшали ову дисертацију.

Захвалила бих се другарима из подземља, **Александри**, **Николи**, **Стефану**, **Невени**, **Маји** и **Сари** на подршци и помоћи, као и на толеранцији, јер смејем се гласно. Међу њима, посебно се захваљујем **Јовани**, мом брату по протоколу, а увела их је много...хвала Јо, на несебичној стручној помоћи, на пријатељству и загрљајима.

Велику захвалност дугујем и својим пријатељима. Међу њима, посебно бих се захвалила мојој **Тијани**. Хвала ти Тићко, за сваку реч подршке, за глас разума, хвала на томе што си увек саслушала и разумела, и што ћеш умети овоме да се радујеш више од мене.

Велико хвала дугујем мом **Николи**, на љубави, разумевању, подршци и вери у мој успех.

Велику подршку имала сам и од стране мог ујака **Зорана**, баке и деке, који су са нестрпљењем ишчекивали одбрану моје дисертације.

Овај дуг пут не бих могла прећи без подршке мог тате **Драгослава**, маме **Зорице** и брата **Микице**, којима дугујем неизмерну захвалност. Хвала вам за сву љубав коју сте ми пружили! Такође, захвалила бих се свом стрицу **Мирославу**, јер је знање једина имовина коју он вреднује...

С' љубављу,

Данијела

АПСТРАКТ

С обзиром на све већу учесталост карцинома дебелог црева, као и бројне штетне ефекте хемиотерапеутика који су тренутно у употреби, све више се испитују супстанце природног порекла у циљу развоја нових антитуморских лекова. У овој дисертацији испитивани су антитуморски ефекти отрова пчеле (*Apis mellifera* L.), мелитина, отрова поскока (*Vipera ammodytes* L.) и L-аминокиселинске оксидазе. Сви испитивани третмани значајно смањују вијабилност ћелија карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480 и HT-29), и показују знатно слабији ефекат на здравим кератиноцитима (HaCaT). Проапоптотску активност показују отров пчеле, мелитин и L-аминокиселинска оксидаза, док је у деловању укупног отрова змије детектован висок ниво некрозе. Апоптоза је покренута спољашњим и/или унутрашњим апоптотским путем у зависности од ћелијске линије и третмана, што потврђују биомаркери апоптозе - повишена експресија проапоптотских гена и протеина под дејством третмана. L-аминокиселинска оксидаза показује прооксидациону активност и доводи до редокс зависне модулације процеса апоптозе на свим испитиваним линијама. Испитивани третмани индукују значајне промене у експресији гена прве и друге фазе биотрансформације, као и ABC мембранских транспортера. Присутна је значајна инхибиција експресије П-гликопротеина, који се највише доводи у везу са развојем резистенције. То даје могућност даљег испитивања ових третмана као његових потенцијалних блокатора, модулятора експресије и/или активности. С обзиром на актуелност теме, и на чињеницу да отрови и чисте супстанце изоловане из њих до сада нису испитивани са аспекта метаболизма и потенцијала за модулацију резистенције, резултати имају велики значај и указују да животињски отрови могу бити извор једињења са добрим антитуморским деловањем.

Кључне речи: апоптоза, колоректални карцином, L-аминокиселинска оксидаза, мелитин, отров пчеле, отров змије, природни агенси, резистенција.

ABSTRACT

Considering the increasing frequency of colon cancer, as well as the numerous harmful effects of currently used chemotherapeutic agents, there is a need to investigation of substances from natural origin to develop new antitumor drugs. In this dissertation, the antitumor effects of bee venom (*Apis mellifera* L.), melittin, snake venom (*Vipera ammodytes* L.) and L-amino acid oxidase were examined. All investigated treatments significantly decreased the viability of colon cancer cells (HCT-116, SW-480 and HT-29), with weaker effect on healthy keratinocytes (HaCaT). Bee venom, melittin, and L-amino acid oxidase induced proapoptotic activity, while a high level of necrosis was detected in the treatment of total snake venom. The apoptosis was induced via external and/or internal apoptotic pathway depending on the cell line and type of treatment, which was confirmed by apoptosis biomarkers - increased expression of proapoptotic genes and proteins. L-amino acid oxidase shows prooxidative activity and leads to a redox-dependent modulation of the apoptosis in all tested cell lines. The investigated treatments significantly changed the expression of the biotransformation-related genes and proteins, the first and second stages, as well as expression of the ABC membrane transporters. There is a significant inhibition of P-glycoprotein expression, which is most associated with the development of cancer cell resistance. This result gives the opportunity for further examination of these treatments as its potential blockers, modulators of expression and/or activity. Since venoms and their constituents have not been examined from the aspect of metabolism and potential for modulation of cancer cell resistance, observed results have a great impact, suggesting that animal venoms are a valuable source of compounds with antitumor potential.

Keywords: apoptosis, bee venom, colorectal cancer, L-amino acid oxidase, melittin, natural agents, resistance, snake venom.

САДРЖАЈ

I УВОД	1
1. Карцином дебелог црева	1
1.1. Етиолошки фактори настанка карцинома дебелог црева	1
1.2. Молекуларне основе настанка карцинома дебелог црева	3
1.3. Стандардна терапија у лечењу карцинома дебелог црева у Србији	5
1.4. Ћелијске линије карцинома дебелог црева, као <i>in vitro</i> модел систем	6
2. Апоптоза	7
2.1. Пренос сигнала у спољашњем апоптотском путу	8
2.2. Пренос сигнала у унутрашњем апоптотском путу	9
2.3. Каспазе као кључни молекули процеса апоптозе	12
3. Процес биотрансформације	15
3.1. Резистенција	18
3.1.1. Улога ABC транспортера у развоју резистенције	18
4. Редокс регулација сигналних путева у ћелији	21
4.1. Улога реактивних кисеоничних врста у канцерогенези	23
4.2. Улога реактивних кисеоничних врста у апоптози	24
4.3. Улога реактивних кисеоничних врста у терапији карцинома	25
4.4. Улога реактивних кисеоничних врста у резистенцији	25
5. Биотоксини животињског порекла	26
5.1. Медоносне пчеле на територији Србије	27
5.1.1. Грађа убодног апарата код пчела	27
5.1.2. Отров пчеле	28
5.1.2.1. Мелитин	29
5.2. Змије отровнице на територији Србије	30
5.2.1. Грађа отровног апарата код фамилије Viperidae	31
5.2.2. Отров поскока	32
5.2.2.1. L-аминокиселинске оксидазе	33
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	35
III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
1. Хемикалије	37
2. Узорковање и складиштење пчелињег и змијског отрова	38

2.1.Анализа протеинског састава пчелињег и змијског отрова.....	38
2.1.1. Електрофореза за одређивање протеинског састава пчелињег и змијског отрова.....	38
2.2.Испитивани третмани	39
2.2.1. Припрема третмана.....	39
3. Ћелијско-молекуларне анализе	39
3.1.Коришћене ћелијске линије	39
3.2.Гајење имортализованих ћелијских линија.....	41
3.3.Бројање ћелија за потребе извођења експеримента	42
4. Молекуларне анализе, испитивање ефеката третмана	42
4.1.МТТ тест цитотоксичности	42
4.2.Акридин оранж/етидијум бромид метода за одређивање типа ћелијске смрти	43
4.3.Одређивање експресије циљаних протеина имунофлуоресценцом.....	44
4.4.Одређивање активности каспазе 8.....	45
4.5.Испитивање параметара редокс статуса	46
4.5.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (NBT тест).....	46
4.5.2. Одређивање концентрације глутатиона.....	46
4.5.3. Одређивање концентрације липидних пероксида	47
4.6.Испитивање нивоа експресије информационе РНК циљаних гена.....	47
4.6.1. Изолација РНК из ћелијских линија	48
4.6.2. Реверзна транскрипција (RT-PCR).....	48
4.6.3. Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (qRT-PCR).49	
5. Статистичка анализа података.....	50
IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА.....	51
1. Анализа протеинског састава пчелињег и змијског отрова	51
1.1.Протеински састав пчелињег отрова.....	51
1.2.Протеински састав змијског отрова	51
2. Цитотоксичност третмана	52
2.1.Цитотоксичност отрова пчеле и мелитина.....	52
2.2.Цитотоксичност отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе	56
3. Проапоптотски потенцијал третмана у карциномским ћелијским линијама	61
3.1.Тип ћелијске смрти	61
3.2.Механизам апоптозе	66

3.3.Протеинска експресија Fas рецептора.....	67
3.3.1. Активност каспазе 8.....	74
3.3.2. Протеинска експресија каспазе 9	77
3.3.3. Експресија иРНК апоптотских гена	85
4. Биотрансформација.....	87
4.1.Експресија PGP1	87
4.2.Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације	94
5. Параметри редокс статуса под утицајем третмана	96
5.1.Концентрација супероксид-анјон радикала	96
5.2.Концентрација глутатиона.....	101
5.3.Експресија GSS	105
5.4. Концентрација малодиалдехида.....	111
V ДИСКУСИЈА	116
VI ЗАКЉУЧЦИ	126
VII ЛИТЕРАТУРА	129
VIII ПРИЛОГ.....	147

I УВОД

1. Карцином дебелог црева

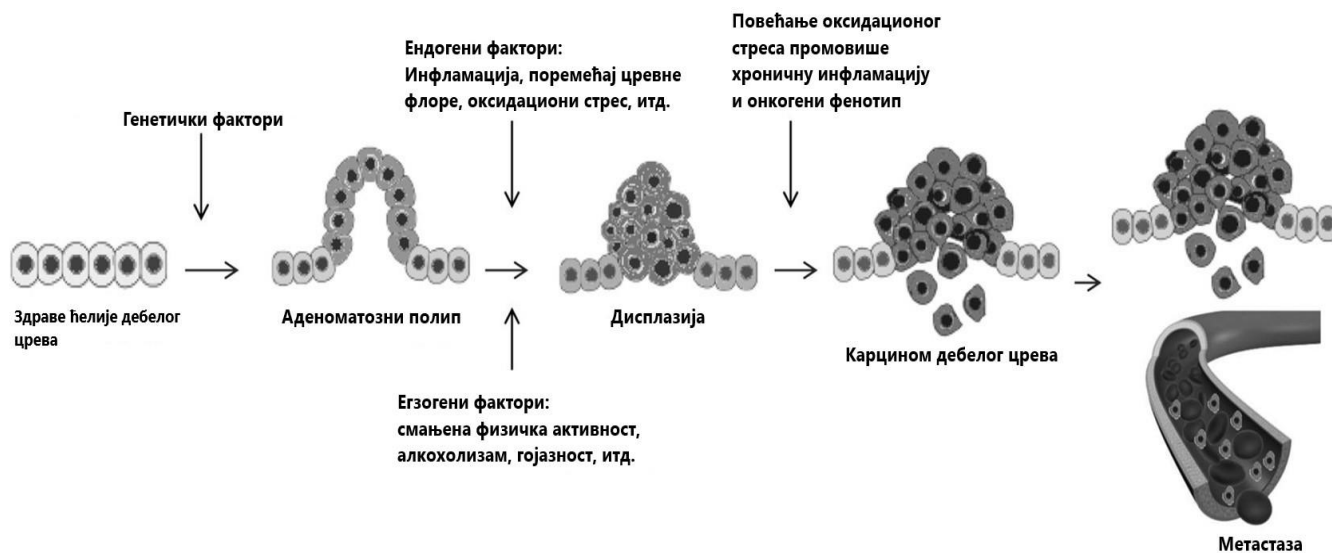
Дигестивни систем је, унутар својих шупљина, целом својом дужином обложен епителом. Типови епитела који се смењују, зависе од тога коју фазу у варењу или апсорпцији обавља одређени део дигестивног тракта. Од усног отвора до завршетка једњака доминира плочасто слојевити епител без орожавања, док су дебело, танко црево, па чак и желудац прекривени једнослојним цилиндричним епителом. У почетку аналне регије налази се плочасто слојевити без орожавања, а затим прелази у плочасто слојевити епител са орожавањем (Anđelković и сар., 2001; Anđelković и сар., 2009; Mescher, 2013). Малигном трансформацијом ћелија епитела дигестивног тракта настају карциноми, као најчешћи тип малигних тумора овог система органа. Међу њима, најучесталији је карцином дебелог црева, који у основи може бити наследан, али је све чешћа његова спорадична појава, без разјашњене интеракције наследних фактора и фактора средине. Што се епидемиолошких карактеристика ове болести тиче, на основу података Светске Здравствене Организације, у Свету је карцином дебелог црева трећи по учесталости (Sung и сар., 2020). У Србији, на основу Globocan 2020 базе података, по учесталости карцином дебелог црева је на другом месту код мушкараца, а код жена на трећем (<https://gco.iarc.fr/>).

1.1. Етиолошки фактори настанка карцинома дебелог црева

Епител дебелог црева је, управо због његове физиолошке функције, изложен променама због сталног присуства токсина, метаболита и осталих продуката варења. Додатно, процес варења изискује чешће обнављање епитела црева, те ћелије цревног епитела физиолошки имају повећан ниво пролиферације. Унос хране доста утиче на микрофлору црева која је у уској вези са одржавањем оптималних услова средине неопходним за добро варење. С тим у вези, најчешћи узрочник настанка спорадичног облика карцинома јесте начин живота који подразумева неадекватну исхрану, претежно богату црвеним месом. Месо које је третирано сољу, сушењем, ферментацијом, и димљењем садржи генотоксичне полицикличне ароматичне угљоводонике и хетероцикличне аminer који настају приликом загревања и чији прекомеран унос може значајно утицати на микросредину у цревима. Такође, слабо конзумирање воћа и поврћа самим тим и смањен унос природних антиоксиданаса, доводи се у везу са повећаном инциденцом карцинома. Поред неадекватне исхране, нерегулисана хронична стања попут дијабетеса, гојазности, и слично, такође могу бити фактори ризика. На појаву малигнитета могу утицати конзумирање цигарета и алкохола, као и неуредан живот са слабом физичком активношћу. Настанку карцинома могу да допринесу и упални процеси у цревима који често доводе до развоја хроничних стања попут Крнове болести и

улцерозног колитиса, чија је последица стварање преканцерозних лезија и повећана могућност за настанак карцинома (Rattray и сар., 2017; Ahmed, 2020).

Утицај наследне или генетичке основе настанка карцинома дебелог црева јасно показују стања као што је фамилијарна аденоматозна полипоза црева, која се јавља у три облика: Гарднеров синдром, Турцотов синдром и синдром умањене фамилијарне аденоматозне полипозе (Milašinović, 2013). Синдром мутираних *MMR* гена (енгл. *DNA mismatch repair genes - MMR*), повећава вероватноћу настанка малигних промена у дебелом цреву. Неполипозни колоректални карцином (енгл. *Hereditary non-polyposis colon cancer - HNPCC*), који се још назива и Линч синдром, у својој основи има мутацију *MMR* гена, и управо се ова мутација сматра иницијалном за његов настанак (Ahmed, 2020). Гени *MMR* у физиолошким условима одржавају нормалан ток поправке оштећења на ДНК, па њихова мутација углавном доводи до смањења или изостанка поправке ДНК оштећења. Аденоматозна полипоза почиње диспластичним лезијама, које се касније прогресивно развијају у полипе (Слика 1). До прогресије полипозе у аденокарцином, могу да доведу и промене у микрофлори црева, које подразумевају пренамножавање бактерије *Fusobacterium nucleatum* (Kasi и сар., 2020). Синдроми који такође доводе до повећане предиспозиције за настанак карцинома дебелог црева су јувенилни полипозни синдром, затим Појц-Јегерсов синдром, као и Ковденова болест, које спадају у ређе наследне хамартоматозне цревне полипозе (Milašinović, 2013).



Слика 1. Хистолошки развој карцинома дебелог црева (модификовано из Carini и сар., 2017)

1.2. Молекуларне основе настанка карцинома дебелог црева

У основи малигне трансформације ћелија никада није само једна мутација, већ више удружених које воде најпре до генотипске, а онда и фенотипске промене ћелија које прогресивно формирају малигно ткиво. Прве промене које иницирају настанак карцинома јесу мутације на протоонкогенима, тумор супресорима, генима који су укључени у репарацију ДНК, генима који су укључени у процес апоптозе, али и промене на нивоу епигенетске регулације генске експресије. Мутације наведених гена су кључне у иницијацији настанка, али и прогресије карцинома дебелог црева (Sawicki и сар., 2021).

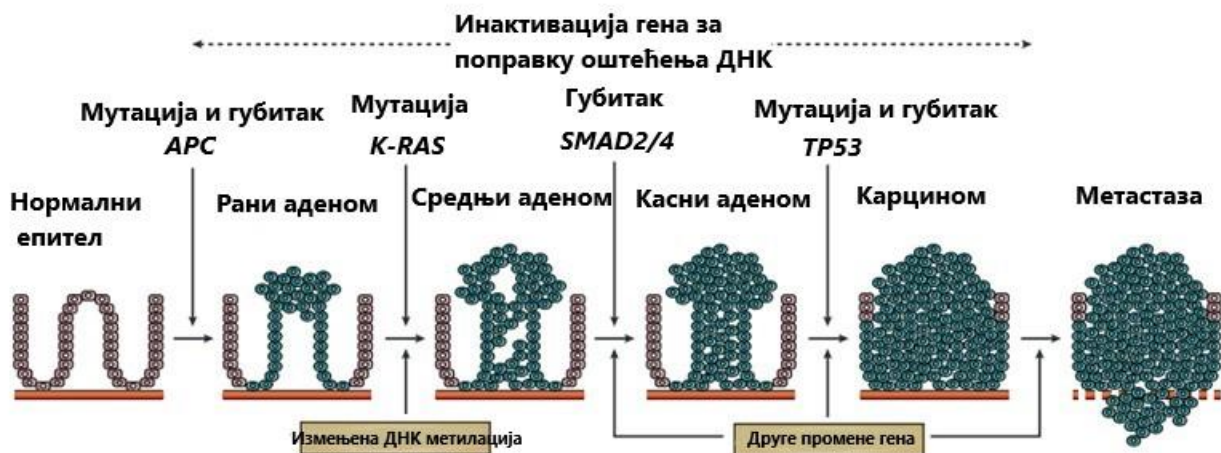
Тумор супресор гени. Најчешћа откривена иницирајућа мутација, и то у 80% случајева карцинома дебелог црева, јесте на тумор супресору *APC* (енгл. *Adenomatous Polyposis Coli* - *APC*). Промена на овом гену је у виду делеције на дугом q краку 5. хромозома, и у уској је вези са настанком поменуте фамилијарне аденоматозне полипозе. Протеински продукт овог гена је мултифункционални протеин чија је главна улога негативна регулација унутарћелијског нивоа и локализације β -катенина. Неактивност *APC* гена је повезана са прогресивним повећањем нивоа нуклеарног β -катенина, што поспешује ћелијску пролиферацију и миграцију. Мутације на нивоу *APC* дешавају се још у аденому у периоду пре формирања полипа, који касније малигно алтерирају, што указује да генетичка прогресија малигне трансформације иде много раније од хистолошке (Turnpenny и Ellard, 2009; Weinberg, 2014; Mamlouk и сар., 2020). Поред мутације на гену *APC*, честа откривена мутација тумор супресора у ћелијама карцинома дебелог црева јесте мутација *TP53* гена, на краку 17p (Слика 2). Ову мутацију садржи више од 50% карцинома дебелог црева. Физиолошка функција гена *TP53* јесте да услед оштећења на молекулу ДНК заустави ћелију у G1 фази ћелијског циклуса и стимулише гене за поправку насталих оштећења. Уколико се оштећења не исправе *TP53* активира апоптозу. Наслеђена мутација овог гена се назива још и Li-Fraumeni синдром (Guha и Malkin, 2017). Изостанак функције овог гена, као последица мутације, доводи до избегавања апоптозе, услед чега долази до накопљања ћелија са оштећеном ДНК и потенцијалног нагомилавања мутација (Turnpenny и Ellard, 2009). Затим, мутације *DCC* гена (енгл. *Deleted in Colon Cancer* - *DCC*), откривене на 18q краку, су такође повезане са настанком колоректалног карцинома, и то у преко 70% случајева. Дисфункција *DCC* гена онемогућава нормалну ћелијску адхезију и самим тим промовише миграцију ћелија карцинома (Turnpenny и Ellard, 2009; Ahmed, 2020). У преко 40% случајева карцинома дебелог црева откривена је мутација на тумор супресор генима *MLH1* (енгл. *MutL Homolog 1*) и *MSH2* (енгл. *MutS Homolog 2*). Протеински продукти ових гена су укључени у поправке оштећења на ДНК, при чему мутације онемогућавају њихову физиолошку функцију (Kasi и сар., 2020). Истраживања показују да су мутације у генима *FBXW7* (енгл. *F-box/WD Repeat-Containing Protein 7*), *TCF7L2* (енгл. *Transcription Factor 7-like 2*) и *PTEN* (енгл. *Phosphatase and TENsin Homolog*) у уској вези са транзицијом аденом-карцином (Chang и сар., 2017; Mamlouk и сар., 2020). Мутације које се дешавају на генима укљученим у TGF- β пут, такође могу промовисати канцерогенезу (Слика 2). Наиме, ови гени су *SMAD2*, *SMAD3* и *SMAD4*, (енгл. *Mothers Against Decapentaplegic Homologs*), чија се мутација и губитак функције повезује са пролиферацијом и метастатским потенцијалом ћелија колоректалног карцинома (Turnpenny и Ellard, 2009; Fleming и сар., 2013).

Протоонкогени. Протоонкогени представљају гене чији протеински производи врше јако важне биолошке функције, и укључени су у важне ћелијске процесе као што је ћелијски раст, деоба, диференцијација и апоптоза. Промене на протоонкогенима, које укључују тачкасте мутације, веће хромозомске реаранжмане попут инсерција, делеција, транслокација и амплификација, као и промене у нивоу експресије протоонкогена, доводе до настанка онкогена. Протеински производи онкогена, онкопротеини, имају кључну улогу током настанка и прогресије тумора. Група протоонкогена која је уско повезана са настанком карцинома дебелог црева јесу фактори раста (Turnpenny и Ellard, 2009). Фактори раста који потичу од тромбоцита (енгл. *Platelet-Derived Growth Factors - PDGFs*) и њихови рецептори (PDGFRs) се повезују са прогресијом тумора и са процесом ангиогенезе. Њихова улога у прогресији карцинома, инвазији и метастази је велика с обзиром на њихову повишену експресију код пацијената са карциномом дебелог црева, у односу на пацијенте са аденомом (Manzat Saplacan и сар., 2017). Процесу настанка карцинома дебелог црева доприноси и активација онкогена *KRAS* (енгл. *Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) на хромозому 12p који доприноси већој агресивности карцинома (Слика 2), као и лошијем одговору на терапију (Ahmed, 2020). Овај онкоген је производ мутираног *RAS* протоонкогена, који има улогу у активацији *RAF-MAPK* и *PI3'K* сигналних киназних путева, неопходних за нормалан ток ћелијског циклуса. Протеински производ *RAS* гена се може наћи у две форме, неактивна конформација везана за *GDP* и активна конформација везана за *GTP*. Када су мутирани, *RAS* протеини остају у активној форми, јер губе способност хидролизе *GTP* у *GDP*, што омогућава континуирану деобу ћелија, што представља главни механизам накупљања ћелија, неконтролисане деобе и настанка тумора (Turnpenny и Ellard, 2009; Weinberg, 2014).

Гени за синтезу ензима укључених у поправку ДНК оштећења. Промене у генима који су део система за поправку оштећења на ДНК доводе до накупљања већег броја мутација, услед немогућности ових система да исправи грешке. На тај начин долази до накупљања оштећења на ДНК и развоја геномске нестабилности. У великом броју случајева колоректалног карцинома, присутни су и *CIN* (енгл. *Chromosomal Instability*) и *MIN* фенотип (енгл. *Microsatellite Instability*), који се сматрају узроцима геномске нестабилности. Хромозомска нестабилност представља нумеричке и структурне аберације хромозома, а овакви догађаји су често последица мутације гена одговорних за хромозомску сегрегацију. Са друге стране, *MIN*, први пут описана у колоректалном карциному, представља повећану стопу мутација са немогућношћу поправке оштећења (Lindblom, 2001; Bogdanović, 2021). Конкретно, у 70 % случајева карцинома дебелог црева присутан је *CIN* фенотип, и сматра се да овакви карциноми имају лошији исход од карцинома у чијим ћелијама је присутан *MIN* фенотип (Kasi и сар., 2020).

Поред описаних промена на генетском материјалу, постоје и **епигенетске промене** које имају значајну улогу у настанку и прогресији карцинома дебелог црева. Карактеристична појава за карцином дебелог црева јесте измењена ДНК метилација *CpG* острваца, односно *CIMP* фенотип (енгл. *CpG Island Methylator Phenotype*). Метилација ДНК је ензимски процес при ком се додаје метил група помоћу ДНК метилтрансфераза. Супстрат за ДНК метилацију је динуклеотидна секвенца *CG*, која се још назива и *CpG* острво. Уколико се ова секвенца налази у оквиру промоторског региона, хиперметилација

доводи до утишавања транскрипције што може довести до неактивности најчешће тумор супресор гена што доприноси процесу канцерогенезе (Mojarad и сар., 2013).



Слика 2. Мутације које посредују настанку карцинома дебелог црева (модификовано из Wickham и Lassere, 2007)

1.3. Стандардна терапија у лечењу карцинома дебелог црева у Србији

Након успостављања дијагнозе карцинома дебелог црева разним дијагностичким методама, приступа се лечењу у зависности од стадијума у ком је болест откривена. Видови лечења у складу са „Националним водичем добре клиничке праксе за дијагностиковање и лечење рака колона и ректума“ су хируршка, радио и хемиотерапија (Milašinović, 2013). У Србији се, на основу протокола, лечењу приступа најпре хируршки уколико је могуће, приликом чега се поред примарне промене отклања и део околног ткива и лимфних нодуса. Може се користити и радиотерапија као преоперативна метода, поготову у случају узнапредовалог стадијума где је циљ смањење величине тумора како би се смањила и вероватноћа расејавања туморских ћелија приликом ресекције. Међутим, примена циљане радиотерапије је чешћа постоперативно, када се њеном употребом смањује ризик од могућих рецидива болести (Milašinović, 2013).

Хемиотерапија представља системско лечење са циљем да смањи ризик од могућих рецидива након хируршког лечења. Примењује се адјувантно код високоризичних облика карцинома, где након хируршког захвата постоји већа вероватноћа за појаву метастаза. Неоадјувантна хемиотерапија се користи пре хируршког захвата у циљу смањења величине карцинома. Тренутно се од хемиотерапеутика за лечење колоректалног карцинома користе 5-флуороурацил, често у комбинацији са леуковорином (фолинска киселина), оксалиплатина и иринотекан (Gristan и Moosavi, 2021). У лечењу метастатских облика колоректалног карцинома користи се и биолошка терапија, биолошким агенасима као што су бевацизумаб, цетуксимаб и панитумумаб. Код пацијената са контраиндикацијом за инфузионо лечење или пак контраиндикацијом за лечење оксалиплатином, користе се орални флуоропиримидини, који су заправо пролекови 5-

флуороурацила, као што је капецитабин и урацил-тегафур (Milašinović, 2013). Поменути леуковорин, односно фолинска киселина, користи се у терапији карцинома у комбинацији са хемиотерапеутиком да би ублажила његове нуспојаве. Фолинска киселина потиче од фолне киселине (витамин B9), пореклом из воћа и поврћа (Lester, 2006; Ibrahim и сар., 2020). Заправо, фолинска киселина је редукована фолна киселина, те самим тим представља њену активну форму.

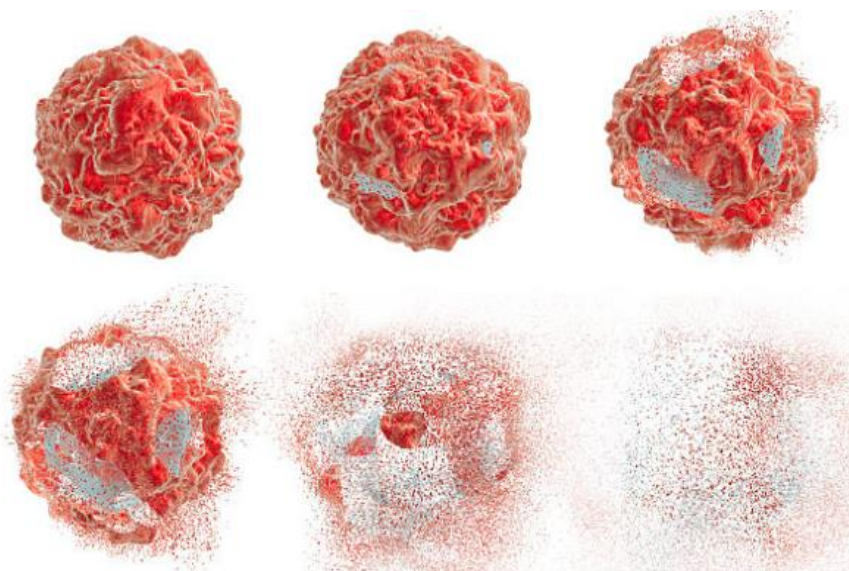
1.4. Ћелијске линије карцинома дебелог црева, као *in vitro* модел систем

Ткиво карцинома дебелог црева је хетерогеног састава, јер поред везива и микросредине у састав неоплазме карцинома дебелог црева улази велики број различитих типова ћелија. Сваки тип ћелија сам по себи може да се разликује најпре макроскопски у морфологији, геному и свим мутацијама које носи са собом, затим метаболизму, а онда и у реаговању на терапију и тенденцији развоја резистенције. Ћелијске линије су незаобилазан модел систем за истраживања у области молекуларне биологије малигне ћелије. Линије као модел систем, могу дати ширу слику о сигналној трансдукцији која карактерише малигно ткиво из кога потичу. Могу се користити непосредно након изолације из примарног тумора, као примарне и краткотрајне ћелијске културе, или се имортализују и комерцијално набављају. Данас постоје банке са добро окарактерисаним колекцијама ћелијских линија, као што је банка ћелијских линија ATCC (енгл. *American Type Culture Collection*). Прва изолована и имортализована ћелијска линија је HeLa, пореклом од карцинома грлића материце, још давне 1953. године. Међу најбоље окарактерисаним и најчешће коришћеним линијама пореклом од карцинома дебелог црева су CaCo-2, DLD1, SW-480, SW-620, COLO 320, HT-29, HCT-116. У студији која је рађена 2014. године, испитан је генетички профил 70 различитих линија карцинома колона у односу на податке добијене за примарни карцином (из базе *The Cancer Genome Atlas*), где је показана велика сличност у мутацијама ћелијских линија пореклом од карцинома дебелог црева са примарним ћелијама карцинома. Међутим, међу линијама изолованим из карцинома дебелог црева постоји разлика у мутацијама те се могу сврстати у различите подгрупе у односу на одсуство или присуство неких мутација, што их чини погодним за испитивање циљаних сигналних путева и њима одговарајућих биолошких маркера како би се добио што адекватнији антитуморски лек (Mouradov и сар., 2014).

Ћелијске линије се углавном гаје у једнослојним културама које су погодне за *in vitro* истраживања, а могуће је и истраживање на ксенографтима *in vivo* (углавном се користе лабораторијски мишеви) (Gillet и сар., 2013). Гајење имортализованих адхерентних ћелијских линија у култури захтева посебне услове, најпре адекватне стерилне лабораторијске посуде са равним дном који омогућавају адхезију линија за дно и међућелијску адхезију. Затим, неопходно је обезбедити оптималне физичке услове, као што су температура, влажност, zasiћеност ваздуха угљен-диоксидом, као хемијске услове за раст коришћењем одговарајућих медијума, специфичног нутритивног састава прилагођеног за раст жељеног типа ћелија (Abbott, 2003).

2. Апоптоза

С обзиром на то да се поједина ткива стално обнављају, настајање нових ћелија условљава претходно умирање одређеног броја и континуирану хомеостазу у ткивима, у циљу одржавања сталности броја ћелија. Апоптоза, односно програмирана ћелијска смрт, представља физиолошки процес заступљен у свим ткивима, још од стадијума ембриогенезе. Међутим, до апоптозе може доћи и услед деловања патолошких фактора као што су микроорганизми, затим физичких и хемијских агенаса, унутрашњих оштећења ћелија, оксидационог стреса, као и услед изостанка фактора стимулације ћелијског раста и деобе, или недостатка хранљивих материја (Jan и Chaudhry, 2019). Апоптоза је вид „активне ћелијске смрти“, јер ћелија учествује у овом процесу активно, на основу генетски програмираног упутства. Током овог процеса ћелија пролази кроз мноштво морфолошких промена са крајњим исходом фрагментације ћелије и формирања апоптотских тела (Weinberg, 2014; D’Arcy, 2019). Промене, као и брзина апоптозе се могу разликовати у зависности од типа ћелија. Ћелија се најпре издваја од своје околине, након чега крећу промене на нивоу једра. У једру се кондензује хроматин и накупља уз једрову мембрану у виду полумесеца. Промене се дешавају и у цитоплазми, где долази до деградације органела које су сувишне од стране ендогених ензима, уз очување органела које су неопходне за сам процес апоптозе. Деградација ћелије иде до тог стадијума да она потпуно губи свој облик, хроматин се згрушњава, цитоплазма повлачи и ћелија поприма облик неправилних грудвица, такозваних апоптотских тела која су оивичена ћелијском мембраном. Услед тога нема изливања ћелијског садржаја и његовог утицаја на околне ћелије, већ све промене остају на нивоу апоптотске ћелије која на крају бива одстрањена из организма од стране макрофага или суседних ћелија (Слика 3) (Zlender, 2003; D’Arcy, 2019).



Слика 3. Процес апоптозе (са сајта: <https://www.istockphoto.com/photos/apoptosis>)

Као механизам који регулише број ћелија, апоптоза заузима важно место и у процесу канцерогенезе. Туморске ћелије поседују механизме којима избегавају апоптозу,

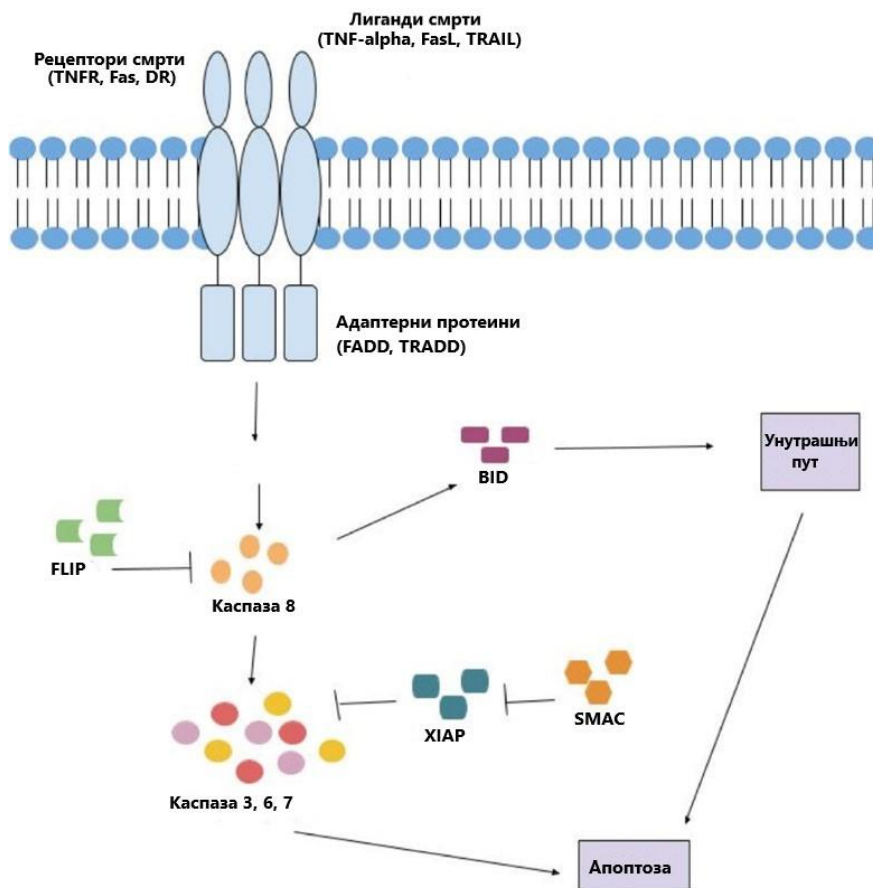
путем нарушеног баланса проапоптотских и антиапоптотских протеина, смањене сигнализације путем рецептора смрти, смањене функције каспаза, и другим механизмима (Weinberg, 2014; Jan и Chaudhry, 2019). Овој појави додатно доприноси инфламаторна средина у којој се ћелије налазе, јер инфламација у ћелијама промовише активацију сигналних путева зависних од NF- κ B транскрипционог фактора, који се сматра негативним регулатором апоптозе (Fernald и Kurokawa, 2013; Francuz и сар., 2016). Поред мутација тумор супресор гена који су описани у претходном поглављу, честе промене које се дешавају у ћелијама карцинома дебелог црева јесу мутације или промене експресије проапоптотских *Bax* и *Apaf-1* гена (енгл. *Apoptotic Protease Activation Factor-1*), амплификација антиапоптотског *Bcl-2* гена или инхибитора каспаза - XIAP (енгл. *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) (Matsuura и сар., 2016). Протеини од којих апоптоза директно зависи јесу каспазе, те је и инактивација неке од кључних каспаза за иницијацију и/или извршење процеса апоптозе начин избегавања овог процеса. Могућ је прекид апоптотске сигнализације директно посредством мутације гена који кодирају протеине каспаза или индиректно посредством инактивирајућих протеина попут XIAP-а (Fulda, 2009).

У сам процес апоптозе су укључени бројни молекули, могу се активирати различити сигнални путеви и међусобно се преклапати, док је крајњи исход исти. Најчешће се процес апоптозе у ћелијама може покренути спољашњим путем, посредством активације мембранских рецептора смрти, или унутрашњим путем који покрећу унутарћелијски сигнали (Weinberg, 2014).

2.1. Пренос сигнала у спољашњем апоптотском путу

Иницијација апоптозе спољашњим путем креће активацијом рецептора смрти (енгл. *Dead Receptors* - DR). Рецептори смрти су трансмембрански и протежу се од спољашње до унутрашње површине ћелијске мембране. Делови ових рецептора који се налазе у цитоплазми називају се домени смрти (енгл. *Dead Domain* - DD) и они повезују рецептор са даљим/унутрашњим сигналним молекулима у процесу апоптозе (Слика 4). До сада је описано осам рецептора смрти суперфамилије TNF (енгл. *Tumor Necrosis Factor*), а то су: TNF-R1 (p55), Fas (CD95, APO-1), TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3, EDAR, DR6 и NGFR (p75) (Lavrik и сар., 2005; Ivanisenko и Lavrik, 2019). Почетак сигналне трансдукције апоптозе јесте везивања лиганда за рецептор смрти. Лиганди су високо специфични макромолекули (TNF α , FasL и TRAIL) који се везују за рецептор, што доводи до његове тримеризације. Услед повезивања, на пример, Fas (енгл. *First Apoptosis Signal*) и FasL у оквиру DISC комплекса (енгл. *Death Inducing Signaling Complex*), долази до накупљања домена смрти, који заправо представљају унутарћелијске делове рецептора смрти. Домени смрти садрже око 100 аминокиселинских остатака који формирају шест антипаралелних α -хеликс региона односно тзв. грчки кључ (енгл. *Greek Key*). Домен смрти се хомотипски везује за адаптерни протеин FADD (енгл. *Fas Associated Death Domain Protein*). Адаптерни протеин FADD поред домена смрти садржи DED домен (енгл. *Death Effector Domain*), који омогућава везивање за прокаспазу 8 или 10, а тиме и њену активацију (Chang и сар., 2003; Ivanisenko и Lavrik, 2019). Поред везивања прокаспаза, у састав комплекса DISC може да улази и целуларни FLIP инхибиторни протеин (с-FLIP). Он се везује за FADD или за прокаспазу 8/10 и формира инхибиторни апоптотски комплекс AIC (енгл. *Apoptosis Inhibitory Complex*), чиме блокира пренос сигнала уколико је високо експримиран, док је

његова присутност у малој мери чак пожељна јер појачава апоптотски сигнал. Повећана активност комплекса АИС, примећена је у ћелијама карцинома, што доприноси избегавању апоптозе и повећава ризик од стварања резистенције (Safa, 2012; Tummers и Green, 2017). Активна форма каспазе 8 даље активира ефекторне прокаспазе 3 и/или 7, протеолитичким цепањем места између њихове велике и мале субјединице. Активирани ефекторне каспазе директно воде ћелију у апоптозу, при чему је овај процес иреверзибилан. Активност ефекторних каспаза може да буде инхибирана од стране XIAP протеина (Tummers и Green, 2017).



Слика 4. Спољашњи апоптотски пут (модификовано из Pfeffer и Singh, 2017)

2.2. Пренос сигнала у унутрашњем апоптотском путу

Процес апоптозе може бити покренут из унутрашњости ћелије, услед различитих стресогених сигнала, оксидационог стреса и оксидационих или других видова оштећења биомакромолекула. Сигнал може потећи из једра, митохондрија, ендоплазматичног ретикулума и других органела, али централно место у овом процесу заузимају митохондрије. Кључну улогу у регулацији унутрашњег, митохондријалног апоптотског пута имају протеини Bcl-2 (енгл. *B-cell Lymphoma 2*) фамилије, чија равнотежа регулише митохондријални мембрански потенцијал. Могу се наћи у цитосолу, ендоплазматичном ретикулуму, митохондријама и омотачу једра. У оквиру ове породице постоје

проапоптотски (Bad, Bax, Bak, Bid, Bcl-xS, и остали) и антиапоптотски протеини (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 и остали) (Lawen, 2003; Wong, 2011; Weinberg, 2014). Трансмембрански домен протеина Bcl-2 фамилије налази се на COOH терминалном крају, и служи за интеракцију са унутарћелијским мембранама. Заједничко за све чланове ове породице протеина јесте да поседују висококонзервативне BH домene (енгл. *Bcl-2 Homology Domain*), који су различито заступљени код појединих чланова ове породице па разликујемо четири подтипа. Антиапоптотски чланови (Bcl-2 и Bcl-xL) имају сва четири подтипа овог домена (BH1, BH2, BH3 и BH4), и одговорни су за инхибицију апоптозе без обзира на стимулусе. Сматра се да антиапоптотски протеини могу бити супстрат за каспазе које их цепањем преобрате у проапоптотске сигнале. Проапоптотски чланови попут Bax и Bak, поседују три BH домена (изостаје BH4), а постоје и они који имају само BH3 домен и међу њима су Bnip3, Nix/Bnip3L, Bid, Noxa, Puma, и Bad (Слика 5) (Gustafsson и Gottlieb, 2007).

Антиапоптотски протеини



Проапоптотски протеини



Протеини са BH3 доменом

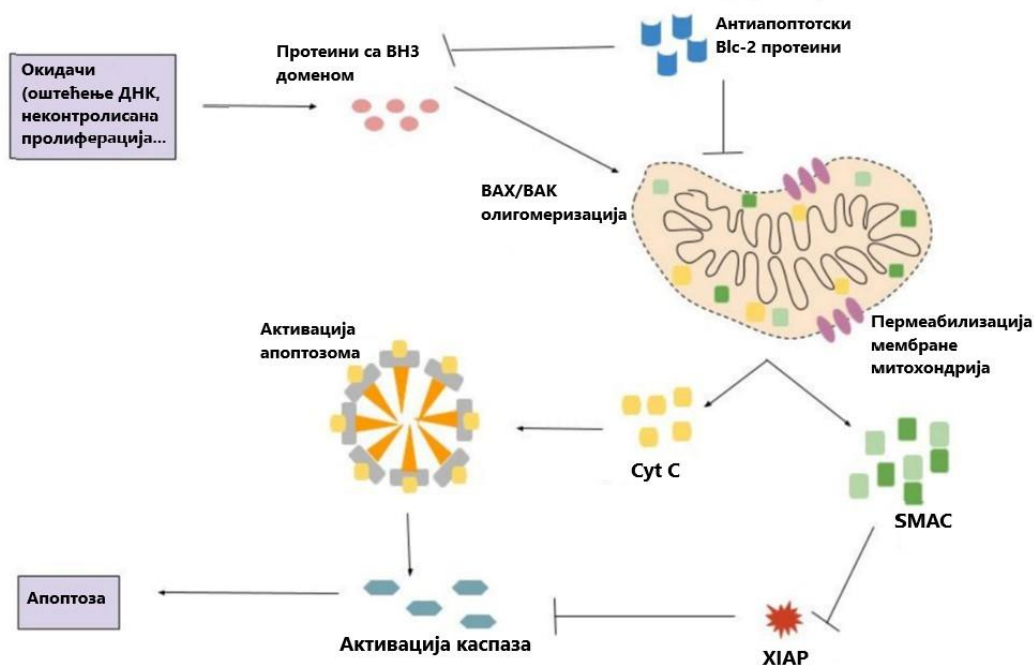


Слика 5. Протеини са BH доменима (модификовано из Giam и сар., 2008)

Управо су протеини који поседују само BH3 домен, најактивнији сигнали апоптозе који преносе информацију из цитосола у митохондрије, и углавном су проапоптотски. Кључну улогу у активирању проапоптотских протеина са BH3 доменом има каспаза 8. Пример за то је Bid протеин, који се протеолитичким цепањем од стране каспазе 8 активира, транслоцира у митохондрије у облику tBid (енгл. *truncated Bid*) и ремети пермабилност мембране тако што директно реагује са проапоптотским Bax протеином. Прекомерна експресија Bcl-2 или Bcl-XL доводи до блокирања активације Bax и Bak протеина (Gustafsson и Gottlieb, 2007). На пример, протеин Bad врши неутрализацију Bcl-2 и Bcl-XL, али нема афинитет ка Mcl-1, ког везује Noxa протеин (Chen и сар., 2005). С тим у вези, од јачине апоптотског стимулуса зависи који ће се протеини са BH3 доменом ослободити и реаговати са антиапоптотским протеинима (Gustafsson и Gottlieb, 2007). Такође, да би се апоптоза несметано одвијала, протеини са BH3 доменом активирају ефекторне проапоптотске Bax и Bak протеине, неопходне за реализацију унутрашњег апоптотског пута. Проапоптотски протеини са BH3 доменом који имају способност директног везивања за Bax и Bak називају се активатори. Са друге стране, проапоптотски

протеини са BH3 доменом који немају могућност да се директно вежу за Bax и Bak (тзв. сензибилизатори), иницирају апоптозу индиректно тако што се везују за антиапоптотске Bcl-2 протеине, и покрећу ослобађање активатора за које су антиапоптотски протеини претходно били везани. Везујући антиапоптотске Bcl-2 протеине, сензибилизатори спречавају да они својим везивањем за Bax и Bak доведу до њихове секвестрације и самим тим до потенцијалне супресије апотозе. Сматра се да се антиапоптотски протеини на мембрани митохондрија везују за активни Bax, који затим од стране протеина са BH3 доменом бива ослобођен, након чега врши регрутацију неактивног цитосолног Bax-а у митохондрије и активира га путем механизма аутоактивације, доводи до оштећења митохондријалне мембране и ослобађања цитохрома (Слика 6). Липиди митохондријалне мембране такође могу да учествују у активирању Bax и Bak. Уколико су сензибилизатори везани за антиапоптотске протеине, долази до активирања Bax-а преко липида на спољашњој мембрани митохондрија, јер Bax слободном дифузијом улази у митохондрије где се у липидном двослоју дешава спонтана хомо-олигомеризација Bax или Bak протеина (Turnpenny и Ellard, 2009; Huang и сар., 2019; Luo и сар., 2020).

Неравнотежа протеина Bcl-2 фамилије у корист проапоптотских доводи до нарушавања пермеабилности митохондријалне мембране и ослобађање Cyt c (енгл. *Cytochrome c*) и осталих ефекторних протеина из митохондрија стварањем пора на њиховој спољашњој мембрани (Tait и Green, 2010; Singh и сар., 2019). Из митохондријалног међумембранског простора, ослобађа се између осталог и инхибитор XIAP протеина, као што је SMAC (енгл. *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*), који промовише ослобађање Cyt c из митохондрија и омогућава ефекторним каспазама да изврше процес апотозе до краја. У цитоплазми, Cyt c се везује за домene на протеину Araf-1 (енгл. *Apoptotic Protease Activation Factor-1*), који има способност да се везује са још 6 Araf-1 протеина и образује апоптозом. Домен CARD и помоћни спирални домени на протеину Araf-1 пролазе кроз конформационе промене како би ослободили његов АТР-азни домен и омогућили вишеструким Araf-1 протеинима да олигомеризују у формирају кружни хептамер. Комплексу се прикључује и прокаспаза 9 у више копија, и то тако што се хомотипски везује преко свог CARD домена за CARD домен на протеину Araf-1 (Yuan и сар., 2010). Прокаспаза 9 се активира, и овај протеолитички комплекс даље врши цепање ефекторних каспаза 3 и 7 које реализују апоптозу до краја (Yuan и Akey, 2013). Да би задржала своју протеолитичку функцију, каспаза 9 остаје везана за апоптозом, јер управо апоптозом омогућава везивање више прокаспаза и њихову активацију и димеризацију. Активација каспазе 9 доводи до даљег појачавања апоптотског сигнала активирањем ефекторних каспаза, услед чега долази и до разградње антиапоптотских протеина коју спроводе ове каспазе, као и до разградње цитоскелета. Разградња цитоскелета доводи до стварања низа морфолошких промена који су типични за различите стадијуме апоптозе.



Слика 6. Унутрашњи апоптотски пут (модификовано из Pfeffer и Singh, 2017)

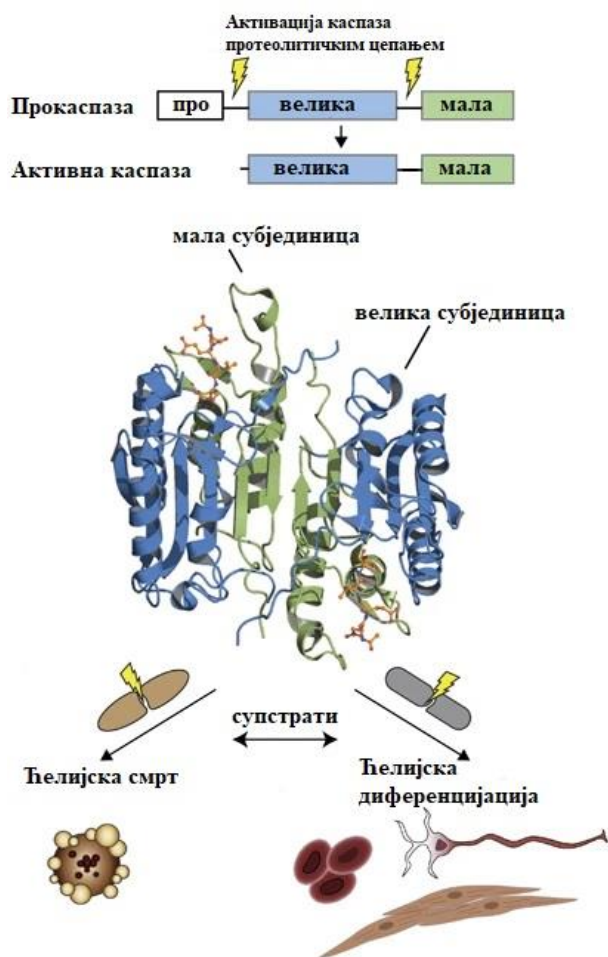
Поред поменутих, постоје и проапоптотски молекули у митохондријама, који се могу ослобађати и деловати мимо каспаза, а то су AIF (енгл. *Apoptosis Inducing Factor*) и ендонуклеаза G, одговорни за протеолизу ћелије. Након изласка из митохондрија због нарушеног интегритета мембране, AIF одлази до једра, најчешће удружен са циклофилином А, где утиче на кондензацију хроматина и ДНК деградацију. У физиолошком смислу, овај фактор има и редокс функцију, сматра се антиоксидансом јер ћелије које имају дефицит или одсуство AIF посебно су осетљиве на оксидациони стрес. Ендонуклеаза G се транслоцира у једро, где врши олигонуклеозомалну фрагментацију ДНК, и то независно од каспаза. Физиолошки, ендонуклеаза G учествује у рекомбинацији ДНК, а њен недостатак инхибира ћелијску пролиферацију тако што зауставља ћелијски циклус у G2 фази (Galluzzi и сар., 2008).

2.3. Каспазе као кључни молекули процеса апоптозе

Кључни протеини у процесу апоптозе су ензими звани каспазе, цистеин-аспартат специфичне протеиназе (енгл. *Cysteiny Aspartate Specific Proteases*). Припадају групи цистеин протеиназа, јер садрже цистеин у активном месту (Cys бочно место), док своју протеолитичку активност спроводе цепањем супстрата иза аспартата (Asp). Једна каспаза може активирати другу, а и саму себе, чиме појачава стимулус за апоптозу и убрзава ћелијску смрт (Weinberg, 2014; Ivanisenko и Lavrik, 2019). Дакле, протеолитичка активност каспазе у већини случаја доводи до активације одговарајућег супстрата. Иницирање апоптозе дешава се помоћу иницијаторских, апијалних каспаза, каспазе 2, 8, 9 и 10, док су каспазе 3, 6 и 7 ефекторне каспазе које се прикључују сигналној трансдукцији при крају

процеса апоптозе. Каспазе се налазе у цитоплазми као неактивни протеини, прекурсори, односно прокаспазе, који се активирају у процесу апоптозе.

Иницијаторске каспазе. Прокаспаза се састоји од 3 домена: N-терминалног домена, које представља продомен и од великог и малог каталитичког домена који ће заправо образовати активну каспазу, одбацивањем продомена протеолитичким цепањем. Активна форма каспазе садржи 4 различите подјединице (хетеротетрамер), од којих су две велике, величине приближно 20 kDa, и две мале од по 10 kDa (Слика 7).

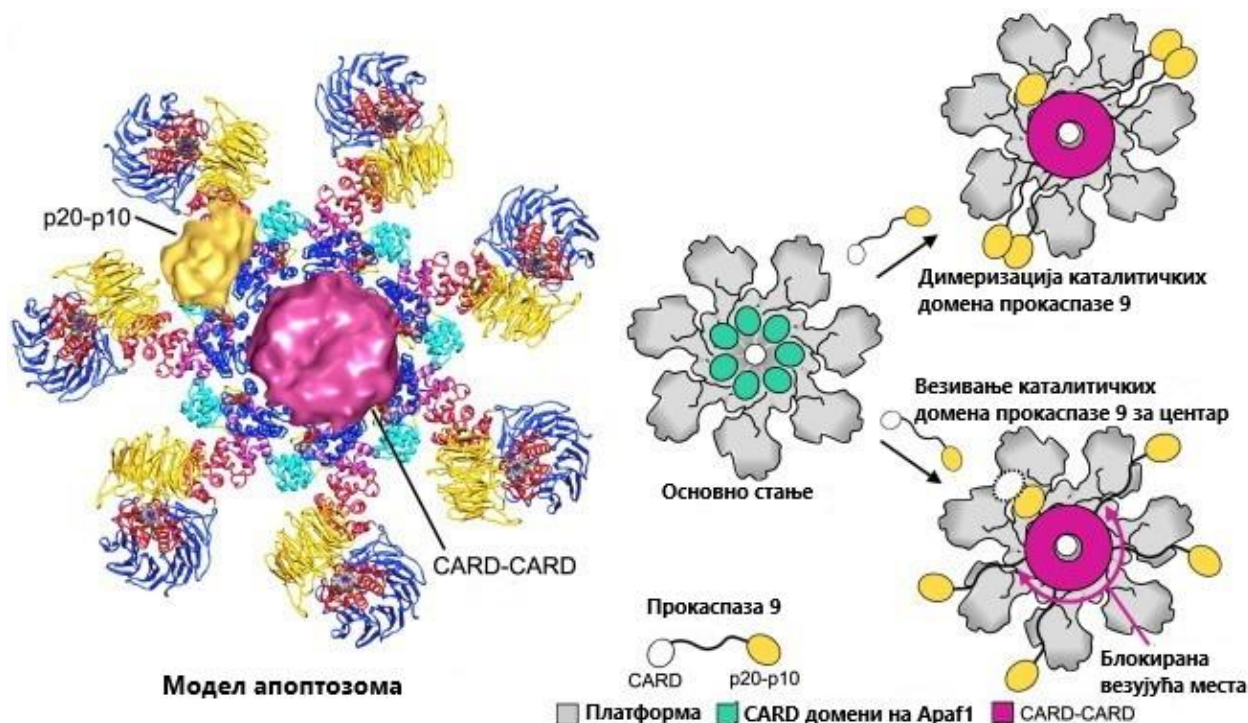


Слика 7. Грађа каспаза (модификовано из Julien и Wells, 2017)

Иницијацију спољашњег пута обавља каспаза 8, за чију активацију је неопходно претходно формирање олигомерних филамената, односно DED домена. Продомен који се налази на иницијаторским каспазама (N-терминални крај) омогућава прокаспазу да се веже за DED. Управо се по продомену иницијаторске разликују од ефекторних каспаза. Преко DED домена дешава се и регрутација каспаза као и њихова аутопротеолиза (Ivanisenko и Lavrik, 2019). Најчешће експримирана каспаза спољашњег пута је каспаза 8 и експериментална истраживања указују да до апоптозе неће доћи само иницијацијом прокаспазе 10 уколико је прокаспаза 8 одсутна, управо због нижег нивоа експримирања каспазе 10 у неким ткивима (Horn и сар., 2017). С тим у вези, најактивнија изоформа прокаспазе 8 је прокаспаза 8a. Прокаспаза 8 има још једну изоформу, 8b, која је по структури и активности веома слична претходној, једина разлика је што је овај протеин краћи. N-терминални домен прокаспазе 8 се састоји од DED1 и DED2 домена, помоћу којих се везује за DISC иницијаторски комплекс.

Поред DED домена садржи, као што је већ карактеристично за све прокаспазе и велики и мали каталитички домен. Аутокаталитички процес активације прокаспазе одвија се тако што долази до цепања на остацима аспартата између великог и малог каталитичког домена, а затим и између продомена и великог каталитичког домена, при чему настаје хетеродимер активне каспазе. Постоји и велики број посттранслационих модификација прокаспазе 8, попут фосфорилације и убиквитинације, које могу да смање или појачају активацију каспазе 8 (Ivanisenko и Lavrik, 2019). С обзиром на идентичну структуру,

каспаза 9 за разлику од каспазе 8, активира се на другачији начин. За њену активацију, као што је већ описано у претходном одељку, неопходан је протеин Araf-1. Овај протеин је централни део апоптозома, структуре којој се придружује и каспаза 9 са циљем активације и појачавања апоптотског сигнала и садржи три домена: N-терминални CARD домен, домен за везивање нуклеотида и C-терминалну половину која садржи 12-13 поновака WD40 домена. Домен CARD (енгл. *Caspase Activation and Recruitment Domain*) је одговоран за интеракције са продоменом каспазе-9, и ова интеракција је неопходна за регрутовање и активацију. Домен за везивање нуклеотида је одговоран за олигомеризацију Araf-1, док WD40 поновци интереагују са цитохромом. Апоптозом је хептамерна структура, што имплицира да је каспаза 9 углавном везана као мономерна, те апоптозом регрутује седам молекула неактивне прокапазе-9 у непосредној близини. Каспаза 9 се својим CARD доменом хомотипски везује за CARD домен на Araf1 протеину (Слика 8).



Слика 8. Грађа апоптозома (модификовано из Yuan и Akey, 2013)

За остале каспазе је типично да је за њихову активацију неопходно протеолитичко цепање, одбацивање активационог домена како би се десила конформациона промена и открило место везивања. Међутим, за каспазу 9 је карактеристично да има другачак активациони домен који се налази између њених великих и малих субјединица, да услед димеризације у апоптозому долази до померања каспазе и до откривања активног места без протеолитичког цепања. Због тога каспаза 9 има много већи афинитет везивања за апоптозом него за покретање аутопротеолитичког цепања, јер управо апоптозом омогућава да се каспаза позиционира у положај за откривање активног места (Li и сар., 2017). Иницијаторске каспазе учествују у активацији ефекторних каспаза.

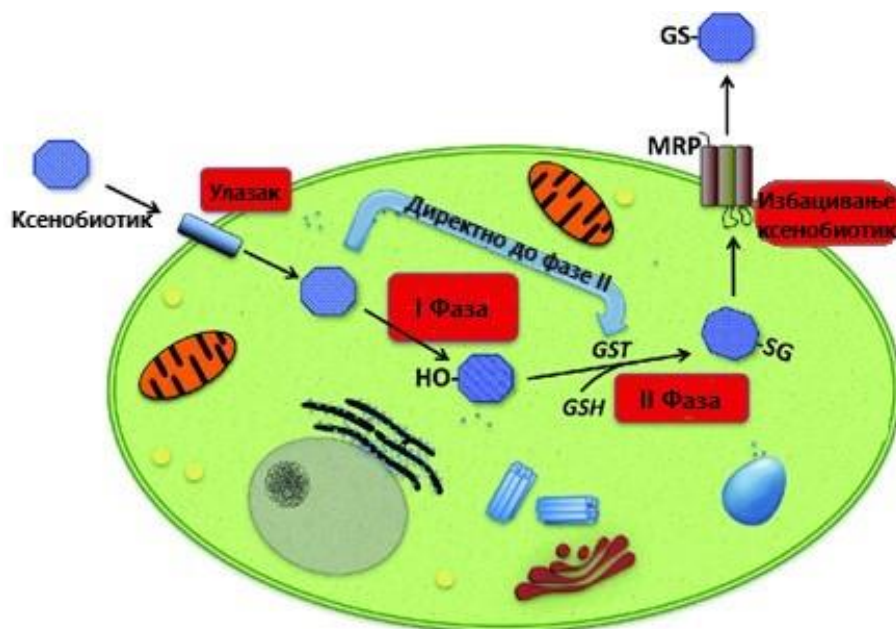
Ефекторне каспазе. Ефекторне каспазе 3 и 7, присутне су у ћелијама као димери, и активирају се протеолитичким цепањем. Сегмент линкера који се налази између две субјединице про-капазе, блокира активно место све до протеолитичког цепања, након чега N- и C-терминалне секвенце помажу у стабилизацији активног места. Протеолитичко цепање ефекторних реализују иницијаторске каспазе. Ефекторне каспазе даље покрећу ендонуклеазе CAD (енгл. *Caspase Activated DNase*) које врше нуклеозомалну фрагментацију ДНК (Hail и сар., 2006). Активација CAD ендонуклеазе се дешава протеолитичким цепањем од стране каспазе 3 или 7, што доводи до одвајања CAD од ICAD (енгл. *Caspase Activated DNase Inhibitor*) (Boatright и Salvesen, 2003; Hail и сар., 2006).

3. Процес биотрансформације

Биотрансформацију ксенобиотика у ћелијама можемо дефинисати као његово метаболисање посредством ензима посредованих модификација кроз две фазе (Williams, 1971), након чега се у трећој фази метаболит елиминише посредством ABC транспортера (Слика 9). Управо процес биотрансформације одређује концентрацију ксенобиотика у ћелији, а самим тим и трајање његовог биолошког ефекта. Трајање дејства лека је, осим са метаболизмом, у вези и са његовом апсорпцијом, дистрибуцијом и излучивањем. Метаболизам је у најужој вези са променама ксенобиотика јер се током овог процеса дешавају модификације које утичу на његову даљу „будућност“ и ефекат. Заправо, од модификација које се дешавају кроз фазе биотрансформације зависи да ли ће доћи до стварања мање или више растворљивог, односно мање или више активног агенса. На овај начин је могућа тотална инактивација лека, али и активирање лека из прекурсора, односно пролека. Процесе модификације ксенобиотика регулишу такозвани ензими ХМЕ (енгл. *Xenobiotic-Metabolizing Enzymes*) (Orhan и сар., 2021). Биотрансформација се неретко сматра врстом детоксификације, али то није њен једини исход. Ензими биотрансформације имају способност да претварају одређене хемикалије у високо токсичне метаболите. Ова чињеница доводи до закључка да би то могао бити један од почетних догађаја тзв. хемијске канцерогенезе и често се означава као биоактивација (Beyerle и сар., 2015).

Прва фаза биотрансформације подразумева хидролизу, редукцију и оксидацију ксенобиотика, додавањем или одбацивањем функционалних група ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ или $-\text{COOH}$), што резултује повећањем растворљивости (хидрофилности) ових супстанци, посредством CYP (енгл. *Cytochrome P450*) протеина (Guengerich, 2007). Протеини CYP су суперфамилија хем-зависних монооксигеназа које катализују оксидацију великог броја једињења. Најзаступљенији су у ендоплазматичном ретикулуму ћелија јетре, али се ван ћелија јетре налазе у свим ткивима у одређеној мери. У ћелији, ови ензими су поред ендоплазматског ретикулума, присутни и у митохондријама и плазма мембрани (Bredel 2001; Parkinson, 2008; Zanger и Schwab, 2013). Везикуле које настају од глатког ендоплазматског ретикулума, такозвани глатки микрозоми, углавном су задужени за транспорт CYP ензима и активно учествују у процесу метаболизма ксенобиотика. Активност CYP ензима захтева и присуство редукујућег молекула, најчешће NADPH (енгл. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), затим CYP редуктазу (енгл. *Cytochrome P450 Oxidoreductase* - POR), као и молекуларног кисеоника. То се дешава тако што оксидовани CYP најпре прави комплекс са ксенобиотиком (супстратом), након чега

долази до редуковања молекулског кисеоника од стране CYP редуктазе (помоћу слободних електрона NADPH), и стварање комплекса активни кисеоник-CYP-супстрат, чији продукт је оксидовани ксенобиотик (Katzung, 2018).



Слика 9. Фазе биотрансформације ксенобиотика (модификовано са сајта: <https://www.researchgate.net/>)

Најзначајнији протеини за метаболизам лекова који припадају суперфамилији CYP ензима, припадају породицама 1, 2 и 3. CYP ензими имају способност да активирају полицикличне хидрокарбоне, PАН (енгл. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) и хетероцикличне аминe, HCA (енгл. *Heterocyclic Amines*), у токсичне метаболите који су повезани са настанком карцинома дебелог црева (Gonzalez и Gelboin, 1994). У ткиву дебелог црева, експримирају се CYP1A1, 1B1, 2C, 2E1, 3A4 и 3A5 (Ding и Kaminsky, 2003). У карциному дебелог црева, CYP протеини често модификацијама ксенобиотика посредују његовом лакшем метаболизму, стварањем растворљивијег агенса, што резултира краћем задржавању ксенобиотика у ћелијама. Због наведеног се ова група протеина доводи и у везу са појавом резистенције (Ingelman-Sundberg и Lauschke, 2020).

Друга фаза метаболизма укључује реакције глукуронидације, сулфонације, ацетилације, метилације, конјугације са глутатионом и конјугацију са аминокиселинама попут глутаминске, таурина и глицина, што углавном смањује токсичност ксенобиотика. Овакви конјугати лекова сматрају се неактивним и лакше елиминишућим комплексима. У реакцијама конјугације најважнију улогу имају ензими трансферазе који се могу наћи слободно у цитосолу, али и у митохондријама. Доминантне трансферазе су UGT (енгл. *Uridine 5'-Diphosphate (UDP)-Glucuronosyl Transferases*), које врше конјугацију ксенобиотика са дериватом глукуронске киселине (UDP), или PAPS (енгл. *3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate*) сулфотрансфераза која врши сулфонацију супстрата.

Сулфонација и глукуронидација супстрата могу имати и ефекат појачавања дејства првобитног лека који се метаболише. У литератури је познат случај са морфијумом, који глукуронидацијом прелази у морфијум-6-глукуронид (Katzung, 2018). Поред поменутих трансфераза, за метаболизам лекова битне су и трансферазе које врше конјугацију супстрата са глутатионом (енгл. *Glutathione* - γ -*glutamyl-cysteinyl-glycine*, GSH), који се у том облику избацује преко GS-X пумпи (енгл. *ATP-dependent Glutathione S-conjugate Export Pump*) што свеукупно чини глутатионски детоксификациони систем. Глутатионски детоксификациони систем, састоји се од ћелијског редукованог глутатиона (GSH), затим од ензима укључених у синтезу глутатиона, од GST (глутатион-S-трансфераза), и од GS-X експортних пумпи. GST су ензими који каталишу конјугацију GSH (конкретно из р1 класе, GSTP, јер су они одговорни за конјугацију GSH-цитостатик) и антитуморског агенса ради стварања мање токсичног и растворљивијег комплекса, који даље подлеже метаболисању. Ови ензими се првенствено налазе и у нормалним и неопластичним ткивима, али је конкретно највише експримирају у епителу дебелог црева. Истраживања су показала да је експресија гена *GSTP1* неколико пута већа у карциному него у нормалном ткиву дебелог црева (Bedford и сар., 2012) Прекомерна експресија GSTP и GSH у ћелији, доводи се у везу са појавом резистенције (Bredel, 2001). Разлог за то је чињеница да се ксенобиотик посредством GSTP конјугује са GSH и тако постаје супстрат за избацивање из ћелије посредством експортних пумпи. Поред тога, GSTP изоформа инхибира JNK киназу која је укључена у одговор ћелије на стрес покретањем апоптозе (Townsend и Tew, 2003). ATP-везујући протеин MRP (енгл. *Multidrug Resistance-Associated Proteins* - ABC), обавља функцију транспортера уз помоћ GSH, тако што везује супстрате претходно конјуговане са GSH. Након друге фазе хидрофилност ксенобиотика је значајно повећана те се у наредној фази стимулише његово избацивање из ћелије помоћу GS-X пумпи, којима припада MRP1.

Избацивање лека из ћелија дешава се у трећој фази посредством протеина који припадају ABC транспортерима, односно фамилији ATP-везујућих протеина (енгл. *ATP Binding Cassette* - ABC). Ови транспортери представљају трансмембранске протеине који имају унутарћелијске ATP везујуће домене. Такође, поред ћелијске мембране, ове транспортере поседују и мембране једра, и неке органеле попут везикула (Sauna и Ambudkar, 2001). Транспортери имају ATPазну активност, врше хидролизу ATP у ADP, што доводи до конформационе промене транспортера и резултује избацивањем ксенобиотика из ћелије као њихове суштинске функције. На тај начин ABC транспортери штите ћелије од штетних дејстава ксенобиотика, па су у физиолошким условима више експримирани у ткивима која долазе у контакт са великом количином нежељених материја – попут црева и јетре. Обзиром на њихов физиолошки статус, ови транспортери доприносе развоју резистенције, нарочито код карцинома који имају одређен ниво урођене резистенције јер настају на органима који у физиолошким условима имају високо експримирани ABC транспортере (Ejendal и Нрусупа, 2002). Транспортери који се најчешће доводе у везу са појавом резистенције у ћелијама карцинома дебелог црева, и који врше избацивање великог броја ксенобиотика јесу П-гликопротеин (енгл. *Multidrug Resistance Protein*, MDR1, ABCB1), MRP, којих има седам и BCRP (енгл. *Breast Cancer Resistance Protein*, ABCG2) (Nooter и сар., 1997; Arts и сар., 1999; Haber и сар., 2006). Њихова експресија у дигестивном тракту је различита, при чему је у дебелом цреву највише експримиран Р-гликопротеин, а затим MRP1 и MRP2 (Berggren и сар., 2007).

Транспортер П-гликопротеин функционише по принципу вакуумске пумпе која се директно везује за супстрат, при том има широку супстратну специфичност. Транспортер MRP1 реагује са агенсима у другој фази метаболизма ксенобиотика, односно за његову активност је потребно присуство ћелијског глутатиона (Leslie и сар., 2005). Због специфичне физиолошке улоге, и чињенице да њихова експресија у ткиву карцинома може бити повећана у односу на здраво ткиво, ABC транспортери се такође доводе у везу са појавом резистенције.

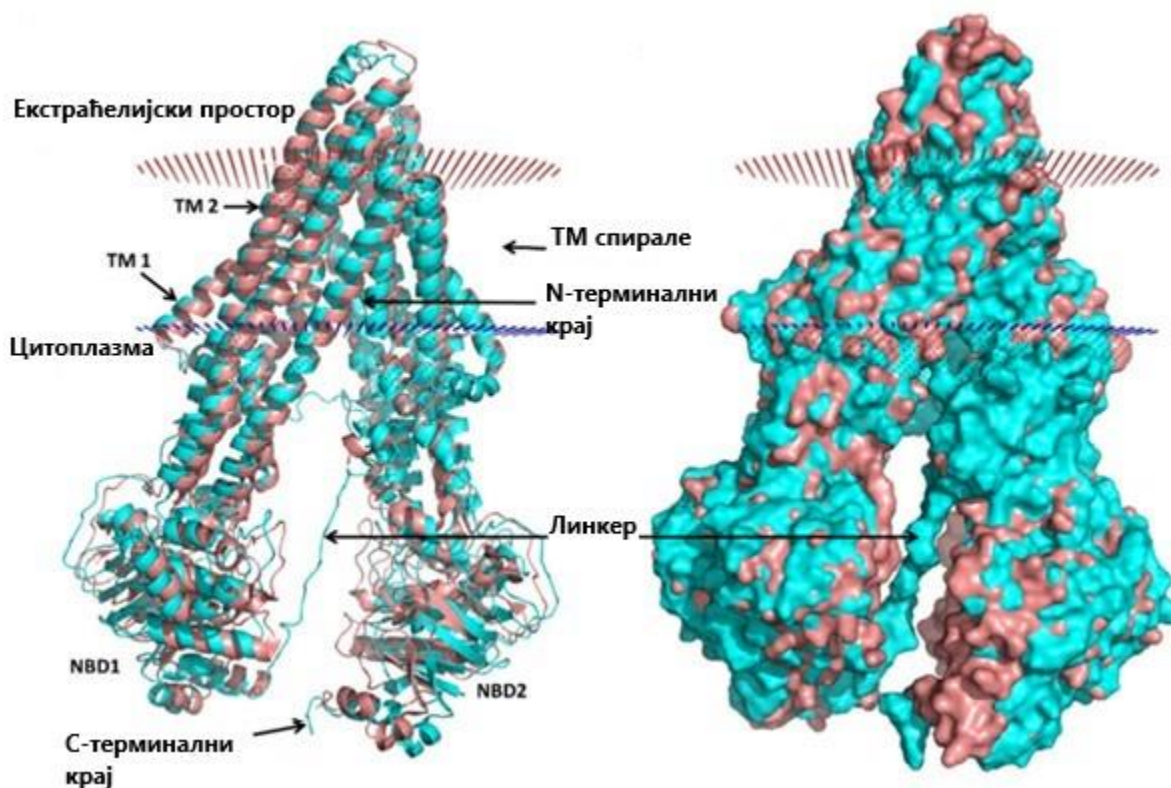
3.1. Резистенција

Један од главних проблема у лечењу карцинома јесте развој резистенције на лекове. Под изразом *multidrug resistance* (MDR), именује се појава вишеструке резистенције, дакле на већи број структурно и функционално различитих агенаса. На појаву резистенције могу имати утицај и одређени фармаколошки параметри попут неповољне фармакокинетики (метаболизам и екскреција), затим неадекватно допремање агенса, ограничен приступ ћелијама тумора због неповољних утицаја микросредине (киселост), немогућност проласка лека кроз ћелијску мембрану, као и због постојања препрека у виду механичких баријера (нпр. крвно-мождана баријера). Развоју резистенције код карцинома могу допринети и промене у специфичним генима и метаболизму лека у ћелији, као и способност туморских ћелија да избегну апоптозу. За појаву избегавања апоптозе најчешће је одговорна мутација TP53 гена, јер услед стварања неактивног протеина није могуће покретање процеса апоптозе. Такође, до избегавања апоптозе може доћи услед повећане експресије проапоптотских гена (Adams и Cory, 2007; Mansoori и сар., 2017; Bukowski и сар., 2020). Унутарћелијски механизми који доводе до појаве резистенције јесу, на првом месту нагомилавање унутарћелијског глутатиона који потпомаже изbacивање агенса, што води ка смањеној акумулацији антитуморског агенса у самој ћелији. Експорту лека предходи његова обрада, односно биотрансформација у самој ћелији од стране специфичних ензима фазе I и II, од чега зависи да ли ће лек остварити своју активност и у активном облику доспети до својих циљева. За превазилажење проблема развоја резистенције туморских ћелија неопходно је најпре открити измењене гене и механизме који ћелијама омогућавају преживљавање чак и услед деловања високих доза цитостатика. Најчешће се са појавом резистенције повезују ABC транспортери (Szakács и сар., 2006). Као молекули који имају веома битну метаболичку улогу када је у питању заштита ћелија од токсичних агенаса, ови транспортери могу да допринесу развоју резистенције управо због њихове способности изbacивања цитостатика из ћелије, али и широког спектра супстратне специфичности. Међу њима је највише испитиван трансмембрански П-гликопротеин, који је заправо вакуумска пумпа специјализована за изbacивање великог броја цитостатика (Mansoori и сар., 2017; Bukowski и сар., 2020).

4.1.1. Улога ABC транспортера у развоју резистенције

П-гликопротеин. П-гликопротеин је трансмембрански протеин састављен од 1280 аминокиселина, величине од око 170 kDa. Припада фамилији ABC транспортера. У својој структури, П-гликопротеин садржи трансмембранске домене TMD1 и TMD2 (енгл. *transmembrane domain 1 and 2*) и домене који се везују за цитоплазматске нуклеотиде NBD1 и NBD2 (енгл. *nucleotide-binding domain 1 and 2*) (Silva и сар., 2015; Dong и сар., 2020; Marques и сар., 2021). Наиме, сваки мономер TMD се састоји од шест

трансмембранских α -хеликса који су хидрофобни. Трансмембрanski домен је задужен за везивање супстрата у оквиру шупљине која се образује између трансмембранских домена оба мономера, TMD1 и TMD2 (Слика 10). У оквиру ове шупљине П-гликопротеин може да веже најмање два супстрата. Са друге стране, домен NBD има улогу стварању енергије хидролизом АТФ-а, која се искоришћава за конформационе промене трансмембранског домена који истискује супстрат. У оквиру сваког NBD, налази се Р-петља, односно мотив *Walker A*, и мотив *Walker B*, као и С мотив, односно мотив повезивача, који се још назива и ABC потпис. Конформациона промена која се дешава приликом истискивања супстрата из ћелије у ванћелијски простор је „окретање“ П-гликопротеина, који из позиције са шупљином отвореном ка ћелији, заузима положај са шупљином окренутом ка споља, из које се супстрат отпушта (Li и сар., 2016; Dong и сар., 2020). Супстратна специфичност овог мембранског транспортера је широка. Има афинитет ка многим органским и неорганским супстанцама које успешно избацује из ћелије. С обзиром на његову повезаност са настанком резистенције, овај транспортер је честа терапијска мета.

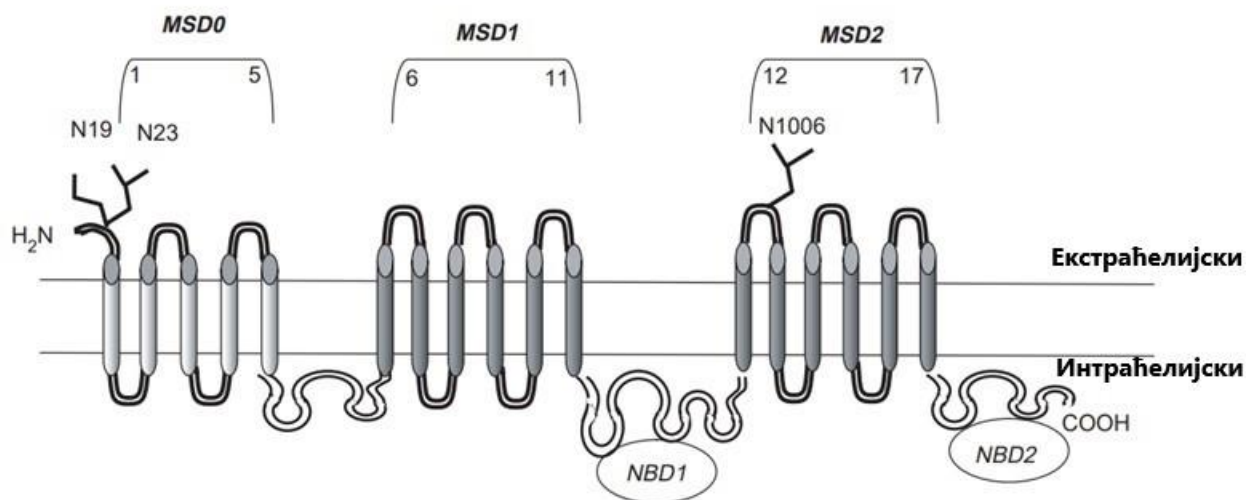


Слика 10. Грађа трансмембранског П-гликопротеина (модификовано из Marques и сар., 2021)

Да би се смањила могућност развоја резистенције на цитостатик, један од могућих терапеутских приступа је примена комбиноване терапије при којој се цитостатику придружује инхибитор ABC транспортера. Данас постоје инхибитори П-гликопротеина који су подељени у неколико група, у зависности од тога како се везују, односно којим механизмом доводе до блокирања функције П-гликопротеина (Kumar и Jaitak, 2019; Dong и сар., 2020; Muriithi и сар., 2020). Први тип модулатора активности су супстанце које

доведе до конкуритивне ихибитије П-гликопротеина и могу да се вежу за П-гликопротеин пре супстрата (лека). Наиме, ови модулатори се везују на истом месту на П-гликопротеину као и лекови, те се налазе у конкуритији за место везивања са лековима. Други тип су неконкуритивни инхибитори П-гликопротеина, који интерагују са алостеричним остатком за модулатију активне конформације. Трећем типу модулатора припадају супстанце које се везују за АТР везивна места, блокирајући тиме индиректно функцију П-гликопротеина. Последњи, четврти тип модулатора јесу супстанце које доводе до интеракција са мембранским липидним двослојем и ремећења микросредине мембране (Palmeira и сар., 2012; Dong и сар., 2020). Поред поделе у односу на механизме деловања, инхибитори П-гликопротеина се могу класификовати и у 4 генерације, у односу на време настанка. Код прве три генерације развијених инхибитори П-гликопротеина дошло је до проблема са њиховом високом токсичношћу, али и са могућношћу да се специфично вежу за П-гликопротеин. Четврта генерација инхибитора обухвата најпре једињења изолована из природних извора и њихове деривате, затим пептидомиметике и дуалне лиганде (то су једињења способна да инхибирају П-гликопротеина али и друге медијаторе вишеструке резистенције) (Dong и сар., 2020; Muriithi и сар., 2020). Природни производи и њихови деривати сматрају се најбољим модулаторима активности овог транспортера, због високе специфичности и ниске токсичности. Највише су у том погледу испитиване биљке и супстанце пореклом из биљака, попут фенолних једињења (Jiahua и сар., 2019). Испитивања у овој области су и даље у току, јер је природа непресушан извор супстанци које могу бити полазна тачка у оваквим истраживањима.

MRP1 и MRP2. Ови транспортери су хомолози и припадају ABC транспортерима и за избацивање својих супстрата користе хидролизу АТР-а попут П-гликопротеина, чиме обезбеђују енергију. Хумана породица MRP/ABCC протеина садржи 13 чланова, величине од 1325 до 1545 аминокиселина. Структура MRP1 и MRP2 протеина је идентична (Слика 11), састоје се од два домена за везивање нуклеотида (NBD) и 12 трансмембранских (TM) спирала, које чине два трансмембранска домена (TMD) у литератури позната и као мембрански домени (енгл. Membrane-Spanning Domains - MSDs). Домени TMD су углавном укључени у препознавање, везивање и транспорт супстрата, а NBD су одговорни за везивање и хидролизу АТР-а, који подстичу транспорт супстрата. Поред тога, MRP1 и 2 садрже и трећи NH₂-терминални домен који обухвата мембрану, са пет трансмембранских спирала (MSD0). Овај трећи домен омогућава протеину стабилну везу са апикалним мембранама (Jedlitschky и сар., 2006). Између ова два протеина постоји разлика у локалним експресијама, при чему MRP1 има кључну улогу у контроли транспорта кроз крвно-моздану баријеру и у поларизованим ћелијама, те се више налази на базолатералним мембранама (крвно-моздана баријера), до је MRP2 више примећен у апикалним мембранама (хепатоцити). С тим у вези, њихова супстранта специфичност се преклапа, али није потпуно иста (Bakos и сар., 2000).



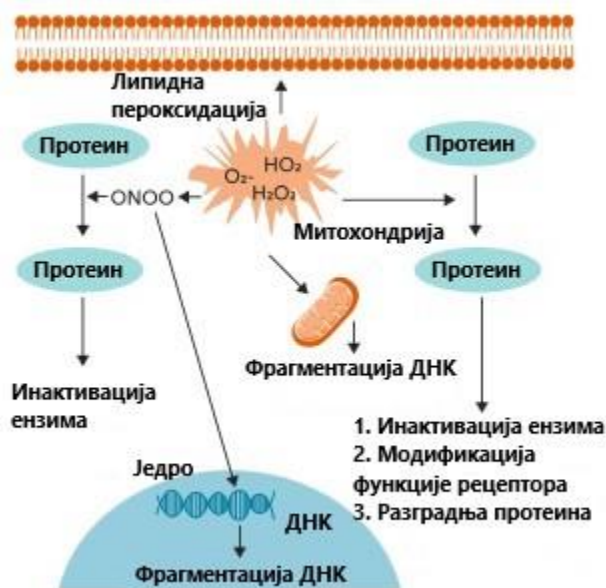
Слика 11. Структура протеина MRP1 и 2 (из Jedlitschky и сар., 2006)

Транспортер MRP1 је идентификован као један од мултиспецифичних транспортера органских анјона (енгл. *Multispecific Organic Anion Transporters - MOATs*) или као транспортер глутатион-коњугата (енгл. *Glutathione-conjugate - GS-X*). Са друге стране, MRP2 има афинитет ка различитим амфифилним анјонима који припадају структурно различитим класама молекула, као што су ендогена једињења, лекови, токсичне хемикалије, нутрацеутици и њихови коњугати, са преференцијом за коњугате глукуроната и глутатиона (Не и сар., 2011). Због широке супстратне специфичности, и ови транспортери могу бити терапијска мета. Њихова прекомерна експресија умногоме утиче на ефлукс великог броја цитостатика и њихових метаболита, што може допринети развоју вишеструке резистенције.

4. Редокс регулација сигналних путева у ћелији

У физиолошким условима ћелије поседују сложене биохемијске механизме којима одржавају редокс равнотежу. Одржавање равнотеже редокс система битно је за управљање животним процесима путем редокс сигнализације, а одржавање равнотеже није ништа друго до баланс између продукције и неутралисања редокс радикала. Оксидациони стрес у ћелијама настаје када се та равнотежа наруши, а хронично стање стреса доводи до оштећења биомакромолекула што води настанку бројних патофизиолошких поремећаја унутар ћелија. Метаболизам кисеоника може да резултира стварањем реактивних врста кисеоника, ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*), које могу покренути стварање нових, још реактивнијих врста. Реактивним врстама кисеоника припадају супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$), водоник пероксид (H_2O_2), хидроксил радикал ($OH^{\cdot}$), синглет кисеоник (1O_2). Међу реактивним кисеоничним врстама, у везу са настанком највећег броја оштећења доводи се $O_2^{\cdot-}$. Поремећају редокс равнотеже могу да допринесу и реактивне врсте азота RNS (енгл. *Reactive Nitrogen Species*), сумпора RSS (енгл. *Reactive Sulfur Species*), селена RSeS (енгл. *Reactive Selenium Species*), као и реактивне карбонилне врсте RCS (енгл. *Reactive Carbonyl Species*). У физиолошким

условима, ћелије су развиле заштитне механизме који се покрећу како би се заштитиле од оксидационих оштећења. Највеће промене услед дејства слободних радикала трпе протеини, али и други биомакромолекули, нуклеинске киселине и липиди (Слика 12) (Žikić и сар., 2000; Sies, 2017). Ове промене на ћелијском нивоу даље могу имати за последицу и развој других патофизиолошких стања у организму, као што су промене у метаболизму, настанак кардиоваскуларних, неуродегенеративних и малигних болести (Hayes, 2020). Са тим у вези, одржавање или поремећај редокс равнотеже су честа терапијска мета код многих болести, док превенција углавном подразумева употребу антиоксиданаса.



Слика 12. Утицај реактивних врста кисеоника на биомакромолекуле (модификовано са сајта: <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/reactive-oxygen-species>)

Поред поменутих неорганских, услед реакције слободних радикала са органским компонентама у ћелијама може доћи до стварања органских радикала, попут липидних пероксил радикала ($\text{ROO}\cdot$) и липидних хидропероксида (ROOH). Смањен ниво глутатиона може довести до утицаја ROS-а на мембранске липиде, ослобађајући органске радикале. Липиди у ћелијама имају незаменљиву улогу у одржавању структурног интегритета мембране, а прекомерна оксидација липида мења физичка својства мембране. Липидни пероксиди се сматрају одговорним за многа упална патолошка стања, али и као кључни окидач фероптозе, новонасталог облика регулисане неапоптотске ћелијске смрти (Gaschler и Stockwell, 2017). С обзиром да су липидни пероксиди склони даљој деградацији, продукти њихове разградње су често сами по себи реактивни. У продукте липидне пероксидације спадају хидрокси киселине и реактивни алдехиди. Међу алдехидним реактивним врстама најиспитиванији су 4- хидроксиноненал - 4-HNE, и малондиалдехид – MDA, и представљају маркере за одређивање нивоа липидне пероксидације (Gaschler и Stockwell, 2017).

Након акутног излагања ћелија оксидационом стресу, поготову ROS, може доћи до репрограмирања ћелијског метаболизма при чему ћелија са гликолизе прелази на пут

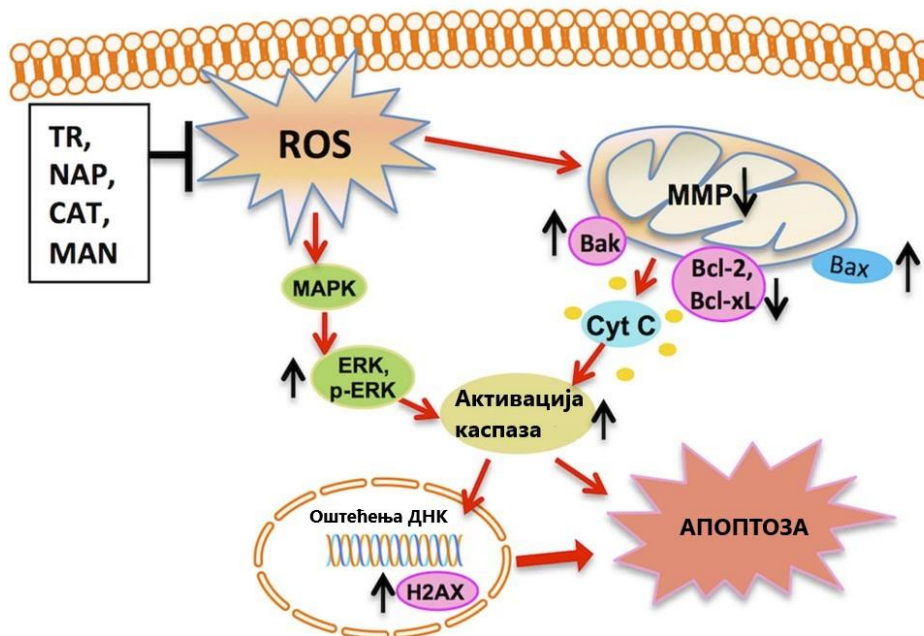
пентоза фосфата PPP (енгл. *Penthouse Phosphate Pathway*), што резултира повећаном продукцијом NADPH помоћу глюкоза-6-фосфат дехидрогеназе (енгл. *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase* - G6PD). Повећање NADPH доводи до активирања управо поменутих механизма заштите који подразумевају GSH и TXN1 и 2 (енгл. *Thioredoxin*) антиоксидационе системе, који ублажавају оксидациони стрес неутрализацијом ROS-a (Hayes, 2020). Глутатион, у редукованој форми, функционише као редокс пуфер тако што уклања токсичне пероксидае посредством GSH пероксидазе. У реакцијама неутрализације слободних кисеоничних радикала, редуковани GSH се оксидује и настаје оксидована форма глутатиона (енгл. *glutathione disulfide* - GSSG), уз помоћ NADPH-зависне глутатион редуктазе. Управо је однос GSH/GSSG битан у антиоксидативној заштити, а самим тим и у регулацију сигналних путева који су од важности за равнотежу у читавом организму. Када глутатиона нема, то доприноси нагомилавању слободних радикала и повећању нивоа оксидационог стреса у ћелијама (Wu и сар., 2003; Sies, 2017; Hayes, 2020).

4.1. Улога реактивних кисеоничних врста у канцерогенези

Оксидативни стрес представља најчешћи вид испољавања негативног дејства фактора средине и може бити одговоран за настанак мутација у ћелијама (Gupta и сар., 2012). Генерисање ROS-a је често изазвано утицајем више егзогених и ендогених фактора. Митохондријски ланац транспорта електрона, ETC (енгл. *Electron Transport Chain*), је главни ендогени извор ROS-a у ћелијама сисара (Galadari и сар., 2017). Директном интеракцијом и оштећењем ДНК молекула слободним радикалима настају мутације, најчешће у виду хромозомских и генских аберација. Самим тим слободни радикали се могу довести у везу са иницијацијом канцерогенезе. Такође, физиолошка улога слободних радикала у сигналној трансдукцији, у ћелијама које су у фази малигне трансформације може допринети прогресији тумора. Утицај реактивних врста се везује и за немогућност нормалног функционисања антиоксидативне заштите у ћелијама, при чему долази до изостанка неутрализације слободних радикала. За разлику од здравих, неке туморске ћелије могу постати „отпорне“ на деловање радикала. Управо ова особина такве ћелије издваја од осталих клонова и категорише их као ћелије са већим малигним потенцијалом. Показано је да ROS утичу на експресију тумор супресор гена, затим молекула који регулишу инфламацију, пролиферацију, апоптозу, инвазију, миграцију, ангиогенезу и многе друге процесе у ћелијама који су у вези са настанком и прогресијом тумора. Туморске ћелије углавном имају веома повишен ниво продукције ROS услед повећане метаболичке активности. Самим тим, због постојања унутрашњег оксидативног стреса, малигна ћелија развија отпорност ка њему, а самим тим постаје мање осетљива и на егзогени стрес. Преживљавање у таквим условима, омогућавају јој транскрипциони фактори који се експримирају под утицајем ROS-a, као што су NF- κ B (енгл. *Nuclear Factor Kappa-light-chaine B*), Nrf2 (енгл. *Nuclear (Erythroid-derived 2)-like Factor 2*), c-Jun (енгл. *Cellular Ju-nanna*), и HIF-1 α (енгл. *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*). Активација ових транскрипционих фактора води ка појачаној активацији антиоксидативног одбрамбеног система и промоцији експресије протеина за преживљавање малигних ћелија (Gupta и сар., 2012; Galadari и сар., 2017).

4.2. Улога реактивних кисеоничних врста у апоптози

Бројни литературни наводи показују улогу ROS у активацији апоптозе (Simon и сар., 2000; Davis и сар., 2001; Circu и Aw, 2010; Jeong и Joo, 2016). Главни извор ROS-а у ћелијама су митохондрије, па су и главно место њиховог деловања. Наиме, супероксид анјон радикал утиче на образовање пора на митохондријама путем иницијације VDAC-зависне пермеабилizације (енгл. *Voltage-Dependent Anion Channel*) и тиме иницира ослобађање Cyt c, као главног окидача апоптозе из митохондрија. У митохондријама, Cyt c је везан за кардиолипин, што отежава ослобађање цитохрома. У присуству H_2O_2 , кардиолипин се оксидује, смањујући афинитет за Cyt c и доводи до ослобађања проапоптотских фактора из митохондрија у цитоплазму. Такође, ROS утичу на протеине Bcl-2 фамилије. Водоник пероксид има способност да директно оксидује Bcl-2 што доводи до губитка његове антиапоптотске функције (Galadari и сар., 2017). Са друге стране, управо су антиапоптотски протеини Bcl-2 и Bcl-XL антагонисти продукције ROS-а, и на тај начин штите ћелије од ROS-посредоване апоптозе (Слика 13). Такође ROS има утицај и на иницирање апоптозе путем деловања на негативне регулаторе попут c-FLIP, који има тенденцију да спречи формирање DISC комплекса. Фосфорилација и инактивација проапоптотских молекула се дешава од стране Akt киназе, антиапоптотског протеина ког активира ROS (Liou и Storz, 2010). Слободни радикали се могу посматрати као двоструки медијатори, обзиром на њихову улогу у процесима настанка тумора и апоптози као виду елиминације малигних ћелија у терапији тумора. Поред свих механизма којим се малигна ћелија посредством оксидативног стреса бори да преживи, управо је он кључно место деловања многих антитуморских лекова (Galadari и сар., 2017; Prasad и сар., 2017).



Слика 13. ROS-посредована апоптоза (модификовано из Kaushik и сар., 2015)

4.3. Улога реактивних кисеоничних врста у терапији карцинома

Обзиром да ROS игра важну улогу у редокс регулацији бројних сигналних путева у ћелији, бројни су покушаји употребе про- или антиоксиданаса на циљане сигналне молекуле и/или путеве у туморским ћелијама (Stepanic и сар., 2015; Perillo и сар., 2020). Неке стратегије антитуморских терапија се базирају на повећању ендогеног нивоа реактивних врста кисеоника у малигним ћелијама. Малигне ћелије су у том случају зависне од своје антиоксидативне заштите, тако да терапија може ићи у циљу њеног инхибирања. Инхибиција одбрамбеног система, а самим тим и повећање нивоа ROS-а, доводи до повећања укупног ендогеног оксидационог стреса који када прескочи праг толеранције ћелије, иницира њену смрт. Малигне ћелије заправо имају виши базални ниво ендогеног ROS-а у односу на здраве ћелије (Pelicano и сар., 2004). Са друге стране, здраве ћелије имају већи капацитет да се носе са оксидационим стресом, јер је инхибиција њихове антиоксидативне одбране знатно тежа. Цитостатици који утичу на редокс систем у ћелијама, најчешће доводе до редокс зависне индукције апоптозе, а међу њима су доксорубицин, цисплатина, имексол и лекови на бази метоксиестрадиола (Kim и сар., 2019; Neumans и сар., 2021). Супротно њима, постоји и стратегија у терапији која индукује смањење ROS-а у малигним ћелијама и базира се на употреби антиоксиданаса (Gupta и сар., 2012; Galadari и сар., 2017).

4.4. Улога реактивних кисеоничних врста у резистенцији

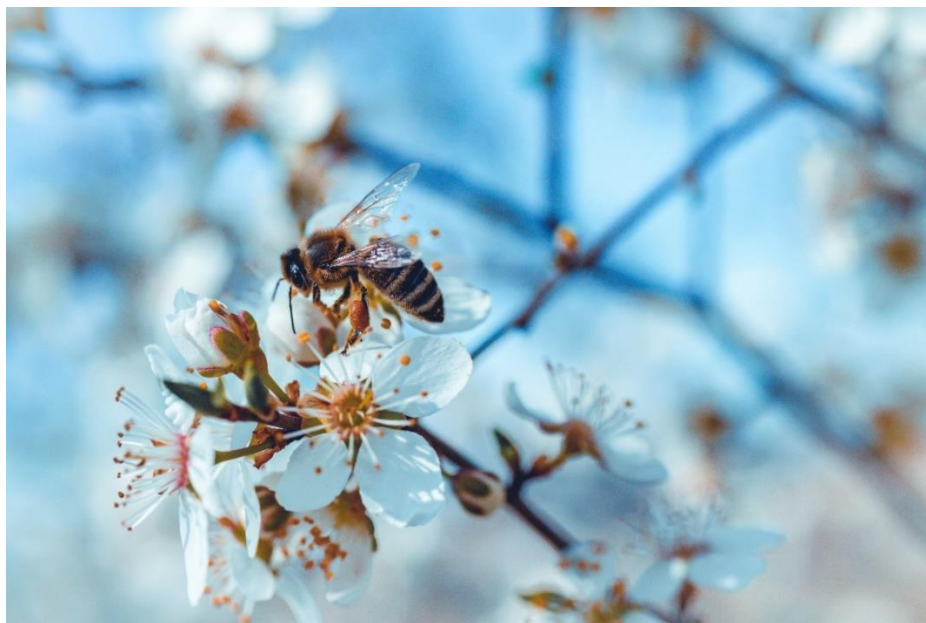
Генерисање или неутралисање реактивних врста, индукција или избегавање процеса апоптозе, као и развој резистенције су уско повезани процеси. Прилагођавање ћелија на оксидативни стрес и избегавање апоптозе јесте један од предуслова за настанак вишеструке резистенције. Резистенција посредована ROS-ом, условљава повећану експресију многих антиапоптотских и ангиогенетских фактора, попут NF- κ B, Nrf-2, HIF-1 α , и других молекула (Cui и сар., 2018). Поред тога, ROS доводе до негативне регулације експресије П-гликопротеина, што изазива повећање осетљивости ћелија на цитостатик. Ово је још један разлог због чега је антитуморска терапија усмерена ка повећању нивоа ROS-а, јер доводи до смањења експресије П-гликопротеина (Galadari и сар., 2017). Карциноми који поседују фенотип вишеструке резистенције, осетљивији су на промене у нивоу ROS-а. Самим тим, утицај на резистенцију могу имати и остали механизми антиоксидационе заштите који утичу на ROS и да самим тим буду модулатори настанка и одржавања резистенције у ћелијама карцинома (Cui и сар., 2018). Модулација резистенције се може вршити и помоћу супстанци/лекова које регулишу антиоксидативни систем у малигним ћелијама, попут аспирина. Аспирин смањује количину GSH инхибирајући молекуле неопходне за његову синтезу, и самим тим повећава количину ROS-а у ћелијама тумора главе и врата (енгл. *Head and Neck Cancer - HNC*). Комбиновање аспирина и сорафениб (тирозин киназни инхибитор), доводи до појачане осетљивости резистентних ћелија HNC на цисплатину (Roh и сар., 2017a; Cui и сар., 2018).

5. Биотоксини животињског порекла

Биотоксине производе живи организми, бактерије, гљиве, биљке и животиње, у циљу сопствене заштите, опстанка или исхране. Ови биотоксини су мешавина различитих соли, протеинских и других малих молекула и често се називају отровима. Еволуција отрова је пример конвергентне еволуције, јер они заправо представљају особину коју поседују многи различити, несродни организми (Schendel и сар., 2019). Испитивање отрова на пољу молекуларне адаптивне еволуције тренутно је ограничено чињеницом да су функције појединачних отрова недовољно познате. Сматра се да отров води порекло управо од неких дигестивних ензима, односно протеина који су имали физиолошке функције. Отрови које синтетишу животиње претежно имају улогу у олакшавању варења, или служе животињама за напад или одбрану. Поред тога што на различите начине могу да испоручују отров, било да је то ујед, прскање, убод жаоке и слично, неке животиње, између осталих и змије, имају способност да „одлуче“ о томе када ће и колико отрова испустити (Arbuckle, 2015; Schendel и сар., 2019). Еволуција отрова доводи до тога да су предаторски отрови све јачи (као отров змија), јер је неопходно да започну и дигестију плена, док су одбрамбени отрови слабији (отров пчеле), јер служе само за одбрану или упозорење (Schendel и сар., 2019). Посебну пажњу је научницима привукло откриће да неке компоненте отрова могу имати медицински значај, па су се истраживања кретала у смеру потенцијалног искоришћавања отрова у лечењу многих болести. Литературни подаци указују на то да отрови пореклом из змија, пчела, оса, паукова, шкорпија или пак биљака могу бити извор антитуморских једињења или једињења са неким другим биолошким ефектима (Liu и сар., 2014). Антиинфламаторно дејство, односно смањење упалног процеса и болова у мишићима и костима као честих нуспојава реуматоидног и остеоартритиса, показано је за отров пчеле (Sung и сар., 2021). Такође, отров пчеле се користи и у лечењу мултипле склерозе (Hauser и сар., 2001). Са друге стране, медицинско дејство које подразумева модулацију рада срца, постиже се супстанцама које су углавном пореклом из отрова змије (Sung и сар., 2021). Отрови проналазе своју примену и у козметологији, попут отрова пчеле и једне врсте паука *Argiope lobata*. Испитивања антитуморског дејства животињских отрова је у експанзији. За многе отрове је до сада показано да смањују пролиферацију туморских ћелија, као што је то случај са отровом шкорпије на ћелијама глиома (Bordon и сар., 2020), змијским и пчелињим отровом на ћелијама карцинома оваријума (Moga и сар., 2018), као и са отровом врсте морског пужа *Conus lorioisii* на карциному дојке (Kumari и сар., 2021). До сада је издвојено неколико комерцијално доступних лекова пореклом из отрова, или пак синтетских једињења која су настала по угледу на супстанце из отрова. Неки од њих су лек против хроничних болова Prialt® (AstraZeneca), изолован из токсичног секрета морских конусних пужева из фамилије Conidae, као и лек Byetta® (AstraZeneca), лек за лечење дијабетеса типа II, изолован из токсина гуштера врсте *Heloderma suspectum*. Затим, у такве лекове се убраја и ACE инхибитор Captopril, направљен по угледу на супстанцу пореклом из отрова змије врсте *Bothrops jararaca* (Koh и Kini, 2012; Pennington и сар., 2018). На основу свега наведеног, може се закључити да су истраживања на пољу биолошких ефеката животињских отрова од великог значаја за развој савременијих видова терапије.

5.1. Медоносне пчеле на територији Србије

Медоносне пчеле су инсекти из реда Hymenoptera, док врсте присутне на територији наше земље припадају фамилији Apidae. То је врста из рода *Apis* (Слика 14), *Apis mellifera* L. (1758). У оквиру ове врсте, на територији Србије уочена је појава две подврсте, *Apis mellifera carnica* и *Apis mellifera macedonica*. Подврсте припадају тзв. источномедитеранској еволутивној линији Ц. Припадници ове групе су распрострањени на Балкану, у равници Дунава и различитих области као што су Сицилија, Апенинско полуострво и Украјина (Muñoz и сар., 2012; Mudri-Stojnić и сар., 2021).

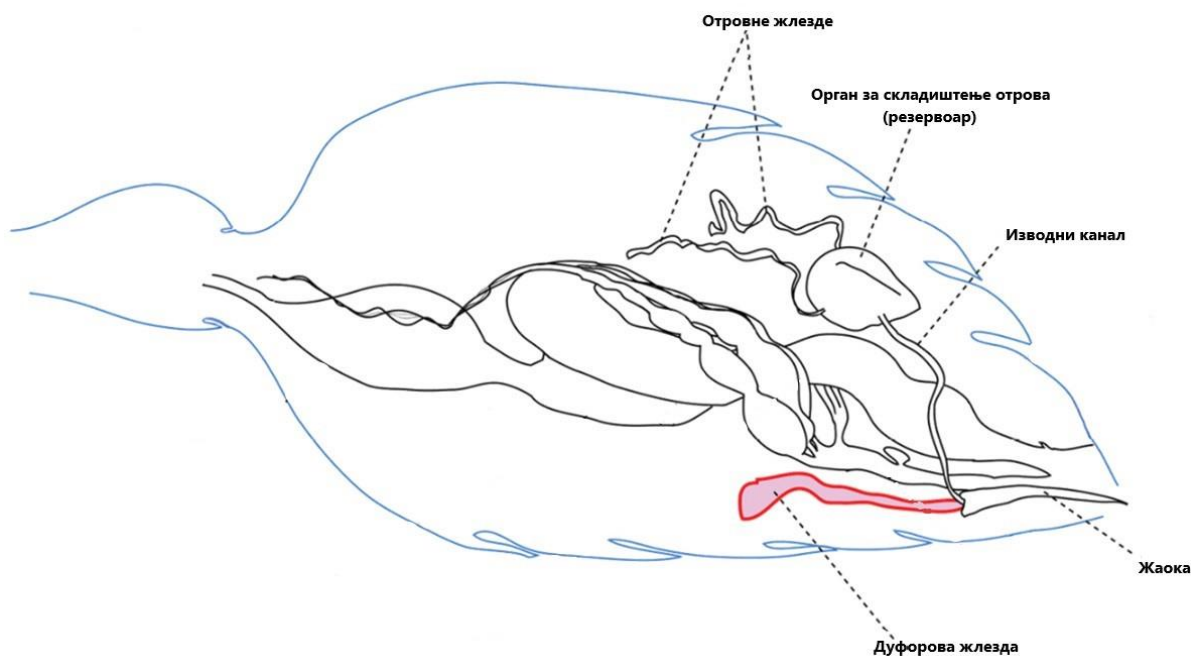


Слика 14. *Apis mellifera* – медоносна пчела (фотографисао на терену Борис Илић)

5.1.1. Грађа убодног апарата код пчела

Отровни апарат код пчела се зове још и убодни апарат. Поседују га све женке ове врсте и користе га за одбрану (радилице), или за репродукцију (матике). По грађи, хомолог је апарату код Orthoptera, Hemiptera, и неотровних Hymenoptera. Убодни апарат, тзв. жаока (Слика 15), налази се на задњем делу абдомена и повезана је са две жлезде, жлездом која одговара колетеријалној жлезди, тзв. Дуфоровом жлездом (алкална жлезда) и жлездом која синтетише отров (кисела жлезда). Отровна жлезда омогућава да се отров убризга одмах након убода жаоке, док Дуфорова жлезда има функцију у комуникацији социјалних пчела, с обзиром да служи за синтетисање феромона. Њен секрет код матица има репродуктивну улогу, садржи естре сличне воску којима оне обележавају своја јаја како их радилице не би уклониле, те се може рећи да има и протективну улогу. Код многих Hymenoptera филаменти отровне жлезде могу бити бројни, међутим код рода *Apis*, то су два дистална неразграната филамента која се спајају и заједно уливају у тзв „врећу“ за отров која се сужава ка жаоки. Отров се из жлезде депонује у отровну врећу која служи као резервоар. Жаока има свој омотач и када пчеле не нападају она је увучена у абдомен, а

исправља се приликом напада помоћу околне мускулатуре (Dotimas и Hider, 1987; Abdalla и da Cruz-Landim, 2001; Martin и сар., 2005; Ramya и Rajagopal, 2008).



Слика 15. Положај убодног апарата пчеле (модификовано из Ramya и Rajagopal, 2008)

5.1.2. Отров пчеле

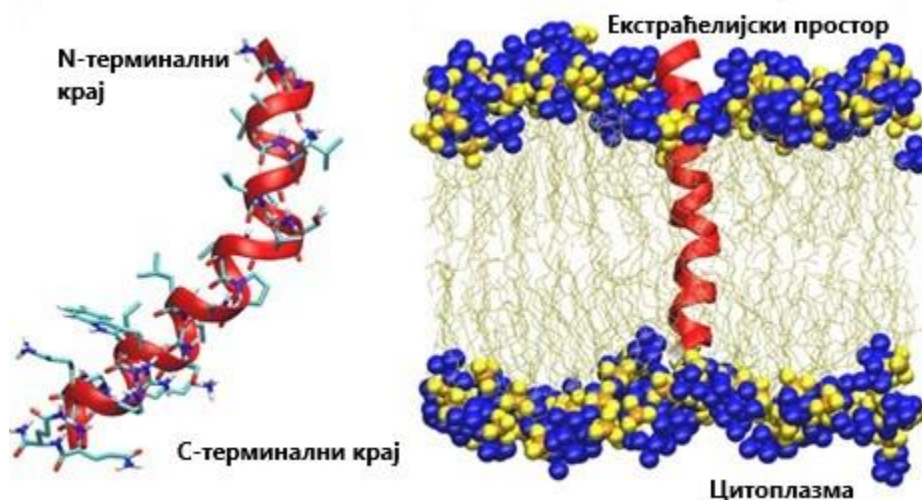
Главну улогу у природи, пчеле имају у опрашивању биљака. Између осталог, сакупљање полена и цветног нектара пчелама омогућава исхрану као и исхрану њихових ларви, богату беланчевинама и угљеним хидратима. У свету постоји огроман број пчела, међу којима се налазе медоносне, солитартне, друштвене, праве, безжаочне пчеле и друге. Врста *Apis mellifera* поседује жаоку, попут правих пчела, али спада у друштвене, медоносне врсте. Да би се заштитиле од предатора, ове пчеле продукују отров из свог жлезданог апарата који се завршава жаоком постављеном на задњем делу тела (Winston, 1991). Отров пчеле је смеша органских и неорганских једињења. Доминантна компонента је мелитин (око 50 %), пептид кога карактерише широк спектар биолошких ефеката. Од пептидних компоненти присутан је још и апамин, са око 2-3 %, затим пептид за дегранулацију мастоцита, секапин, прокамин, адолапин, инхибитор протеазе, тетриапин, хистамин, и још неки мањи пептиди у незнатном проценту. Што се тиче ензима, у саставу пчелињег отрова улазе фосфолипаза А2, хијалуронидаза, фосфомоноестераза, лизофосфолипаза, α -глукозидаза. У отрову пчеле се могу детектовати и допамин, норадреналин, α -аминокиселине, глюкоза фруктоза и неки мањи молекули у ниском проценту (Gajski и Garaj-Vrhovac, 2013).

Показана су многа благотворна дејства отрова, као и његових компоненти (Gomes и сар., 2010; Premratanachai и Chanchao, 2014; Lee и сар., 2015). Отров пчеле је испитиван на многе биолошке активности. Наиме, доказан је терапеутски ефекат отрова пчеле код аутоимуних и неуролошких поремећаја, попут мултипле склерозе и Паркинсонове болести (Hwang и сар., 2015). Антиинфламаторно, аналгетско и антиедемско дејство је највише испитивано на моделу реуматоидног артритиса (Lee и сар., 2005). Ефекат отрова пчеле је испитан и на пацијентима који имају кожне болести попут атопијског дерматитиса, где је показао антиатопијско дејство (An и сар., 2018). Што се тиче антитуморског дејства отрова пчеле показано је да делује антипролиферативно на ћелијским линијама, проапоптотско дејство изазивањем повећане експресије проапоптотских гена, утицај на иницијаторске и ефекторне каспазе и рецепторе попут Fas рецептора (Lee и сар., 2015). Различите компоненте отрова доприносе његовом дејству, како штетном (обзиром да се отров пчеле сматра једним од највећих алергена), тако и повољном када су у питању употреба компоненти отрова као лекова (Son и сар., 2007). Биолошка активност мелитина се огледа у дејству на мембране како ћелија тако и унутрашњих органа, тако да се високе дозе сматрају проинфламаторним и хемолитичким, обзиром да поспешује активност фосфолипазе A2 (PLA₂). Ниске дозе ове компоненте имају повољна дејства на организам, попут снижавања притиска, повећања пропустљивости крвних судова, и антиинфламаторно дејство. Апамин поседује аналгетско дејство, инхибира Ca²⁺, а активира K⁺ канале, имуносупресор је и у малим дозама може стимулисати функцију нервног система, док велике дозе могу бити неуротоксичне. Адолапин има инхибиторно дејство на PLA₂ и COX што указује на антиинфламаторну активност. Фосфолипаза има цитотоксични ефекат на туморске ћелије, али се сматра најагресивнијом компонентом отрова због јаког литичког дејства. Улазак отрова у ткиво омогућава компонента која се назива хијалуронидаза, која делује хидролитички на пептиде и представља алерген. Процентуално је заступљена са 2%. Остале компоненте присутне су са мање од 1%, али то није разлог за њихово занемаривање када је реч о доприносу токсичног или терапеутског дејства отрова (инхибитори протеаза, допамин, норадреналин) (Son и сар., 2007; Bogdanov, 2017).

5.1.2.1. Мелитин

Мелитин, као доминантна компонента (40-50%), је најчешће изолована и највише испитивана компонента отрова пчеле. С тога се највећи број повољних ефеката пчелињег отрова приписује углавном овом, иначе литичком пептиду (Слика 16). Активни пептид мелитин се ослобађа из свог прекурсора, промелитина, током његове биосинтезе у организму медоносне пчеле. Обзиром да се ради о пептиду, у његов састав улази 26 аминокиселина (Habermann, 1980). У редоследу аминокиселина, аминокиселини регион (остаци 1-20) претежно је хидрофобан, док је карбокси-терминални регион (остаци 21-26) хидрофилан због присуства позитивно наелектрисаних аминокиселина. Овај пептид поседује амфифилни карактер, с обзиром да је делимично хидрофилан, а са друге стране има и јак афинитет према липидним мембранама. Амфифилна природа, карактеристична је за многе пептидне везане за мембрану и трансмембранске спирале мембранских протеина. Управо због ових особина мелитин се користи као одговарајући модел пептида за праћење интеракција липида и протеина у мембранама, као и за цитолитичке пептиде (Saberwal и Nagaraj, 1994; Raghuraman и Chattopadhyay, 2007).

Појединачно дејство мелитина које доприноси деловању пчелињег отрова је хемолитичко, јер је мета деловања мелитина мембрана еритроцита. Мелитин се брзо везује за еритроците и индукује ослобађање хемоглобина у ванћелијски медијум. Сматра се да је главни механизам литичке активности мелитина заправо његова уградња у мембране због афинитета према липидима. На месту везивања, мелитин формира тетрамерне агрегате који служе као јонски канали и тиме ремети структуру мембране, самим тим и мембрански потенцијал и пропустљивост мембране (Raghuraman и Chattopadhyay, 2007). Тетрамери мелитина могу утицати и на деполаризацију нервних завршетака што доводи до појаве бола приликом уједа пчеле (Gajski и Garaj-Vrhovac, 2013). Због свог начина деловања, употреба мелитина би могла заузети значајно место када је у питању терапијски значај овог литичког пептида. У литератури постоје подаци о антитуморском дејству мелитина и могућност да се као пептидна компонента користи заједно са хемиотерапеутиком (Tender и сар., 2021). У многим истраживањима *in vitro* показано је инхибиторно дејство на ћелије разних малигних тумора, и то механизмом индуковања апоптозе (Moon и сар., 2008; Wang и сар., 2009; Gajski и Garaj-Vrhovac, 2013; Gajski и сар., 2016; Vargaei и сар., 2020; Zhou и сар., 2021).



Слика 16. Структура мелитина (модификовано из: Glättli и сар., 2005)

5.2. Змије отровнице на територији Србије

Змије су безноги гмизавци ектотермне терморегулације, припадници реда Squamata (кладус Ophidia; подред Serpentes), који су увек интригирали научнике почев од изучавања њиховог порекла, морфологије, екологије, па до проучавања њихових отрова. Изучавање змијских отрова данас заузима битно место када је у питању терапија срчаних обољења (Frangieh и сар., 2021), а све више и терапија тумора (Jain и Kumar, 2012; Moga и сар., 2018).

На територији Србије се могу наћи отровнице из фамилије Viperidae: ***Vipera ammodytes*** L. (поскок – Слика 17), ***Vipera berus*** L. (шарка) и ***Vipera ursinii*** L. (шарган). Од

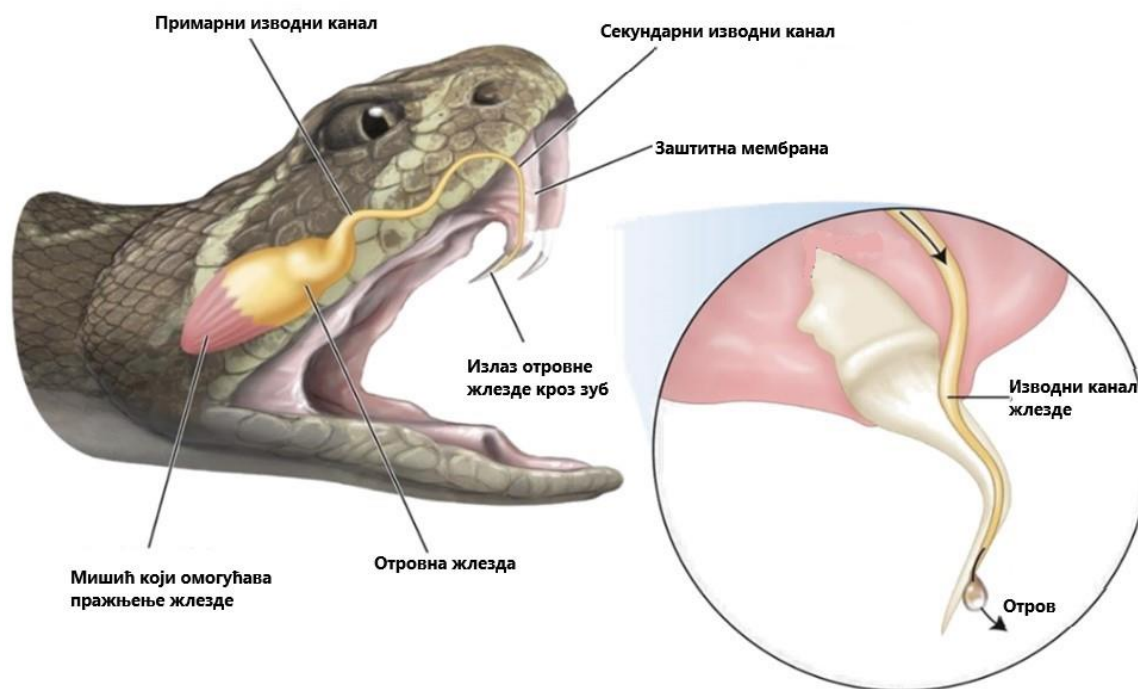
ових врста, најучесталији је поскок, змија која је распрострањена готово по целој територији наше земље, а уједно и најотровнија змија Европе (Logonder и сар., 2009).



Слика 17. *Vipera ammodytes* – поскок (фотографисао на терену Ненад Прерадовић)

5.2.1. Грађа отровног апарата код фамилије *Viperidae*

Генерално, змије поседују четири врсте различитих отровних апарата. Они се разликују по величини, по локацији отровне жлезде, као и по изгледу и величини зуба. Сви постојећи типови су еволутивно настали од најстаријег аглифозног типа који је заступљен код змија неотровница из фамилије *Colubridae*. Сматра се да су отровне жлезде еволуирале од Дувернојеве жлезде која је заступљена код великог броја змија из исте фамилије. Кроз еволуцију, отровни апарати су се у односу на примарни аглифозни тип развијали и морфолошки доста променили. Типови који су настали еволутивним развојем аглифозног типа су: опистоглифи (поседују га такође *Colubridae* које испоручују отров помоћу очњака који су дужи од осталих зуба), протеоглифи (поседују га *Elapidae*) и соленоглифи тип. Змије отровнице са територије Србије припадају фамилији *Viperidae* и поседују еволутивно најмлађи и најсложенији отровни апарат соленоглифног типа (Слика 18). Дуги очњаци ових врста се склапају приликом затварања вилица, док се приликом напада исправљају. Налазе се на роstralном делу максиле, а изводни канал жлезде се налази у њиховој шупљини. Жлезда се код ових змија налази иза орбите и троугластог је облика, и у вези је са околном мускулатуром која регулише истискивање отрова јаким контракцијама мишића када за то постоји стимулус (Petrilla и сар., 2008).



Слика 18. Отровни апарат фамилије *Viperidae* (модификовано из Petrilla и сар., 2008)

5.2.2. Отров поскока

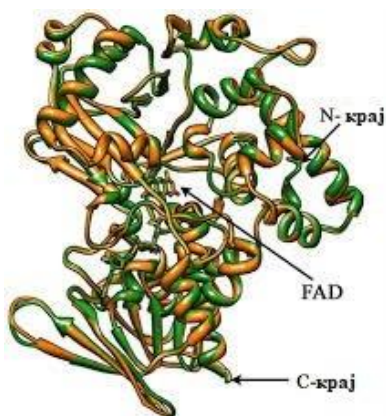
Отров поскока је, попут осталих змијских отрова, смеша биолошки активних протеина који имају широк спектар патофизиолошких активности (Gorčević и сар., 2021). Отрови змија у принципу никада не делују једнолично на плен. Колико год подела да постоји, сматра се да ниједан отров није „чист“ и да је заправо сваки од њих мешавина различитих дејстава: неуротоксично (пре и пост синаптичко), кардиотоксично, миолитичко, коагулантно (антикоагулантно), хемостатичко, хеморагично, нефротоксично, хепатотоксично и слично (Casewell и сар., 2020; Gorčević и сар., 2021). На основу набројаног, могло би се рећи да је дејство отрова највише усмерено ка нервном (неуротоксин) и крвном систему (хемотоксин). Литературни подаци за Србију, за период од 1893. до 2007. године, указују на то да је код пацијената који су се јавили због уједа отровница дијагностикована углавном системска интоксикације и неуроинтоксикација, док смртни исход није забележен (Nikolić, 2020).

Састав отрова представља битан параметар за одређивање таксономских категорија, па *V. ammodytes* која припада групи виперида у свом отрову садржи следеће ензимске компоненте: металопротеиназе SVMP (енгл. *Snake Venom Metalloproteinases*); L-аминокиселинске оксидазе LAAO (енгл. *L-amino acid oxidases*); серин протеиназе SVSP (енгл. *Snake Venom Serine-Proteinases*); секреторне протеине богате цистеином CRISP (енгл. *Cysteine-Rich Secretory Proteins*); протеиназе TL (енгл. *Trombin-like proteinases*); α -фибриногеназе, изоензиме фосфолипазе друге групе PLA2 (енгл. *Phospholipase Isoenzymes*). Од неезимских компоненти, отров поскока садржи лецитине С типа

SNACLEC (енгл. *C-type lectins*); васкуларни ендотелијални фактор раста VEGF (енгл. *Vascular Endothelial Growth Factor*); факторе раста нерава NGF (енгл. *Nerve Growth Factor*); као и инхибиторе серин протеаза SPI (енгл. *Serine Protease Inhibitors*); и дезинтегрине (Georgieva и сар., 2008; Calvete, 2013; Gorčević и сар., 2021). С обзиром на састав отрова поскока, присуство хеморагијских металопротеиназа (као и амодитазе која је фибролитичка) указује на његово хеморагијско дејство (Leonardi и сар., 2002; Leonardi и сар., 2007). Међутим, за најактивнију фосфолипазу из отрова, тзв. амодитоксин А (*Ammodytotoxin A*), показано је да има и пресинаптичко неуротоксично дејство (Ritonja и сар., 1986; Logonder и сар., 2008). Важни биолошки ефекти на људску врсту што се тиче отрова поскока, везани су углавном за његово кардиотоксично дејство (Karabuvu и сар., 2017). Инстраживања на пољу антитуморског дејства отрова врсте *V. ammodytes* и из њега изолованих компоненти су малобројна. До сада је показано антитуморско дејство фосфолипазе А2 на Сасо-2 ћелијској линији хуманог аденокарцинома колона (Rodrigues и сар., 2009), и металопротеиназе на HeLa ћелијама (Leonardi и сар., 2015).

5.2.2.1. L-аминокиселинске оксидазе

L-аминокиселинске оксидазе (енгл. *L-amino acid oxidase* - LAAO), представљају флавопротеине (Слика 19), односно ензиме који катализују оксидацију L-аминокиселина приликом чега као продукт настаје водоник пероксид (H_2O_2) и амонијак (NH_3). Величине су између 50 и 70 kDa и садрже нековалентно везан кофактор FAD (енгл. *Flavin Adenine Dinucleotide*). У својој структури, оксидазе садрже три домена, од којих је један већ поменут и везује фактор FAD, затим поседују домен за везивање супстрата, као и хеликазни домен. L-аминокиселинске оксидазе садрже и до 5% угљених хидрата, као и сијалну киселину, тако да спадају у гликопротеине. Супстрат за оксидазе јесу L-аминокиселине, и то најчешће L-леуцин, мада имају афинитет и према фенилаланину, изолеуцину, метионину, триптофану и другим L-аминокиселинама (Du и Clemetson 2002; Georgieva и сар., 2008; Ullah, 2020). Ови ензими су у великој мери заступљени у отрову змија, на њима су највише и изучавани, те се претпоставља да су токсини (Li и сар., 1994). Постоје подаци да је већина силових отрова змије жуте боје управо због присуства L-аминокиселинских оксидаза (Stábeli и сар., 2007; Ullah, 2020).



L-аминокиселинске оксидазе су компоненте коју садржи сваки змијски отров. Није познато да ли количина овог ензима утиче на јачину отрова, али литературни подаци показују да је њихово дејство слично (Tasoulis и Isbister, 2017). Фамилија Viperidae, којој припада и поскок, дели се на 3 субфамилије: Azemopinae, Viperinae и Crotalinae (<http://www.reptile-database.org/>).

Слика 19. Структура L-аминокиселинске оксидазе (модификовани из: Bhattacharjee и сар., 2017)

Оно по чему се разликују врсте из ових субфамилија, а тиче се L-аминокиселинских оксидаза, јесте њихова процентуална заступљеност у отрову (Tasoulis и Isbister, 2017). Отрови змија из подфамилије Crotalinae се сматрају јачим од отрова које производе змије из подфамилије Viperinae. Поређењем састава ових отрова види се да је процентуална заступљеност L-аминокиселинских оксидаза већа у корист отрова Crotalinae (Слика 8). Анализе су показале велику структурну подударност L-аминокиселинских оксидаза пореклом из отрова поскока са оксидазама из отрова *C. adamanteus* висока (Alignment score 83.7), што указује вероватно на високу подударност и када је њихово дејство у питању (Mitra и сар., 2015).

До сада испитивано антитуморско дејство L-аминокиселинских оксидаза показује да оне изазивају апоптозу у високом проценту, па су добра полазна тачка у преклиничким испитивањима, без обзира на чињеницу да нису доминантна компонента ни у једној групи отрова (Du и Clemetson, 2002). Показано је да LAAO пореклом из врста *Crotalus adamanteus* (источна дијамантска звечарка) и *Crotalus atrox* (западна дијамантска звечарка), изазивају апоптозу ћелија сисара, вероватно због јаке продукције водоник пероксида и поремећаја редокс статуса у ћелијама (Suhr и Kim, 1996; Paloschi и сар., 2018).



II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

С обзиром на све већу учесталост карцинома дебелог црева, као и бројне нуспојаве хемиотерапеутика који су тренутно у употреби, све више се прибегава испитивању супстанци природног порекла у циљу развоја нових антитуморских лекова. Највише испитиване у тој области су биљке, међутим отрови различитих врста животиња могу бити вредан извор активних супстанци са потенцијално добрим анти-туморским својствима. Истраживања животињских продуката, у овом случају отрова, су у односу на друге природне изворе активних супстанци тек у зачетку. С обзиром на актуелност теме, постављени су **општи** циљеви докторске дисертације:

- ❧ Испитивање антитуморског потенцијала, односно цитотоксичности отрова пчеле (*Apis mellifera*) и отрова змије (*Vipera ammodytes*), као и чистих једињења које су саставни део ових отрова (мелитин из пчелињег и L-аминокиселинска оксидаза из змијског отрова), на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480 и HT-29).
- ❧ Испитивање проапоптотске активности третмана и дефинисање молекуларних механизма апоптозе у ћелијским линијама карцинома дебелог црева.
- ❧ Испитивање процеса биотрансформације третмана у ћелијама карцинома дебелог црева.

На основу изнетог, изведени су **специфични** циљеви истраживања:

- ❧ Узорковање отрова пчеле, електростимулацијом током 2017. године, од медоносних пчела, на територији Смедеревске Паланке.
- ❧ Узорковање отрова од женки поскока током 2018. године, у складу са дозволама за узорковање отрова у лабораторијским условима.
- ❧ Испитивање биолошких *in vitro* ефеката третмана, на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116, HT-29 и SW-480):
 - ❧ Испитивање цитотоксичности пчелињег и змијског отрова, као и мелитина и L-аминокиселинске оксидазе на ћелијским линијама карцинома дебелог црева HCT-116, HT-29 и SW-480, и здравим кератиноцитима, HaCaT.
 - ❧ Испитивање типа индуковане ћелијске смрти под утицајем испитиваних третана на ћелијским линијама карцинома дебелог црева.
 - ❧ Испитивање молекуларних механизма дејства супстанци са проапоптотским деловањем, праћењем кључних сигналних молекула као маркера спољашњег



- и/или унутрашњег апоптотског пута: протеинске експресије Fas рецептора на мембрани; активности каспазе 8, експресије иРНК гена и протеинске експресије каспаза 8 и 9; експресије иРНК *Bax* и *Bcl-2* гена.
- ☞ Испитивање утицаја третмана на параметре редокс статуса: концентрацију редукованог глутатиона (GSH), супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) и малондиалдехида (MDA), као и протеинске експресије ензима глутатион синтетазе (GSS).
 - ☞ Испитивање процеса биотрансформације третмана у наведеним ћелијским линијама, праћењем експресије иРНК гена чији су протеински производи укључени у метаболизам антитуморских супстанци: ензима цитохром P450 фамилије - *CYP1A1* (субфамилија А) и *CYP1B1* (субфамилија В); глутатион трансферазе π класе - GSTP1, укључене у другу фазу метаболизма лекова; експресије иРНК гена мембранских ABC транспортера, *MRP-1* и *MRP-2*, као и експресије иРНК гена и протеинске експресије П-гликопротеина који избацују ксенобиотику и анти-туморске агенсе из ћелије.
 - ☞ Дефинисање разлика у одговору на третмане између ћелијских линија пореклом из истог органа.



III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Експериментални део докторске дисертације одрађен је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу. Експерименти су реализовани у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије - Преклиничка испитивања биоактивних супстанци (ПИБАС), евиденциони број ИИИ 41010, до краја 2019. године. Након тог периода, Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије је дефинисало финансирање научно истраживачког рада НИО на основу Уговора бр. 451-03-68/2020-14/200122 (за 2020. годину), 451-03-9/2021-14/200122 (за 2021. годину) и 451-03-68/2022-14/ 200122 (за 2022. годину).

1. Хемикалије

За потребе извођења експеримената коришћене су следеће хемикалије: медијум за гајење ћелија DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), физиолошки раствор са фосфатним пуфером PBS (енгл. *Phosphate Buffer Saline*), фетални говеђи серум FBS (енгл. *Fetal Bovine Serum*), 0,25% трипсин-EDTA, пеницилин и стрептомицин од Capricorn Scientific, Немачка. Боја трипан плаво, мелитин (прах, из *Apis mellifera*), L-аминокиселинска оксидаза (прах, из *Crotalus adamanteus*), примарно антителио анти-GSS, трихлорсирћетна, тиобарбитурна, сулфосалицилна и хлороводонична киселина, метанол и GSH редуктаза од Sigma Chemicals CO., САД. Акридин оранж од Acros organics, САД. Реагенс NADPH (енгл. *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) и DTNB (енгл. *Ellman's Reagent*) од GIBCO, Invitrogen, САД. Затим, DMSO (енгл. *Dimethyl Sulfoxide*), етидијум бромид, MTT (енгл. *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), NBT (енгл. *Nitro Blue Tetrazolium*), амонијум персулфат APS (енгл. *Ammonium Persulfate*), Tris (*Tris(hydroxymethyl)aminomethane*), говеђи серумски албумин BSA (енгл. *Bovine Serum Albumine*), хлороформ, етанол и изопропанол PCR чистоће од SERVA, Немачка. Параформалдехид, SDS (енгл. *Sodium dodecyl sulfate*), Acrilamid, Bisakrilamid (*N`N`-bis-methilen-acrylamid*) и TEMED (*N'-Tetramethylethylenediamine*) од Merck, Немачка. Каспаза 8 колориметријски кит, анти- Fas антителио од RD Systems, САД. Вода PCR чистоће и TRIzol од Ambion, САД. Секундарно антителио конјуговано са Cy3, DAPI (енгл. *Diamidino-2-phenylindole*) боја, кит за реверзну транскрипцију (енгл. *cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*), PCR кит (енгл. *qPCR MasterMix, Applied Biosystems*), боја Coomassie Brilliant Blue и примарно антителио анти-MDR1 су од Thermo Fisher Scientific, САД. Медијум за лепљење препарата је од Abcam, Чешка.



2. Узорковање и складиштење пчелињег и змијског отрова

Пчелињи отров је пореклом од врсте *Apis mellifera* (медоносна пчела) са територије Смедеревске Паланке (44° 21' 34" N, 20° 57' 28" E), Република Србија. Након прикупљања отрова електростимулацијом, отров је растворен у дестилованој води, пречишћен помоћу филтер мембране промера 0,2 µm ради отклањања нечистоћа, а затим сушен. У сувом стању, пчелињи отров је чуван у замрзивачу, на -20 °C, за потребе експеримената. Непосредно пре експеримента, суви прах пчелињег отрова растваран је у малој запремини дестиловане воде са додатком медијума за гајење ћелија (DMEM) до концентрације почетног штока, који је затим разблажен до циљних концентрација.

Змијски отров је узоркован од женки врсте *Vipera ammodytes* (поскок) у лабораторијским условима током 2018. године на Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" (ИБИСС) - Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду. Узорковање је вршено на основу дозволе Министарства за заштиту животне средине Републике Србије, број: 353-01-212/2018-04 и дозволе Етичке Комисије ИББИС-а, број: 02-09/18. Након узорковања, змијски отров је сушен и у сувом стању чуван у замрзивачу на -20 °C. За потребе експеримената, суви прах змијског отрова растваран је у малој запремини дестиловане воде са додатком DMEM-а у запремини потребној за добијање концентрације штока.

2.1. Анализа протеинског састава пчелињег и змијског отрова

2.1.1. Електрофореза за одређивање протеинског састава пчелињег и змијског отрова

За испитивање протеинског састава сувог пчелињег отрова коришћена је електрофореза (енгл. *Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS PAGE) на 16% полиакриламидном гелу (Laemmli, 1970). Анализа протеинског састава отрова пчеле рађена је на Хемијском факултету Универзитета у Београду, у сарадњи са проф др. Маријом Гавровић Јанкуловић.

За раздвајање протеина змијског отрова на основу молекулске масе коришћена је такође SDS-PAGE електрофореза (Laemmly, 1970). Иницијални узорак је припремљен тако што је измерено 0,02 g сувог змијског отрова и растворено у 1 ml dH₂O, како би се добила концентрација од 2000 µg/ml. Након тога половини тог раствора, додат је пуфер за лизирање, ради додатног пречишћавања, тако да је добијен почетни шток концентрације 1000 µg/ml. Овако припремљен узорак је инкубиран 5 мин на 95°C, на термоблоку, и након краткотрајног хлађења наливен у бунаре на гелу. Принцип SDS-PAGE методе се заснива на коришћењу анјонског детерџента (SDS), који денатурише протеине и обавија их негативним наелектрисањем исте густине дуж целог молекула, тако да се на гелу раздвајају према својим молекулским масама. За извођење овог експеримента коришћен је вертикални систем за електрофорезу (енгл. *BioRad TetraCell Electrophoresis System*). Између стаклених плоча фиксираних у носачу са дистанцерима, прво је наливен 12% акриламидни гел за раздвајање (1.5 M Tris-HCl пуфер pH 8.8; 10% SDS; 30% акриламид/bis; 10% APS; TEMED). По завршетку полимеризације гел за раздвајање је испиран са dH₂O и осушен филтер папиром. Након сушења наливен је 4% гел за концентровање (0.5 M Tris-



HCl пуфер, pH 6.8; 10% SDS; 30% акрилamid/bis; 10% APS; TEMED) уз ураћање “чешља” за припрему бунара за наношење узорака. Након полимеризације, формирани су бунари за наливање узорака. Сендвич стаклених плоча између којих се налази полимеризован гел стављен је у каду за електрофорезу и наливан пуфер за електрофорезу (трис-глицински пуфер, pH 8.5). У бунаре на гелу је наливено по 20 μ l узорака 10, 20, 30, 50 и 100 μ g/ml протеина змијског отрова. Концентровање протеина изведено је при константном напону од 80 V. При преласку узорака у гел за раздвајање, напон је повећаван на 120 - 200 V. По завршетку електрофорезе, плоче су раздвајане, гелови испирани са dH₂O и бојени како би се детектовале протеинске траке. По завршетку електрофоретског раздвајања, протеинске траке су визуализоване бојењем (0.1% *Coomassie Brilliant Blue*, 50% метанол и 10% сирћетне киселина, 40% dH₂O) током 24 сата. За обезбојавање гела и контрастирање протеинских трака коришћен је раствор за потпуно обезбојавање позадине (50% метанол и 10% сирћетне киселина, 40% дестилована вода). Параметри за детекцију и идентификацију протеина су маркери молекулске тежине (mw), а масе су изражене у килодалтонима. Добијене траке су мерене дензитометријски, помоћу програма ImageJ, који је коришћен за процену количине добијених протеина у отрову.

2.2. Испитивани третмани

Ћелије су третиране растворима отрова пчеле (ОП) и отрова змије (ОЗ), као и чистим супстанцама које се налазе у саставу ових отрова: мелитин (М) – већински заступљен у отрову пчеле и L-аминокиселинска оксидаза (LAAO) – улази у састав сваког змијског отрова.

2.2.1. Припрема третмана

Третмани су растварани у малој количини дестиловане воде (1% у финалној запремини штока), а затим разблаживани медијумом за гајење ћелија до концентрације штока од 200 μ g/ml за змијски отров и LAAO, 500 μ g/ml за отров пчеле и 1000 μ g/ml за мелитин. Шток је затим пречишћен пропуштањем раствора кроз филтере са мембраном и порама од 0,2 μ m. Даље концентрације коришћене у раду, добијене су разблаживањем штока стерилним медијумом за гајење ћелија.

3. Ћелијско-молекуларне анализе

3.1. Коришћене ћелијске линије

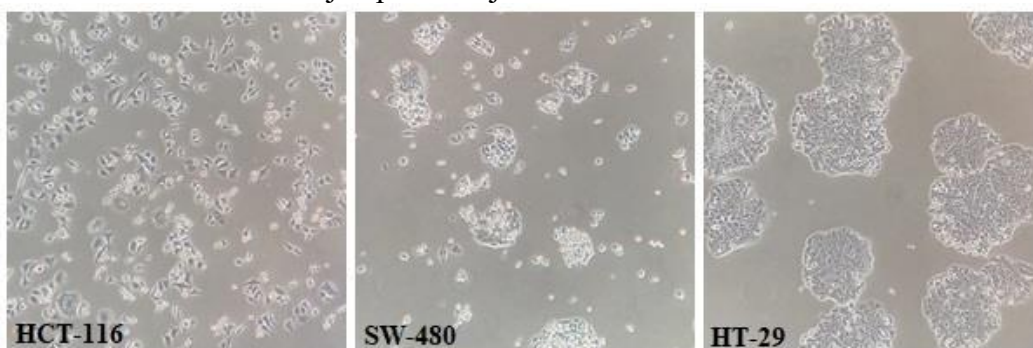
За испитивање антитуморских својстава третмана на карциному дебелог црева, као модел систем коришћене су три различите ћелијске линије пореклом из овог органа: НСТ-116, SW-480 и HT-29. Као контрола за цитотоксично дејство третмана, коришћена је здрава HaCaT ћелијска линија (кератиноцити).

Имортиализована, адхерентна ћелијска линија НСТ-116, изолована је из примарног хуманог колоректалног карцинома и поседује мутацију на кодону за *ras* протоонкоген. По морфологији одговарају епителним ћелијама (Слика 20). Ћелијски производи овог типа ћелија јесу карциноембрионални антиген (енгл. *Carcinoembryonic Antigen* - CEA) и



кератин. Такође, позитивне су на експресију за трансформишући фактор раста бета 1 (енгл. *TGF beta 1*) и трансформишући фактор раста бета 2 (енгл. *TGF beta 2*) (ATCC - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx#generalinformation>).

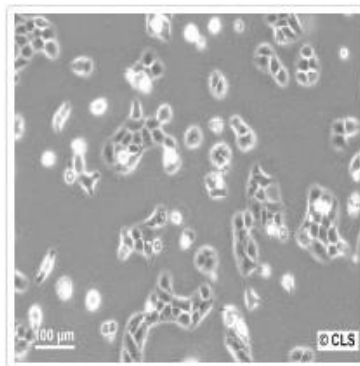
Имортализована, адхерентна ћелијска линија SW-480, изолована је из примарног хуманог колоректалног аденокарцинома. Карактеристична је по томе што има експримиран ген за епидермални фактор раста, и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген, те као позитивна контрола представља добар модел систем приликом испитивања ових мутација. Поред поменутих мутација, позитивне су и за мутације на *c-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *myb*, *sis* и *fos* онкогенима. Такође, поседују мутацију на *p53* тумор супресор гену. Продукти ових ћелија јесу кератин, *TGF beta* и CEA (ATCC - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-228.aspx#generalinformation>). Морфолошки изглед ових ћелија приказан је на Слици 20.



Слика 20. Морфолошки изглед коришћених ћелијских линија (фотографисано на инвертном светлосном микроскопу, на увећању 100x)

Имортализована, адхерентна ћелијска линија HT-29, изолована је из примарног хуманог колоректалног аденокарцинома и морфолошки такође одговара епителним ћелијама (Слика 20). Позитивна је за експресију многих рецептора, као што су хумани аденорецептор алфа (енгл. *Human Adrenergic Alpha2A* – ADRA2A), урокиназни рецептор (енгл. *Urokinase Receptor* - u-PAR), витамин Д (умерена експресија). Онкогени присутни у овој ћелијској линији јесу *myc* +, *ras* +, *myb* +, *fos* +, *sis* +, *p53* +, *abl* -, *ros* -, *src* -. Продукти ових ћелија су, поред везујућег *TGF beta* и CEA, муцин и секреторне компоненте IgA. HT-29 ћелије су негативне за CD4, али постоји површинска експресија галактоза церамида који представља могући алтернативни рецептор за HIV (енгл. *Human Immunodeficiency Virus*) (ATCC - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx#generalinformation>).

Нормални кератиноцити, HaCaT су по морфологији епителне ћелије, такође адхерентне, изоловане из хистолошки нормалног ткива коже. Морфолошки изглед ових ћелија приказан је на Слици 21.



Слика 21. Морфолошки изглед здравих кератиноцита – HaCaT (извор: https://www.clsgmbh.de/p800_HaCaT.html)

Ћелијске линије HCT-116 и SW-480 су добијене од др Данијеле Вигњевић са Института Кири, Париз, (набављене из "банке ћелија" *American Type Culture Collection* - ATCC). Ћелијске линије HT-29 и HaCaT добијене су од др Милице Пешић са ИБИСС-а, Београд (HT-29 из ATCC банке ћелија; HaCaT из *Cell Lines Service, Eppelheim, Germany*).

3.2. Гајење имортализованих ћелијских линија

У *in vitro* преклиничким експериментима, као модел систем најчешће се користе имортализоване ћелијске линије. Бесмртност се постиже циљаним модификацијама генома, те су самим тим способне да се неограничено деле и континуирано гаје у култури. Иморталозоване ћелијске линије пореклом из карцинома дебелог црева, гајене су у контролисаним лабораторијским условима у инкубатору (MD 151 UV, Medline), на оптималној влажности, температури од 37 °C и 5% zasiћености ваздуха угљен-диоксидом. Дугорочно чување ћелијских линија постигнуто је на ниским температурама, у контејнерима са течним азотом (Spectrum series 20), на -196 °C. Експериментални рад са ћелијским линијама захтевао је најпре одмрзавање и континуирано гајење у медијуму, који садржи оптималне супстанце за њихов раст и деобу (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM), са додатком 10% FBS-а и 0.5% пеницилин/стрептомицин-а. Ћелије су након одмрзавања гајене у стерилним фласковима, T-25 cm² са 5 ml медијума или T-75 cm² са 12 ml медијума. Коришћене ћелијске линије су адхерентне линије које се лепе на равно дно, односно површину стерилних фласкова. Након што су ћелије достигле конфлуентност минимум 80% у фласку, пасажирани су или засејавани по одговарајућем протоколу за потребе експеримената.

Одмрзавање ћелијских линија подразумева најпре одмрзавање ћелија залеђених у медијуму за замрзавање (DMEM са додатком 10% FBS и 10% DMSO), ресуспендовање ћелија из криотубе у 5 ml медијума за гајење и центрифугирање 10 минута на 1200 обртаја (rpm). Након центрифуге, медијум из супернатанта је аспириран и ћелије су ресуспендоване у 5 ml свежег медијума у фласк T-25 cm². Следећег дана, након што су ћелије залепљене за дно флашка, стари медијум је замењен свежим (Mazur, 1970).



Неопходни кораци приликом гајења адхерентних ћелијских линија јесу трипсинизација, односно раскидање веза које ћелије формирају међусобно помоћу трипсина и пасажирање адхерентних ћелијских линија (пребацивање дела садржаја у нови флак са свежим медијумом). Ћелијама је аспириран медијум, а затим додат 0.25% трипсин (1 ml за T-25 cm² и 3 ml за T-75 cm² флак), инкубиране су са трипсином до потпуног одлепљивања, што се прати посматрањем флака под микроскопом. Након одлепљивања ћелија су пребачене у малој запремини у нови флак са свежим медијумом (Freshney, 1983). Свежи, хладан медијум уједно неутралише дејство трипсина, који својом активношћу може оштетити ћелије услед продуженог времена инкубације.

3.3. Бројање ћелија за потребе извођења експеримента

Приликом засејавања ћелија, за потребе одговарајућих есеја, неопходан корак је њихово бројање. Најједноставније методе за бројање ћелија употребљавају одговарајуће боје које селективно боје живе или мртве ћелије у узорку. Једна од таквих боја је трипан плаво, која селективно боји мртве ћелије плавом бојом. Боја трипан плаво улази у мртве ћелије које имају оштећену мембрану и боји их у плаво, док живе ћелије остају необојене услед немогућности проласка боје кроз неоштећену мембрану.

Према протоколу, ћелијска суспензија узорка у коме се ћелије броје и трипан плаво мешају се у односу 1:1 (по 10 µl). Ћелије помешане са бојом наливају се на коморицу за бројање ћелија (хемцитометар), након чега се ћелије броје у 2 велика дијагонална квадрата површине 0,0003 mm², на светлосном микроскопу. Након бројања одређује се средња вредност из два квадрата, множи са фактором разблажења (2) и димензијом коморе (10⁴ - корекциони фактор - дубина коморе и запремина у 1 ml). Добијена вредност представља број ћелија у једном милилитру. На основу тог броја одређивана је запремина ћелија која је засејана за потребе одговарајућег есеја.

Вијабилност ћелија (проценат живих у укупном броју ћелија у суспензији) коришћених у експериментима била је већа од 90%.

4. Молекуларне анализе, испитивање ефеката третмана

4.1. MTT тест цитотоксичности

За одређивање цитотоксичности отрова пчеле и змије, мелитина и L-аминокиселинске оксидазе на HCT-116, SW-480 и HT-29 линијама карцинома дебелог црева, коришћен је MTT тест (Mosmann, 1983). Нормални кератиноцити (HaCaT), коришћени су као контрола цитотоксичности третмана. Ова анализа представља колориметријску методу која индиректно одређује проценат вијабилних ћелија у одговарајућим узорцима. Она мери интензитет љубичасто обојеног формазана који настаје дејством митохондријлних редуктаза унутар живих ћелија на жуто обојену тетразолијумову со (MTT). Интензитет боје се мери на спектрофотометру, на 550 nm (ELISA, RT-21000C), а очитане вредности апсорбанци индиректно представљају проценат вијабилних ћелија у узорку.



Ћелије су за ову анализу засејане у микротитар плоче са 96 отвора, и то 10^4 ћелија у 100 μl медијума по бунару. Након 24 h, ћелијама је аспириран медијум и додат третман у одговарајућим концентрацијама, запремине 100 μl . Нетретираним ћелијама, које служе као контрола је замењен стари медијум свежим. Анализа је рађена 24 и 72 h након деловања третмана.

Третмани пчелињим отровом, мелитином, змијским отровом и L-аминокиселинском оксидазом коришћени су у распону концентрација од 0.1 до 10 $\mu\text{g/ml}$ за све испитиване карциномске ћелијске линије. Сви третмани су за нормалне кератиноците коришћени у распону од 1-100 $\mu\text{g/ml}$.

Након истека времена третмана, у контролне и третиране ћелије додат је раствор МТТ-а (5 mg/ml) у запремини од 25 μl . Након инкубације од 2 h на 37 °C, супернатант је аспириран и формазан је растваран у 150 μl DMSO-а. Апсорбанце су мерене на ELISA читачу за микротитар плоче, на одговарајућој таласној дужини. Отвори у којима је био медијум без ћелија, читавају се на исти начин и служе као слепа проба која се одузима од сваке апсорбанце. Добијене вредности апсорбанци су заправо број живих ћелија чији се проценат израчунава као однос апсорбанци третираних и контролних ћелија помножен са 100. На основу процената вијабилних ћелија и добијених крива вијабилности, одређене су IC_{50} вредности помоћу CalcuSyn програма. Вредности IC_{50} су мера за цитотоксичност третмана и представљају концентрације која убијају 50% ћелија, и изражене су у $\mu\text{g/ml}$.

4.2. Акридин оранж/етидијум бромид метода за одређивање типа ћелијске смрти

Акридин оранж/етидијум бромид (АО/ЕБ) је микроскопска метода за одређивање типа ћелијске смрти у одговарајућем узорку ћелија изазване испитиваним третманима (Baskić и сар., 2006). Боја акридин оранж улази у ћелије са очуваним интегритетом мембране везујући се за киселе компоненте унутар ћелија, односно за негативно наелектрисане нуклеинске киселине и карбоксилне групе на протеинима. Везујући се за дволанчану ДНК, акридин оранж емитује зелену флуоресценцу, док везивањем за једноланчану ДНК и РНК емитује црвену боју. Етидијум бромид улази само у мртве ћелије, заправо у ћелије које више немају очувану мембрану, и везујући се за ДНК емитује црвено-наранџасту флуоресценцу. На основу овога, могу се разликовати следећи стадијуми, односно типови ћелијске смрти:

- Живе, односно вијабилне ћелије, обојене су зелено, са јасно видљивим контурама једра.
- Ћелије које су ушле у стадијум ране апоптозе имају зелена једра, али долази до кондензације и фрагментације хроматина, па се посматрањем на микроскопу уочавају зелени фрагменти једра, док је интегритет ћелијске мембране и даље очуван.
- У касној апоптози, ћелије имају наранџасто или црвено једро са кондензованим хроматином, неретко фрагментисаним, при чему се више не препознају ободи ћелијске мембране.
- Некротске ћелије су лако уочљиве, оне су кондензоване и хомогено црвене боје.



За потребе ове анализе, ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 отвора, и то 10^4 ћелија у 100 μl медијума по бунару. Након 24 h, ћелије су третиране одговарајућим концентрацијама третмана: отров пчеле и мелитин у циљаним концентрацијама од 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$, и отров змије и L-аминокиселинске оксидазе у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Нетретиране ћелије служиле су као контрола. Анализа морфологије и флуоресценце ћелија је рађена 24 h након деловања третмана.

По истеку времена третмана, третираним и контролним ћелијама додато је по 10 μl боје АО и ЕБ. Боје су претходно растворење у дестилованој води, у концентрацији од 100 $\mu\text{g/ml}$. Непосредно након додавања АО/ЕБ, ћелије су посматране и бројане под флуоресцентним микроскопом (Ti-Eclipse, Nikon), на увећању 400x. Бројано је најмање 300 ћелија по узорку. Као резултат се добијају проценти живих ћелија, ћелија у раној и касној апоптози, као и проценти некротских ћелија, прерачунати у односу на укупан број избројаних ћелија.

4.3. Одређивање експресије циљаних протеина имунофлуоресценцом

Имунофлуоресценца је метода којом се постиже маркирање одређених ћелијских структура и молекула, и самим тим одређује њихово присуство, локализација и ниво експресије. Техника се суштински заснива на реакцији антиген-антитело. Антитело је за потребе имуноцитохемијских метода обележено флуоресцентном бојом, а детекција се врши посматрањем препарата кроз филтере за детекцију боје одређене таласне дужине на флуоресцентном микроскопу (Higuchi и сар., 2001).

За потребе ове анализе, ћелије су засејане у плочама са 6 отвора, у којима су претходно постављена, и на UV светлу стерилисана, покривна стакла. Засејано је 5×10^4 ћелија у 2 ml медијума по бунару. Након достизања жељене конфлуентности, ћелије су третиране: отровом пчеле и мелитина у циљаним концентрацијама од 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$, отровом змије и L-аминокиселинске оксидазе у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$, док је нетретираним ћелијама, које представљају контролу, замењен свеж медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

Након истека времена третмана аспириран је супернатант, ћелије су испиране PBS-ом и фиксирани 4% параформалдехидом (20 минута, собна температура). Потом, уследила је серија од три испирања PBS-ом и пермеабилizација ћелијске мембране хладним метанолом, 20 секунди (метанол је претходно чуван на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Препарат је поново испиран три пута PBS-ом, након чега су ћелије блокиране 1% раствором BSA (20 минута, собна температура). По истеку овог времена, ћелије су директно уроњене у раствор примарног антитела (Fas, каспаза 9, GSS и MDR1), одређене концентрације или односа (Fas, каспаза 9 и MDR1 у концентрацији 10 $\mu\text{g/ml}$, а GSS у односу 1:100) по следећем поступку: на парафилму (дезинфикованом 75% алкохолем), наливена је кап од 50 μl раствора примарног антитела на коју је наслоњена покривна плочица тако да је страна на којој су ћелије уроњена у антитело. Инкубација са примарним антителом трајала је 1 h, а након тога ћелије су враћене у бунаре на плочи и примарно антитело је испирано три пута по 15 минута PBS-ом. По истом поступку ћелије су инкубирани са секундарним антителом, такође у трајању од сат времена, заштићене од светла. Секундарно антитело је



конјуговано са флуоресцентом бојом (Cy3 или Alexa488), осетљивом на светлост тако да је процедура припреме, инкубације и испирања рађена у мраку. Однос у ком је додато секундарно антитело је 1:200, и у раствор је такође додата боја за детекцију једара DAPI, у односу 1:1000. Секундарно антитело испирано је на исти начин као примарно. Покровна стакла са ћелијама су залепљена на предметна стакла уз помоћ поливинил алкохол медијума, тако да су ћелије уроњене у њега. Препарати су осушени преко ноћи, након чега су посматрани под флуоресцентним микроскопом (Ti-Eclipse), на увећању 600x и одговарајућим филтерима за детекцију боје секундарног антитела. Током микроскопирања направљене су репрезентативне микрографије (минимум 20 по препарату), које су даље обрађене помоћу NIS-ELEMENT програма, а затим и квантификоване. Обрада ћелија на микрографијама се врши помоћу ImageJ програма, након чега се квантификује најмање 4 ћелије по микрографији на начин описан детаљно на линку: <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>. Као резултат добијена је релативна флуоресценца по ћелији (енгл. *CTCF* - *Corrected total cell fluorescence*), преко формуле:

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

4.4. Одређивање активности каспазе 8

Одређивање активности каспазе 8 као циљаног ензима, укљученог у процес апоптозе у ћелијама, вршено је колориметријским китом (RD Systems).

Ћелије су засејане у T-25 cm² флашкове, 10⁶ ћелија у 5 ml медијума по фласку. Када су достигле конфлуентност додато је по 5 ml одговарајућег третмана: отров пчеле и мелитин у циљаним концентрацијама од 1 и 5 µg/ml, и отров змије и L-аминокиселинске оксидазе у концентрацијама 2 и 5 µg/ml, док је нетретираним ћелијама које представљају контролу замењен свеж медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

Инкубација ћелија са третманом је трајала 24 h, а након тога је у епрувете пребачен супернатант и трипсинизирани ћелије, за сваки узорак појединачно. Епрувете су центрифугиране на 1200 rpm, 10 минута. Супернатант је аспириран, а талог ресуспендован у пуфер за лизирање ћелија (25 µl пуфера на 10⁶ ћелија). Лизат је инкубиран на леду 10 минута а затим центрифугиран 3 минута на 7500 rpm и 4 °C. Добијени супернатант (50 µl по поновку) је пребачен у микротитар плочу са 96 отвора након чега је у сваки бунарић додато по 50 µl по поновку реакционог реагенса који садржи: 10 mM DTT (дитиотреитол) и 5 µl супстрата за каспазу 8 IETD-pNA (*Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline*). Плоча је инкубирана 2 h у инкубатору, на 37 °C. Након истека инкубације, апсорбанце су мерене на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 405 nm. Ниво активности каспазе 8 директно је пропорционалан очитаном интензитету боје.



4.5. Испитивање параметара редокс статуса

4.5.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (NBT тест)

Концентрација супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) је одређивана NBT тестом (Auclair и Voisin, 1985), спектрофотометријском методом која се заснива на редукцији жуто обојеног NBT у присуству $O_2^{\cdot-}$ до NBT (плав до сиво-црн).

Ћелије су засејане у микротитар плоче од 96 отвора, 10^4 ћелија у 100 μ l медијума по бунару. Након 24 h, ћелије су третиране отровом пчеле, мелитином и L-аминокиселинском оксидазом у концентрацијама 1, 2, 5, и 10 μ g/ml (100 μ l третмана по отвору). Контролним ћелијама је промењен медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

Након истека третмана, ћелијама је додато по 10 μ l раствора NBT-а у концентрацији 5 mg/ml, након чега је уследио период инкубације на 37 °C у трајању од 45 минута. По истеку инкубације у сваки бунарић додато је 50 μ l DMSO-а и апсорбанце су читаване на ELISA читачу на 550 nm. Апсорбанце су искоришћене за прерачун концентрације $O_2^{\cdot-}$, изражене у nmol/ml, по формули:

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

A - апсорбанца; V_{cuv} - укупна запремина раствора у бунарићу = 160 μ l; V_{ex} - запремина ћелија са третманом = 100 μ l; 0.015 - моларни екстинкциони коефицијен за моноформаза (15,000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Коначне вредности представљене су у односу на број вијабилних ћелија.

4.5.2. Одређивање концентрације глутатиона

Концентрација глутатиона (GSH) у ћелијама мерена је спектрофотометријском методом (Baker и сар., 1990), која се заснива на оксидацији GSH посредством сулфидног реагенса DTNB (5,5'-дитио-бис(2-нитробензојева киселина)). Продукт реакције је жуто обојена TNB (5'-тио-2-нитробензојева киселина), а интензитет бојене реакције мерен је на ELISA читачу, на 405 nm.

Ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 отвора, 5×10^4 ћелија са додатком 100 μ l медијума по бунару. Након 24 h, ћелије су третиране отровом пчеле, мелитином и L-аминокиселинском оксидазом у концентрацијама 1, 2, 5, и 10 μ g/ml (100 μ l третмана по отвору). Контролним ћелијама је промењен медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

По завршетку времена инкубације третмана, плоча је центрифугирана на 1000 rpm у трајању од 10 минута. Из отвора је аспириран медијум и додато је 100 μ l 2.5% сулфосалицилне киселине, након чега је плоча инкубирана на леду 15 минута. По истеку времена инкубације, плоча је центрифугирана 15 минута на 1000 rpm. Из супернатанта сваког узорка извучено је по 50 μ l и наливено на нову микротитар плочу, а затим у сваки узорак додато по 100 μ l реакционе смеше (реакциона смеша садржи 1 mM NADPH, 0.7 U GSH редуктазе по милилитру реакционе смеше, 1 mM DTNB, растворен у DMSO-у и допуњен PBS-ом до потребне запремине). У плочу са бунарићима за стандардну криву наливени су узорци (50 μ l) различитих концентрација GSH (100 mM – 0.39 μ M), а читава



процедура је одрађена идентично као са узорцима ћелија. Плоче су инкубиране 5 минута и апсорбанце су очитане на таласној дужини од 405 nm, на ELISA читачу. Апсорбанце су искоришћене за прерачун концентрације GSH изражене у nmol/ml, по формули:

$$\text{nmol GSH/ml} = A/F \times R$$

A - апсорбанца; F – фактор добијен из стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH (0.0157); R – разблажење (x2).

4.5.3. Одређивање концентрације липидних пероксида

Малондиалдехид (MDA) је продукт липидне пероксидације и индикатор оштећења липида мембране, која настају као последица стања оксидационог стреса у ћелијама. Концентрација MDA се одређује спектрофотометријском методом TBARS (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances assay*) (Buege и Aust, 1987).

Ћелије су засејане у плоче са 6 отвора, у 2 ml медијума зајесано је 10^6 ћелија по отвору. Након 24 h, ћелије су третиране отровом пчеле, мелитином и L-аминокиселинском оксидазом у концентрацијама 1, 2, 5, и 10 $\mu\text{g/ml}$ (100 μl третмана по отвору). Контролним ћелијама је промењен медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

По истеку третмана, ћелије су испране PBS-ом, а затим је додато 200 μl пуфера за лизирање ћелија и 2 μl протеазног инхибитора по узорку. Инкубација је трајала 30 минута на леду, а по истеку ћелије су пребачене из плоче у микротубе заједно са раствором пуфер-инхибитор. Узорци су потом центрифугирани 10 минута на 1200 rpm и температури од 4 °C. Добијени супернатант је пребачен у нове епендорфице и одвојено је по 10 μl супернатанта који је служио за читавање апсорбанци протеина на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer plus). Протеини су најпре загрејани 5 минута на 90 °C, затим је 5 μl протеина растворено у 495 dH₂O и апсорбанца сваког узорка је мерена у више поновака. Концентрације протеина су прерачунате из стандардне криве (добијене на основу познатих концентрација BSA). Преосталој количини супернатанта додато је по 1 ml реакционе смеше, TCA-TBA-HCl (15% трихлорсирћетна; 0.375% тиобарбитурна и 0.25 M хлороводонична киселина), након чега су узорци вортексовани и загревани 30 минута на 90 °C. Епрувете су охлађене на леду 5 минута, а затим центрифугиране 10 минута на 6600 rpm и температури од 4 °C. За даљу анализу коришћен је добијени супернатант, који је наливен у плочу са 96 отвора у поновцима (100 μl по поновку) и очитан на 405 nm, на ELISA читачу. Резултати концентрације MDA су приказани у pmol/mg протеина. Концентрација се прерачунава преко формуле:

$$\text{C TBARS} = (\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10 (\text{MDA nmol/mg proteina}) / 1.56 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}$$

ΔA_{uz} – средња вредност апсорбанце узорка; ΔA_{sp} – средња вредност апсорбанце слепе пробе; V_{rs} – запремина реакционе смеше; V_{uz} – запремина узорка; C_{pr} – концентрација протеина у mg/ml.

4.6. Испитивање нивоа експресије информационе РНК циљаних гена

Испитивање експресије информационе РНК (иРНК) циљаних гена, укључених у процес апоптозе и биотрансформације ксенобиотика, вршено је методом квантитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (*Quantitative Real Time Polymerase Chain*



Reaction – qRT-PCR). Одређивање експресије информационе РНК је постигнуто најпре њеном изолацијом из карциномских ћелија, а затим превођењем у комплементарну ДНК (цДНК). Комплементарна ДНК даље служи као узорак за амплификацију *qRT-PCR* методом.

4.6.1. Изолација РНК из ћелијских линија

Изолација РНК из ћелија се заснива на методи у чијој основи је реакција фенол-хлороформ (Chomczynski и Sacchi, 1987).

Ћелије су за потребе изолације РНК засејане у Т-25 cm^2 флашкове, 10^6 ћелија по фласку уз додатак 5 ml медијума. Након постизања конfluентности од 80-90%, ћелије су третиране са 5 ml отрова пчеле и мелитина у циљаним концентрацијама од 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$, и отровом змије и L-аминокиселинском оксидазом у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$, док је контролним ћелијама промењен медијум. Анализа је рађена 24 h након третмана.

Након истека третмана, ћелије су подигнуте из флашкова трипсином и центрифугиране 10 минута на 1200 rpm . Супернатант је аспириран и талогу је додато 1 ml тризола којим се вршила хомогенизација ћелија на леду (механичка хомогенизација, увлачењем и извлачењем узорка у наставак пипете док се узорак скроз не хомогенизује). Хомогенат ћелија је пребачен у микротубу, додато је 200 ml хлороформа и енергично мешано 15 секунди, након чека су узорци стајали 2-3 минута на собној температури, а затим центрифугирани 15 минута на температури од 4 $^{\circ}\text{C}$, на 12000 rpm . Центрифугом су издвојене 3 фазе од којих је даље коришћена само горња провидна, водена фаза у којој је растворена РНК. Провидна фаза је издвојена у нову микротубу и додато је 500 μl изопропанола, промешано је ручно и стављено на инкубацију 10 минута на собној температури, а затим центрифугирано 10 минута на температури од 4 $^{\circ}\text{C}$, на 12000 rpm . Након центрифугирања супернатант је одливен, а у талог, који је заправо РНК, додато је 1 ml хладног 80% етанола и центрифугирано 5 минута на 7500 rpm и температури од 4 $^{\circ}\text{C}$. Етанол је након центрифугирања отклоњен и микротубе са талогом РНК су осушене додатно од етанола пар минута на собној температури. Након сушења, талог РНК је ресуспендован у 20 μl воде PCR чистоће и узорци су инкубирани на термоблоку 5 минута, на 55 $^{\circ}\text{C}$. Мерење концентрације узорака вршено је на биофотометру на таласној дужини од 260 nm, тако што је у кивету за биофотометар наливено 495 μl воде PCR чистоће и 5 μl узорка РНК. Приликом читавања концентрације РНК у обзир је узимано разблажење. Приликом мерења, на биофотометру је могуће проверити и чистоћу узорака. На таласној дужини од 260 nm је апсорбциони максимум нуклеинских киселина, док је на 280 nm апсорпциони максимум ароматичних једињења. Чистоћа се гледа на основу броја који представља однос апсорбанци 260 и 280 nm, и за чисту РНК се узима опсег 1.8 до 2.0 (ниже вредности указују на контаминацију протеинима, а више вредности на присуство ДНК). Узорци су чувани на температури од -80 $^{\circ}\text{C}$ до коришћења.

4.6.2. Реверзна транскрипција (RT-PCR)

Превођење укупне, изоловане РНК из узорака у комплементарни ланац ДНК, цДНК (енгл. *Complementary DNA*, cDNA) вршено је употребом комерцијалног кита, (cDNA



Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems), који функционише по принципу комплементарног превођења РНК посредством ензима реверзне транскриптазе (Bustin, 2000). Мастер микс за реверзну транскрипцију по реакцији (1 узорак) је садржао: 1 μl реверзне транскриптазе (енгл. *Reverse Transcriptase*), 2 μl пуфера (10x *RT Buffer*), 2 μl дезоксирибонуклеотид трифосфата концентрације 5 mM (*dNTP*), 2 μl олиго-dT прајмера и 11 μl PCR воде. У овако припремљен мастер микс додато је 2 μl РНК, концентрације 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Процес превођења је вршен на PCR апарату (*Eppendorf Mastercycler*). Програм за превођење се сетује на PCR апарату по циклусима, од којих је први иницијални циклус у трајању од 10 минута, на 25°C; затим други циклус у трајању од 120 минута, на 37°C; трећи циклус у трајању од 5 минута на 85°C, и последњи циклус је хлађење узорака, у трајању од 5 минута на 4°C. Након превођења, цДНК чува се на температури од -20 °C до коришћења.

4.6.3. Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (qRT-PCR)

Квантификација нивоа експресије иРНК за циљане гене постиже се преко Real-Time система (*Quantitative Real-Time system, Applied Biosystems 7500/7500 Real-Time PCR Software v2.0*), коришћењем комерцијалног кита (*qPCR MasterMix, Applied Biosystems*). У свом саставу, *qPCR MasterMix* садржи неспецифичну флуоресцентну боју *Syber Green*, која интеркалира у молекул дволанчане ДНК, емитујући сигнал – зелену флуоресценцу. Умножавањем молекула ДНК током PCR реакције, долази до јачег емитовања флуоресценце у сваком наредном циклусу, која у једном од њих достиже значајно повећање у односу на базални ниво флуоресценце, што апарат читава као резултат (вредност C_T). Поред C_T вредности, апарат даје и криву топљења ДНК (енгл. *Melting curve*) која указује на специфичности PCR продукта и евентуално присуство прајмер-дајмера (енгл. *Primer-dimer*).

За реакцију квантификације потребно је имати цДНК као почетни молекул, прајмере испитиваног гена, као и реакциону смешу која по реакцији садржи: 10 μl *qPCR MasterMix*-а, 0.5 μl *Forward primer*-а и 0.5 μl *Reverse primer*-а концентрације 10 μM и 8 μl PCR воде. У овако припремљен мастер микс додато је 1 μl цДНК. Реакциона смеша се прави за сваки прајмер посебно. Кит различитим топлотним циклусима омогућава денатурацију ДНК (висока температура) и хибридизацију прајмера са ДНК, а затим и полимеризацију. То се постиже сетовањем апарата у 40 циклуса, и сваки од њих садржи следеће кораке: први корак, иницијална фаза денатурације која траје 60 секунди, на температури од 95°C; затим други корак, фаза денатурације, 15 секунди на 95°C; фаза екстензије прајмера која се подешава на температури оптималној за коришћене прајмере (58°C). По истом шаблону подешава се и крива топљења (енгл. *Melt Curve*).

Релативна експресија подразумева поређење концентрација ДНК са неким другим узорком (нетретиране ћелије). Нормализација узорака вршена је у односу на референтни ген (енгл. *housekeeping gene*), β -actin. Прерачунавање релативне експресије и нормализација узорка се врши C_T компаративном методом (Schmittgen и Livak, 2008):



$$2^{-\Delta\Delta CT} = \Delta CT_1 - \Delta CT_2$$

ΔCT_1 - је разлика C_T вредност испитиваног гена у узорку и C_T вредности β -actin-а у узорку; ΔCT_2 - је разлика C_T вредност испитиваног гена у контроли и C_T вредности β -actin-а у контроли.

У табели су наведене секвенце коришћених прајмера за испитиване гене:

	Forward секвенце	Reverse секвенце
<i>β-actin</i>	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<i>Bax</i>	5'-GGACGAACTGGACAGTAACATGG-3'	5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'
<i>Bcl-2</i>	5'-CTACGAGTGGGATGCGGGAGATG-3'	5'-GGTTCAGGTACTCAGTCATCCACAG-3'
<i>Cas8</i>	5'-AGAGTCTGTGCCCAAATCAAC-3'	5'-GCTGCTTCTCTCTTTGCTGAA-3'
<i>Cas9</i>	5'-GAGTCAGGCTCTTCSTTTG-3'	5'-CCTCAAACCTCAAGAGCAC-3'
<i>CYP1A1</i>	5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3'	5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3'
<i>CYP1B1</i>	5'-TGATGGACGCCTTTATCCTCTC-3'	5'-CATAAAGGAAGGCCAGGACATA-3'
<i>GSTP1</i>	5'-TCAAAGCCTCCTGCCTATAC-3'	5'-AGGTGACGCAGGATGGTATT-3'
<i>MRP1</i>	5'-ACCCTAATCCCTGCCAGAG-3'	5'-CGCATTCTTCTTCCAGTTC-3'
<i>MRP2</i>	5'-ATACCAATCCAAGCCTCTAC-3'	5'-GAATTGTCACCTGTAAAGAG-3'
<i>MDR1</i>	5'-GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACACAAAATT-3'	5'-CAGACAGCAGCTGACAGTCCAAGAACAGGACT-3'

5. Статистичка анализа података

Експерименти су рађени у трипликату и представљени као средња вредност независних експеримената $\pm$ стандардна грешка. Статистичке анализе за обраду података одрађене су у оквиру програма SPSS (SPSS for Windows, ver. 17, 2008, Chicago, IL). За одређивање статистичке значајности коришћена је ANOVA при чему је свака вредност < 0.05 сматрана за статистички значајну. За испитивање корелације коришћен је Пирсонов коефицијент корелације. Вредности IC_{50} (концентрација која убија 50% ћелија), добијене су из дозно зависних крива преко програма *CalcuSyn*. Ниво експресије протеина и квантификација узорака протеина на гелу, мерени су дензитометријски, преко ImageJ програма (Wayne Rasband, ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).



IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Након експерименталних истраживања, резултати приказују анализу антитуморске активности отрова пчеле (*Apis mellifera*) и отрова змије (*Vipera ammodytes*), као и чистих супстанци које садрже ови отрови, мелитина и L-аминокиселинске оксидазе. Као модел систем коришћене су ћелијске линије карцинома дебелог црева НСТ-116, SW-480 и НТ-29. Антитуморско дејство испитивано је са аспекта цитотоксичности, проапототске активности, као и процеса метаболизма третмана у ћелијама карцинома дебелог црева, који су допринели евалуацији резултата у смеру потенцијалног коришћења третмана са смањеном могућношћу развоја резистенције.

1. Анализа протеинског састава пчелињег и змијског отрова

1.1. Протеински састав пчелињег отрова

Електрофоретско раздвајање укупних протеина у узорку пчелињег отрова постигнуто је на 16% полиакриламидном гелу (Слика 1 у Прилогу). Раздвајање протеина вршено је на основу њихове молекулске тежине, а масе су изражене у килодалтонима (kDa). Заступљеност протеина у отрову изражена је процентуално (Табела 1).

Табела 1. Протеински састав отрова пчеле изражен у процентима на основу заступљености у узорку.

Протеини	Заступљеност на гелу у %
Мелитин	50.80
Фосфолипаза А	46.29
Хијалуронидаза	2.57
Неидентификовани	0.34

Резултати електрофоретског раздвајања отрова пчеле врсте *Apis mellifera*, показују да је најзаступљенија компонента у отрову пчеле мелитин, са процентуалном заступљеношћу од 50.80%. У нашем узорку, поред мелитина, удео у протеинском саставу има фосфолипаза А, као и хијалуронидаза. Неидентификовани удео протеина је мањи од 1%.

1.2. Протеински састав змијског отрова

Електрофоретско раздвајање укупних протеина у узорку пчелињег отрова постигнуто је на 12% полиакриламидном гелу (Слика 2 у Прилогу). Раздвајање протеина



вршено је на основу њихове молекулске тежине, а масе су изражене у килодалтонима (kDa). Заступљеност протеина у отрову изражена је процентуално (Табела 2).

Табела 2. Протеински састав отрова змије изражен у процентима на основу заступљености у узорку.

<i>Протеини</i>	<i>Заступљеност на гелу у %</i>
Серин протеазе/CRISPs	40.79
Металопротеиназе PI	36.81
Металопротеиназе PII	22.40

Резултати електрофоретског раздвајања отрова змије, врсте *Vipera ammodytes*, показују да је најзаступљенија компонента у нашем узорку отрова из групе серин протеаза, односно CRISPs (енгл. *Cysteine-Rich Secretory Proteins*). Металопротеиназе се у нашем узорку отрова заступљене у две класе, PI и PII.

2. Цитотоксичност третмана

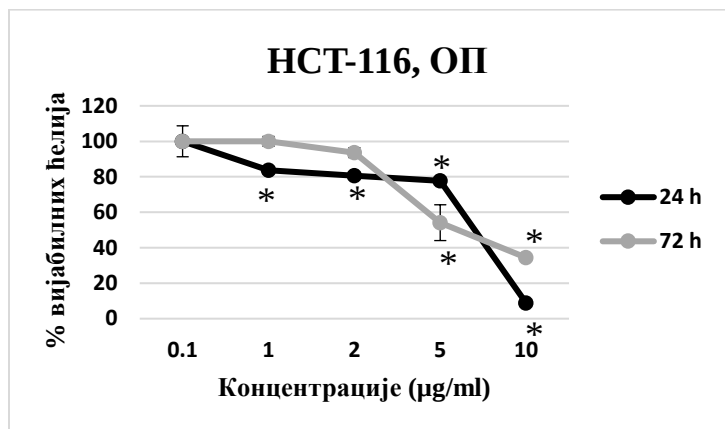
Потенцијални цитотоксични ефекат отрова пчеле (ОП), мелитина (М), отрова змије (ОЗ) и L-аминокиселинске оксидазе (LAAO) испитиван је на различитим ћелијским линијама пореклом из карцинома дебелог црева HCT-116, SW-480 и HT-29 у распону концентрација 0.01-10 µg/ml. Анализа цитотоксичности рађена је МТТ колориметријским тестом. Поред ћелијских линија карцинома, као контролне, здраве ћелије за испитивање цитотоксичности, коришћени су здрави кератиноцити, HaCaT ћелијска линија.

2.1. Цитотоксичност отрова пчеле и мелитина

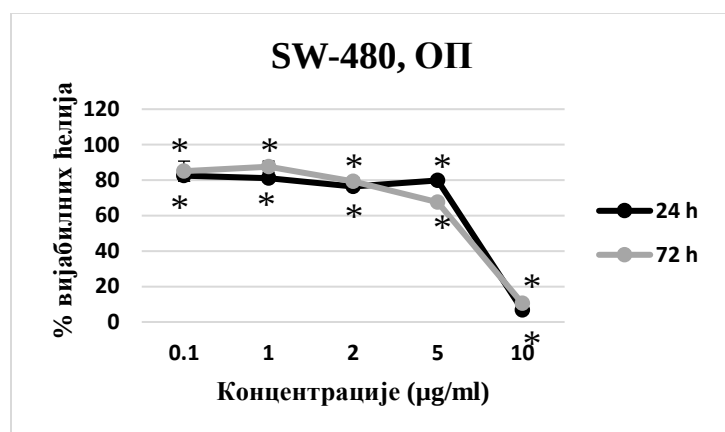
Цитотоксичност третмана процењује се на основу његовог утицаја на вијабилност ћелија. Добијени резултати на HCT-116 ћелијама указују да отров пчеле значајно смањује ћелијску вијабилност у односу на нетретирание ћелије, 24 и 72 h од третмана у испитиваном распону концентрација (Графикон 1, Табела 1 у Прилогу). Резултати показују значајно дозно зависно смањење вијабилности HCT-116 ћелија након оба времена, на шта указују коефицијенти Пирсонове корелације (Табела 7 у Прилогу).

Отров пчеле значајно утиче на смањење вијабилности SW-480 ћелија у односу на контролне ћелије (Графикон 2, Табела 1 у Прилогу). Присуство корелација након 24 и 72 h од деловања третмана, указују на дозно зависно смањење вијабилности SW-480 ћелија (Табела 7 у Прилогу). Ћелије SW-480 су осетљивије на отров пчеле у односу на HCT-116 ћелије.

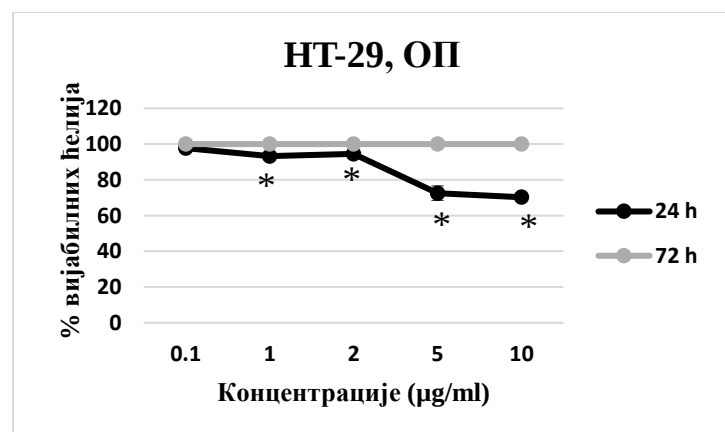
Резултати показују да отров пчеле смањује вијабилност HT-29 ћелија у односу на контролу након 24 h, са јасном дозном зависношћу (Графикон 3, Табела 7 у Прилогу). Међутим, код ових ћелија се након 72 h од деловања третмана дешава потпуно опорављање (Графикон 3, Табела 1 у Прилогу).



Графикон 1. Утицај отрова пчеле (ОП) на вијабилност НСТ-116 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 2. Утицај отрова пчеле (ОП) на вијабилност SW-480 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



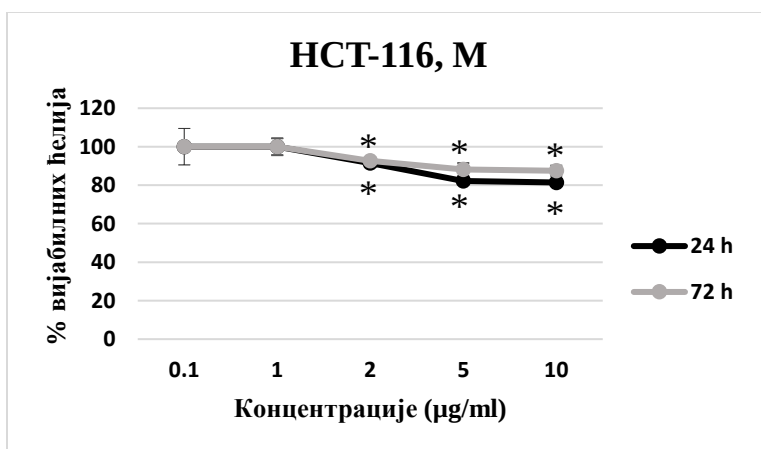
Графикон 3. Утицај отрова пчеле (ОП) на вијабилност НТ-29 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



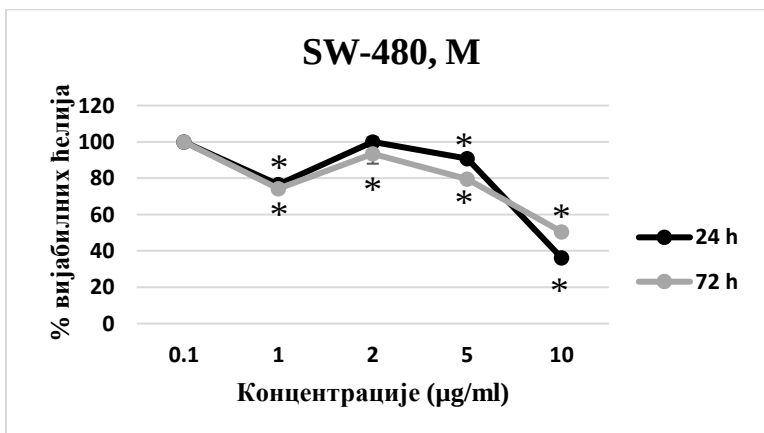
Мелитин такође значајно утиче на смањење вијабилности испитиваних ћелијских линија 24 и 72 h након третмана. Резултати показују да се вијабилност НСТ-116 ћелија под утицајем мелитина смањује дозно зависно након оба времена, с обзиром на присуство корелације (Графикон 4, Табела 2 и 7 у Прилогу).

Мелитин значајно смањује вијабилност SW-480 ћелија након 24 и 72 h од третмана у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 5, Табела 2 у Прилогу). Резултати указују на присуство дозно зависног смањења вијабилности SW-480 ћелија, с обзиром на присуство корелације у оба испитивана временска периода (Табела 7 у Прилогу).

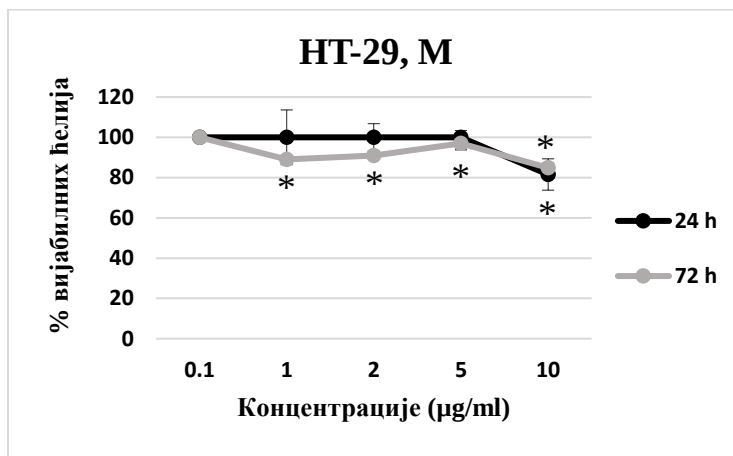
Смањење вијабилности НТ-29 ћелија под утицајем мелитина је такође значајно (Графикон 6, Табела 2 у Прилогу). Долази до значајног дозно зависног смањења вијабилности, што потврђује присуство корелације након 24 и 72 h од деловања третмана (Табела 7 у Прилогу). Ове ћелије су најмање осетљиве на деловање мелитина када се упореде са НСТ-116 и SW-480 ћелијама.



Графикон 4. Утицај мелитина (М) на вијабилност НСТ-116 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

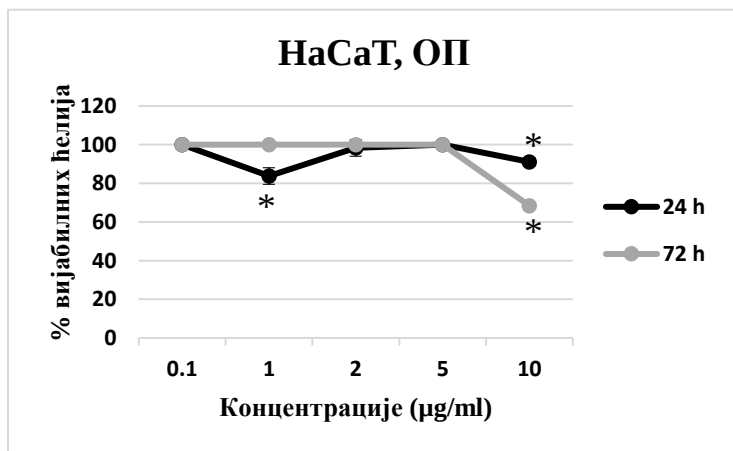


Графикон 5. Утицај мелитина (М) на вијабилност SW-480 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

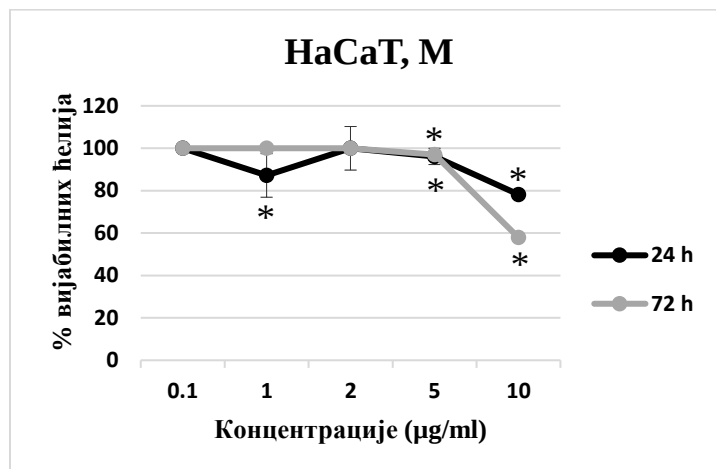


Графикон 6. Утицај мелитина (М) на вијабилност НТ-29 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Здрави кератиноцити HaCaT, који су коришћени као контрола за испитивање цитотоксичности третмана, такође показују одређену осетљивост на отров пчеле и мелитин у односу на нетретиране ћелије (Графикон 7 и 8, Табела 3 у Прилогу). Смањење вијабилности HaCaT ћелија 24 h након деловања отрова пчеле је значајно у концентрацијама 1 и 10 µg/ml, без присуства јасне дозне зависности. Отров пчеле смањује вијабилност HaCaT ћелија и након 72 h у највишој концентрацији, при чему присуство корелације указује на дозну зависност. Мелитин такође утиче на смањење вијабилности ћелија, дозно зависно након 24 и 72 h, на шта указује присуство корелације (Табела 7 у Прилогу).



Графикон 7. Утицај отрова пчеле (ОП) на вијабилност здравих кератиноцита - HaCaT, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 8. Утицај мелитина (М) на вијабилност здравих кератиноцита - HaCaT, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Цитотоксична активност је приказана као IC_{50} вредност у $\mu\text{g/ml}$ (Табела 3), израчуната на основу крива вијабилности ћелија. Вредност IC_{50} представља концентрацију која убија 50% ћелија. Добијене IC_{50} вредности указују на значајну цитотоксичност отрова пчеле и мелитина на HCT-116 и SW-480 ћелијама. Иако третмани утичу на смањење вијабилности HT-29 ћелија у појединим концентрацијама, прерачунате IC_{50} вредности су веће од највише испитиване концентрације (10 $\mu\text{g/ml}$), у случају оба третмана. У односу на вредности IC_{50} , отров пчеле има јачи цитотоксични ефекат од мелитина на HCT-116 и SW-480 ћелијама. На здравим HaCaT ћелијама IC_{50} вредности за отров пчеле и мелитин су више од највеће испитиване концентрације (10 $\mu\text{g/ml}$), (Табела 3). На основу добијених IC_{50} вредности, у третманима отровом пчеле и мелитином, не уочава се временска зависност ни код једне испитиване ћелијске линије (Табела 3).

Табела 3. Цитотоксични ефекат отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), изражен преко IC_{50} вредности ($\mu\text{g/ml}$), на HCT-116, SW-480, HT-29 и HaCaT линијама, 24 и 72 h након третмана.

Ћелијска линија	ОП ($\mu\text{g/ml}$)		М ($\mu\text{g/ml}$)	
	24 h	72 h	24 h	72 h
HCT-116	5.32±0.20	5.69±0.31	>10	>10
SW-480	5.35±0.16	5.68±0.25	8.89±0.31	10.01±0.19
HT-29	>10	>10	>10	>10
HaCaT	>10	>10	>10	>10

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка.

2.2. Цитотоксичност отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе

Цитотоксичност отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе такође је процењена на основу њиховог ефекта на вијабилност ћелија. Резултати показују да отров змије

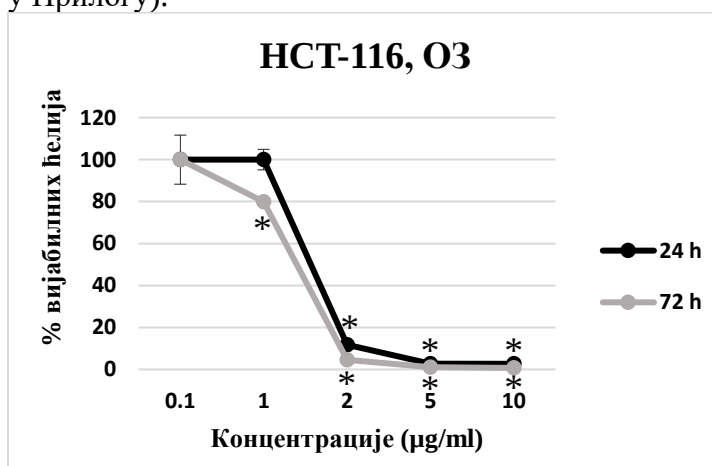


значајно смањује вијабилност испитиваних ћелијских линија карцинома дебелог црева у односу на нетретирание ћелије 24 и 72 h од деловања третмана.

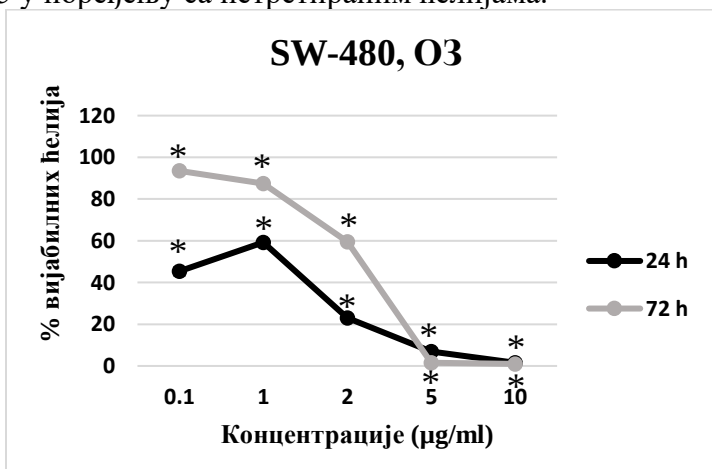
Отров змије је јако цитотоксичан третман који у највећим концентрацијама потпуно смањује вијабилност НСТ-116 ћелија (Графикон 9, Табела 4 у Прилогу). У вишим концентрацијама 2, 5 и 10 $\mu\text{g/ml}$, долази до готово потпуног елиминисања вијабилних ћелија. Смањење вијабилности НСТ-116 ћелија под утицајем отрова змије је дозно зависно након 24 и 72 h, што потврђује и присуство корелације (Табела 7 у Прилогу).

Отров змије значајно смањује вијабилност SW-480 ћелија у односу на контролу (Графикон 10, Табела 4 у Прилогу). Резултати показују постојање дозно зависног смањења вијабилности SW-480 ћелија, на шта указује и присуство корелација након 24 и 72 h (Табела 7 у Прилогу).

Вијабилност НТ-29 ћелија је такође значајно смањена у третираним ћелијама отровом змије у односу на контролу (Графикон 11, Табела 4 у Прилогу). Присуство корелације указује на значајно дозно зависно смањење вијабилности НТ-29 ћелија након 24 и 72 h (Табела 7 у Прилогу).

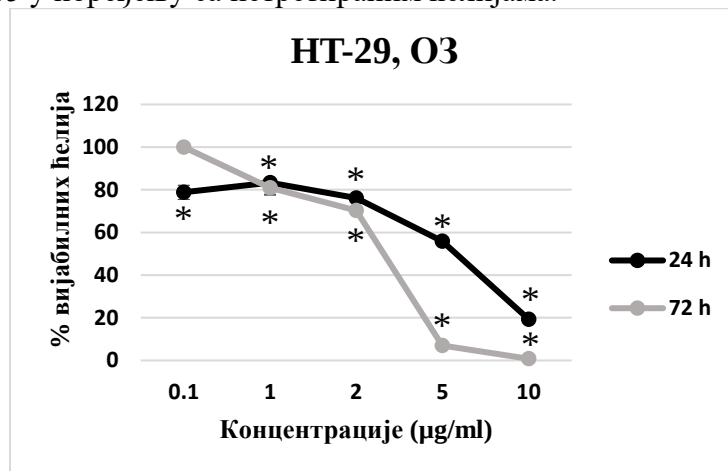


Графикон 9. Утицај отрова змије (ОЗ) на вијабилност НСТ-116 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.





Графикон 10. Утицај отрова змије (ОЗ) на вијабилност SW-480 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

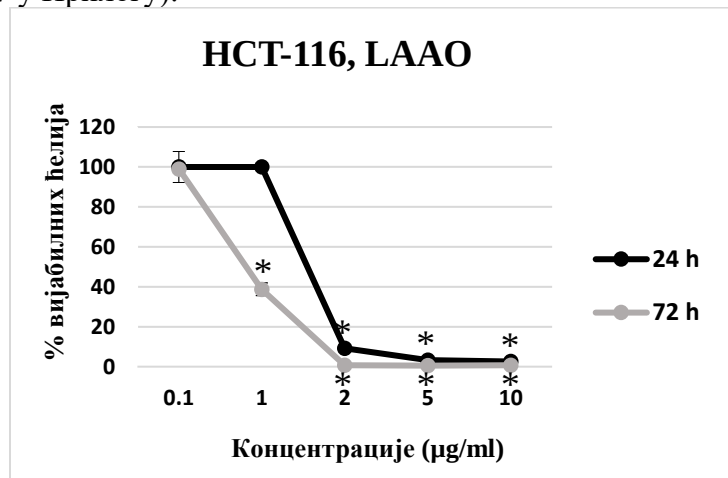


Графикон 11. Утицај отрова змије (ОЗ) на вијабилност HT-29 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

На основу процене вијабилности ћелија, такође је уочена и значајна цитотоксичност L-аминокиселинске оксидазе на ћелијским линијама карцинома дебелог црева 24 и 72 h након третмана (Графикон 12, Табела 5 у Прилогу). Резултати показују да L-аминокиселинска оксидаза значајно смањује вијабилност НСТ-116 ћелија дозно зависно, што потврђује присуство корелације након оба испитивана времена (Табела 7 у Прилогу).

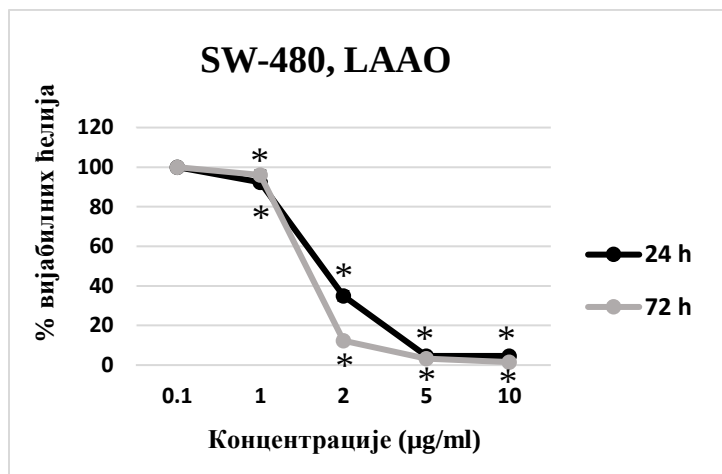
На SW-480 ћелијама добијени су слични резултати (Графикон 13, Табела 5 у Прилогу), долази до значајног смањења вијабилности под утицајем L-аминокиселинске оксидазе дозно зависно, на шта указују коефицијенти корелације, након 24 и 72 h.

Графикон 14 и Табела 6 у Прилогу показују значајно смањење вијабилност HT-29 ћелија под утицајем L-аминокиселинске оксидазе у односу на контролу. Присутно је значајно дозно зависно смањење вијабилности, на шта указује присуство корелације након 24 и 72 h (Табела 7 у Прилогу).

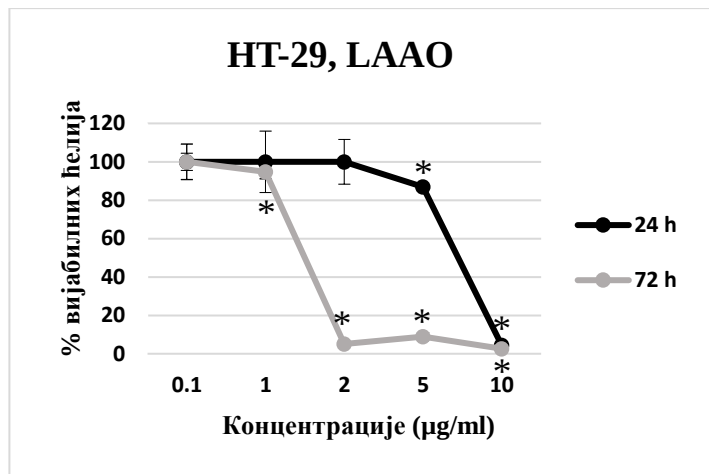




Графикон 12. Утицај L-аминокиселинске оксидазе (LAAO) на вијабилност НСТ-116 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

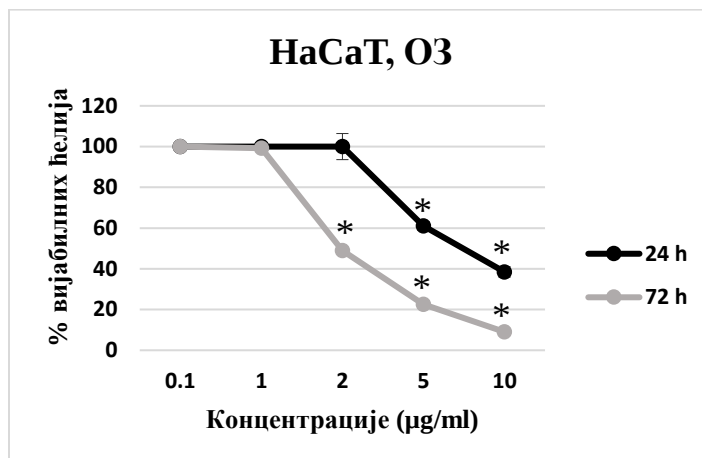


Графикон 13. Утицај L-аминокиселинске оксидазе (LAAO) на вијабилност SW-480 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

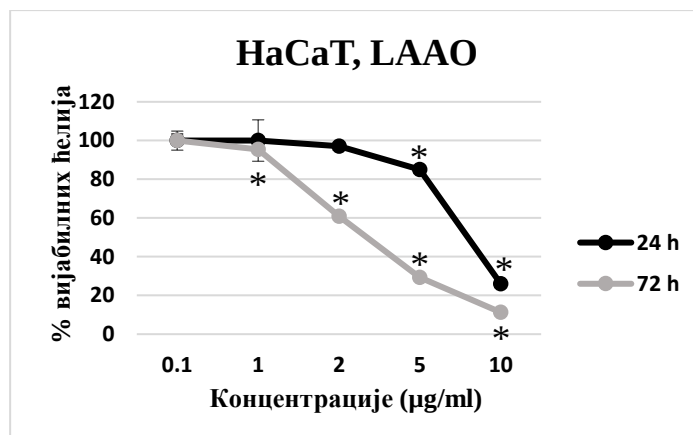


Графикон 14. Утицај L-аминокиселинске оксидазе (LAAO) на вијабилност HT-29 ћелија, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Резултати цитотоксичности отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе на вијабилност здравих HaCaT ћелија су приказани на Графиконима 15 и 16 и Табели 6 у Прилогу. Испитивани третмани значајно смањују вијабилност ћелија дозно зависно, уз присуство корелације, након 24 и 72 h (Табела 7 у Прилогу).



Графикон 15. Утицај отрова змије (O3), на вијабилност здравих кератиноцита - HaCaT, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 16. Утицај L-аминокиселинске оксидазе (LAAO) на вијабилност здравих кератиноцита - HaCaT, 24 и 72 h након третмана. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Добијене IC_{50} вредности, као показатељи цитотоксичности отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе, су јако ниске (од 0.92 до 7.80 µg/ml), што указује на њихову значајну цитотоксичност на HCT-116, SW-480, HT-29 и HaCaT ћелијама (Табела 4). На основу IC_{50} вредности, здрава ћелијска линија HaCaT је најмање осетљива на дејство отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе, док је HT-29 линија најмање осетљива међу карциномским ћелијским линијама (Табела 4). Отров змије показује временску зависност на HCT-116 и SW-480 ћелијама, а L-аминокиселинске оксидазе на свим ћелијским линијама (Табела 4).



Табела 4. Цитотоксични ефекат отрова змије (O3) и L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), изражен преко IC₅₀ вредности (µg/ml), на HCT-116, SW-480, HT-29 и HaCaT линијама, 24 и 72 h након третмана.

Ћелијска линија	O3 (µg/ml)		LAAO (µg/ml)	
	24 h	72 h	24 h	72 h
HCT-116	1.45±0.04	1.16±0.03	1.69±0.02	0.92±0.01
SW-480	1.19±0.01	2.16±0.03	1.84±0.06	1.51±0.01
HT-29	2.88±0.06	2.05±0.05	7.80±0.08	1.41±0.06
HaCaT	7.34±0.08	1.99±0.03	7.51±0.08	3.80±0.11

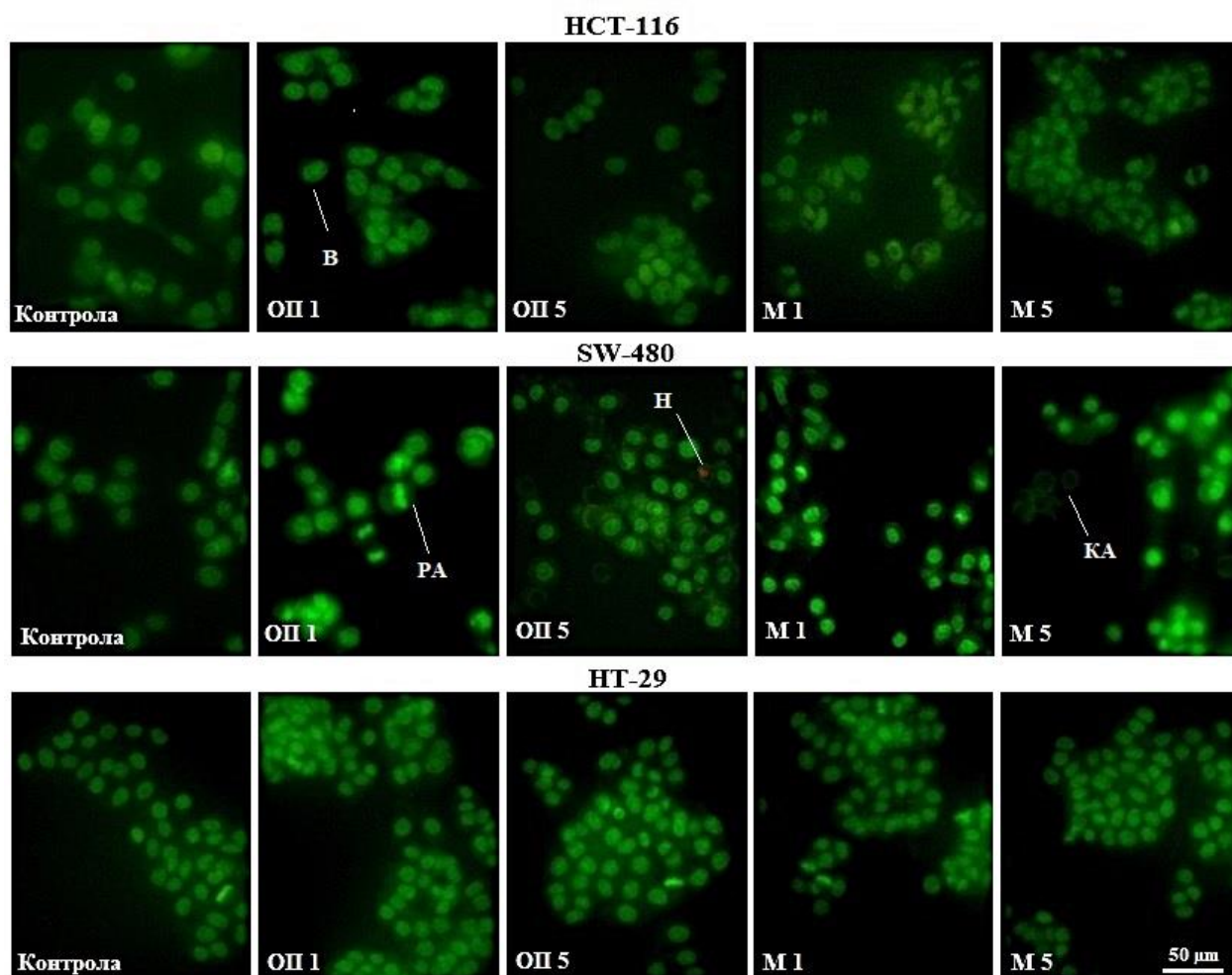
Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка.

3. Проапоптотски потенцијал третмана у карциномским ћелијским линијама

Након добијених резултата о ефекатима испитиваних третмана на вијабилност ћелија и потврђене цитотоксичности, даље је испитиван тип индуковане ћелијске смрти под утицајем отрова пчеле, мелитина, отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе, на ћелијским линијама карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480 и HT-29).

3.1. Тип ћелијске смрти

Тип ћелијске смрти је одређиван микроскопском методом, након флуоресцентног бојења ћелија (АО/ЕБ) и детекције специфичних морфолошких промена на ћелијама. Резултати показују да отров пчеле и мелитин доминантно изазивају морфолошке промене типичне за процес апоптозе на ћелијама карцинома у испитиваним концентрацијама 1 и 5 µg/ml, након 24 h. Морфолошке промене се уочавају кроз различите фазе кондензације ћелија означене као рани (РА) и касни (КА) стадијуми апоптозе. Микрографије третираних ћелија јасно показују промене у кондензацији хроматина (светлозелена флуоресценца) карактеристичне за рану апоптозу и/или високо кондензованог хроматина са тамнозеленом до наранџастом флуоресценцом карактеристичном за касну апоптозу. Ћелије округлог облика, хомогено црвене боје на микрографијама представљају некротске ћелије (Слика 22).



Слика 22. Утицај отрова пчеле (ОП) и мелитина (М) на морфологију НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, 24 сата након третмана. Вијабилне ћелије (В), апоптотске (ране-РА, касне -КА) и некротске (Н).

Отров пчеле је значајно и дозно зависно индуковао рану апоптозу на НСТ-116 ћелијама у обе концентрације, док је касна апоптоза детектована само у вишој концентрацији отрова пчеле (Табела 5).

Највеће дозно зависно повећање процената ране и касне апоптозе уочава се на SW-480 ћелијама. Услед деловања отрова пчеле на SW-480 ћелије, у ниском проценту је детектована и некроза (Табела 5).

Најмање промене у испитиваним концентрацијама третмана се уочавају на линији НТ-29. Проценат ране апоптозе на овим ћелијама услед деловања отрова пчеле је значајан у односу на контролу, у обе испитиване концентрације. Касна апоптоза и некротске ћелије нису детектоване (Табела 5).



Табела 5. Утицај отрова пчеле (1 и 5 $\mu\text{g/ml}$), на проценат вијабилних (В), апоптотских (раних-РА, касних-КА) и некротских (Н) НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, након 24 h.

Отров пчеле

	$\mu\text{g/ml}$	<i>B</i>	<i>PA</i>	<i>KA</i>	<i>H</i>
НСТ-116	0	97.8 $\pm$ 0.35	2.2 $\pm$ 0.35	/	/
	1	96.4 $\pm$ 0.42	3.3 $\pm$ 0.42*	/	0.3 $\pm$ 0.01*
	5	83.9 $\pm$ 1.64*	11.9 $\pm$ 0.38*	4.2 $\pm$ 0.38*	/
SW-480	0	94.6 $\pm$ 0.94	3.6 $\pm$ 0.54	/	0.3 $\pm$ 0.01
	1	91.0 $\pm$ 0.34	8.4 $\pm$ 0.34*	0.3 $\pm$ 0.01*	0.3 $\pm$ 0.01
	5	69.4 $\pm$ 0.45*	10.3 $\pm$ 0.69*	19.5 $\pm$ 1.06*	0.8 $\pm$ 0.09*
НТ-29	0	96.57 $\pm$ 1.33	3.43 $\pm$ 0.32	/	/
	1	87.76 $\pm$ 0.95*	12.24 $\pm$ 0.95*	/	/
	5	86.85 $\pm$ 0.65*	13.15 $\pm$ 0.64*	/	/

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Ефекат мелитина, као доминантно присутног једињења у отрову пчеле такође изазива апоптозу у свим испитиваним ћелијама. У узорку НСТ-116 ћелија под утицајем мелитина детектоване су ћелије у раној и касној апоптози у значајним процентима у односу на нетретиране ћелије. Проценти ране и касне апоптозе повећавају се дозно зависно. Некроза је присутна у јако ниском проценту (Табела 6).

На SW-480 ћелијама под утицајем мелитина, поред ране, детектоване су и ћелије у касној апоптози у значајном проценту у односу на нетретиране ћелије. Некроза је у ниским процентима детективана у обе испитиване концентрације (Табела 6).

Мелитин доводи до индукције апоптозе на НТ-29 ћелијама, дозно зависно, при чему је касна апоптоза присутна у ниском проценту у концентрацији од 5 $\mu\text{g/ml}$. Некроза на НТ-29 ћелијама услед деловања третмана није детектована (Табела 6).



Мелитин

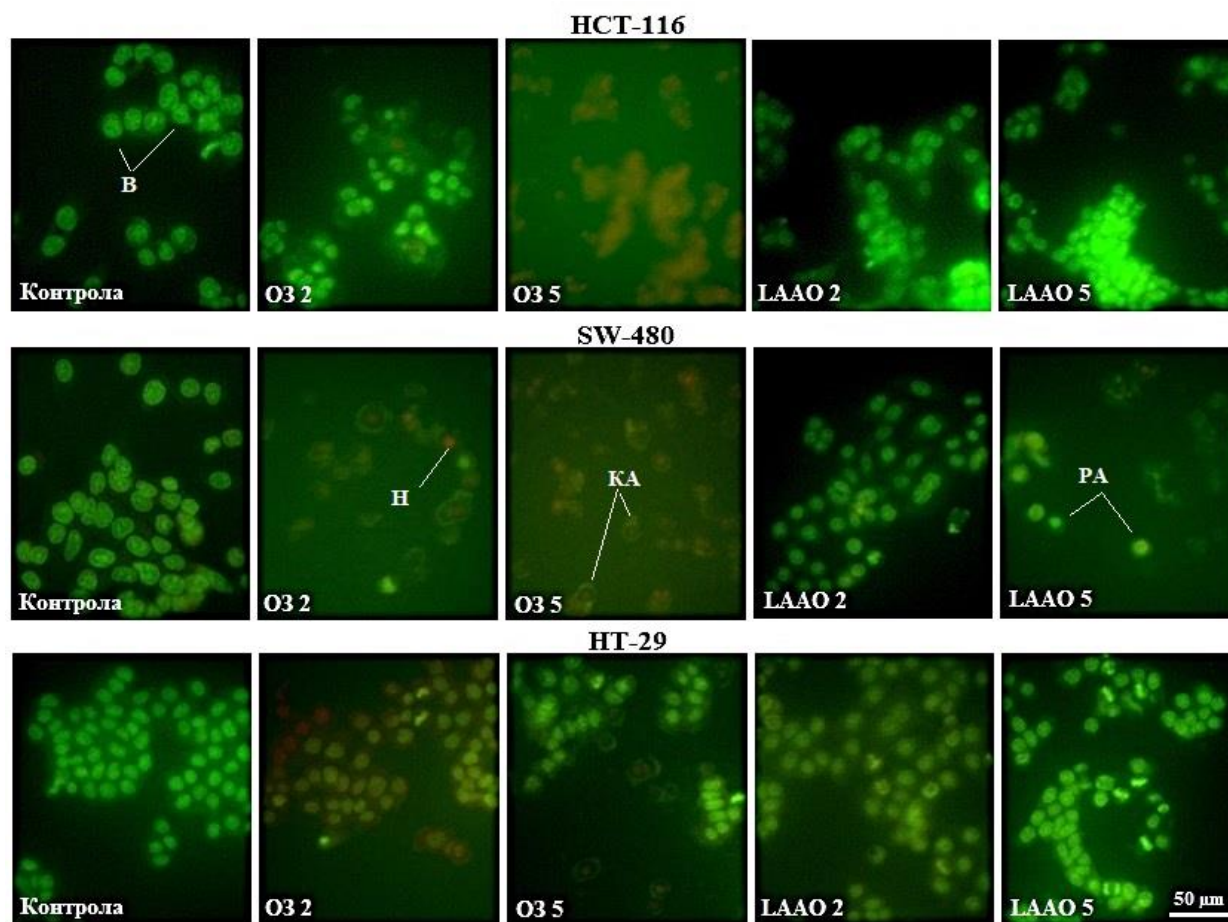
	$\mu\text{g/ml}$	<i>В</i>	<i>РА</i>	<i>КА</i>	<i>Н</i>
НСТ-116	0	97.8 $\pm$ 0.35	2.2 $\pm$ 0.35	/	/
	1	87.5 $\pm$ 1.20*	9.8 $\pm$ 0.99*	2.2 $\pm$ 0.10*	0.6 $\pm$ 0.30*
	5	78.8 $\pm$ 1.64*	15.5 $\pm$ 1.68*	5.2 $\pm$ 0.06*	0.6 $\pm$ 0.30*
SW-480	0	94.6 $\pm$ 0.94	3.6 $\pm$ 0.54	/	0.3 $\pm$ 0.01
	1	87.0 $\pm$ 0.07*	10.9 $\pm$ 0.58*	1.6 $\pm$ 0.45*	0.4 $\pm$ 0.06
	5	74.3 $\pm$ 1.04*	12.0 $\pm$ 0.70*	12.9 $\pm$ 0.11*	0.7 $\pm$ 0.23*
НТ-29	0	96.57 $\pm$ 1.33	3.43 $\pm$ 0.32	/	/
	1	93.21 $\pm$ 0.37	6.79 $\pm$ 0.36	/	/
	5	83.41 $\pm$ 0.94	14.75 $\pm$ 1.39	1.84 $\pm$ 0.46	/

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Микрографије са морфолошким променама насталим под утицајем отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе приказане су на Слици 23. Отров змије индукује висок проценат ране и касне апоптозе у НСТ-116 ћелијама, праћен некрозом у концентрацији 2 $\mu\text{g/ml}$. Међутим, у вишој концентрацији (5 $\mu\text{g/ml}$), доминантан тип ћелијске смрти услед деловања отрова змије је некроза (Табела 7).

На SW-480 ћелијама, у нижој концентрацији отрова змије, доминантан тип ћелијске смрти је апоптоза, и то у раном стадијуму, док са повећањем концентрације ћелије доминантно умиру некротски (Табела 7).

Под утицајем отрова змије на НТ-29 ћелијама детектовани су значајни проценти апоптозе и некрозе у односу на контролу, у обе испитиване концентрације. Поређењем са другим испитиваним линијама, у НТ-29 ћелијама је проценат индуковане некрозе најмањи (Табела 7).



Слика 23. Утицај отрова змије (O3) и L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), на морфологију HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелија, 24 сата након третмана. Вијабилне ћелије (B), апоптотске (ране-РА, касне-КА) и некротске (H).

За разлику од отрова змије, L-аминокиселинска оксидаза доминантно изазива апоптозу у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$ на испитиваним ћелијским линијама, при чему је проценат некрозе јако низак у односу на контролу (Табела 8).

Проценат апоптозе се у HCT-116 ћелијама под утицајем L-аминокиселинске оксидазе повећава дозно зависно, док су некротске ћелије детектоване у минималном проценту у вишој концентрацији третмана, након 24 h (Табела 8).

Ћелије SW-480 такође доминантно и дозно зависно улазе у апоптозу под утицајем L-аминокиселинске оксидазе. Проценат касне апоптозе је значајно виши у односу на проценат ћелија у раној апоптози. Некроза је детектована у ниском проценту (Табела 8).

Резултати на HT-29 ћелијама, такође указују на доминантно индуковану апоптозу као тип ћелијске смрти, док се некроза јавља у минималном проценту у односу на контролу, услед деловања L-аминокиселинске оксидазе (Табела 8).



Табела 7. Утицај отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе (2 и 5 µg/ml), на проценат вијабилних (В), апоптотских (раних-РА, касних-КА) и некротских (Н) НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, након 24 h.

Отров змије					
	µg/ml	<i>B</i>	<i>PA</i>	<i>KA</i>	<i>H</i>
НСТ-116	0	96.23±0.05	3.77±0.01	/	/
	2	55.34±0.02*	14.33±0.01*	22.75±0.03*	7.58±0.01*
	5	0.35±0.001*	1.06±0.001*	32.86±0.05*	65.73±0.05*
SW-480	0	97.23±0.01	2.77±0.01	/	/
	2	25.58±0.3*	6.20±0.5*	55.43±1.2*	12.79±0.01*
	5	3.09±0.001*	1.03±0.001*	36.09±0.1*	59.79±0.5*
НТ-29	0	98.15±0.01	1.85±0.05	/	/
	2	68.11±0.23*	20.27±0.15*	3.98±0.05*	7.64±0.50*
	5	50.99±0.25*	14.74±0.05*	8.38±0.01*	25.89±0.30*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 8. Утицај L-аминокиселинске оксидазе (2 и 5 µg/ml), на проценат вијабилних (В), апоптотских (раних-РА, касних-КА) и некротских (Н) НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, након 24 h.

L-аминокиселинска оксидаза					
	µg/ml	<i>B</i>	<i>PA</i>	<i>KA</i>	<i>H</i>
НСТ-116	0	96.23±0.05	3.77±0.01	/	/
	2	68.63±0.05*	28.10±0.02*	3.27±0.01*	/
	5	51.03±0.03*	29.33±0.02*	18.77±0.02*	0.87±0.001*
SW-480	0	97.23±0.01	2.77±0.01	/	/
	2	75.89±0.05*	22.19±0.1*	1.28±0.01*	0.64±0.001*
	5	28.57±0.02*	11.64±0.1*	58.20±0.5*	1.59±0.001*
НТ-29	0	98.15±0.01	1.85±0.05	/	/
	2	84.51±0.05*	14.55±0.01*	/	0.94±0.001*
	5	59.58±0.15*	31.84±0.22*	5.31±0.05*	3.27±0.001*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

3.2. Механизам апоптозе

Механизам индуковане апоптозе под дејством испитиваних третмана на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијским линијама испитиван је праћењем одговарајућих параметара и маркера апоптозе на генском и протеинском нивоу, колориметријском методом,



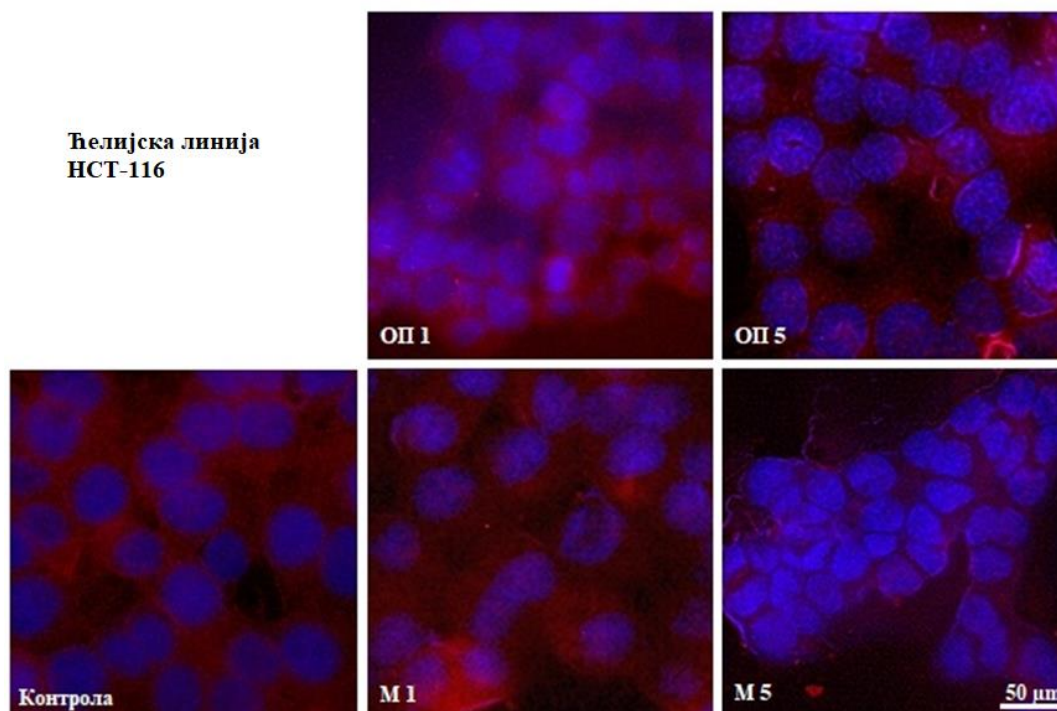
имунофлуоресцентном и qPCR методом. Ефекти отрова пчеле, мелитина (у концентрацијама 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$) и L-аминокиселинске оксидазе (у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$), праћени су након 24 h од деловања третмана на ћелијским линијама карцинома дебелог црева HCT-116, SW-480 и HT-29.

3.2.1. Протеинска експресија Fas рецептора

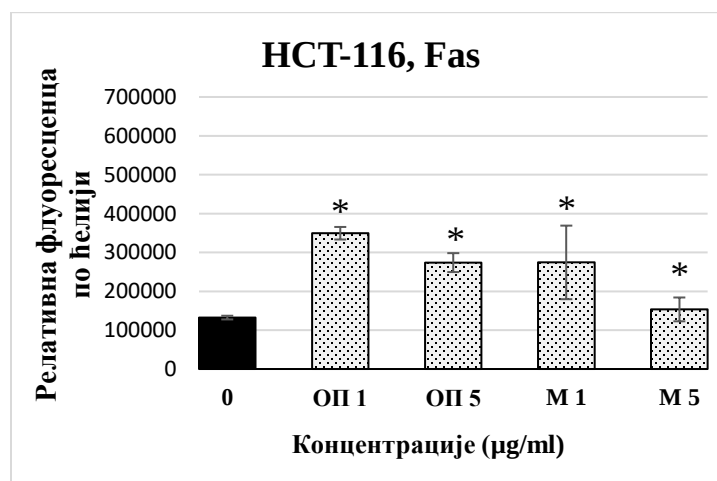
Протеинска експресија и локализација Fas рецептора нетретираних HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелија и ћелија третираних отровом пчеле и мелитином, одређивана је имунофлуоресцентном методом. На микрографијама се види протеинска експресија Fas рецептора у контролним и третираним ћелијама (Слика 24). Резултати квантификације флуоресценце указују на статистички значајно повећање експресије рецептора Fas на ћелијској мембрани HCT-116 ћелија, у односу на контролу, под утицајем отрова пчеле (Графикон 17). Мелитин својим деловањем на HCT-116 ћелијама такође изазива повећање протеинске експресије рецептора Fas у односу на контролу (Графикон 17). Оба третмана остварују бољи ефекат у нижој концентрацији на HCT-116 ћелијама.

На микрографијама је приказана експресија Fas-а под утицајем отрова пчеле и мелитина и у контролим SW-480 ћелијама (Слика 25). Анализом интензитета флуоресценце уочава се статистички значајно повећање експресије Fas рецептора у оба третмана (Графикон 18). Поређењем утицаја отрова пчеле и мелитина на експресију Fas рецептора, уочава се да је отров пчеле изазвао веће промене експресије овог рецептора у односу на мелитин.

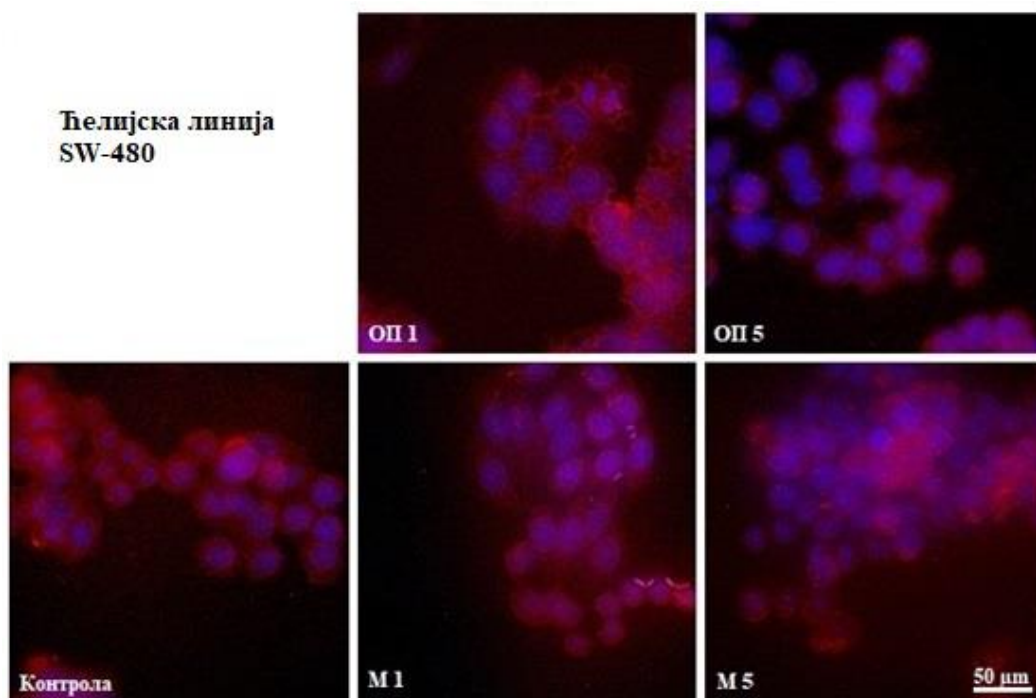
На Слици 26, приказана је експресија Fas рецептора на HT-29 ћелијама, под утицајем отрова пчеле и мелитина. Анализом микрографија, уочено је повећање нивоа експресије мембранског рецептора Fas, под утицајем отрова пчеле, у поређењу са нетретираним HT-29 ћелијама. Повећање је статистички значајно (Графикон 19). Мелитин, такође, утиче на статистички значајно повећање нивоа експресије овог параметра у ћелијама HT-29 (Графикон 19).



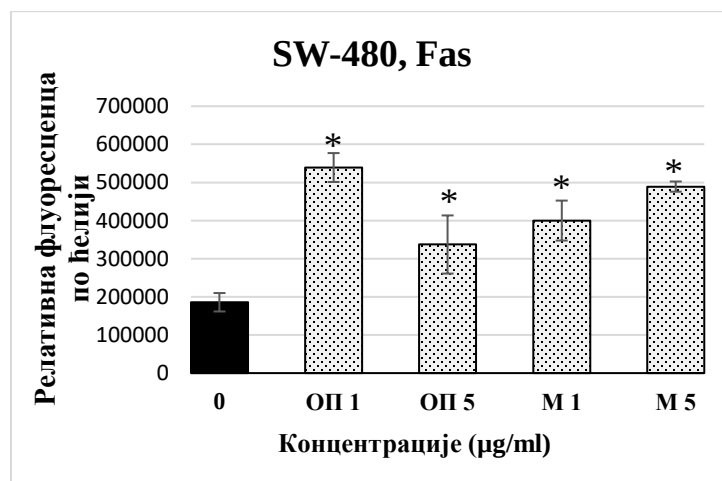
Слика 24. Интензитет протеинске експресије Fas рецептора у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



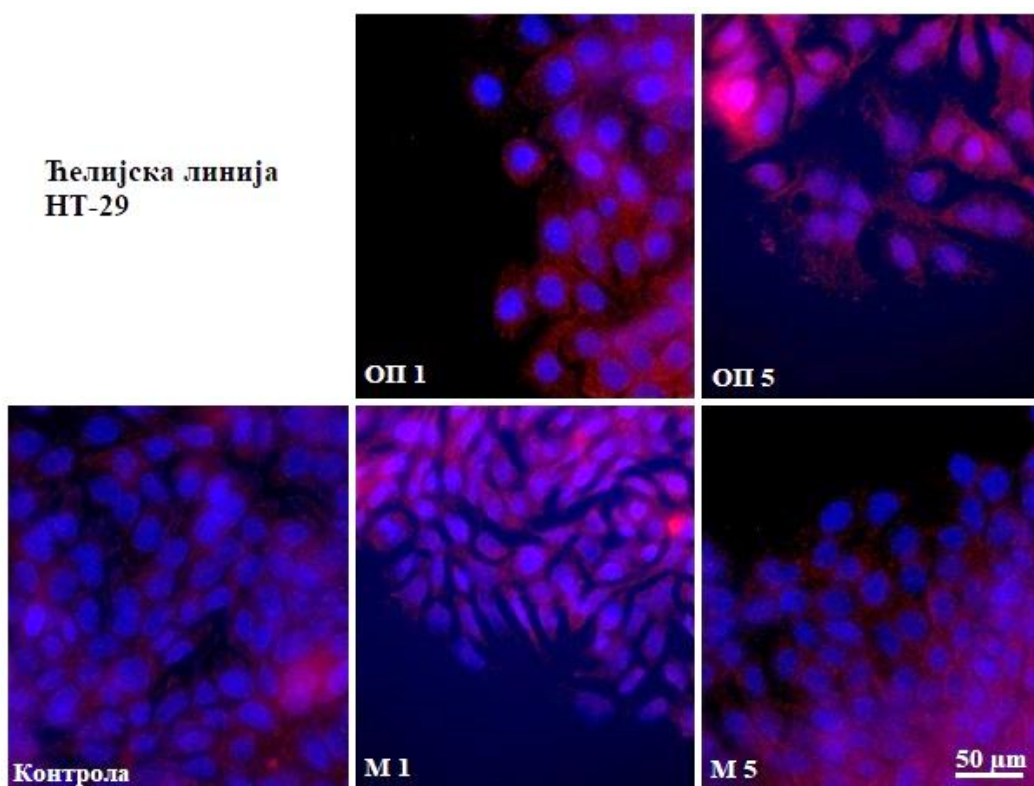
Графикон 17. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



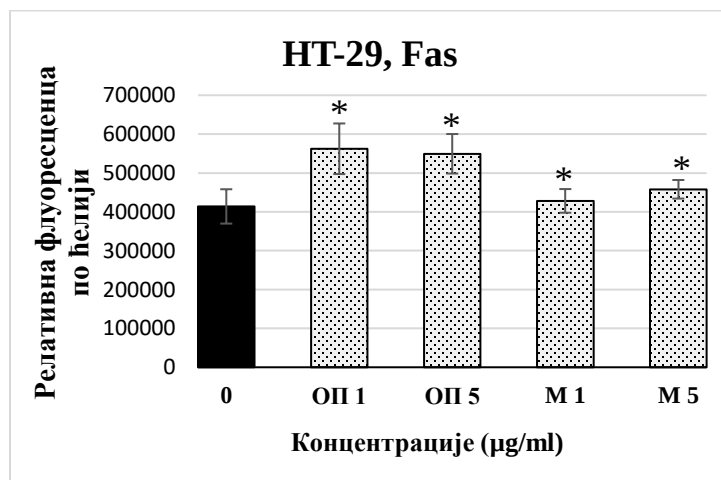
Слика 25. Интензитет протеинске експресије Fas рецептора у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 18. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 26. Интензитет протеинске експресије Fas рецептора у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



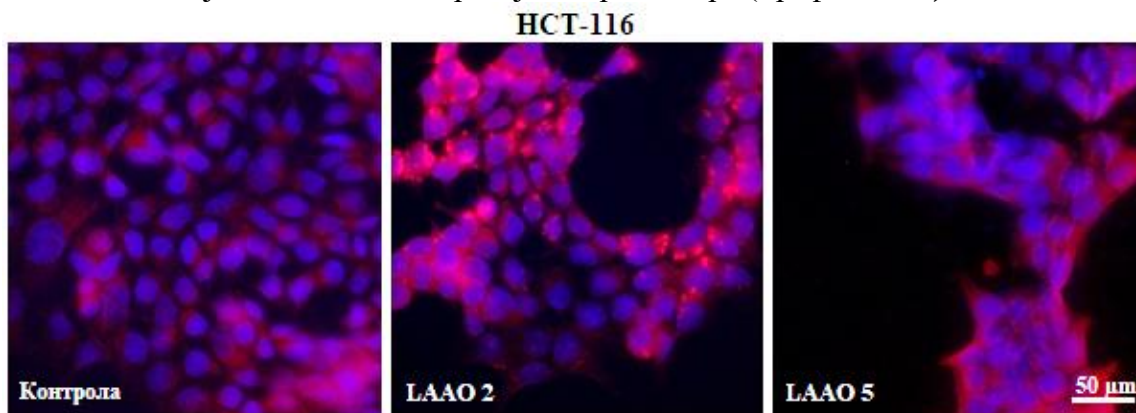
Графикон 19. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



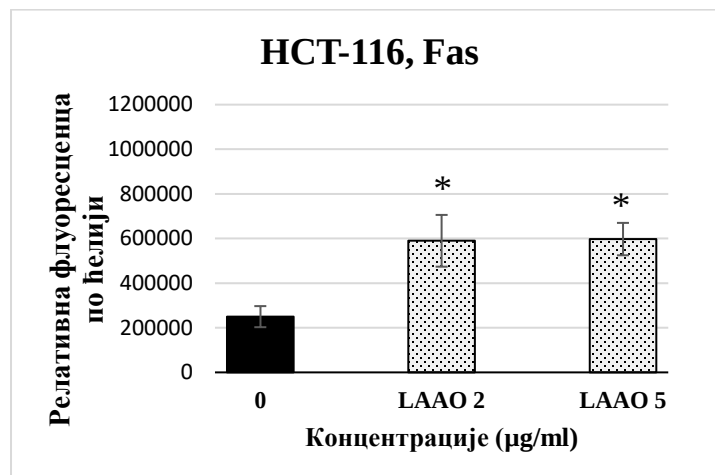
L-аминокиселинске оксидазе доводе до значајних промена протеинске експресије Fas рецептора на ћелијским линијама карцинома дебелог црева. Резултати анализе интензитета флуоресценце на микрографијама НСТ-116 ћелија (Слика 27), приказују статистички значајно повећање експресије Fas-а под утицајем L-аминокиселинске оксидазе у односу на контролу (Графикон 20).

На Слици 28, приказана је експресија Fas-а на SW-480 ћелијама, под утицајем L-аминокиселинске оксидазе. Резултати анализе микрографија показују статистички значајно повећање експресије Fas рецептора под утицајем L-аминокиселинске оксидазе у односу на контролу, које је дозно зависно (Графикон 21).

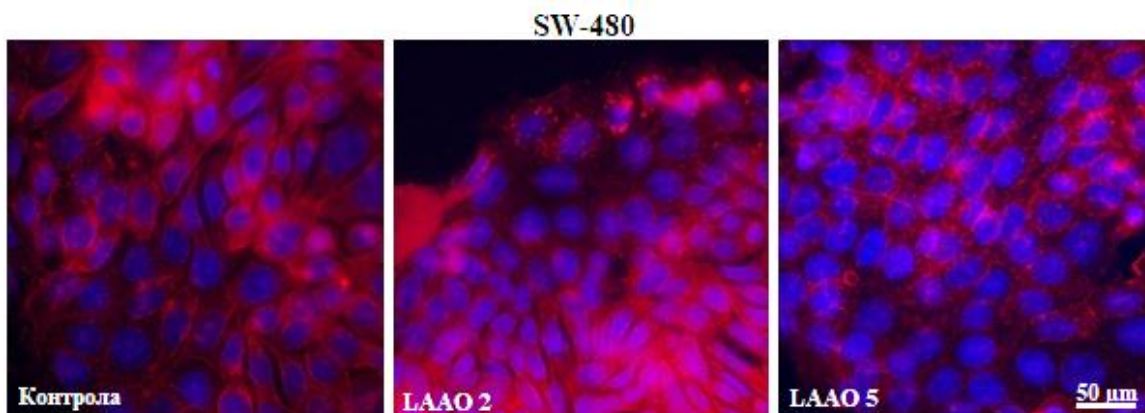
На НТ-29 ћелијама, интензитет експресије Fas-а, под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, приказан је на микрографијама (Слика 29), а анализа флуоресценце показала је статистички значајно повећање експресије Fas рецептора (Графикон 22).



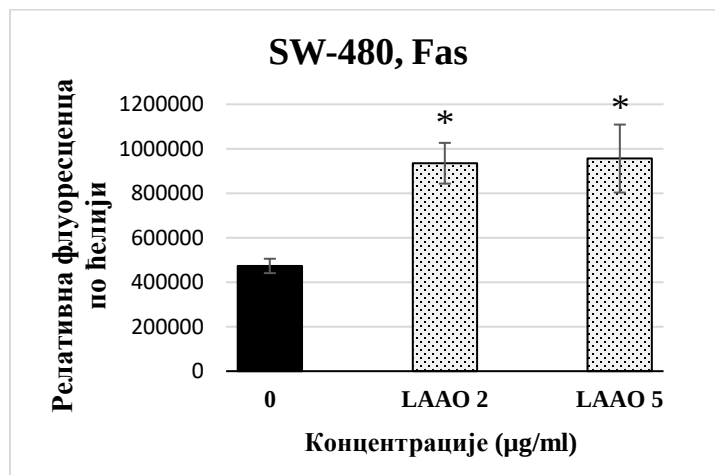
Слика 27. Микрографије протеинске експресије Fas рецептора у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор је црвено обојен (секундарно антитело коњуговано са Cy3).



Графикон 20. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

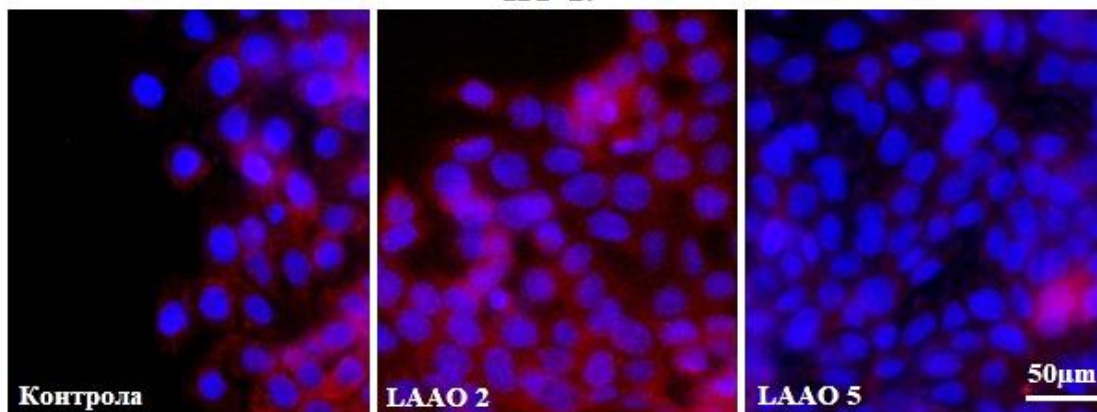


Слика 28. Микрографије протеинске експресије Fas рецептора у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

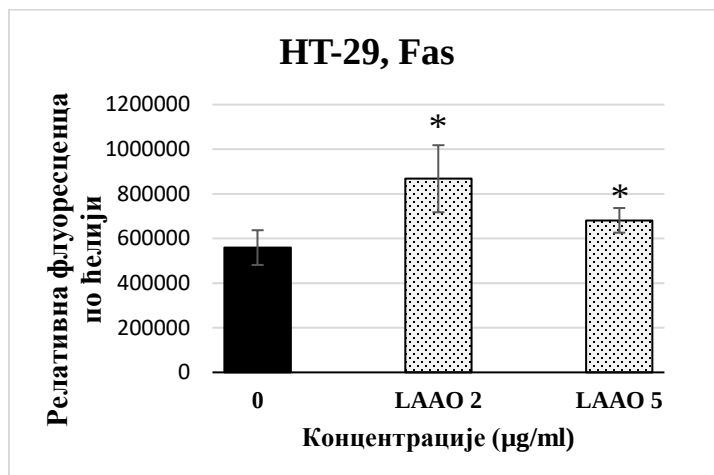


Графикон 21. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

HT-29



Слика 29. Микрографије протеинске експресије Fas рецептора у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), Fas рецептор је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



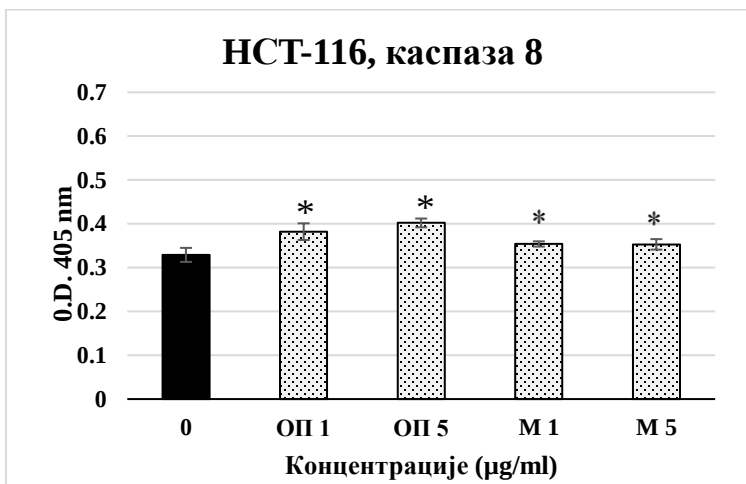
Графикон 22. Ниво протеинске експресије Fas рецептора у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

3.2.2. Активност каспазе 8

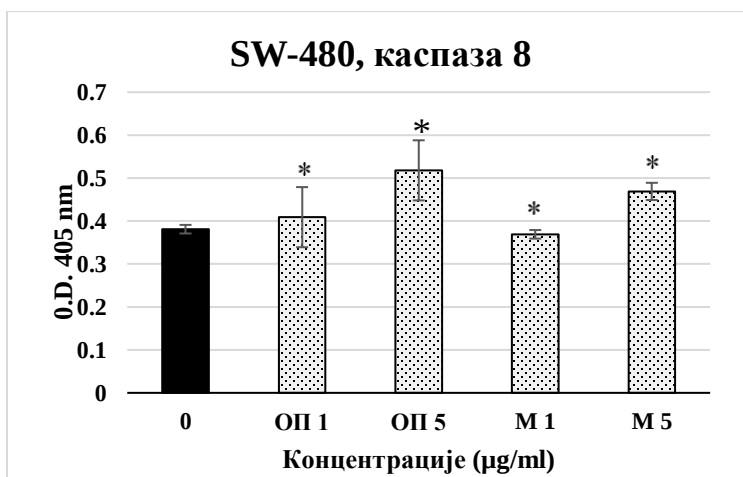
Активност каспазе 8, као једне од иницијаторских каспаза спољашњег апоптотског пута, одређивана је колориметријском методом. Резултати показују да отров пчеле и мелитин изазивају статистички значајно повећање активности каспазе 8 у HCT-116 ћелијама у односу на контролне ћелије. Значајне промене забележене су под утицајем отрова пчеле, и то дозно зависно (Графикон 23).

Резултати добијени на SW-480 ћелијама, такође указују на повећање активности каспазе 8 у свим концентрацијама отрова пчеле у односу на контролу, док код мелитина долази до смањења активности каспазе 8 у нижој концентрацији (Графикон 24).

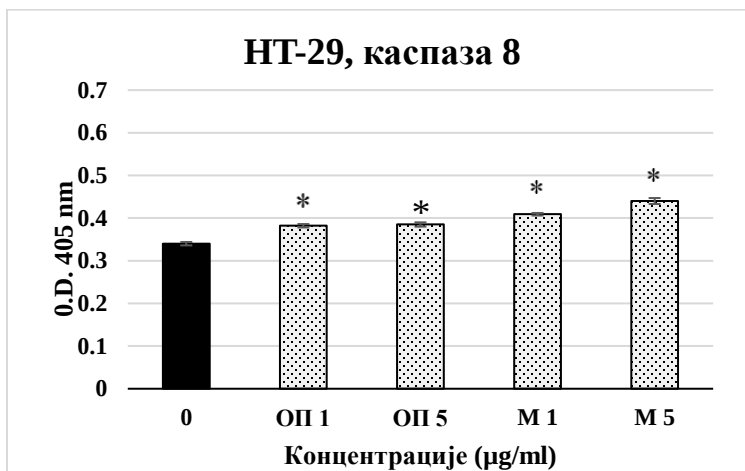
На HT-29 ћелијама се под утицајем отрова пчеле и мелитина уочава значајно и дозно зависно повећава активност каспазе 8 у односу на контролу (Графикон 25).



Графикон 23. Активност каспазе 8 у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 24. Активност каспазе 8 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

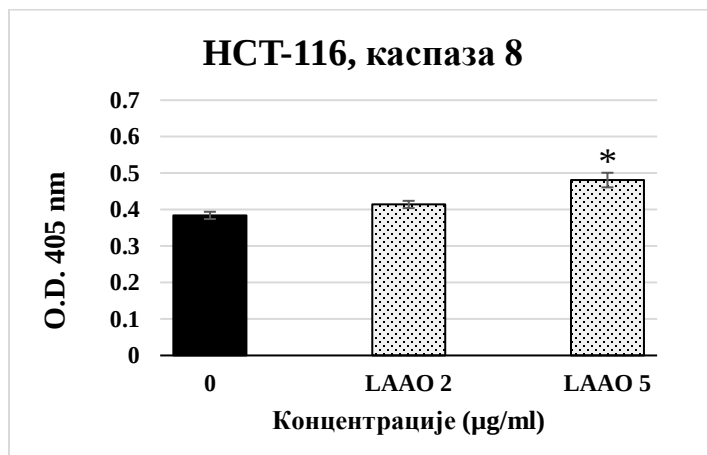


Графикон 25. Активност каспазе 8 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

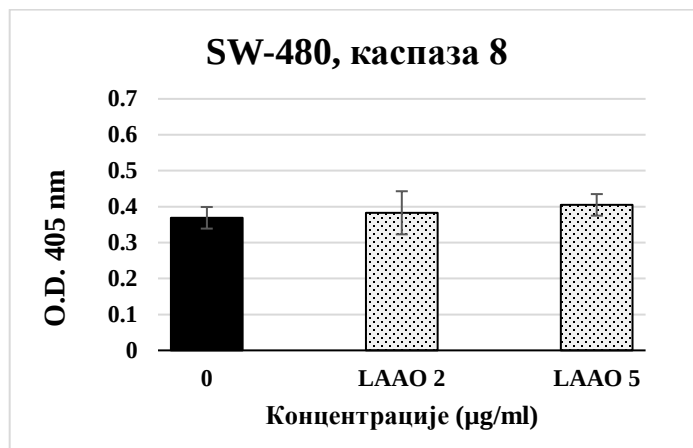
Резултати су показали да L-аминокиселинска оксидаза доводи до повећања активности каспазе 8 у HCT-116 ћелијама, дозно зависно у односу на нетретиране ћелије (Графикон 26).

Резултати добијени на SW-480 ћелијама, такође показују дозно зависно повећање активности каспазе 8 под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, које није статистички значајно (Графикон 27).

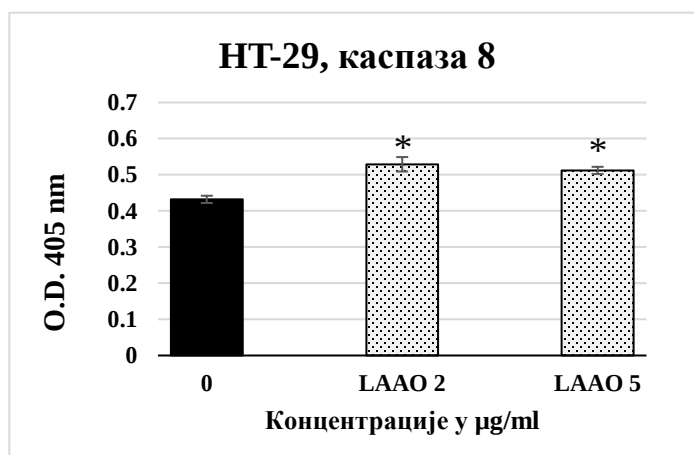
У HT-29 ћелијама, под утицајем L-аминокиселинске оксидазе долази до статистички значајног повећања активности каспазе 8 у односу на контролне ћелије (Графикон 28).



Графикон 26. Активност каспазе 8 у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 27. Активност каспазе 8 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 28. Активност каспазе 8 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

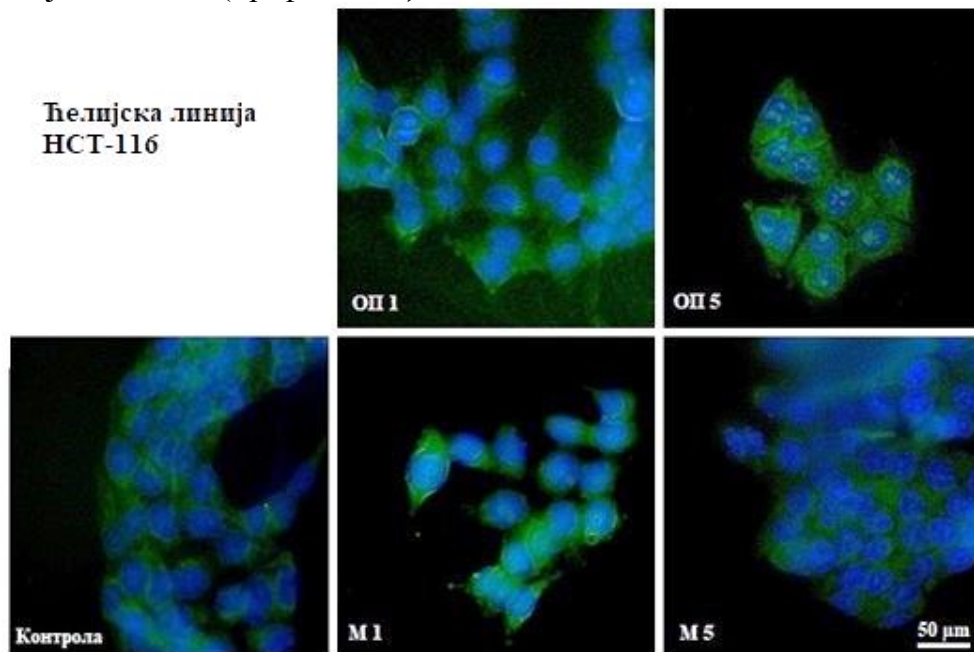
3.2.3. Протеинска експресија каспазе 9

Протеинска експресија каспазе 9, иницијаторске каспазе унутрашњег апоптотског пута, под утицајем отрова пчеле и мелитина на НСТ-116, SW-480 и HT-29 ћелијама, праћена је имунофлуоресцентном методом, 24 h након деловања третмана. Експресија каспазе 9 у контролним и третираним НСТ-116 ћелијама приказана је на микрографијама (Слика 30). Резултати квантификације интензитета флуоресценце указују на значајно повећање експресије каспазе 9 под утицајем отрова пчеле и мелитина у НСТ-116 ћелијама, у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 29). Под утицајем отрова пчеле на НСТ-116 ћелијама долази до дозно зависног повећања експресије каспазе 9, док код мелитина дозна зависност није јасна (Графикон 29).

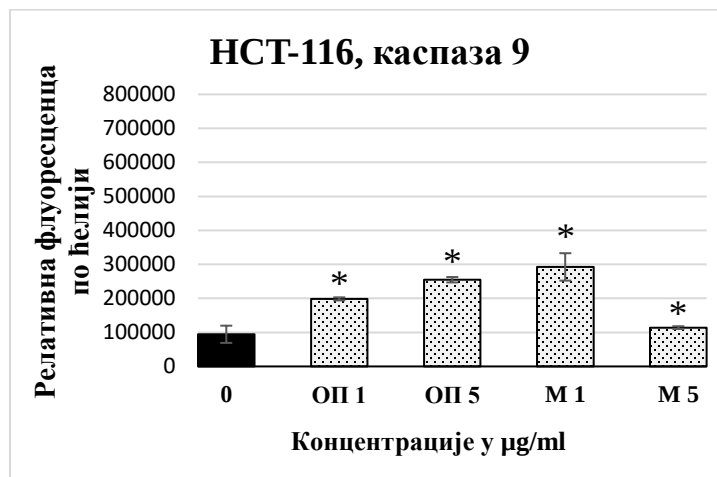


На Слици 31, приказана је протеинска експресија каспазе 9 у контролним и третираним SW-480 ћелијама. Резултати квантификације флуоресценце показују да се услед утицаја отрова пчеле и мелитина уочава статистички значајно, дозно зависно повећање експресије каспазе 9, у односу на контролу (Графикон 30).

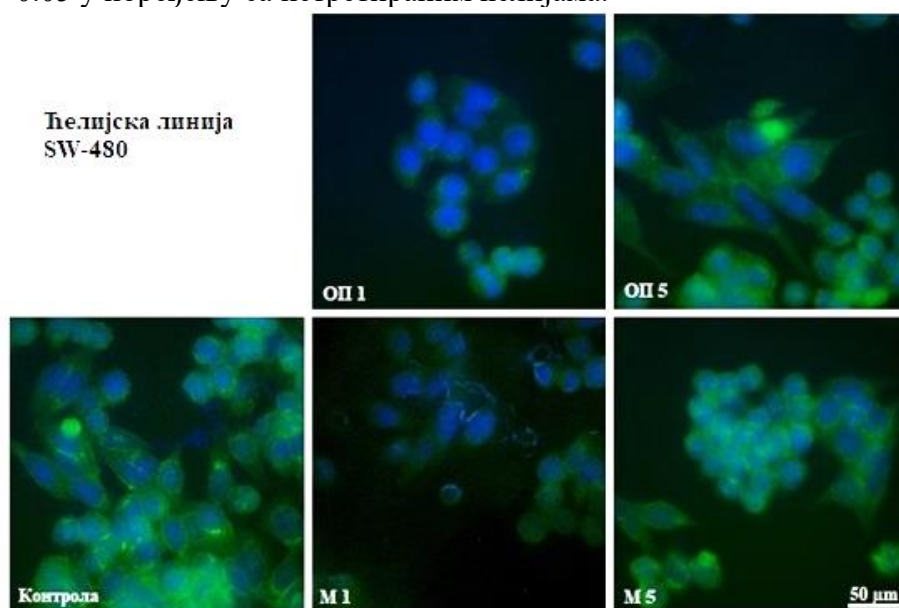
Отров пчеле и мелитин на НТ-29 ћелијама углавном доводе до смањења протеинске експресије каспазе 9, што се јасно види на микрографијама (Слика 32). Смањење експресије каспазе 9 на НТ-29 ћелијама је статистички значајно, осим у вишој концентрацији мелитина (Графикон 31).



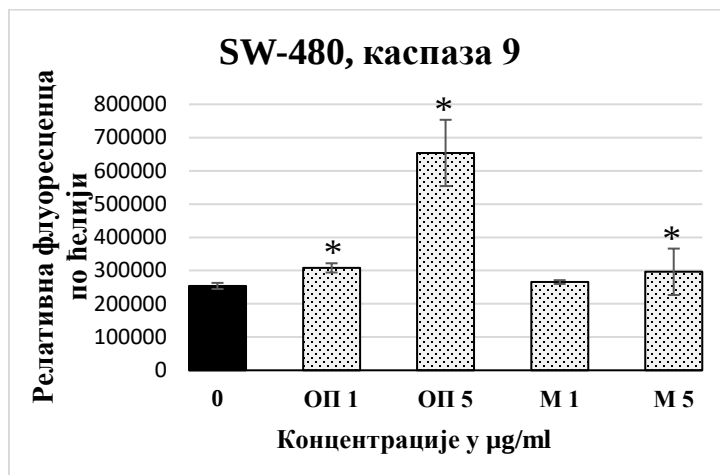
Слика 30. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је зелено обојена (секундарно антителио конјуговано са Alexa488).



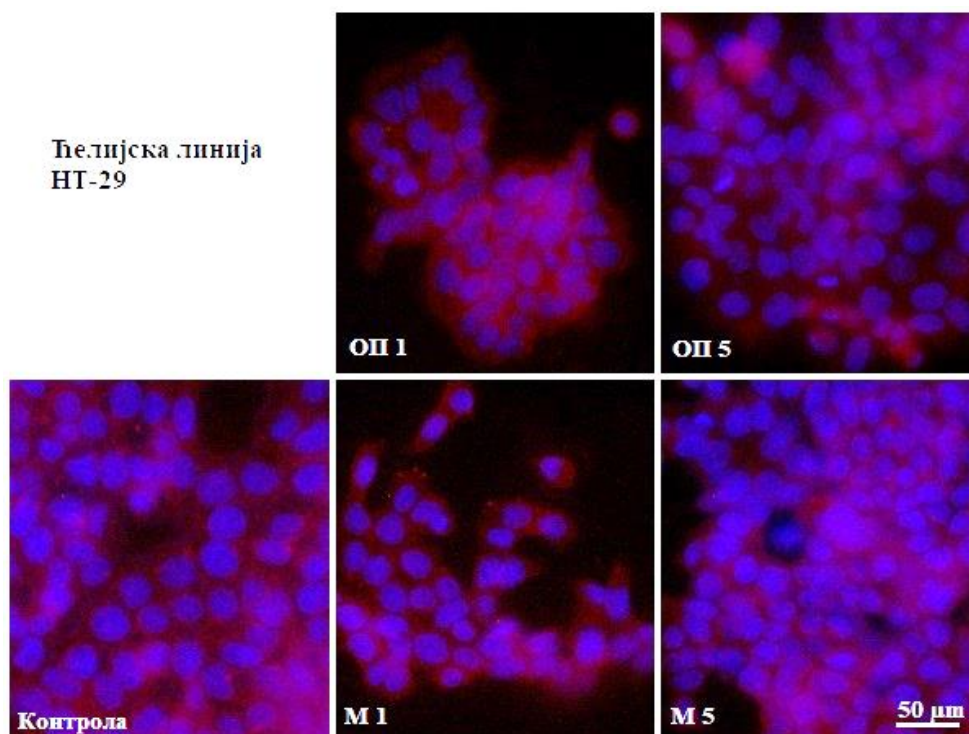
Графикон 29. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



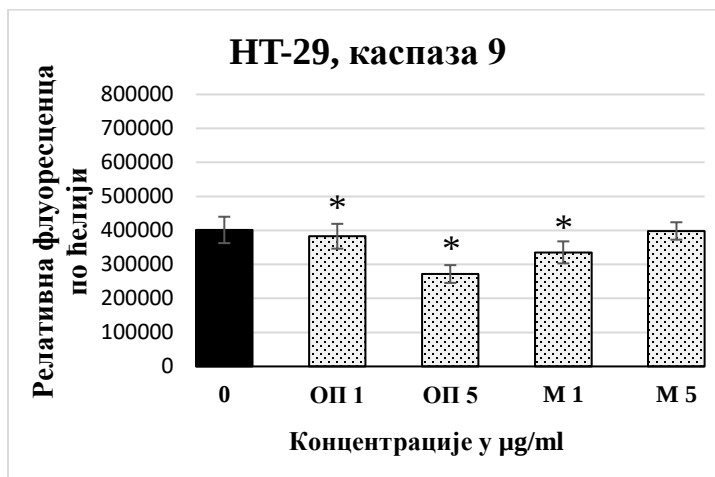
Слика 31. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је зелено обојена (секундарно антителио конјуговано са Alexa488).



Графикон 30. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 32. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је црвено обојена (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

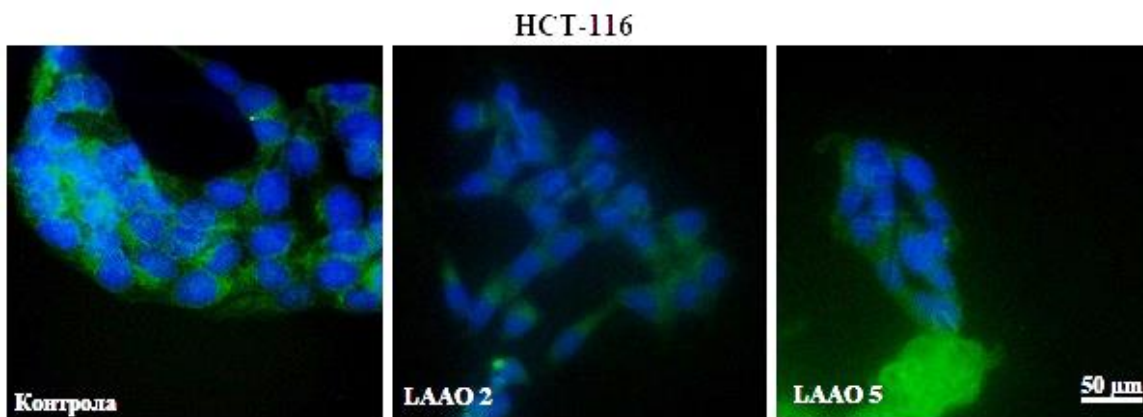


Графикон 31. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

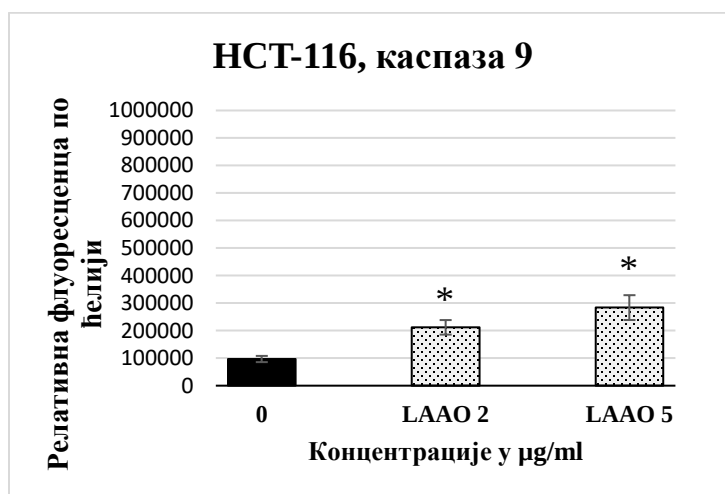
Резултати деловања L-аминокиселинске оксидазе на протеинску експресију каспазе 9 у HCT-116 ћелијама показују статистички значајно и дозна зависно повећање у односу на контролне ћелије (Графикон 32), на основу анализе интензитета флуоресценце са микрографија (Слика 33).

Резултати квантификације интензитета флуоресценце каспазе 9 на SW-480 ћелијама под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, показују статистички значајно и дозно зависно повећање у односу на нетретиране ћелије (Слика 34, Графикон 33).

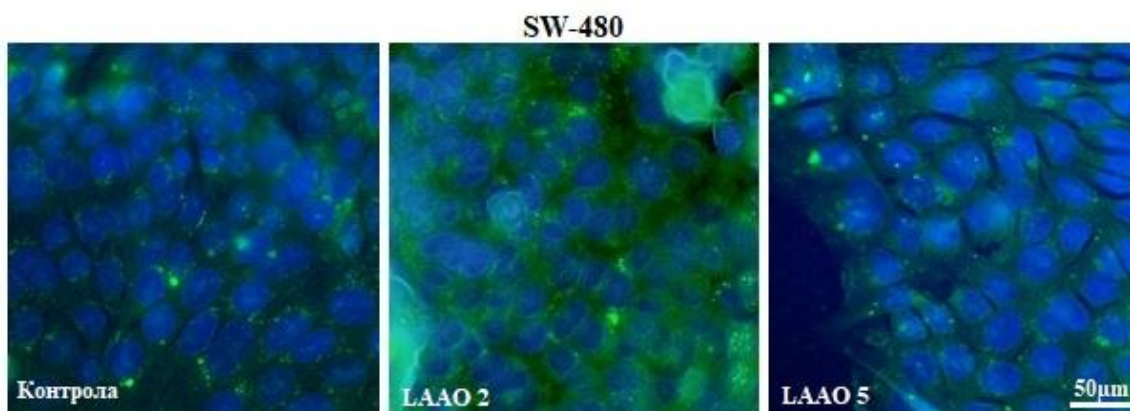
На основу мерења интензитета флуоресценце са микрографија (Слика 35), уочено је да деловањем L-аминокиселинске оксидазе на HT-29 ћелије, долази до статистички значајног смањења протеинске експресије каспазе 9, у обе концентрације у односу на контролу (Графикон 34).



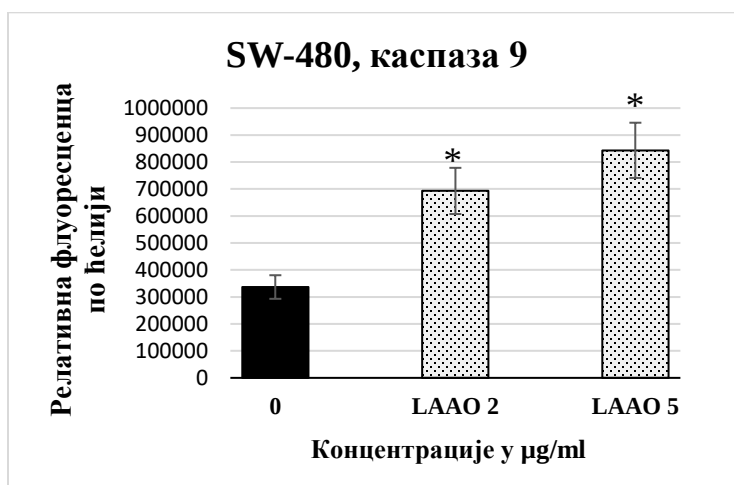
Слика 33. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је зелено обојена (секундарно антитело конјуговано са Alexa488).



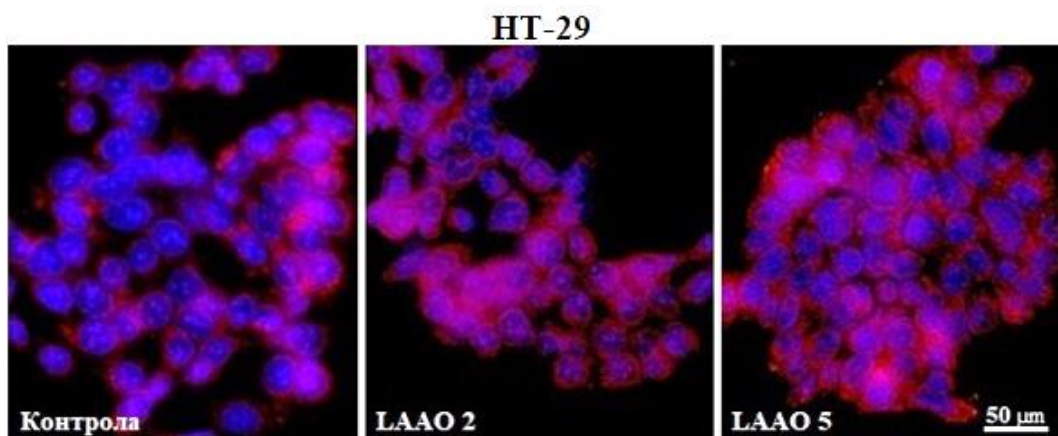
Графикон 32. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је програмом ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



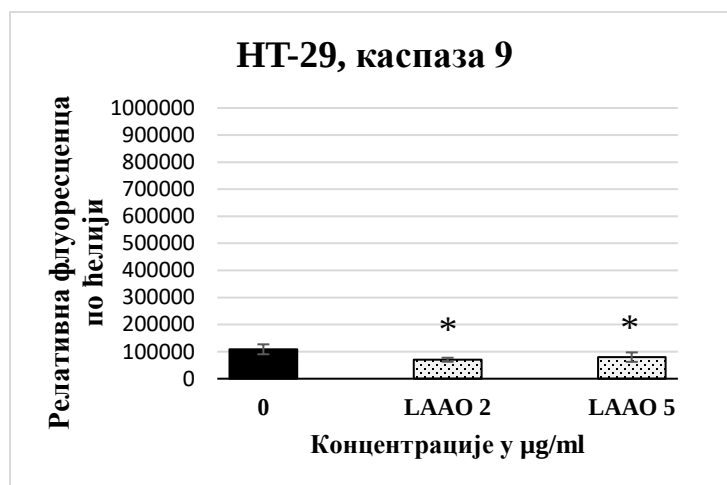
Слика 34. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је зелено обојена (секундарно антитело конјуговано са Alexa488).



Графикон 33. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 35. Интензитет протеинске експресије каспазе 9 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је црвено обојена (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 34. Ниво протеинске експресије каспазе 9 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



3.2.4. Експресија иРНК апоптотских гена

Утицај отрова пчеле, мелитина и L-аминокиселинске оксидазе на експресију иРНК гена укључених у процес апоптозе (*Bax*, *Bcl-2*, *каспазе 8* и *9*), на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијским линијама карцинома дебелог црева, испитиван је методом qPCR, 24 h након третмана. Под утицајем отрова пчеле, експресија иРНК *Bax* гена статистички значајно се повећава у НСТ-116 и НТ-29 ћелијама, док је у SW-480 ћелијама смањује. Експресија иРНК *Bcl-2* гена под утицајем отрова пчеле је свуда смањена, осим у НТ-29 ћелијама, где долази до статистички значајног повећања.

Отров пчеле утиче на статистички значајно повећање иРНК експресије *каспаза 8* гена у свим третираним ћелијама, у односу на контролу. Информациона РНК *каспаза 9* гена је повећана у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, док је у НТ-29 ћелијама смањена (Табела 9).

Табела 9. Експресија иРНК гена укључених у процес апоптозе у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, под утицајем отрова пчеле, 24 сата након третмана.

		Отров пчеле (µg/ml)			
		<i>Bax</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Каспаза 8</i>	<i>Каспаза 9</i>
Контрола		1	1	1	1
НСТ-116	1	2.45±0.004*	0.13±0.001*	1.73±0.001*	1.87±0.001*
	5	1.67±0.002*	0.04±0.001*	1.30±0.002*	1.88±0.001*
SW-480	1	0.76±0.002*	0.01±0.001*	1.72±0.001*	1.55±0.002*
	5	0.33±0.001*	0.06±0.001*	1.47±0.001*	1.10±0.001*
НТ-29	1	1.06±0.001	1.02±0.001	2.25±0.001*	0.95±0.002*
	5	1.16±0.001*	1.78±0.005*	1.58±0.002*	0.65±0.001*

Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасцу.

Резултати који су добијени испитивањем утицаја мелитина на гене укључене у процес апоптозе су такође значајни. Експресија иРНК *Bax* и *Bcl-2* гена је под утицајем мелитина статистички значајно смањена у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, док је у НТ-29 повишена. Мелитин статистички значајно повећава експресију иРНК *каспаза 8* гена у свим узорцима осим у вишој концентрацији мелитина на НСТ-116 ћелијама. Експресија иРНК *каспаза 9* гена је под утицајем мелитина значајно повећана у нижој концентрацији мелитина на SW-480 ћелијама, док је у осталим узорцима смањена (Табела 10).



Табела 10. Експресија иРНК гена укључених у процес апоптозе у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама, под утицајем мелитина, 24 сата након третмана.

		Мелитин (µg/ml)			
		<i>Bax</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Каспаза 8</i>	<i>Каспаза 9</i>
Контрола		1	1	1	1
НСТ-116	1	0.38±0.005*	0.73±0.005*	1.15±0.001*	1.06±0.002
	5	0.28±0.002*	1.01±0.005	0.45±0.001*	0.47±0.002*
SW-480	1	0.04±0.001*	0.56±0.005*	2.27±0.001*	2.14±0.001*
	5	0.15±0.003*	0.08±0.001*	1.88±0.001*	0.66±0.001*
НТ-29	1	2.17±0.001*	4.99±0.002*	2.41±0.001*	0.01±0.001*
	5	2.79±0.001*	23.75±0.001*	2.55±0.02*	0.43±0.001*

Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасцу.

Експресија иРНК *Bax* гена, статистички значајно је повећана у свим испитиваним ћелијама третираним L-аминокиселинском оксидазом у односу на контролу. Резултати експресије иРНК *Bcl-2* и *каспаза 8* гена, приказују статистички значајно повећање ових гена у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, док је у НТ-29 ћелијама снижена у односу на контролу. Експресија иРНК *каспаза 9* гена, статистички значајно је снижена у НСТ-116 ћелијама, док је у SW-480 и НТ-29 ћелијама повећана, изузев више концентрације L-аминокиселинске оксидазе у НТ-29 ћелијама (Табела 11).

Табела 11. Експресија иРНК гена укључених у процес апоптозе у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама, под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, 24 сата након третмана.

		L-аминокиселинска оксидаза (µg/ml)			
		<i>Bax</i>	<i>Bcl-2</i>	<i>Каспаза 8</i>	<i>Каспаза 9</i>
Контрола		1	1	1	1
НСТ-116	1	3.53±0.001*	17.63±0.001*	6.23±0.05*	0.92±0.01*
	5	2.06±0.001*	8.06±0.001*	2.79±0.01*	0.81±0.01*
SW-480	1	2.66±0.001*	2.43±0.001*	3.55±0.02*	1.54±0.01*
	5	3.07±0.001*	1.85±0.001*	2.91±0.01*	2.64±0.02*
НТ-29	1	1.45±0.001*	0.11±0.001*	0.50±0.01*	1.25±0.01*
	5	1.58±0.001*	0.23±0.001*	0.74±0.03*	0.93±0.001*

Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасцу.



4. Биотрансформација

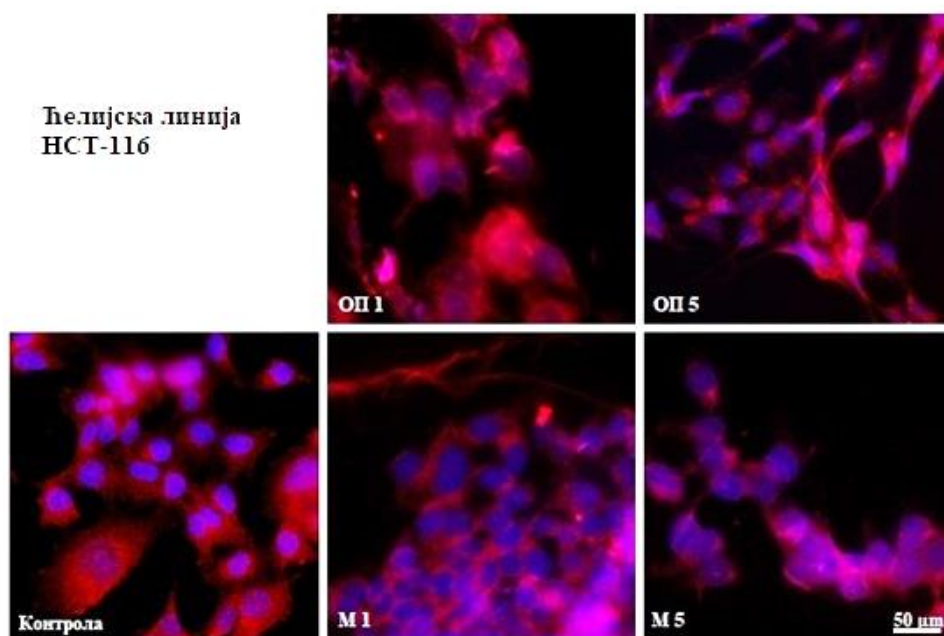
Ензими и мембрански транспортери укључени у процес биотрансформације отрова пчеле и мелитина у концентрацијама 1 и 5 $\mu\text{g/ml}$, и L-аминокиселинске оксидазе у концентрацијама 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$ у ћелијама карцинома дебелог црева (НСТ-116, SW-480 и НТ-29), праћени су имунофлуоресцентном и квантитативном PCR методом, 24 h након деловања третмана. Праћена је протеинска експресија П-гликопротеина 1, PGP1 и глутатион-ситетазе, GSS, као и експресија иРНК гена укључених у различите фазе процеса биотрансформације: *CYP1A1* и *CYP1B1* (енгл. *Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A and B, Member 1*), *GSTP1*, *MRP1* и *MRP2*), *PGP1*.

4.1. Експресија PGP1

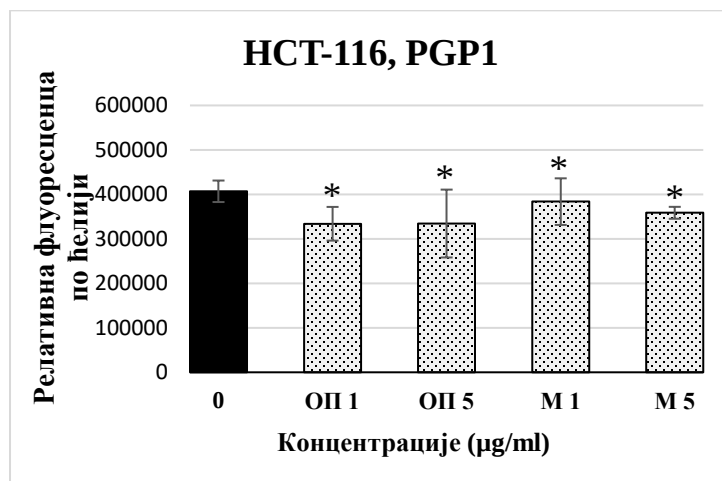
Протеинска експресија PGP1, детектована је имунофлуоресцентном методом. Експресија PGP1 у НСТ-116 ћелијама приказана је на микрографијама (Слика 36). Резултати квантификације интензитета флуоресценце са микрографија показују да је на НСТ-116 ћелијама експресија PGP1 смањена под утицајем отрова пчеле и мелитина у односу на нетретирание ћелије. Отров пчеле и мелитин доводе до статистички значајног смањења експресије PGP1 у односу на контролу (Графикон 35).

На Слици 37 приказана је експресија PGP1 у SW-480 контролним и ћелијама третираним отровом пчеле и мелитином. У SW-480 ћелијама, такође долази до статистички значајног смањења експресије PGP1 под утицајем ових третмана, у односу на контролне ћелије (Графикон 36).

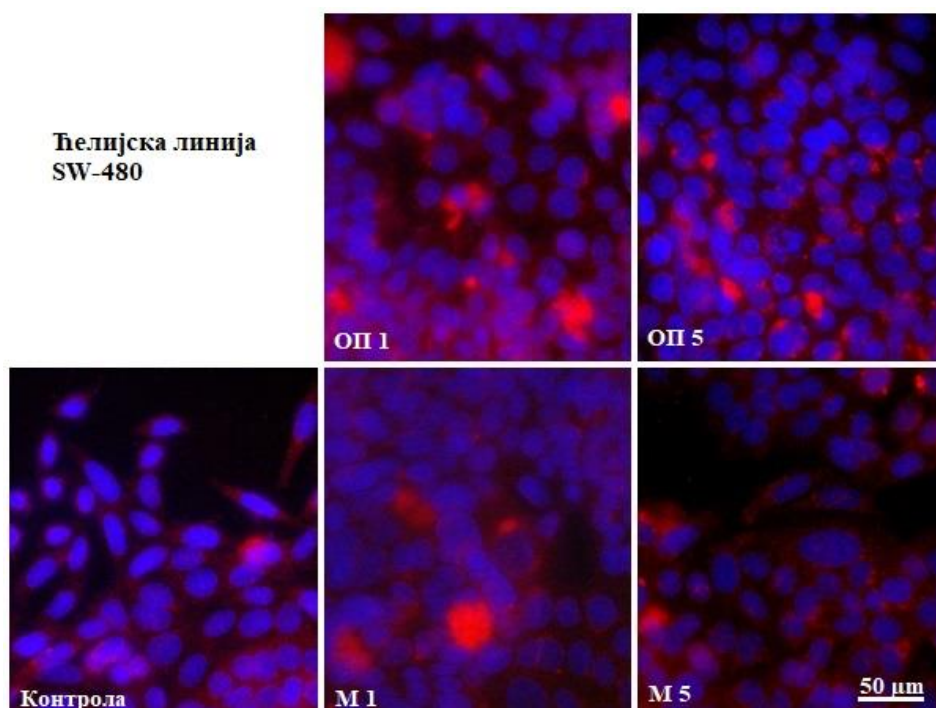
Протеинска експресија PGP1 на НТ-29 ћелијама приказана је на микрографијама (Слика 38). Резултати квантификације интензитета флуоресценце PGP1 показују смањење експресије PGP1. Протеинска експресија PGP1 се статистички значајно смањује на НТ-29 ћелијама под утицајем оба третмана, у поређењу са контролом (Графикон 37).



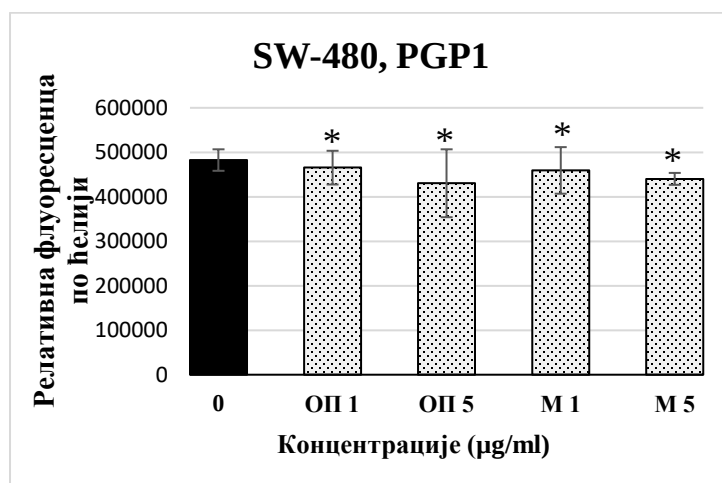
Слика 36. Интензитет протеинске експресије PGP1 у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



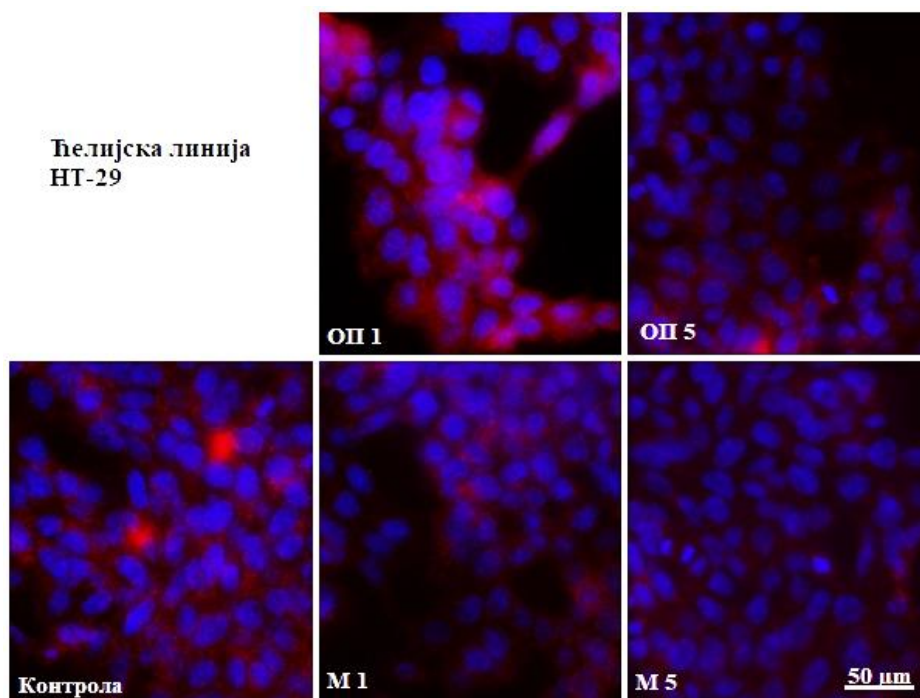
Графикон 35. Ниво протеинске експресије PGP1 у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



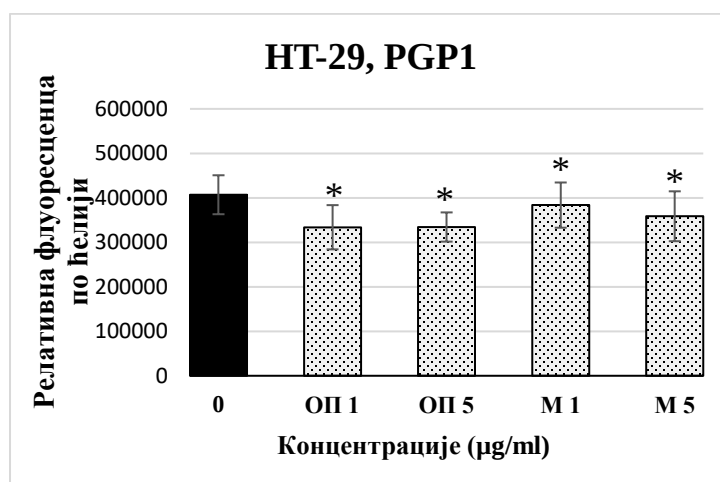
Слика 37. Интензитет протеинске експресије PGP1 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).



Графикон 36. Ниво протеинске експресије PGP1 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 38. Интензитет протеинске експресије PGP1 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600х. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



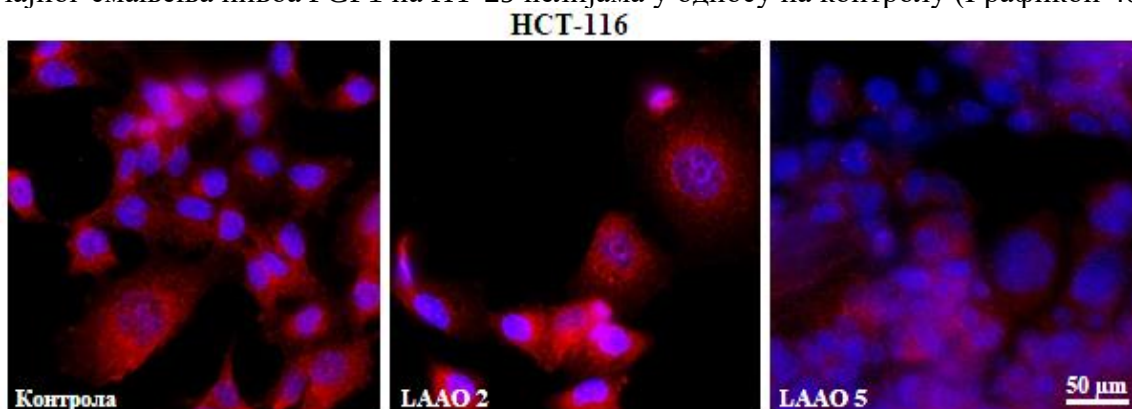
Графикон 37. Ниво протеинске експресије PGP1 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



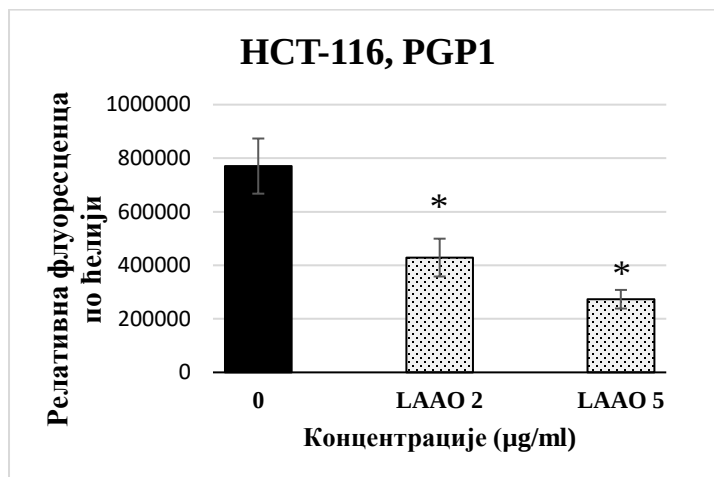
Утицај L-аминокиселинске оксидазе на протеинску експресију PGP1 у НСТ-116 ћелије, видљив је на микрографијама (Слика 39). Експресија PGP1, смањује се статистички значајно у односу на нетретиране ћелије, при чему је присутна и дозна зависност (Графикон 38).

Резултати анализе флуоресценце на SW-480 ћелијама добијени на основу микрографија (Слика 40), показују значајно смањење нивоа експресије PGP1 под утицајем L-аминокиселинске оксидазе у односу на нетретиране ћелије. Дозна зависност није забележена (Графикон 39).

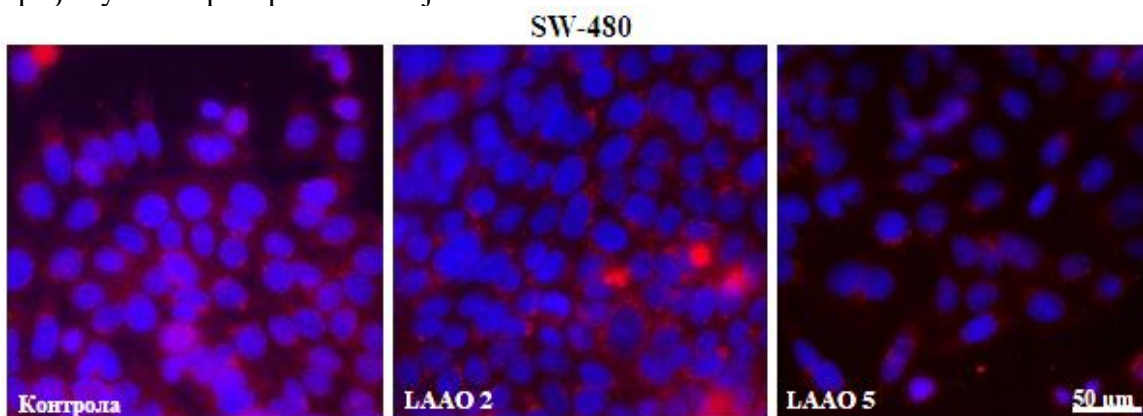
Резултати утицаја L-аминокиселинске оксидазе на експресију PGP1 у НТ-29 ћелијама (Слика 41), добијени на основу обраде флуоресценце са микрографија приказани су на Графикону 67. На НТ-29 ћелијама под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, долази до статистички значајног повећања експресије PGP1 у нижој концентрацији овог третмана. Деловањем више концентрације L-аминокиселинске оксидазе, долази до значајног смањења нивоа PGP1 на НТ-29 ћелијама у односу на контролу (Графикон 40).



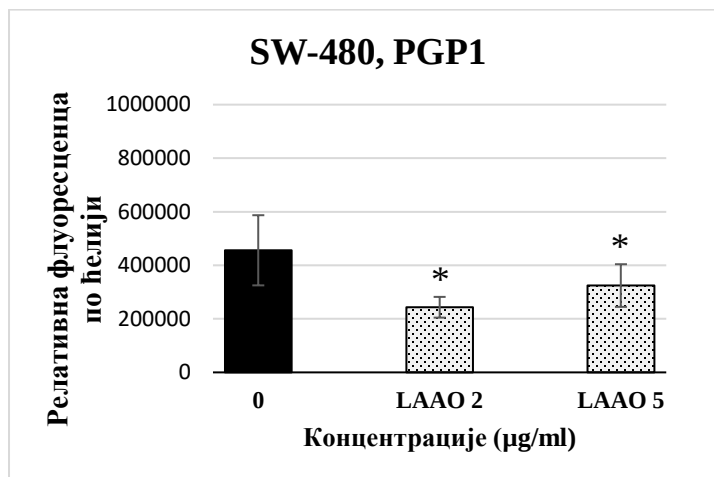
Слика 39. Интензитет протеинске експресије PGP1 у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



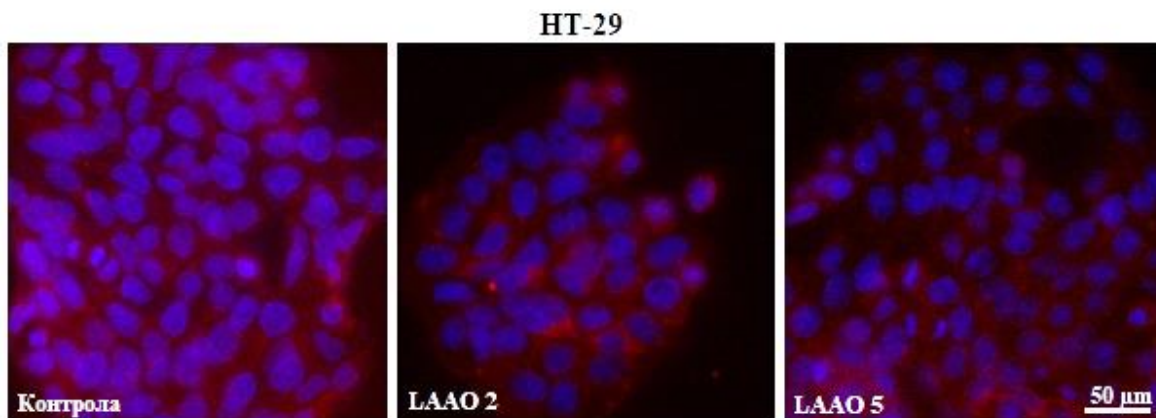
Графикон 38. Ниво протеинске експресије PGP1 у HT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



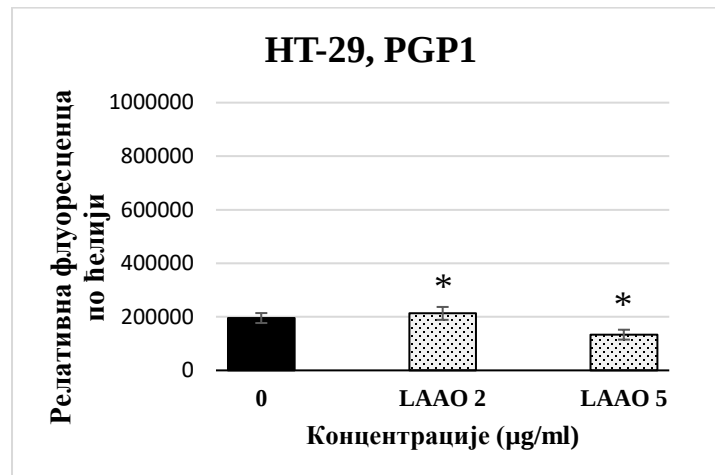
Слика 40. Интензитет протеинске експресије PGP1 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је обојен црвено (секундарно антителио конјуговано са Cy3).



Графикон 39. Ниво протеинске експресије PGP1 у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је програмом ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 41. Интензитет протеинске експресије PGP1 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), PGP1 је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 40. Ниво протеинске експресије PGP1 у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

4.2. Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације

Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације испитивана је на ћелијским линијама карцинома дебелог црева под утицајем отрова пчеле, мелитина (1 и 5 µg/ml) и L-аминокиселинске оксидазе (2 и 5 µg/ml), 24 h након деловања третмана. Под утицајем отрова пчеле, експресија иРНК гена *CYP1A1*, *CYP1B1* и *GSTP1* статистички значајно је смањена у HCT-116 и SW-480 ћелијама у односу на контролу, док је у HT-29 ћелијама статистички значајно повећана. Отров пчеле утиче на статистички значајно повећање иРНК гена *MRP1* у HCT-116 и SW-480 ћелијама у односу на контролу, док је у HT-29 ћелијама статистички значајно смањена. Експресија иРНК *MRP2* гена је под утицајем отрова пчеле статистички значајно повећана у HCT-116, док је у SW-480 и HT-29 ћелијама значајно смањена, у односу на контролу. Отров пчеле је изазвао статистички значајно повећање експресије иРНК *PGP1* гена само у нижој концентрацији на HCT-116 ћелијама, у односу на контролу, док је у свим осталим узорцима експресија иРНК *PGP1* гена статистички значајно смањена (Табела 12).



Табела 12. Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, под утицајем отрова пчеле, 24 сата након третмана.

		Отров пчеле (µg/ml)					
	К	<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>MRP1</i>	<i>MRP2</i>	<i>PGP1</i>
		1	1	1	1	1	1
НСТ-116	1	0.21±0.01*	0.60±0.001*	0.86±0.05*	1.82±0.02*	4.58±0.90*	12.21±0.01*
	5	0.10±0.01*	1.04±0.001	0.53±0.02*	2.20±0.01*	3.63±0.50*	0.39±0.001*
SW-480	1	0.01±0.001*	0.01±0.001	0.28±0.01*	1.52±0.001*	0.04±0.001*	0.84±0.002*
	5	0.08±0.001*	0.01±0.001	0.13±0.01*	1.83±0.002*	0.19±0.01*	0.53±0.01*
НТ-29	1	4.99±0.05*	2.79±0.010*	1.44±0.001*	0.88±0.001*	0.04±0.001*	0.30±0.002*
	5	20.53±0.04*	1.54±0.010*	1.69±0.02*	0.74±0.001*	1.32±0.01*	0.05±0.01*

Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасцу.

Мелитин такође утиче на промену експресије иРНК гена, најпре почетних фаза биотрансформације, али и мембранских транспортера. Под утицајем мелитина, генска експресија *CYP1A1*, *CYP1B1* и *GSTP1* значајно је смањена у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, у односу на контролу, док су у НТ-29 ћелијама експресије ових гена значајно повећане. Експресија иРНК *MRP1* гена је под утицајем мелитина статистички значајно повећана само у нижим концентрацијама мелитина на НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Под утицајем мелитина, експресија иРНК *MRP2* гена статистички значајно је повећана у НСТ-116 и НТ-29 ћелијама, док је у SW-480 ћелијама снижена. Експресија иРНК *PGP1* гена статистички значајно је повећана само у НСТ-116 ћелијама под утицајем мелитина, у односу на контролу (Табела 13).

Табела 13. Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, под утицајем мелитина, 24 сата након третмана.

		Мелитин (µg/ml)					
	К	<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>MRP1</i>	<i>MRP2</i>	<i>PGP1</i>
		1	1	1	1	1	1
НСТ-116	1	0.69±0.015*	0.14±0.001*	0.70±0.005*	1.91±0.001*	5.89±0.005*	1.01±0.01
	5	0.94±0.045	0.05±0.001*	0.51±0.005*	0.96±0.001	1.05±0.12	1.58±0.01*
SW-480	1	0.01±0.003*	0.01±0.024*	0.03±0.001*	2.23±0.01*	0.02±0.005*	0.36±0.001*
	5	0.05±0.02*	0.01±0.014*	0.08±0.005*	0.79±0.001*	0.06±0.001*	0.02±0.001*
НТ-29	1	8.00±0.02*	1.97±0.01*	3.94±0.05*	0.89±0.001*	4.20±0.01*	0.02±0.001*
	5	14.03±0.05*	1.85±0.001*	5.58±0.01*	1.07±0.02	14.83±0.05*	0.01±0.001*

Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасцу.



Под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, експресија иРНК гена прве две фазе биотрансформације *CYP1A1*, *CYP1B1* и *GSTP1* је повећана у свим испитиваним ћелијским линијама у односу на контролу. Експресија иРНК *MRP1* гена се у НСТ-116 и SW-480 ћелијама под утицајем ниже концентрације L-аминокиселинске оксидазе значајно смањује, док се у вишим незначајно повећава. Статистички значајно повећање експресије иРНК *MRP1* гена је забележено у НТ-29 ћелијама. Под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, експресија иРНК *MRP2* гена, повећана је статистички значајно у свим ћелијским линијама у односу на контролу. Експресија иРНК *PGP1* гена, смањена је у свим ћелијама у односу на контролу осим у НСТ-116 ћелијама, где је статистички значајно повећана (Табела 14).

Табела 14. Експресија иРНК гена укључених у процес биотрансформације у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија, под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, 24 сата након третмана.

L-аминокиселинска оксидаза (µg/ml)							
		<i>CYP1A1</i>	<i>CYP1B1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>MRP1</i>	<i>MRP2</i>	<i>PGP1</i>
	К	1	1	1	1	1	1
НСТ-116	2	7.52±0.04*	2.43±0.01*	1.34±0.01*	0.37±0.001*	1.55±0.01*	15.89±0.90*
	5	8.94±0.02*	4.59±0.001*	2.36±0.005*	1.05±0.001	1.91±0.01*	20.97±1.20*
SW-480	2	1.01±0.001	1.02±0.0001	1.22±0.001*	0.90±0.001*	1.20±0.01*	0.30±0.001*
	5	1.00±0.0001	1.71±0.001*	1.41±0.001*	1.06±0.001	1.42±0.01*	0.34±0.001*
НТ-29	2	3.32±0.02*	3.81±0.0001*	1.08±0.001	1.74±0.001*	1.32±0.01*	0.71±0.001*
	5	2.35±0.01*	4.56±0.001*	1.02±0.001	1.56±0.001*	1.20±0.001*	0.65±0.001*

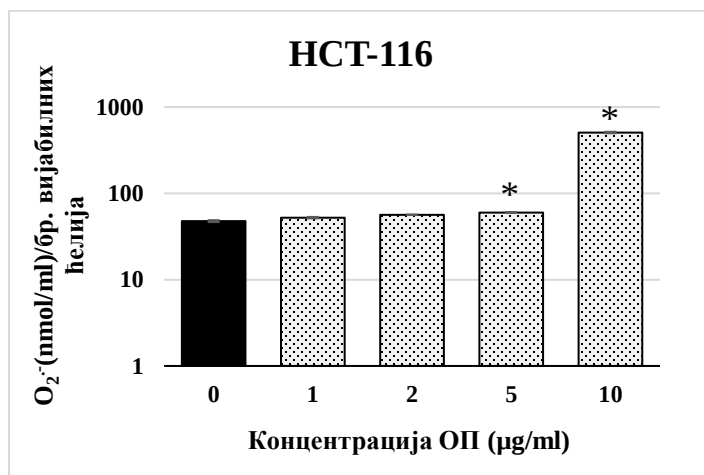
Резултати су приказани као средња вредност два независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама. Представљају експресију иРНК у циљном узорку, у односу на контролни узорак нормализован на референтни ген. Релативна експресија гена израчуната је по $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ обрасца.

5. Параметри редокс статуса под утицајем третмана

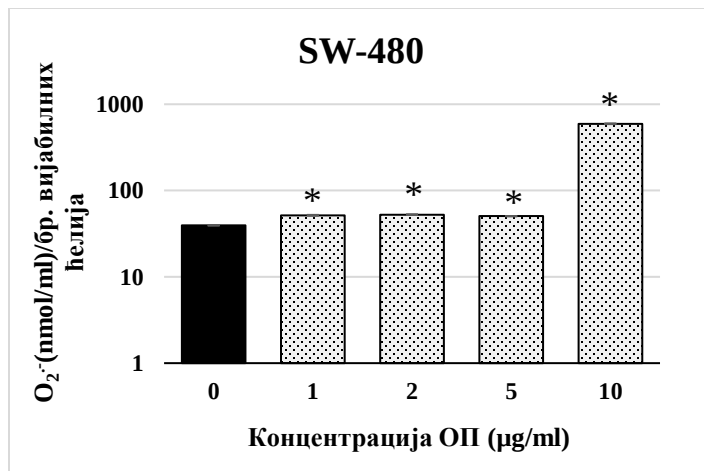
Утицаја отрова пчеле, мелитина и L-аминокиселинске оксидазе на циљане параметре редокс статуса праћен је помоћу колориметријских метода. Испитиване су промене концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), глутатиона (GSH) и малондиалдехида (MDA), 24 h након дејства наведених третмана на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијским линијама. Резултати су изражени преко процената вијабилности ћелија (Табеле 1-6 у Прилогу).

5.1. Концентрација супероксид-анјон радикала

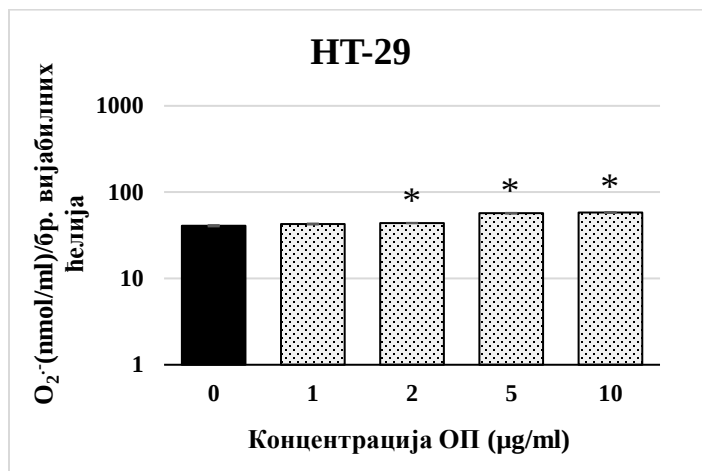
Концентрација $O_2^{\cdot-}$ је одрађивана колориметријским NBT тестом. Под утицајем отрова пчеле долази до повећања концентрације $O_2^{\cdot-}$ у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама у односу на нетретиране ћелије (Графикони 41, 42 и 43). Повећање концентрације $O_2^{\cdot-}$ је дозно зависно у свим испитиваним линијама, на шта указују коефицијенти корелације (Табела 19 у Прилогу).



Графикон 41. Концентрација O_2^- у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 42. Концентрација O_2^- у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

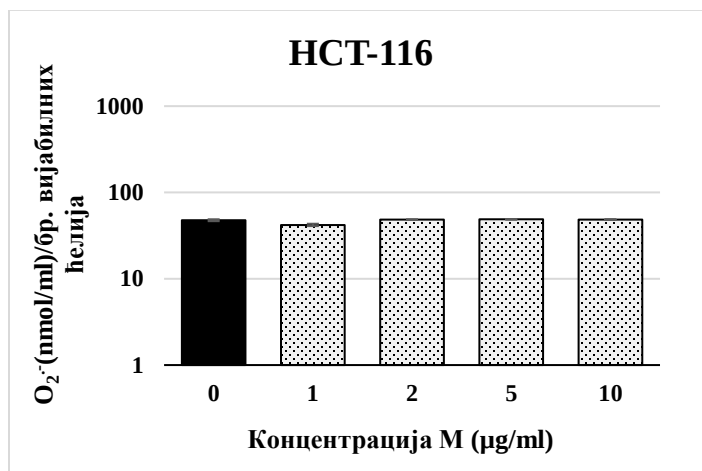


Графикон 43. Концентрација O_2^- у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

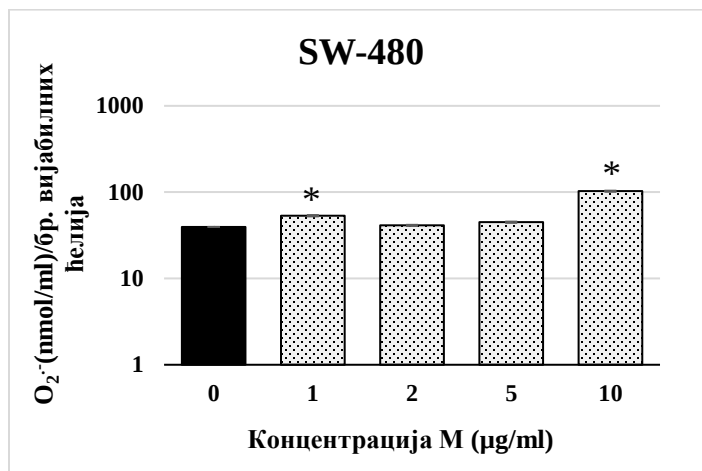
Под утицајем мелитина, концентрација O_2^- остаје непромењена код НСТ-116 ћелија у односу на нетретиране, контролне ћелије (Графикон 44).

Концентрација O_2^- се статистички значајно повећава услед деловања мелитина на SW-480 ћелијама у односу на контролу (Графикон 45), дозно зависно (Табела 8 у Прилогу).

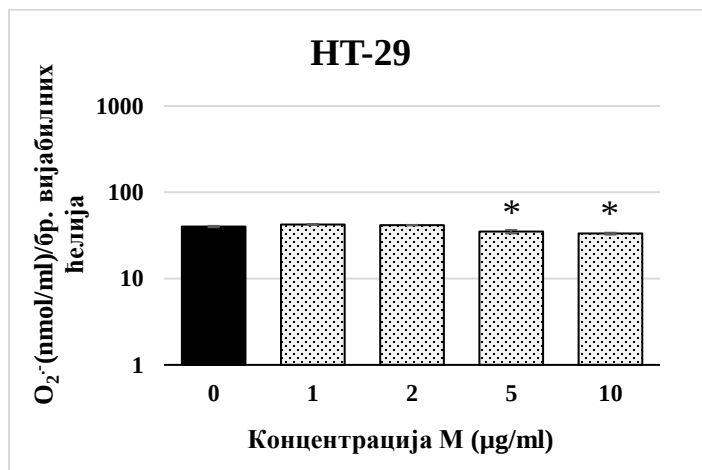
Концентрација O_2^- се статистички значајно смањује под утицајем мелитина на HT-29 ћелијама у односу на контролне ћелије (Графикон 46). Присутно је дозно зависно смањење, што потврђује корелација (Табела 8 у Прилогу).



Графикон 44. Концентрација O_2^- у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

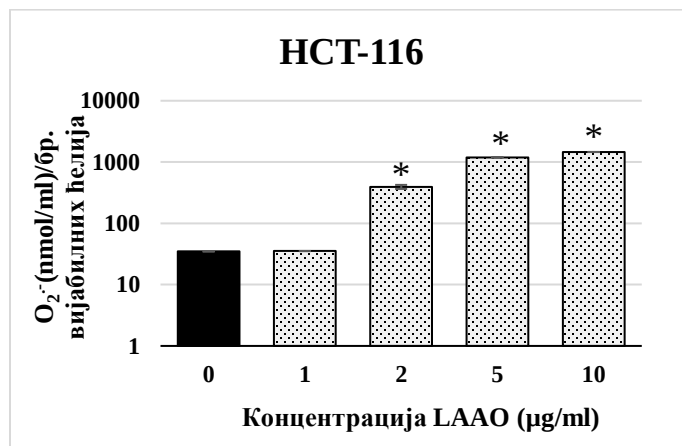


Графикон 45. Концентрација O_2^- у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

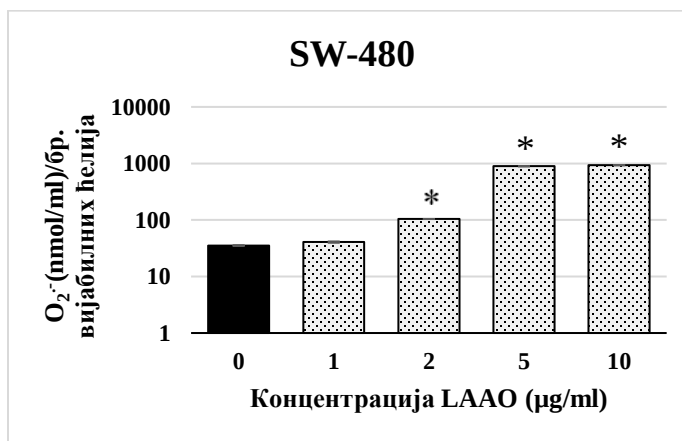


Графикон 46. Концентрација O_2^- у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

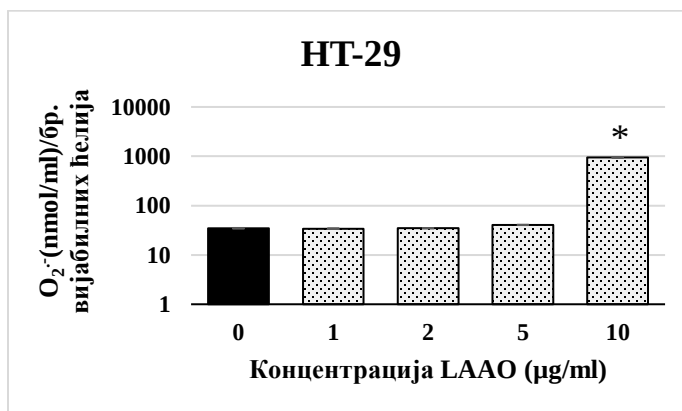
Под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, концентрација O_2^- на НСТ-116, SW-480 и HT-29 ћелијама се значајно повећава, у односу на контролне ћелије (Графикони 47, 48 и 49). У свим линијама се у деловању третмана уочава дозна зависност, што потврђују коефицијенти корелације (Табела 8 у Прилогу).



Графикон 47. Концентрација O_2^- у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 48. Концентрација O_2^- у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

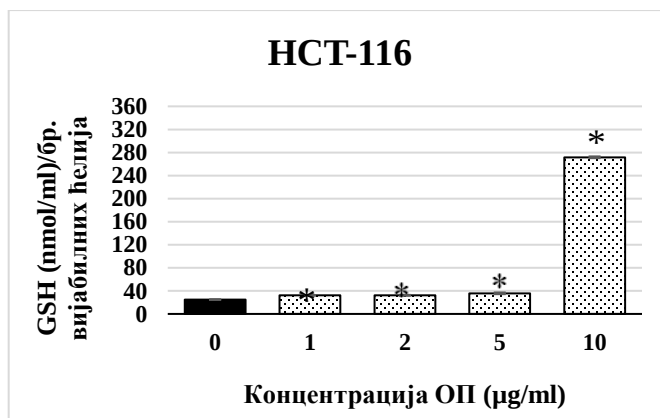


Графикон 49. Концентрација O_2^- у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

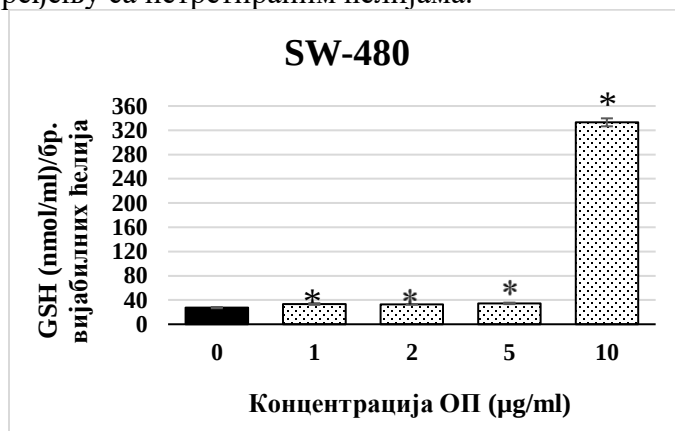


5.2. Концентрација глутатиона

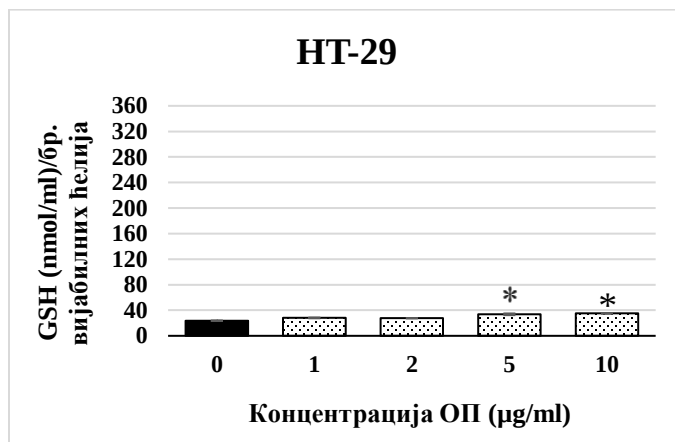
Глутатион (GSH) је компонента антиоксидативног заштитног система у ћелији и његова концентрација може да укаже на изложеност ћелија оксидативном стресу. Концентрација GSH је одређена спектрофотометријском методом. Резултати на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама показују да се концентрација GSH под утицајем отрова пчеле повећава дозно зависно у односу на контролу (Графикон 50, 51 и 52; Табела 8 у Прилогу). У ћелијама НТ-29, ниво GSH је нижи у поређењу са НСТ-116 и SW-480 ћелијама. (Графикон 52).



Графикон 50. Концентрација GSH у НСТ-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 51. Концентрација GSH у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

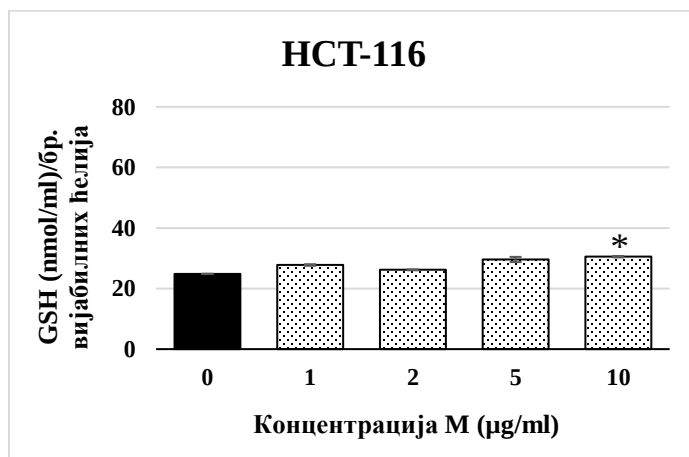


Графикон 52. Концентрација GSH у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

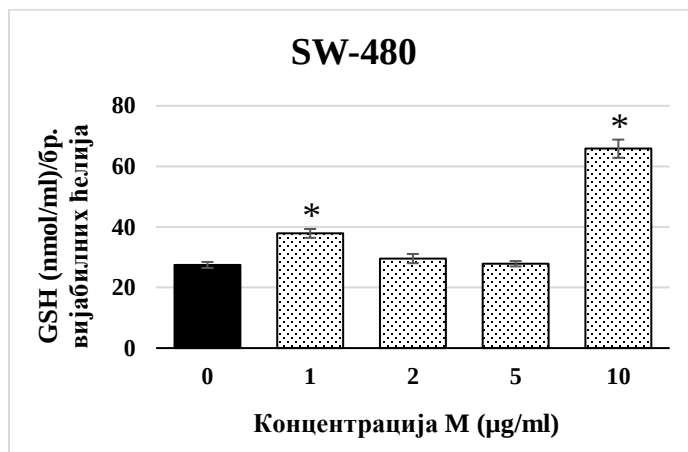
Мелитин, у односу на отров пчеле изазива блаже промене у концентрацији GSH у третираним ћелијама у односу на нетретиране. Резултати на HCT-116 ћелијама показују статистички значајну промену у концентрацији GSH под утицајем мелитина, само у највишој концентрацији (Графикон 53). Без обзира на мале промене у концентрацији овог параметра, коефицијент корелације указује на дозну зависност (Табела 8 у Прилогу).

У SW-480 ћелијама, повећање концентрације GSH у третираним ћелијама такође статистички значајно у односу на контролне ћелије под утицајем мелитина (Графикон 54).

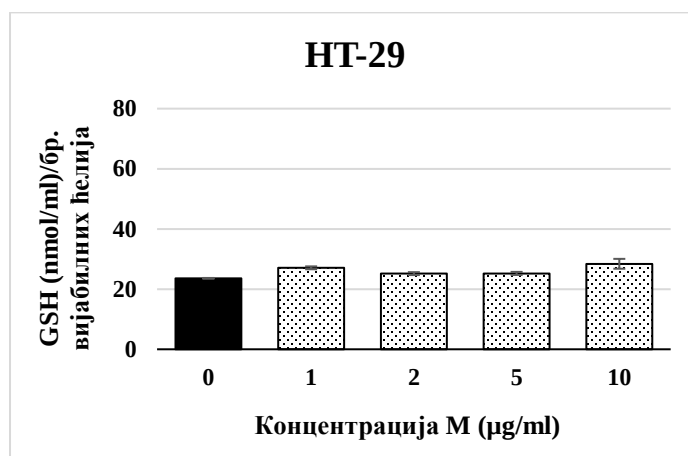
У HT-29 ћелијама под утицајем мелитина не долази до статистички значајних промена нивоа GSH у односу на контролне ћелије (Графикон 55).



Графикон 53. Концентрација GSH у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

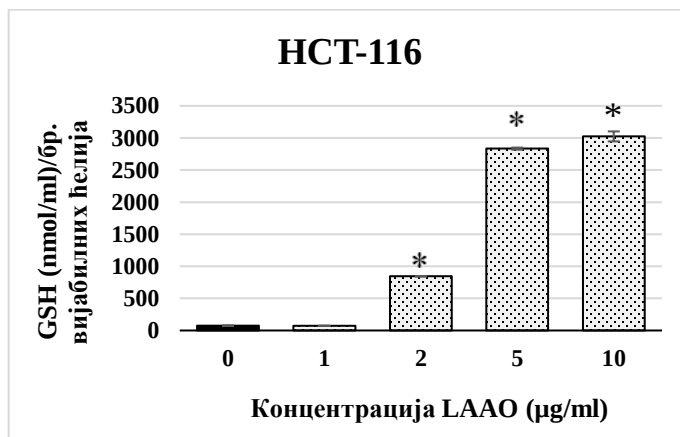


Графикон 54. Концентрација GSH у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (M). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

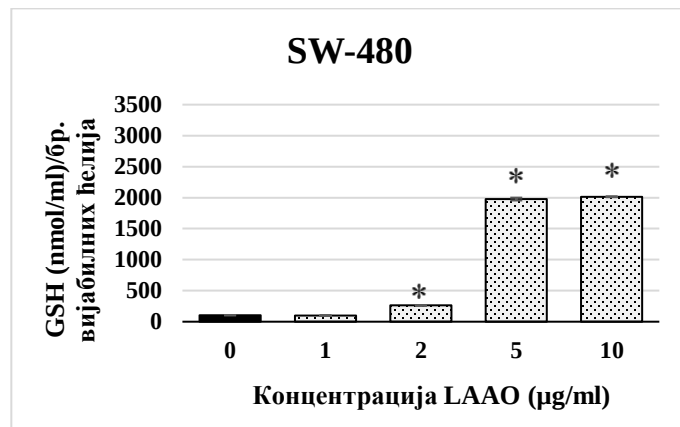


Графикон 55. Концентрација GSH у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (M). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

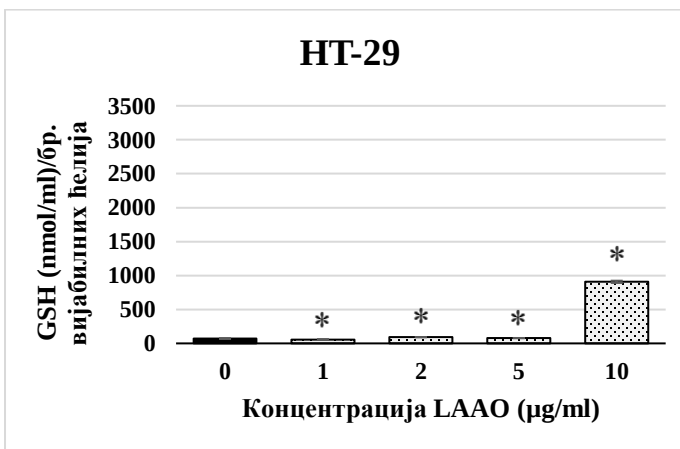
Под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, концентрација GSH се статистички значајно повећава у HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелијама, у односу на нетретиране ћелије (Графикони 56, 57 и 58). У деловању L-аминокиселинске оксидазе се на свим линијама уочава дозна зависност, што потврђују и коефицијенти корелације (Табела 8 у Прилогу).



Графикон 56. Концентрација GSH у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 57. Концентрација GSH у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.





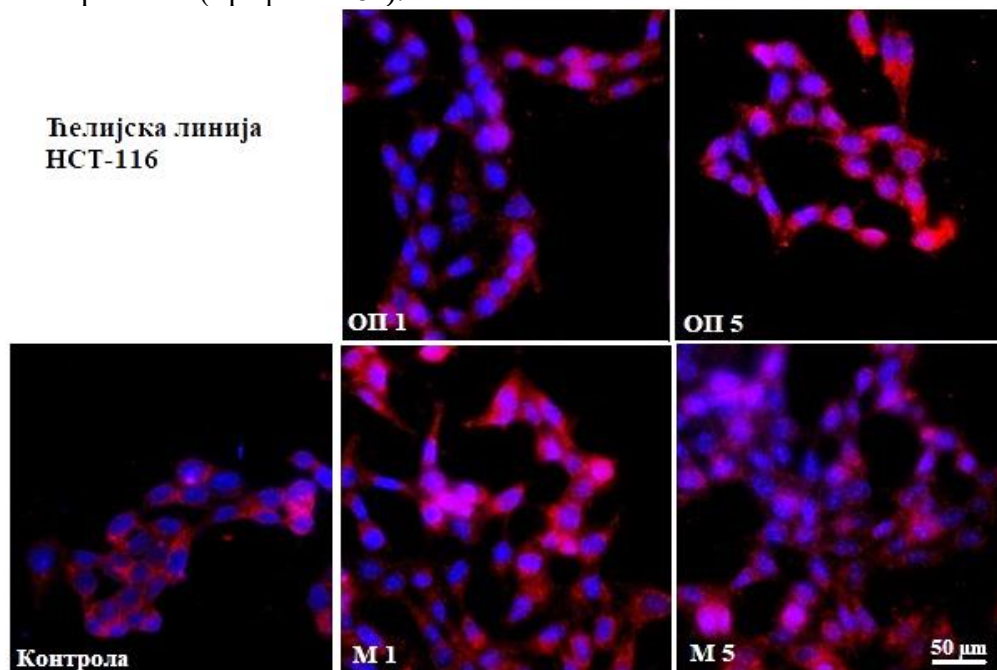
Графикон 58. Концентрација GSH у НТ-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

5.3. Експресија GSS

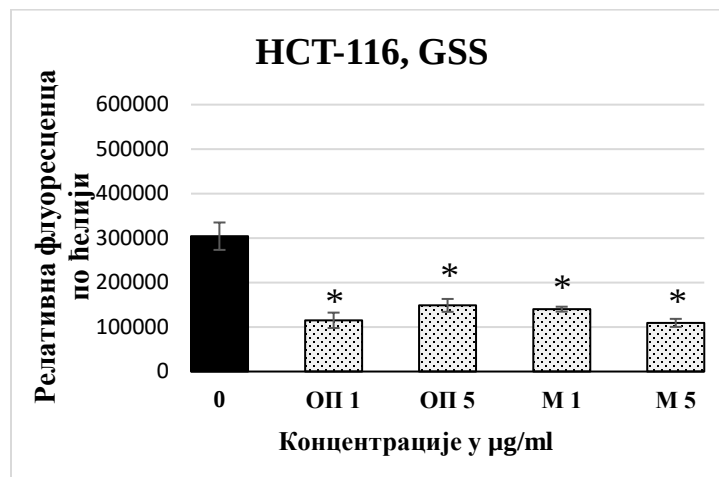
Протеинска експресија глутатион синтетазе (GSS) на ћелијским линијама карцинома дебелог црева рађена је имунофлуоресцентном микроскопском методом. Резултати квантификације интензитета флуоресценце на микрографијама (Слика 42), показали су да се код НСТ-116 ћелија, под утицајем отрова пчеле и мелитина, статистички значајно смањује експресија GSS, у односу на нетретиране ћелије (Графикон 59).

Резултати деловања отрова пчеле и мелитина на SW-480 ћелијама, добијени су на основу мерења флуоресценце на микрографијама (Слика 43). Експресија GSS у SW-480 ћелијама под утицајем отрова пчеле, значајно се повећава у односу на нетретиране ћелије. Мелитин у SW-480 ћелијама доводи до смањене експресије GSS у нижој концентрацији, док је у вишој концентрацији мелитина, експресија GSS повећана у поређењу са контролом (Графикон 60).

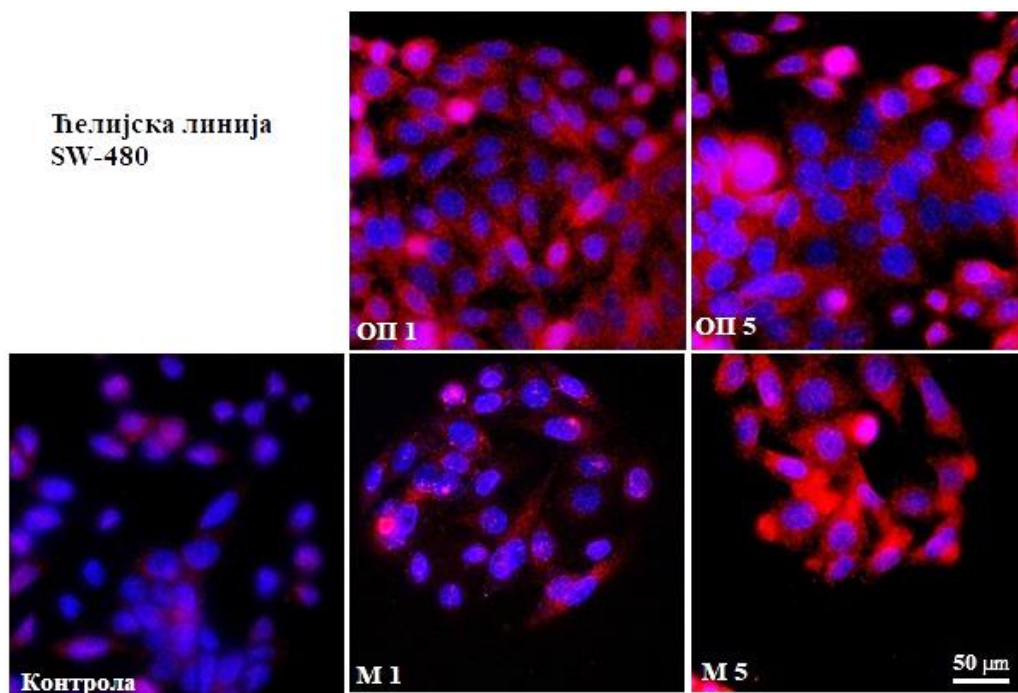
Резултати анализе микрографија НТ-29 ћелија (Слика 44), показују да је ниво експресије GSS статистички значајно смањен у односу на нетретиране ћелије, под утицајем оба третмана (Графикон 61).



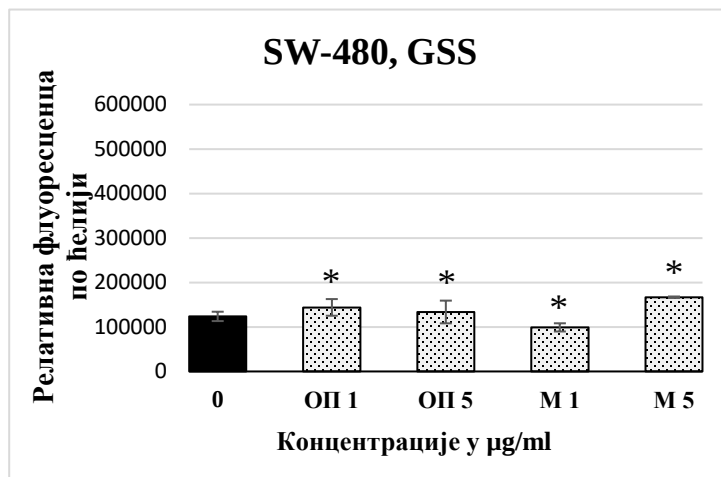
Слика 42. Интензитет протеинске експресије GSS у НСТ-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



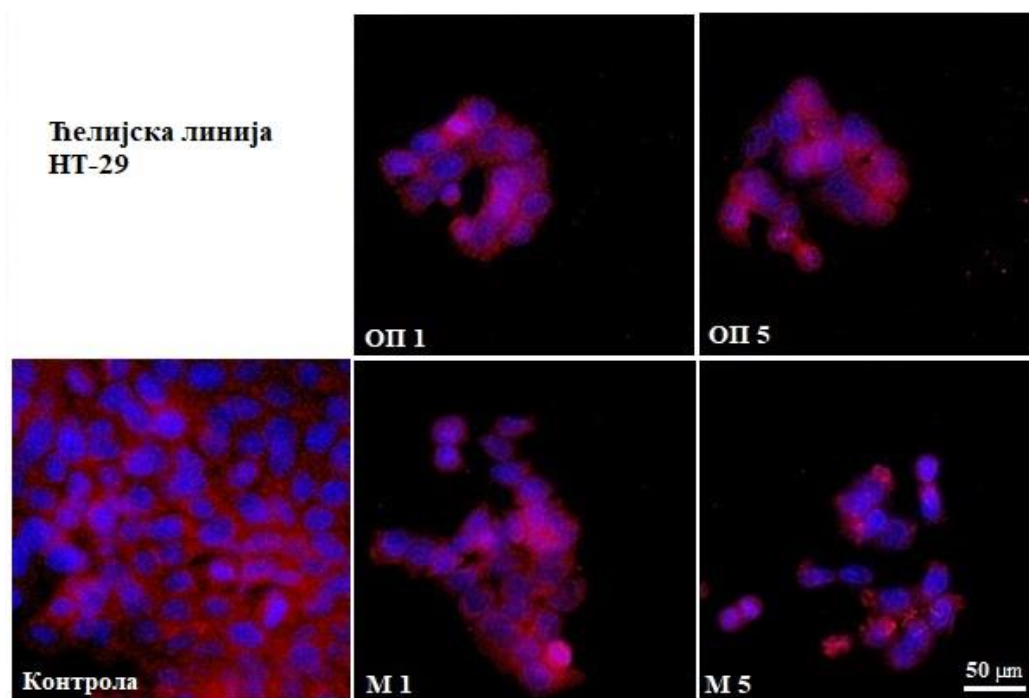
Графикон 59. Ниво протеинске експресије GSS у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



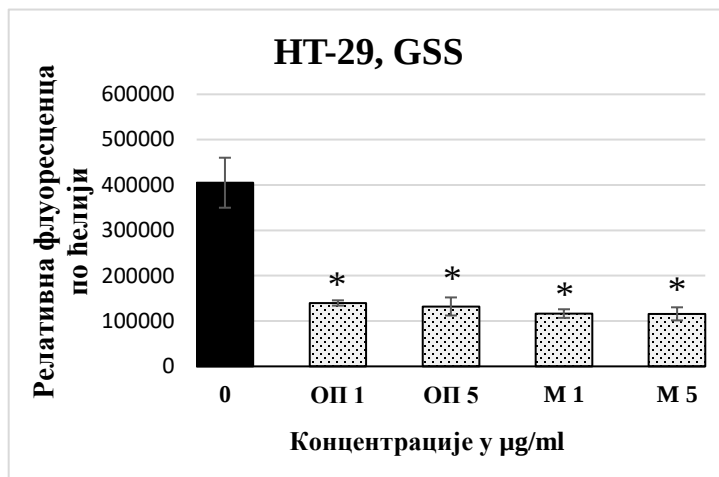
Слика 43. Интензитет протеинске експресије GSS у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвена обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 60. Ниво протеинске експресије GSS у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 44. Интензитет протеинске експресије GSS у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвено обојен (секундарно антителио конјуговано са Cy3).

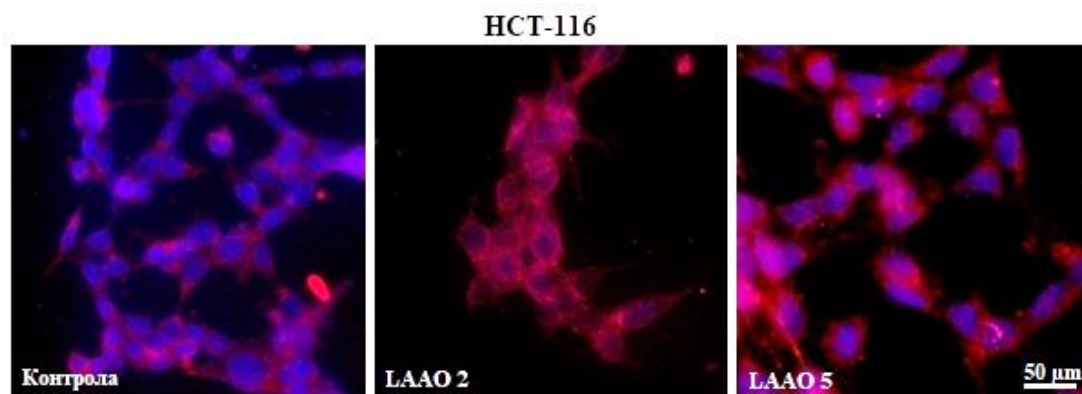


Графикон 61. Ниво протеинске експресије GSS у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП) и мелитина (М), концентрација 1 и 5 µg/ml. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

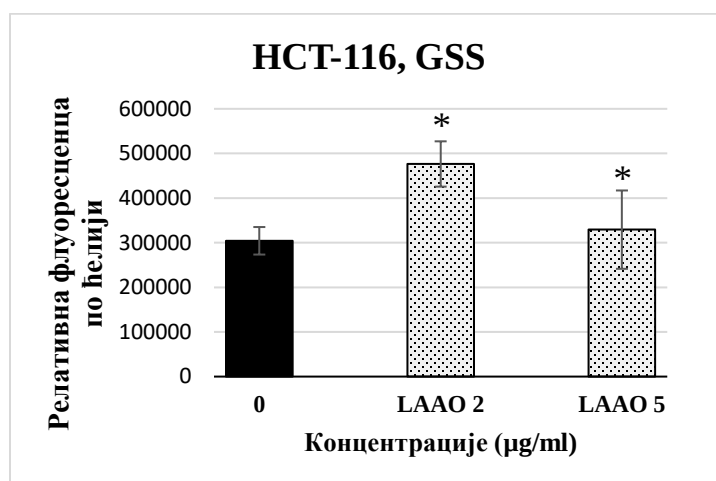
Резултати утицаја L-аминокиселинске оксидазе на експресију GSS у HCT-116 ћелијама, квантификовани су на основу интензитета флуоресценце на микрографијама (Слика 45). Резултати указују на статистички значајно повећање нивоа експресије GSS у HCT-116 ћелијама, у односу на нетретиране ћелије. Повећање експресије је значајније у нижој концентрацији L-аминокиселинске оксидазе (Графикон 62).

У SW-480 ћелијама долази до повећања експресије GSS под утицајем L-аминокиселинске оксидазе у односу на контролне ћелије, што је уочљиво и на микрографијама (Слика 46), при чему је повећање статистички значајно (Графикон 63).

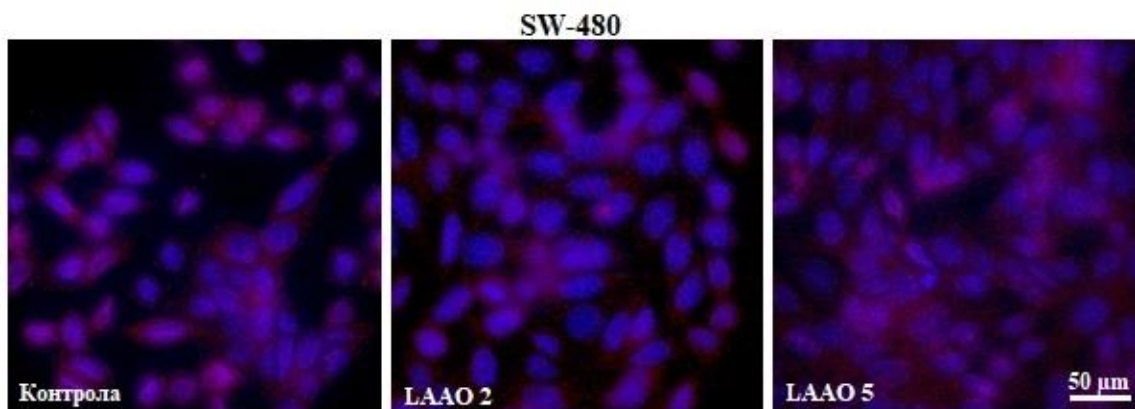
Ниво експресије GSS у HT-29 ћелијама под утицајем L-аминокиселинске оксидазе квантификован је на основу флуоресценце на микрографијама (Слика 47). Резултати су показали да је експресија GSS у HT-29 ћелијама је статистички значајно повећана у нижој концентрацији L-аминокиселинске оксидазе, док у вишој концентрацији не долази до значајне промене у експресији овог протеина у поређењу са контролом (Графикон 64).



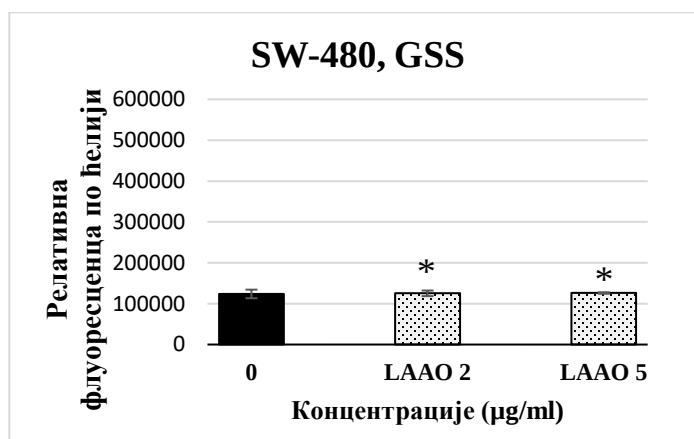
Слика 45. Интензитет протеинске експресије GSS у HT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



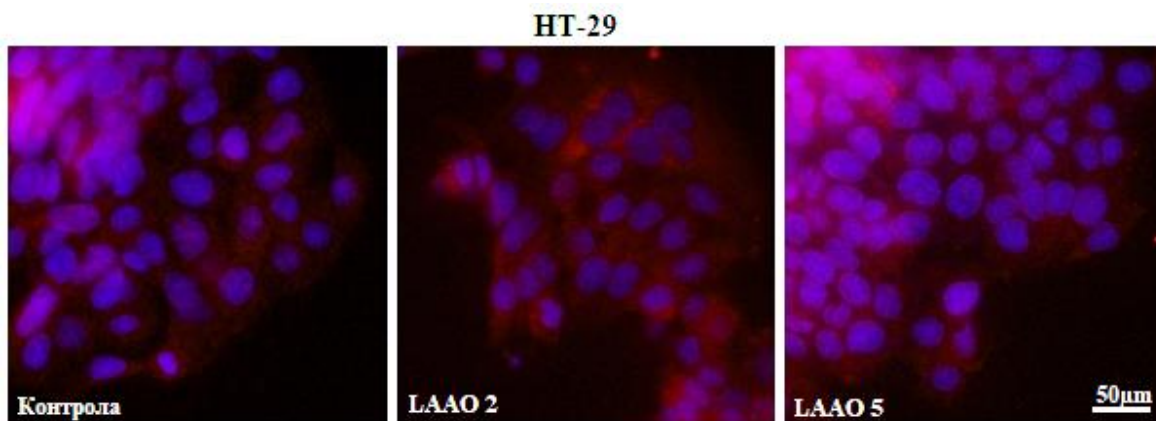
Графикон 62. Ниво протеинске експресије GSS у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



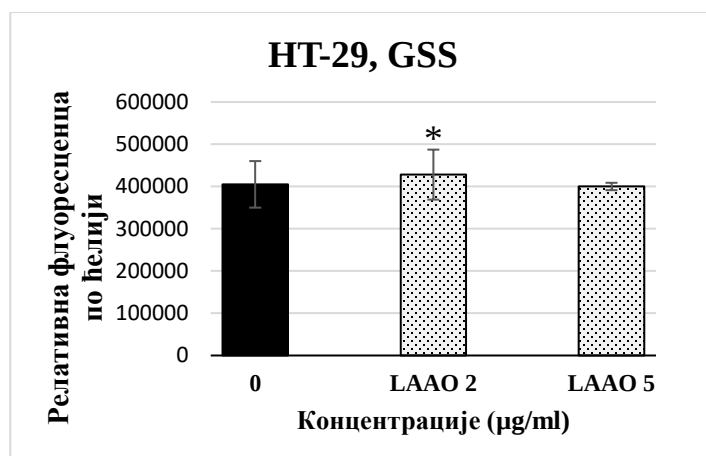
Слика 46. Интензитет протеинске експресије GSS у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 63. Ниво протеинске експресије GSS у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Слика 47. Интензитет протеинске експресије GSS у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Микрографије су добијене на флуоресцентном микроскопу, увећање 600x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), GSS је црвено обојен (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Графикон 64. Ниво протеинске експресије GSS у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO), концентрација 2 и 5 $\mu\text{g/ml}$. Релативни интензитет флуоресценце у контролним и третираним ћелијама мерен је у програму ImageJ. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

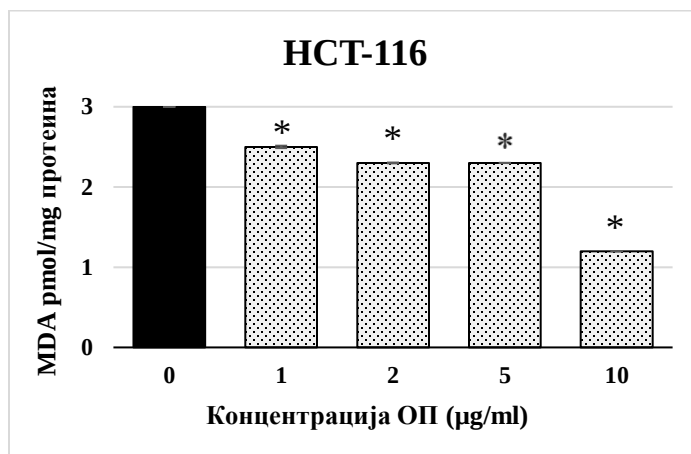
5.4. Концентрација малондиалдехида

Концентрација малондиалдехида (MDA) указује на оштећења липида мембране, која настају услед хроничног оксидативног стреса. Резултати показују да се на HCT-116 ћелијама под утицајем отрова пчеле, статистички значајно смањује концентрација MDA у односу на контролне ћелије (Графикон 65). Смањење концентрације је дозно зависно (Табела 8 у Прилогу).

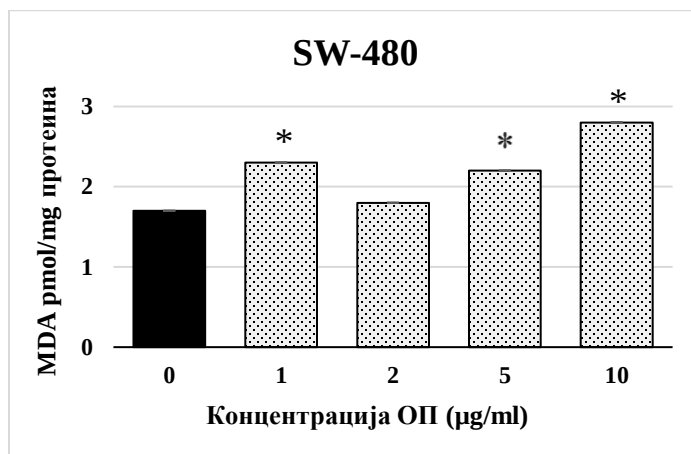
Резултати концентрације MDA под утицајем отрова пчеле у SW-480 и HT-29 ћелијама, су статистички значајно повећане у односу на контролне ћелије (Графикони 66 и



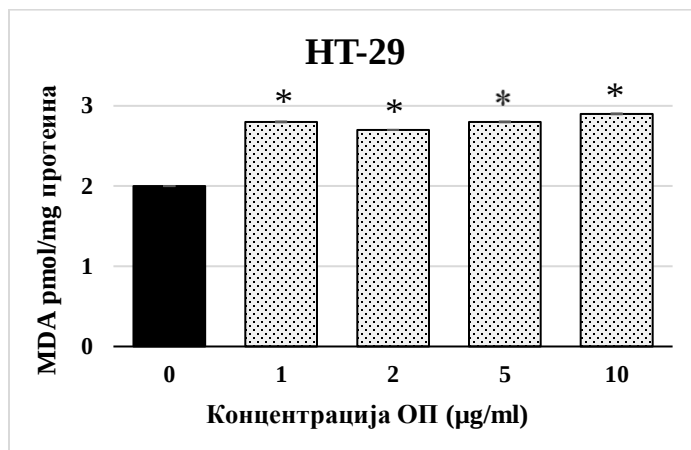
67). У деловању третмана се на обе ћелијске линије уочава дозна зависност, потврђена коефицијентима корелације (Табела 8 у Прилогу).



Графикон 65. Концентрација MDA у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



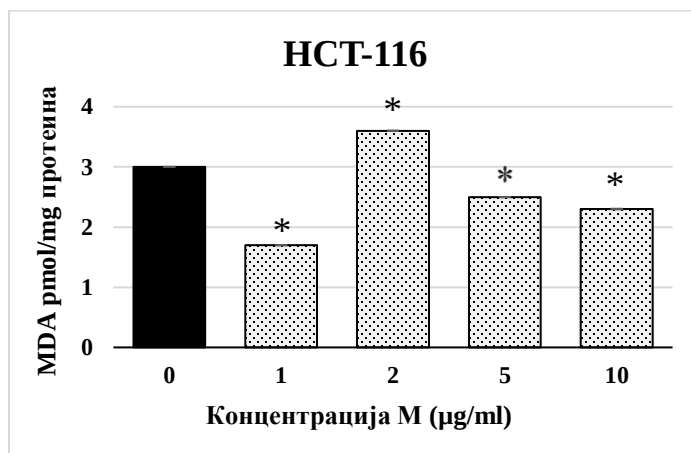
Графикон 66. Концентрација MDA у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



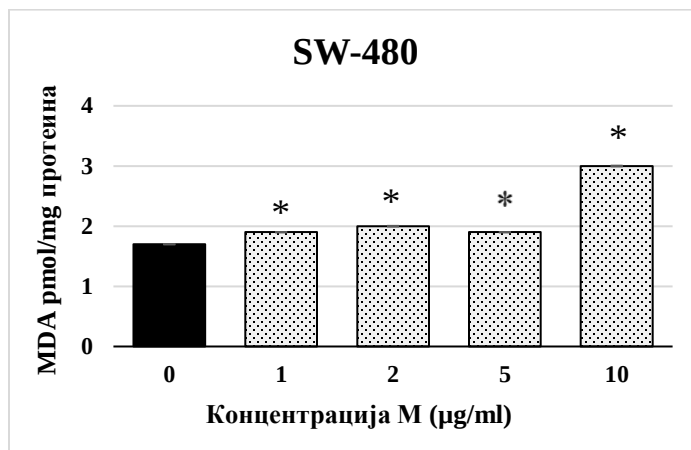
Графикон 67. Концентрација MDA у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања отрова пчеле (ОП). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Под утицајем мелитина, на НСТ-116 ћелијама долази до статистички значајног смањења концентрације MDA у односу на контролу, осим у концентрацији мелитина од 2 µg/ml (Графикон 68).

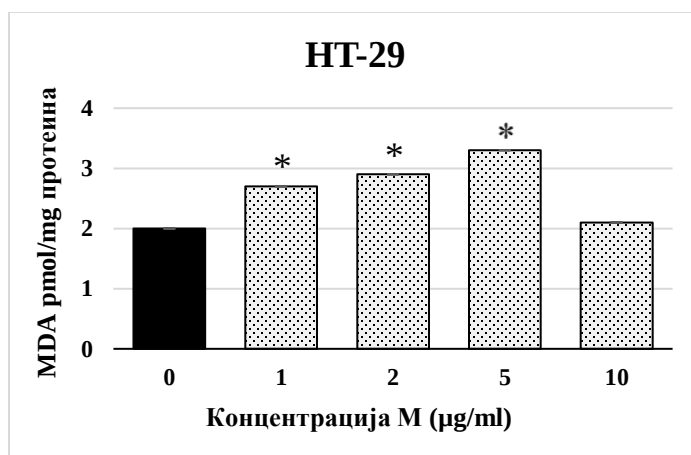
На SW-480 и HT-29 ћелијама, концентрација MDA се статистички значајно повећава под утицајем мелитина у односу на контролу (Графикон 69). У деловању третмана на SW-480 ћелијама је присутна дозна зависност, док код HT-29 ћелија није, с обзиром на слабу корелацију (Графикон 70, Табела 19 у Прилогу).



Графикон 68. Концентрација MDA у НСТ-116, ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



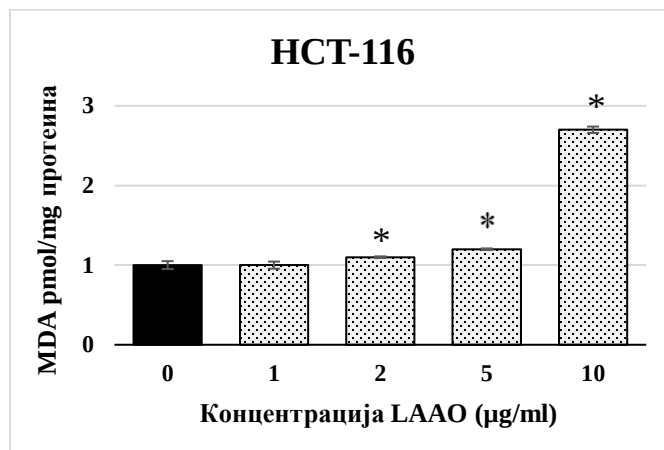
Графикон 69. Концентрација MDA у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



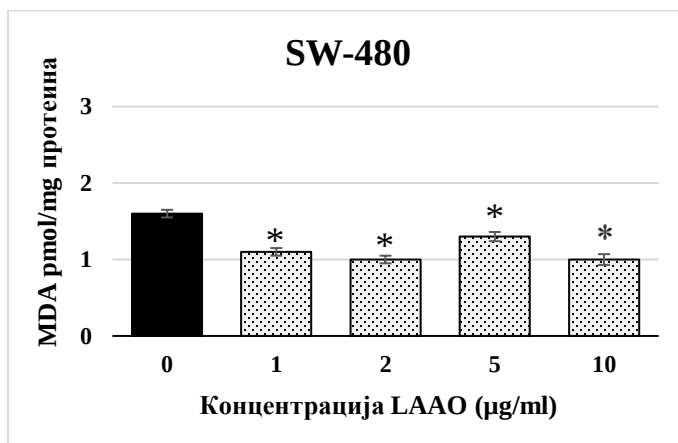
Графикон 70. Концентрација MDA у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања мелитина (М). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Под утицајем L-аминокиселинске оксидазе на HCT-116 ћелијама, долази до статистички значајног повећања концентрације MDA, у односу на контролне ћелије (Графикон 71). Повећање је дозно зависно, што је потврђено присуство корелације (Табела 8 у Прилогу).

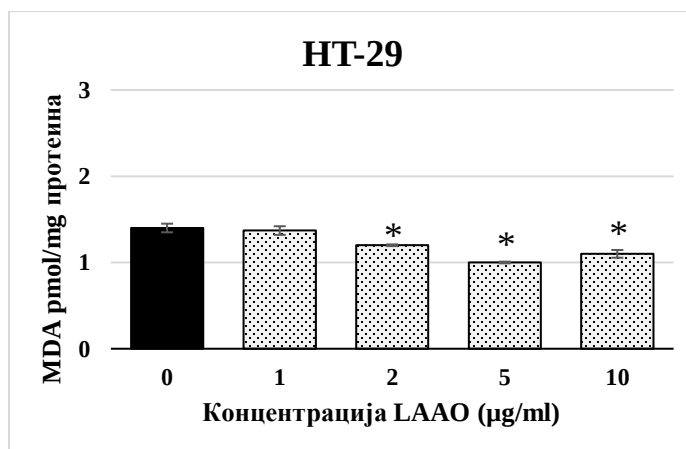
Резултати показују да се под утицајем L-аминокиселинске оксидазе, на SW-480 и HT-29 ћелијама концентрација MDA статистички значајно смањује у односу на нетретиране ћелије (Графикони 72 и 73). У деловању третмана се у случају обе ћелијске линије уочава дозно зависно смањење (Табела 8 у Прилогу).



Графикон 71. Концентрација MDA у HCT-116 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 72. Концентрација MDA у SW-480 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



Графикон 73. Концентрација MDA у HT-29 ћелијама, 24 h након деловања L-аминокиселинске оксидазе (LAAO). * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.



V ДИСКУСИЈА

Малигне болести су један од водећих здравствених проблема и међу најчешћим су узроцима смртности у људској популацији без обзира на пол (Sung и сар., 2020). Повећана учесталост малигнитета изискује потребу за проналаском и применом адекватних лекова, али поред тога, неопходно је радити на превенцији и подизању свести људи о овој проблематици. Тренутно се за лечење малигних болести користе углавном синтетски цитостатици који имају доста нежељених ефеката, често и неселективно дејство, па постоји стална потреба за испитивањима и употреби нових, адекватнијих лекова (Piasek и сар., 2009; Pagani, 2010). Већ више од деценије се огромна материјална средства троше на испитивање нових и модификацију постојећих цитостатика, како због нежељених ефеката, тако и због све чешће појаве развоја резистенције малигних ћелија на терапију (Mills и сар., 2018). Појава резистенције је непредвидива и не може се са сигурношћу одредити када ће на ћелије неког организма престати ефекат лека. Малигно ткиво је састављено од различитих ћелија, које се по много чему разликују, па и по потенцијалу да развију резистенцију на цитостатик (Pauwels и сар., 2007). Потенцијал ћелија пореклом из дигестивног тракта је свакако велики, с обзиром на постојање такозване „урођене“ резистенције, због саме физиолошке улоге овог система органа. У физиолошким условима, ћелије дебелог црева имају висок ниво експресије молекула који су укључени у метаболизам ксенобиотика (Ranhotra и сар., 2016). Развој резистенције умногоме зависи од одбрамбеног, метаболичког механизма и самих туморских ћелија, али и од врсте цитостатика који се употребљава.

Активне супстанце пореклом из природе, било да потичу од биљака, животиња или других организама, показале су доста успеха у терапији, као и потенцијал за превазилажење проблема који се тичу развоја резистенције. У бројним преклиничким и клиничким испитивањима антитуморског деловања на првом месту су биљке, односно из њих добијени екстракти, етарска уља и изоловане супстанце биљног порекла (Dajas, 2012; Harlev и сар., 2012; Al-Snafi и сар., 2016; Milutinović и сар., 2019). Многе супстанце биљног порекла поседују изузетан антитуморски потенцијал и показале су цитотоксично, проапоптозо, антимиграторно, антиинвазивно, антиангиогено дејство, као и бројне друге ефекте на туморским ћелијским линијама, ткивима пацијената, *in vitro* и *in vivo* модел системима (Gap и сар., 2020; Lin сар., 2020). Заузимају посебно место и у развоју нових антитуморских лекова као четврта генерација инхибитора П-гликопротеина, једног од главних молекула одговорних за развој резистенције на лек. Што се тиче супстанци пореклом из животиња, међу којима су и отрови, претежно се могу наћи у секретима разних врста. С обзиром на чињеницу да производи животињског порекла и њихова активна једињења имају неке позитивне и корисне ефекте у терапији малигних болести (Milutinović и сар., 2020; Roy и Bhadravaya, 2020), неопходно је поспешивање истраживања оваквих третмана. Пчелињи отров, као један од најчешће испитиваних отрова на пољу антитуморске терапије, има показана антитуморска својства (Gajski и



Garaj-Vrhovac, 2013; Gajski и сар., 2016), укључујући његове проапоптотске ефекте на ћелије карцинома дебелог црева код људи (Zheng и сар., 2015). Змијски отрови су мање проучавани због своје деструктивне активности на здравим ћелијама, па у литератури постоји далеко мање података о антитуморским својствима њихових компоненти. О отровницама из Србије, према нашим сазнањима, постоји свега пар литературних навода који говоре о антитуморском дејству фосфолипазе A2 и металопротеиназе пореклом из отрова врсте *Vipera ammodytes* (Rodrigues и сар., 2009; Leonardi и сар., 2014).

У оквиру ове докторске дисертације испитиван је антитуморски потенцијал животињских отрова, отрова пчеле и отрова змије, и једињења пореклом из ових отрова. Коришћени модел системи за *in vitro* испитивања су ћелијске линије карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480 и HT-29). Проучавањем састава отрова и прегледом литературних података о активности појединачних једињења, направљен је одабир најадекватнијих чистих супстанци присутних у њима за даља испитивања и третмане. Мелитин води порекло из отрова пчеле, док је L-аминокиселинка оксидаза присутна у сваком змијском отрову, па и у отрову поскока (*Vipera ammodytes*).

Састав отрова. Приликом анализе састава пчелињег и змијског отрова методом електрофоретског раздвајања протеина, детектовано је неколико значајних компоненти. Резултати анализа су показали да је најзаступљенија компонента пчелињег отрова, литички пептид – мелитин. Поред мелитина, у отрову су, на основу наших резултата, присутни и ензими фосфолипаза и хијалуронидаза. Литературни подаци указују на то да највећи допринос у деловању отрова пчеле има мелитин (Gajski и Garaj-Vrhovac, 2013; Seremuga и сар., 2020). Поред мелитина, који се сматра литичким пептидом, издвојени протеини из отрова пчеле могу се поделити у групу ензима (фосфолипаза, хијалуронидаза и др.), пептида (апамин, веспид и др.) и малих молекула (допамин, ацетилхолин, серотонин и др.) (Ali, 2012).

Анализом састава отрова змије, откривено је неколико мањих протеина, одговорних за постизање токсичног дејства отрова на плен. Протеини су из групе протеиназа (серин протеиназе и металопротеиназе), које синергистички доводе до хемотоксичности отрова поскока и припадају ензимским компонентама. По литератури, у састав отрова поскока улазе и L-аминокиселинске оксидазе, ензими који на непознат начин утичу на јачину отрова приликом уједа. Поред ензимских, постоје и неензимске компоненте, међу којима су најприсутнији CRISPs (Gorčević и сар., 2021), који су, између осталих детектовани и у нашем узорку отрова.

Цитотоксично дејство испитиваних третмана. Антитуморско дејство отрова пчеле, отрова змије, мелитина и L-аминокиселинке оксидазе на имортализованим ћелијским линијама карцинома дебелог црева HCT-116, SW-480 и HT-29, као погодним моделима за *in vitro* истраживања, испитивано је најпре са аспекта цитотоксичности. На основу добијених резултата, може се закључити да отров пчеле значајно утиче на смањење вијабилности HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелија, што показују јако ниске IC₅₀ вредности (Табела 3). Мелитин, такође индукује значајно смањење вијабилности испитиваних ћелијских линија, с тим што је цитотоксични ефекат овог третмана слабији у односу на укупни отров пчеле. Укупном отрову пчеле, односно његовом јачем



цитотоксичном ефекту могу допринети и остале присутне компоненте (хијалуронидаза, фосфолипаза и др), међу којима може доћи до синергистичког деловања а самим тим и до појачавања цитотоксичног дејства (Zhou и сар., 2013; Zhou и сар., 2021). Међутим, постигнути цитотоксични ефекти мелитина, као појединачне компоненте отрова, указују да је управо он у великој мери заслужан за цитотоксично дејство отрова пчеле. Најмање осетљива ипитивана ћелијска линија на цитотоксичност отрова пчеле и мелитина је НТ-29 ћелијска линија, са IC_{50} вредностима изнад највише испитиване концентрације (Табела 3), која и према истраживањима других аутора представља отпорнији тип ћелија (Deng и сар., 2014; Kim и сар., 2015). Цитотоксични третмани који се користе у антитуморској терапији, често су неселективни и у великом проценту убијају и здраве ћелије. Резултати на здравим кератиноцитима $HaCaT$, приказују значајно цитотоксично дејство отрова пчеле и мелитина само у највишим концентрацијама, што потврђују и IC_{50} вредности, које су веће од највише испитиване концентрације ($10 \mu g/ml$). Ово указује на селективно дејство мелитина, које је потврђено и другим литературним подацима (Pandey и сар., 2010; Shaw и сар., 2019). Цитотоксично деловање мелитина може се повезати са његовим литичким својством и механизмом лизирања мембранског двослоја. Као амфипатски спирални пептид, мелитин је у стању да се угради у фосфолипидни двослој, што доводи до нарушавања ћелијске мембране и до интензивне цитотоксичности (Seremuga и сар., 2020). Афинитет мелитина према ћелијским мембранама, испољава се, између осталих и на ћелијама карцинома желуца (AGS) и дебелог црева (COLO205, НСТ-15), на којима доводи до бубрења и стварања гранулација (Soliman и сар., 2019). Отров змије и L-аминокиселинска оксидаза такође имају значајан утицај на смањење вијабилности НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија. Цитотоксични ефекат представљен IC_{50} вредностима, указује на веома јаку цитотоксичност ових третмана (Табела 4). L-аминокиселинска оксидаза има блаже цитотоксично дејство у односу на укупни отров змије. С обзиром на присутност компоненти у отрову змије које имају протеолитичке функције, јако цитотоксично дејство змијског отрова није неочекивано (Chakrabarty и Sarkar, 2017). Са друге стране, L-аминокиселинска оксидаза према литературним наводима, доводи до цитотоксичног дејства ремећењем редокс равнотеже и иницирањем продукције слободних кисеоничних радикала, а у највећој мери H_2O_2 (Paloschi и сар., 2018). L-аминокиселинска оксидаза постиже јаче цитотоксичне ефекте након дужег времена излагања третману (72 h) на свим испитиваним ћелијама, што је значајно са аспекта развоја резистенције.

Цитотоксичност свих испитиваних третмана се може окарактерисати као веома јака, поређењем са ефектима комерцијално доступног цитостатика 5-флуороурацила на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама, на ком су добијене IC_{50} вредности 3.2, 10.07, и 10.00 μM на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелије, редом, након 72 сата од деловања (Ikehata и сар., 2014). Поређењем постигнутих цитотоксичних ефеката испитиваних третмана на различитим ћелијским линијама пореклом из истог органа, уочава се да је НТ-29 линија најмање осетљива. По неким ауторима, слабију осетљивост НТ-29 линије на цитостатике повезују са високом експресијом микроРНК 21 (Deng и сар., 2013). До разлике у осетљивости на цитостатик могу да доведу и различити фенотипи на основу геномских нестабилности (Rodrigues и сар., 1990). У многим карциномима, укључујући и колоректални, дешава се хромозомска нестабилност (CIN) и микросателитска нестабилност MIN (Bhattacharyya и сар., 1994). Ћелијске линије SW-480 и НТ-29 поседују CIN фенотип (Loeb, 1991; Camps, 2006), мутацију у p53 гену и очуван репарациони



механизам, док НСТ-116 имају MIN фенотип, оне су p53 wild-type, и имају оштећен репарациони систем (Rodrigues и сар., 1990; Yao и сар., 2005; Howells и сар., 2007). Без обзира на фенотипске и генотипске разлике између НСТ-116 и SW-480 линија, не уочава се јасна разлика у деловању испитиваних третмана на њих, већ подједнака осетљивост на испитиване третмане.

Индуковање ћелијске смрти под утицајем испитиваних третмана. Механизам цитотоксичног деловања отрова пчеле, мелитина, отрова змије и L-аминокиселинске оксидазе на НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама, даље је испитиван одређивањем типа индуковане ћелијске смрти. Резултати су показали да отров пчеле, мелитин и L-аминокиселинска оксидаза индукују апоптозу у свим испитиваним ћелијским линијама са минималним процентом некрозе, док отров змије доминантно индукује некрозу (Табеле 5, 6, 7 и 8). Морфолошке промене настале на ћелијама под утицајем отрова пчеле, мелитина и L-аминокиселинске оксидазе одговарају стадијумима ране и касне апоптозе, с тим што су у времену детекције ћелије у раној апоптози заступљене у значајно већем проценту. Са друге стране, укупни отров змије је на испитиваним ћелијама изазвао типичне некротске промене. Најповољнији механизам деловања цитостатика, јесте индукција апоптозе, ограничене на појединачну ћелију и без ефеката на суседне ћелије и ткива. Појава некрозе у деловању било ког лека, па и цитостатика, сматра се његовим нежељеним ефектом, с обзиром на то да се на појаву некрозе надовезује јак имунски одговор (Sachet и сар., 2017). Некроза са собом носи и инфламацију, а инфламација ствара неповољне услове за деловање терапије, јер ствара добру микросредину за развој резистенције (Singh и сар., 2019). С обзиром на то, антитуморски агенс који своје цитотоксично дејство постиже индукцијом апоптозе, вредан је детаљнијих испитивања која би водила ка његовој употреби у терапији. Бројни литературни подаци показују проапоптотско дејство отрова пчеле и мелитина на ћелијама леукемије (Seremuga и сар., 2020), затим хепатоцелуларног карцинома (Wang и сар., 2009), карцинома простате (Park и сар., 2011), и других. Са друге стране, за L-аминокиселинску оксидазу и механизме њеног проапоптотског деловања још увек је недовољно информација. С обзиром на доминантну појаву некрозе у деловању укупног отрова змије, даља испитивања молекуларних механизма апоптозе за њега нису рађена.

Механизам апоптозе

Молекули који су укључени у процес апоптозе су бројни, и могу се поделити на оне који учествују у реализацији спољашњег, и оне који припадају унутрашњем апоптотском путу. Да би се ближе одредио механизам проапоптотског деловања неког лека, могуће је пратити одговарајуће молекуле укључене у овај механизам, као потенцијалне мете за деловање терапије, било да ли је реч о супресији или стимулацији неког од њих.

Отров пчеле. Различити молекули и лиганди могу покренути апоптозу везивањем за мембранске рецепторе смрти као што је Fas, чиме се покреће спољашњи апоптотски пут (Lee и сар., 2015). Отров пчеле индукује апоптозу тако што покреће спољашњи, рецепторима посредован апоптотски сигнални пут у све три испитиване ћелијске линије (НСТ-116, SW-480 и НТ-29). На то указују резултати повишене протеинске експресије Fas



рецептора. То показују и други литературни подаци (Zheng и сар. 2015). Наиме, најизраженије повећање експресије Fas рецептора је у SW-480 ћелијама, што је у корелацији са највећим процентом апоптозе у овој ћелијској линији. Сама по себи, повишена протеинска експресија Fas-а може да укаже, али није сигуран знак активације сигналног пута. Међутим, резултат повишене активности каспазе 8 јасно показују да је овај сигнални пут активиран. Активација мембранског рецептора условљава формирање DISC комплекса и активацију прокаспазе 8 у активну каспазу која појачава апоптотски сигнал и иницира дисталне молекуле спољашњег апоптотског пута, ефекторне каспазе, или пак појачава стимулус укључивањем и активацијом компоненти унутрашњег апоптотског пута (Ivanisenko и Lavrik, 2019). Резултати показују да је активност каспазе 8 значајно повећана у НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелијама. Такође, испитивана генска експресија *каспазе 8* под утицајем отрова пчеле, показује повећање експресије у свим ћелијама. На основу испитивања маркера унутрашњег апоптотског пута може се закључити да НСТ-116 и SW-480 ћелије појачавају апоптотски сигнал укључивањем митохондрија и додатном активацијом унутрашњег апоптотског пута, што са НТ-29 ћелијама није случај. На активацију унутрашњег пута у НСТ-116 ћелијама, указује повећање генске експресије проапоптотског гена *Bax* а смањење антиапоптотског гена *Bcl-2*. У SW-480 ћелијама, долази до смањења оба гена, при чему су вредности више за проапоптотски *Bax* ген (Табела 9). Код протеина из *Bcl-2* фамилије најбитнији је баланс и интеракција на протеинском нивоу, због њихове хомодимеризације, али и међусобне хетеродимеризације. Протеински продукти ових гена су антагонисти, и од њихове равнотеже зависи да ли ће апоптотски сигнал бити појачан или утишан. Антиапоптотски протеини имају улогу да везивањем за проапоптотске блокирају њихову способност транслокације у митохондрије, чиме спречавају појачавање апоптотског сигнала (Huang и сар., 2019; Luo и сар., 2020). Ремећење митохондријалног мембранског потенцијала и излазак *Cyt c* из митохондрија доводи до активације каспазе 9 (Yuan и сар., 2010; Singh и сар., 2019). Резултати показују да се услед деловања отрова пчеле повећава експресија каспазе 9 на генском и протеинском нивоу, што указује на активацију унутрашњег апоптотског пута у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Активирани иницијаторске каспазе спољашњег и унутрашњег пута доводе до активације ефекторних каспаза, одговорних за настанак морфолошких промена специфичних за процес апоптозе, детектованих методом АО/ЕБ. За разлику од НСТ-116 и SW-480 ћелија, у НТ-29 ћелијама не долази до укључивања унутрашњег пута, на шта указује снижена експресије каспазе 9. С обзиром да је покретање унутрашњег пута регулисано односом про и антиапоптотских сигнала, резултати генске експресије *Bax* и *Bcl-2* указују да не долази до ремећења пермеабилности митохондријалне мембране, с обзиром да су у равнотежи. Генска експресија антиапоптотског *Bcl-2* је у након третмана вишом концентрацијом отрова пчеле значајно повећана што је опет у складу са претходном тврдњом, али и са резултатом смањене протеинске експресије каспазе 9.

Митохондрије су кључне органеле за реализацију апоптозе, али поред тога, оне су и место где се у ћелији генеришу ROS. Супероксид анион радикал, као један од најпотентнијих ROS, има способност да повећа пермеабилност мембране митохондрија што води ка ослобађању *Cyt c*. Тако да се $O_2^{\cdot -}$ сматра једним од унутарћелијских иницијатора унутрашњег апоптотског пута (Galadari и сар., 2017). Такође, $O_2^{\cdot -}$ може утицати и на активацију унутрашњег пута јер има тенденцију спречавања формирања



комплекса DISC (Liou и Storz, 2010). Резултати су показали да се у испитиваним линијама карцинома дебелог црева јављају благе промена у испитиваним циљаним концентрацијама за апоптозу (1 и 5 $\mu\text{g/ml}$), док се значајнија повећања дешавају у вишим концентрацијама отрова пчеле (10 $\mu\text{g/ml}$), на којима апоптоза није испитивана. У НТ-29 ћелијама, долази до најмањих промена редокс статуса у поређењу са друге две ћелијске линије, што корелише са њиховом најмањом осетљивошћу и најмањом појавом апоптозе под утицајем отрова пчеле. Резултати процене антиоксидативне заштите ћелије која се детектује мерењем нивоа GSH, указују на то да ниво оксидативног стреса у испитиваним ћелијама није висок. Глутатион је благо повишен у свим ћелијама, али најзначајније повећање уочено је у највишој концентрацији отрова пчеле и у складу је са повећањем O_2^- , што може указати на то да више концентрације третмана делују проксидативно и изазвају оксидативни стрес у испитиваним ћелијама. С обзиром на уску везу између поремећаја редокс равнотеже и оштећења мембранских липида, отров пчеле доводи до промена у концентрацији малониалдехида (MDA), индикатора мембранских оштећења. Отров пчеле у SW-480 и НТ-29 ћелијама доводи до повећања мембранских оштећења, на шта указује повећање концентрације MDA. Под утицајем ових третмана у НСТ-116 ћелијама долази до смањења концентрације MDA, што потенцијално значи да се цитотоксичност у овим ћелијама не остварује посредством оштећења мембрана.

Мелитин. На испитиваним ћелијским линијама карцинома дебелог црева, мелитин показује ефекте сличне отрову пчеле. На основу добијених резултата може се рећи да је за активност отрова пчеле заслужан мелитин. Незнатне разлике у ефектима ова два третмана, могу се приписати постојању других компоненти у отрову пчеле, које својом активношћу или синергистичким интеракцијама са другим компонентама могу појачати дејство отрова. Промене испитиваних параметара који објашњавају механизам апоптозе потврђују његово проапоптотско дејство, и у складу су са литературним наводима (Gajski и Garaj-Vrhovac, 2013; Zarrinnahad и сар., 2018; Vargaei и сар., 2020; Zhou и сар., 2021). Протеинска експресија Fas рецептора се под утицајем мелитина повећава у свим испитиваним линијама, а најзначајније повећање је у SW-480 ћелијама. Овај резултат потврђује проапоптотско дејство и чињеницу да се апоптоза у овим ћелијама одвија спољашњим путем посредованим мембранским рецепторима. У складу са овим резултатом је и резултат повећане активности каспазе 8 протеина као и генске експресије *каспазе 8*, где такође долази до повећања у свим линијама (сем у вишој концентрацији на НСТ-116), што указује на да мелитин утиче на активацију спољашњег апоптотског пута у свим испитиваним ћелијама карцинома дебелог црева. Индукција апоптозе спољашњим путем посредством мелитина је већ позната и наши резултати су у складу са литературним налазима за НСТ-116 и SW-480 ћелијске линије (Zheng и сар., 2015). Једино у НСТ-116 ћелијама долази до смањења генске експресије *каспазе 8*, мада резултати активности каспазе 8 показују повећање, што свакако говори о активацији спољашњег пута у овој ћелијској линији. Повећање протеинске експресије каспазе 9 указује и на активацију унутрашњег апоптотског пута у НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Резултати неподударања детектоване генске и протеинске експресије каспазе 9 у НСТ-116 и SW-480 ћелијама се могу објаснити временом њихове детекције у експерименталним истраживањима. Наиме, 24 сата након деловања третмана повишена експресија каспазе 9 је детектована на протеинском нивоу, што указује на потребу укључивања оба апоптотска пута као акутни одговор на третман. Експерименталном методом је показано да након 24 сата долази до



смањења генске експресије каспазе 9 и искључивања унутрашњег апоптотског пута у деловању третмана. У прилог томе говоре и IC_{50} вредности, које су ниже на 24 сата, у односу на 72 када је сигнал за укључивање унутрашњег пута, гледајући генску експресију каспазе 9, могуће прекинут. У НСТ-116 и SW-480 линијама долази и до смањења регулатора унутрашњег апоптотског пута, *Bax* и *Bcl-2* гена. У литератури постоје подаци који говоре о способности мелитина да деполарише мембрану митохондрија и активира ефекторне каспазе (Сегетуга и сар., 2020). За разлику од НСТ-116 и SW-480 ћелија, у НТ-29 ћелијама, долази до смањења каспазе 9 и на генском и на протеинском нивоу, до повећања проапоптотског гена *Bax*, али и до много значајнијег повећања антиапоптотског *Bcl-2* гена. С обзиром на важност равнотеже између ових параметара, могуће је да долази до ремећења равнотеже, али у корист антиапоптотског протеина. Овај резултат указује на неактивност унутрашњег апоптотског пута у овој ћелијској линији. Резултати испитивања редокс зависне индукције апоптозе, у корелацији су са резултатима укупног отрова пчеле. Под утицајем мелитина долази до још блажих промена у концентрацији редокс параметара у свим тестираним ћелијским линијама него код укупног отрова пчеле. Ово указује да је механизам проапоптотског дејства мелитина редокс независан и више везан за неке друге окидаче. Према литератури, липидни пероксиди се под утицајем мелитина могу образовати као последица његовог уласка у ћелије, јер долази до ремећења интегритета мембране. Наиме, пролазак мелитина кроз ћелијску мембрану доводи до повећане продукције MDA у ћелијској линији меланома A375 и карцинома дојке MCF7, у односу на ћелије које нису третиране (Shaw и сар., 2019). Ово може такође довести до повећања параметара липидне пероксидације у ћелијама, поред оксидативног стреса. То би могло објаснити повећања концентрације MDA у SW-480 и НТ-29 ћелијама.

L-аминокиселинска оксидаза. Према нашим сазнањима, у литератури постоји јако мало података о механизму проапоптотског деловања L-аминокиселинске оксидазе, на карциному дебелог црева (Zainal Abidin и сар., 2018). L-аминокиселинска оксидаза доводи до активације спољашњег апоптотског пута у свим испитиваним линијама карцинома дебелог црева (НСТ-116, SW-480 и НТ-29), с обзиром на значајно повећање протеинске експресије Fas рецептора и генске експресије каспазе 8, чија је активност такође повишена. Генска експресија каспазе 8 снижена је само у НТ-29 ћелијама, међутим повећање активности протеина указују на активност спољашњег апоптотског пута. Јасне промене у одговарајућим маркерима унутрашњег апоптотског пута указују на његову активацију у SW-480 ћелијама, где је повећана генска експресија *Bax* и *Bcl-2*, у корист проапоптотског *Bax*-а, затим и протеинска и генска експресија каспазе 9. С обзиром да у SW-480 ћелијама повећање активности каспазе 8 није статистички значајно у односу на контролне ћелије, и упркос повећању протеинске експресије Fas-а може се закључити да је у овим ћелијама доминантно активиран унутрашњи апоптотски пут под утицајем L-аминокиселинске оксидазе. У литератури постоји податак да L-аминокиселинска оксидаза пореклом из врсте змије *Cryptelytrops purpureomaculatus*, утиче на смањење антиапоптотског протеина и до активације ефекторне каспазе 3, на SW-480 и SW-620 ћелијским линијама карцинома дебелог црева (Zainal Abidin и сар., 2018). У НСТ-116 ћелијама, резултати указују на велику предност антиапоптотског гена, те је могуће да долази до прекида сигнала, с обзиром на супресију каспазе 9 на генском нивоу. L-аминокиселинска оксидаза показује значајну разлику у деловању на НТ-29 ћелијама у односу на претходно објашњене третмане. Овај третман генерално доводи до промена на



митохондријама у НТ-29 ћелијама, до повећања експресије проапоптског *Bax*, док је антиапоптотски *Bcl-2* снижен и до повећања *каспазе 9* на генском нивоу у нижој концентрацији, која још увек није детектована на протеинском нивоу.

У случају овог третмана можемо говорити о редокс зависној индукцији апоптозе и оксидативном стресу као механизму одговорном за њено покретање. У литератури постоје подаци да је најчешћи механизам деловања L-аминокиселинских оксидаза, управо ремећење редокс равнотеже и повећање H_2O_2 (Paloschi и сар., 2018). Повећање концентрације O_2^- у ћелијама третираним L-аминокиселинском оксидазом указују на њено прооксидативно дејство и иде у прилог претпоставци других аутора да је ремећење редокс равнотеже један од главних механизма деловања ових ензима (Paloschi и сар., 2018). Повећањем концентрација O_2^- , L-аминокиселинска оксидаза умногоме доприноси индукцији апоптозе. Такође значајна повећања у нивоу GSH, указују да у случају деловања овог третмана долази до повећања нивоа оксидативног стреса, за разлику од претходних третмана. Ово повећање глутатиона значи да долази до његове синтезе *de novo* и вероватно повећања и оксидоване форме. На основу резултата повећане протеинске експресије GSS, може се закључити да се у овим третманима глутатион *de novo* синтетише услед потребе да одбрани ћелије од оксидативног стреса. Протеин GSS је битан учесник у путу синтезе ћелијског GSH, јер каталише реакцију спајања γ -глутамилцистеин и глицина (Bansal и Simon, 2018). Са друге стране, GSH може да индукује апоптозу тако што његово трошење доводи до активације каспаза (Trachootham и сар., 2008), што је у складу са добијеним резултатима његове повишене концентрације под утицајем L-аминокиселинске оксидазе. Оксидативног стрес може довести до оштећења ћелија и ћелијских компоненти, као што су липиди у ћелијској мембрани (Avery, 2011). Концентрација малондиалдехида (MDA), значајно је повећана у ћелијама НСТ-116 третираним L-аминокиселинске оксидазе, у поређењу са контролом, док није примећено код SW-480 и НТ-29 ћелија, што указује да у њима нема оштећења мембране.

Биотрансформација третмана и потенцијална употреба за превазилажење резистенције

Метаболизам лекова у туморским ћелијама одређује даљу судбину антитуморских супстанци у смислу стварања мање или више токсичних једињења, која ће се задржати у ћелијама или бити елиминисана (Gao и сар., 2013; Housman и сар., 2014). У овој докторској дисертацији је за ћелије карцинома дебелог црева, третиране отровом пчеле, мелитином и L-аминокиселинском оксидазом, по први пут дат профил генске експресије одговарајућих ензима који учествују у метаболизму ксенобиотика и мембранских транспортера одговорних за њихову елиминацију. Генерално, промене у нивоима ових ензима и мембранских транспортера могу бити одговорне за појаву резистенције малигних ћелија.

Отров пчеле. Експресија гена за ензиме укључене у процесе прве и друге фазе биотрансформације ксенобиотика, *CYP1A1*, *CYP1B1*, и *GSTP1*, значајно је смањена под утицајем отрова пчеле на НСТ-116 и SW-480 ћелијама. Смањење ових параметара указује на чињеницу да не долази до значајне метаболичке обраде отрова пчеле, с обзиром да су по литератури *CYP1A1* и *CYP1B1* одговорни за оксидовање ксенобиотика (Katzung, 2018),



а *GSTP1* за његово конјуговање са глутатионом (Bedford и сар., 2012). Поред тога, показано је да управо инхибиција ових ензима може бити терапијска мета, сходно томе да је њихова појачана активност један од кључних механизма туморских ћелија да развију резистенцију на цитостатик (Mansoori и сар., 2017; Bulus и сар., 2019). У том смислу могу бити употребљени као комбинована терапија са одоварајућим цитостатиком, са циљем инхибиције генске експресије ових ензима.

На основу литературних података, у карциному дебелог црева постоји повећана експресија П-гликопротеина, а затим и протеина MRP1 и MRP2 (Berggren и сар., 2007). У нашим резултатима, повећање генске експресије ABC транспортера у НСТ-116 ћелијама, MRP1 и MRP2, указује на могућност да се преко њихових протеинских продуката избацује ксенобиотик из НСТ-116 ћелија. У SW-480 ћелијама долази до повећања MRP1 а до смањења MRP2. Међутим, смањена експресија *GSTP1*, као и благе промене у нивоу GSH, указују да у овим ћелијама не долази до конјугације отрова са глутатионом, те могуће да се његово изbacивање преко ових експортних пумпи не дешава, без обзира на повећање њихове генске експресије. Са друге стране, у НСТ-116 и SW-480 ћелијама долази до значајног смањења генске и протеинске експресије *PGP1*, који има широку супстратну специфичност. Његова инхибиција је јако битна за потенцијално отклањање развоја резистенције. Заправо, све чешћа су истраживања нових супстанци пореклом из природе које ће деловати инхибиторно на *PGP1*, његове експресије и/или активности овог транспортера (Abdallah и сар., 2015).

Са друге стране, отров пчеле показује другачије ефекте на НТ-29 ћелије у смислу експресије испитиваних гена, што може бити узрок њихове слабије осетљивости на третман у поређењу са НСТ-116 и SW-480 ћелијама. На основу резултата значајно повећане експресије гена *CYP1A1*, *CYP1B1*, и *GSTP1*, може се претпоставити да у њима долази до активног метаболизма овог третмана. Метаболизам ксенобиотика у ћелијама је процес којим могу настати слабији или јачи метаболити од почетне супстанце (Orhan и сар., 2021). Са тим у вези, могућ је настанак мање активних метаболита у НТ-29 ћелијама, где се активне супстанце метаболизмом мењају и не испољавају свој максимални ефекат у односу на друге две ћелијске линије. Међутим, у НТ-29 ћелијама долази до значајне супресије свих ABC транспортера, што указује на акумулацију метаболисаних супстанци отрова пчеле у овим ћелијама. Управо овај резултат даје могућност за употребу отрова пчеле као инхибитора ABC транспортера, који представљају главне елиминаторе цитостатика из туморских ћелија.

Мелитин. Мелитин, као доминантна компонента отрова пчеле, показује јако сличне ефекте на испитиване гене као и сам отров. Разлици у деловању највероватније доприноси мешовити састав отрова. Мелитин, такође, доводи до смањења експресије метаболитских гена у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, што указује да не представља супстрат за деловање њихових протеинских продуката. Обзиром на инхибицију гена за ензиме прве фазе метаболизма, инхибиран је и ген за ензим из друге фазе - *GSTP1*, што све комплетно говори да нема конјугације метаболита мелитина са GSH. Због тога повећање генске експресије MRP1 (у обе линије у нижој концентрацији мелитина) и MRP2 (само у НСТ-116) вероватно не доводи до изbacивања мелитина из ћелије. Сnižена експресија *PGP1* гена у SW-480 и НТ-29 представља значајан резултат у смислу могуће терапијске



примене. Експресија *PGP1* је повећана на генском нивоу само у НСТ-116 ћелијама, али је на протеинском нивоу снижена, што може указати на задржавање третмана у овим ћелијама и испољавања његовог антитуморског дејства.

У НТ-29 ћелијама долази до активног метаболисања мелитина, с обзиром на значајно повећање свих метаболишућих гена (*CYP1A1*, *CYP1B1*, и *GSTP1*). Такође, значајно је повећан и *MRP2* на генском нивоу што указује на могућност метаболисања и избацивања конјугата путем овог транспортера што објашњава слабију активност мелитина на овим ћелијама у поређењу са друге две ћелијске линије.

L-аминокиселинска оксидаза. С обзиром на цитотоксични ефекат L-аминокиселинске оксидазе, као и оксидативни стрес који изазива у ћелијама очекивано је да ће ћелије карцинома дебелог црева реаговати на третман тако што активирају метаболичке ензиме и покушавају да се изборе избацивањем L-аминокиселинске оксидазе из ћелије. На активни метаболизам у свим тестираним ћелијама указују значајна повећања метаболичких гена *CYP1A1*, *CYP1B1*, и *GSTP1*, као и значајно повећање GSH у циљаним концентрацијама (2 и 5 µg/ml). Повећање *MRP2* у свим ћелијама указује на потенцијално избацивање L-аминокиселинске оксидазе као конјугата претходно метаболисаног једињења у првој фази биотрансформације, конјугованих са GSH уз помоћ *GSTP1*, чија је генска експресија такође повишена. Смањење експресије *PGP1* на генском (осим у ћелијама НСТ-116) и протеинском нову у свим ћелијама указује да L-аминокиселинска оксидаза није супстрат за *PGP1* и последично на њену потенцијалну примену. Генерално смањење протеинске експресије *PGP1* у SW-480 и НТ-29 ћелијама под утицајем L-аминокиселинске оксидазе је добар резултат, у смислу њеног потенцијалног развоја као инхибитора овог мембранског транспортера и превазилажења резистенције, с обзиром да се овај транспортер највише доводи у везу са њеним развојем.

Многе природне супстанце, углавном феноли из биљака, поседују ову способност, да смање експресију или активност ефлукс пумпи, које се могу користити за побољшање ефикасности цитостатика (Sjostedt и сар., 2017; Milutinović и сар., 2019). Прекомерна експресија метаболичких гена и мембранских транспортера у туморским ћелијама одговорна је за акумулацију, дистрибуцију и избацивање многих хемиотерапеутика (Akhdar и сар., 2012; Bukowski и сар., 2020). Без обзира на порекло из истог органа ових ћелијских линија, уочавају се различити профили, у смислу осетљивости и реаговања на третман, као и могућности развоја или спречавања настанка резистенције. Испитивани третмани имају добру основу да се детаљније испитају у овом правцу, који би довео до евентуалне примене ових једињења у комбинацији са одговарајућим цитостатацима.



VI ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације, могу се извести

Општи закључци:

- ❧ Испитивани третмани отрова пчеле (*Apis mellifera*) и отрова змије (*Vipera ammodytes*), као и мелитин (заступљен у отрову пчеле) и L-аминокиселинска оксидаза (заступљена у отрову змије), делују цитотоксично на ћелијске линије карцинома дебелог црева (HCT-116, SW-480 и HT-29). Ћелијска линија HT-29 је најмање осетљива на све третмане, у поређењу са друге две ћелијске линије пореклом из истог органа, HCT-116 и SW-480, које показују сличну осетљивост на испитиване третмане. Најбољу цитотоксичност на испитиваним линијама постигао је отров змије, као и L-аминокиселинска оксидаза. Испитивани третмани најмању цитотоксичност испољавају на здравим ћелијама (HaCaT), што указује на селективност у њиховом деловању.
- ❧ Отров пчеле, мелитин и L-аминокиселинска оксидаза делују проапоптотски, што је добар резултат за потенцијалну примену и даље проучавање третмана обзиром да апоптоза представља жељени тип ћелијске смрти изазване третманом. Отров змије, за разлику од претходних третмана, цитотоксичне ефекте постиже изазивањем некрозе.
- ❧ Отров пчеле и мелитин доводе до покретања спољашњег и унутрашњег пута апоптозе у HCT-116 и SW-480 ћелијама, док је у HT-29 ћелијама активиран само спољашњи апоптотски пут. L-аминокиселинска оксидаза изазива активацију и спољашњег и унутрашњег апоптотског пута у све три испитиване ћелијске линије, док је у SW-480 ћелијама доминантано активиран унутрашњи апоптотски пут.
- ❧ Отров пчеле и мелитин доводе до промена у концентрацији параметара редокс статуса, у зависности од коришћених концентрација, али су оне благе и нису пресудне у покретању апоптозе на испитиваним ћелијским линијама карцинома дебелог црева. За разлику од њих, L-аминокиселинска оксидаза показује прооксидативну активност и доводи до редокс зависне модулације процеса апоптозе.
- ❧ Испитивани третмани показују значајне ефекте на експресију гена прве и друге фазе биотрансформације (*CYP1A1*, *CYP1B1* и *GSTP1*) и на експресију ABC



транспортера на генском (*PGP1*, *MRP1* и *MRP2*) и протеинском нивоу (*PGP1*), као молекула који играју важну улогу у метаболисању ксенобиотика у ћелијама, али и развоју резистенције туморских ћелија. Ефекти различитих третмана се међусобно разликују, а уочене су и разлике у одговорима на третмане међу ћелијским линијама. Добијени резултати инхибиторне активности на гене појединих фаза метаболисања лека даје значајан допринос за даља испитивања ових супстанци као потенцијалних инхибитора у појединачним или комбинованим третманима са одговарајућим цитостатичима.

Специфични закључци:

- ❧ Отров пчеле показује значајну цитотоксичност на испитиваним линијама карцинома дебелог црева, као и селективност обзиром на слабију цитотоксичност на здравим ћелијама у испитиваним концентрацијама. Отров пчеле показује проапоптотску активност, при чему се молекуларни механизми апоптозе разликују на НТ-29 ћелијама, код којих је апоптоза активирана само преко спољашњег пута, које показују највећу стабилност у одржавању редокс равнотеже и самим тим најмању осетљивост на дејство третмана. Спољашњи апоптотски пут је активиран у све три ћелијске линије, на шта указује повишена експресија *Fas* рецептора на мембранама и повишена активност каспазе 8. Унутрашњи апоптотски пут је активиран у НСТ-116 и SW-480 ћелијама, на шта указују промене у експресији гена из *Bcl-2* фамилије и повишена експресија каспазе 9. Отров пчеле доводи до смањења метаболичких гена прве и друге фазе биотрансформације, као и *PGP1* у испитиваним линијама, па је погодан за даља испитивања у смеру комбинованих третмана у циљу смањења ризика од појаве резистенције.
- ❧ Мелитин испољава нешто блаже цитотоксично и проапоптотско дејство у односу на укупни отров, али је механизам деловања исти. Остале компоненте отрова доприносе јачем ефекту, али би се на основу резултата могло закључити да је за цитотоксичну активност отрова заправо одговоран мелитин. Повољни резултати указују на то да је и мелитин, као чиста супстанца погодан за даља испитивања у циљу превазилажења проблема резистенције, обзиром да доводи до инхибиције метаболичких ензима, као и протеинске експресије *PGP1* у НСТ-116 и SW-480 ћелијама.
- ❧ L-аминокиселинска оксидаза показује најјачу временски зависну цитотоксичну и проапоптотску активност у поређењу са осталим третманима, али и слабију селективност. Механизам њихове проапоптотске активности је повезан са изазивањем оксидативног стреса у испитиваним ћелијама, за разлику од осталих третмана. У НТ-29 ћелијама долази до промена на митохондријама и активирања унутрашњег апоптотског пута, али су отпорније на дејство L-аминокиселинске оксидазе у поређењу са осталим линијама пореклом из карцинома дебелог црева. Експресија гена за метаболичке ензиме је повишена као одговор на третман, па



се може претпоставити да је L-аминокиселинска оскидаза супстрат за њихово деловање. Генерално постоји тренд смањења протеинске експресије PGP1, што овом третману даје могућност даљег испитивања као инхибитора експресије и/или активности ове пумпе.

Коначан закључак:

На основу добијених и дискутованих резултата у оквиру ове докторске дисертације, може се закључити да су животињски отрови и супстанце које улазе у њихов састав мало испитиване, а показују изузетан антитуморски потенцијал. Отров пчеле, мелитин и L-аминокиселинска оскидаза, као супстанце са јаким цитотоксичним активностима, које своју цитотоксичност постижу индукцијом апоптозе, представљају супстанце са високим потенцијалом за даље фазе испитивања. На примеру отрова змије, показана је и разлика у ефектима укупног отрова и појединачне супстанце (L-аминокиселинске оксидазе), што нам сугерише да отрове не треба занемарити због њихове токсичне природе, јер су извор многих компоненти са повољним биолошким ефектима и са великим потенцијалом у сврху лечења. Посебан значај добијених резултата се односи на инхибиторне ефекте експресије појединих гена за метаболичке ензиме и мембранске транспортере, као потенцијалне мете, обзиром да им се приписује главна улога у развоју резистенције туморских ћелија. Даља евалуација ових маркера, као и испитиваних третмана је посебно важна, обзиром да се велике наде полажу у супстанце природног порекла и њихов потенцијал у спречавању развоја резистенције тумора.

VII ЛИТЕРАТУРА

1. Abbott A. Cell culture: Biology's new dimension. *Nature*. 2003; 424(6951): 870.
2. Abdallac FC, da Cruz-Ladim C. Dufour glands in the hymenopterans (*Apidae*, *Formicidae*, *Vespidae*): a review. *Revista Brasileira de Biologia*. 2001; 61(1): 55–106.
3. Abdallah HM, Al-Abd AM, SalahEl-Dine R, El-Halawany AM. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *Journal of Advanced Research*. 2015; 6(1): 45–62.
4. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007; 26: 1324–1337.
5. Ahmed M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Research*. 2020; 13(1): 1–10.
6. Akhdar H, Legendre C, Aninat C, Morel F. Anticancer drug metabolism: chemotherapy resistance and new therapeutic approaches. In: James Paxton: Topics on Drug Metabolism. IntechOpen, 2012.
7. Ali MAAM. Studies on bee venom and its medical uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*. 2012; 1(2): 69–83.
8. Al-Snafi AE. Medicinal plants with anticancer effects (part 2)- plant based review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. 2016; 5(5): 175–193.
9. An HJ, Kim JY, Kim WH, Gwon MG, Gu HM, Jeon MJ, Han SM, Pak SC, Lee CK, Park S, Park KK. Therapeutic effects of bee venom and its major component, melittin, on atopic dermatitis *in vivo* and *in vitro*. *British Journal of Pharmacology*. 2018; 175(23): 4310–4324.
10. Anđelković Z, Somer Lj, Avramović V, Milosavljević Z, Tanasković I, Matavulj M, Perović M, Nikolić I, Rančić G, Lalošević D, Milenkova Lj, Danilović V, Petrović A. Histologija. Impresum, Niš, 2009.
11. Anđelković Z, Somer Lj, Perović M, Avramović V, Milenkova Lj, Kostovska N, Petrović A. Histološka građa organa. Bonafides, Niš, 2001.
12. Arbuckle K. Evolutionary context of venom in animals. *Evolution of venomous animals and their toxins*. 2017; 24: 3–31.
13. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. Handbook of methods for oxygen radical research. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1985.

14. Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Journal of Biochemistry*. 2011; 434(2): 201–210.
15. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical Biochemistry*. 1990; 190(2): 360–365.
16. Bakos É, Evers R, Sinkó E, Váradi A, Borst P, Sarkadi B. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *Molecular Pharmacology*. 2000; 57(4): 760–768.
17. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*. 2018; 217(7): 2291–2298.
18. Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN. Analysis of cyclohexamide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International*. 2006; 30: 924–932.
19. Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, Schrenk D, Lennerna H. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Molecular Pharmaceutics*. 2007; 4(2): 252–257.
20. Beyerle J, Frei E, Stiborova M, Habermann N, Ulrich CM. Biotransformation of xenobiotics in the human colon and rectum and its association with colorectal cancer. *Drug Metabolism Reviews*. 2015; 1–23.
21. Bhattacharjee P, Mitra J, Bhattacharyya D. L-Amino Acid Oxidase from venoms. *Toxins and Drug Discovery*. 2017; 295–320.
22. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(14): 6319–6323.
23. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2003; 15: 725–731.
24. Bogdanov S. Propolis: composition, health, medicine: a review. Bee Product Science, 2017.
25. Bogdanović AS. Prognostički značaj biomarkera epitelnomezehimalne tranzicije kod metastatskog kolorektalnog karcinoma u jetri. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2021.
26. Bordon KCF, Cologna CT, a Fornari-Baldo EC, Pinheiro-Junior EL, Cerni FE, Amorim FG, Anjolette FAP, Cordeiro FA, Wiesel GA, Cardoso IA, Gobbo Ferreira I, de Oliveira SI, Boldrini-Franc J, Pucca MB, Baldo MA Candiani Arantes E. From animal poisons and

- venoms to medicines: achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11: 1132.
27. Bredel M. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Research Reviews*. 2001; 35(2): 161–204.
 28. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1987; 52: 302–310.
 29. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Science*. 2020; 21(9): 3233.
 30. Bulus H, Oguztuzun S, Güler Simsek S, Kilic M, Oguz Ada A, Göl S, Kaya Kocdogan K, Kaygin P, Bozer B, Iscan M. Expression of CYP and GST in human normal and colon tumor tissues. *Biotechnic & Histochemistry*. 2019; 94(1): 1–9.
 31. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000; 25: 169–193.
 32. Calvete JJ. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013; 75(1): 44–62.
 33. Camps J, Armengol G, del Rey J, Lozano JJ, Vauhkonen H, Prat E, Egozcue J, Sumoy L, Knuutila S, Miro R. Genome-wide differences between microsatellite stable and unstable colorectal tumors. *Carcinogenesis*. 2006; 27(3): 419–428.
 34. Carini F, Mazzola M, Rappa F, Jurjus A, Gerges Geagea A, Al Kattar S, Bou-Assi T, Jurjus R, Damiani P, Leone A, Tomasello G. Colorectal carcinogenesis: role of oxidative stress and antioxidants. *Anticancer Research*. 2017; 37(9): 4759–4766.
 35. Casewell NR, Jackson TNW, Laustsen AH, Sunagar K. Causes and consequences of snake venom variation. *Trends in Pharmacological Science*. 2020; 41(8): 570–581.
 36. Ceremuga M, Stela M, Janik E, Gorniak L, Synowiec E, Sliwinski T, Sitarek P, Saluk-Bijak J, Bijak M. Melittin—a natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells. *Biomolecules*. 2020;10: 247.
 37. Chakrabarty D, Sarkar A. Cytotoxic Effects of Snake Venoms, Springer Science, Business Media Dordrecht 2016.
 38. Chang DW, Vanessa ZX, Marcus EC, Yang PX. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *The EMBO Journal*. 2003; 22: 4132–4142.
 39. Chang PY, Chen JS, Chang SC, Wang MC, Chang NC, Wen YH, Tsai WS, Liu WH, Liu HL, Lu JJ. Acquired somatic TP53 or PIK3CA mutations are potential predictors of when polyps evolve into colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(42):72352–62.

40. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DCS. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. *Molecular Cell*. 2005; 17(3): 393–403.
41. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987; 162: 156–159.
42. Circu LT, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48(6): 749–762.
43. Cui Q, Wang JQ, Assaraf YG, Ren L, Gupta P, Wei L, Ashby CR, Yang DH, Chen ZS. Modulating ROS to overcome multidrug resistance in cancer. *Drug Resistance Updates*. 2018; 41: 1–25.
44. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019; 43(2019): 582–592.
45. Dajas F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012; 143(2): 383–396.
46. Davis JW, Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001; 296(1): 1–6.
47. Deng J, Lei W, Fu JC, Zhang L, Li JH, Xiong JP. Targeting miR-21 enhances the sensitivity of human colon cancer HT-29 cells to chemoradiotherapy in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014; 443(3): 789–795.
48. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003; 43(2003): 149.
49. Dong J, Qinc Z, Zhangd WD, Cheng G, Yehudae AG, Ashby Jrf CR, Chenf ZS, Chenga XD, Qina JJ. Medicinal chemistry strategies to discover P-glycoprotein inhibitors: An update. *Drug Resistance Updates*. 2020; 49(2020):100681.
50. Dotimas EM, Hider RC Honeybee Venom. *Bee World*. 1987; 68(2): 51–70.
51. Du XY, Clemetson KJ. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. *Toxicon*. 2002; 40: 659–665.
52. Ejendal KF, Hrycyna CA. multidrug resistance and cancer: The role of the human ABC transporter ABCG2. *Current Protein and Peptide Science*. 2002; 3(5): 503–511.
53. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*. 2013; 1–14.
54. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, Day F, Li S, Tsui C, Lipton L, Desai J, Jones IT, McLaughlin S, Ward RL, Hawkins NJ, Ruzskiewicz AR, Moore J, Zhu HJ, Mariadason JM, Burgess AW, Busam D, Zhao Q,

- Strausberg RL, Gibbs P, Sieber OM. SMAD2, SMAD3 and SMAD4 mutations in colorectal cancer. *Cancer Research*. 2013; 73(2): 725–735.
55. Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J. The role of inflammation in colon cancer pathogenesis. *Postępy Hig Med Dosw*. 2016; 70: 360-366.
 56. Francuz T, Czajka-Francuz P, Cisoń-Jurek S, Wojnar J. The role of inflammation in colon cancer pathogenesis. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2016; 70: 360–366.
 57. Freshney RI, Frame MC. Culture of endothelial cells for the study of angiogenesis *in vitro*. The endothelial cell - a pluripotent control cell of the vessel wall. 1st International Endothelial Cell Symposium of the ETCS, Paris, July 1982, pp 13-28.
 58. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*. 2009; 124(3): 511–515.
 59. Gajski G, Domijan AM, Žegura B, Štern A, Gerić M, Novak Jovanović I, Vrhovac I, Madunić J, Breljak D, Filipič M, Garaj-Vrhovac V. Melittin induced cytogenetic damage, oxidative stress and changes in gene expression in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicon*. 2016; 110: 56–67.
 60. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2013; 36(2013): 697–705.
 61. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*. 2017; 104(2017): 144–164.
 62. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, Tavernarakis N, Penninger J, Madeo F, Kroemer G. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15(2018): 1113–1123.
 63. Gan Q, Jin W, Ju H, Guan L, Hai X, Cheng P, and Qin H. Modulation of apoptosis by plant polysaccharides for exerting anti-cancer effects: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11(2020): 792.
 64. Gao F, Zhang JM, Wang ZG, Peng W, Hu HL, Fu CM. Biotransformation, a promising technology for anti-cancer drug development. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013; 14(10): 5599–5608.
 65. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017; 482(2017): 419–425.
 66. Georgieva D, Arni RK, Betzel C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. *Expert Rev. Proteomics*. 2008; 5(6): 787–797.
 67. Giam M, Huang DCS, Bouillet P. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene*. 2008; 27(1): 128–136.

68. Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. 2013; 105(7): 105(7): 452–8.
69. Glättli A, Chandrasekhar I, van Gunsteren WF. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. *European Biophysics Journal*. 2006; 35: 255–267.
70. Gomes A, Bhattacharjee P, Mishra R, Biswas AK, Dasgupta SC, Giri B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010; 48(2): 93–103.
71. Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human Cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metabolism Reviews*. 1994; 26(1-2): 165–183.
72. Gopcevic K, Karadzic I, Izrael-Zivkovic L, Medic A, Isakovic A, Popovic M, Kekic D, Stanojkovic T, Hozic A, Cindric M. Study of the venom proteome of *Vipera ammodytes ammodytes* (Linnaeus, 1758): A qualitative overview, biochemical and biological profiling. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*. 2021; 37(2021): 100776.
73. Gristan YD, Moosavi L. "Folinic Acid." StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2021.
74. Guengerich FP. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. 2007; 21(1): 70–83.
75. Guha T, Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li–Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7: a026187.
76. Guha T, Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li–Fraumeni Syndrome. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2017; 7: a026187.
77. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012; 16(11): 1295–1322.
78. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007; 292: 45–51.
79. Haber M, Smith J, Bordow SB, Flemming C, Cohn SL, London WB, Marshall GM, Norris MD. Association of high-level *MRP1* expression with poor clinical outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2006; 24(10): 1546–1553.
80. Habermann E. Melittin - structure and activity. Natural Toxins Proceedings of the 6th International Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins, Uppsala, 1980, Pages 173–181.
81. Hail JN, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 2006; 11(6): 889–904.

82. Harlev E, Nevo E, Lansky EP, Lansky S, Bishayee A. Anticancer attributes of desert plants. *Anti-Cancer Drugs*. 2012; 23(3): 255–271.
83. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020; 38(2): 167–197.
84. He SM, Li R, Kanwar JR Zhou SF. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18: 439-481.
85. Heyman S, Rosen S, Khamaisi M, Jean-Marc I, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Investigative Radiology*. 2010; 45(4): 188–195.
86. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Z, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 38610–38618.
87. Hilmi O, Fuat K, Ali E. Mitochondrial biotransformation of drugs and other xenobiotics. *Current Drug Metabolism*. 2021; 22(8): 657–669.
88. Horn S, Hughes MA, Schilling R, Sticht C, Tenev T, Ploesser M, Meier P, Sprick MR, MacFarlane M, Leverkus M. Caspase-10 negatively regulates caspase-8-mediated cell death, switching the response to CD95L in favor of NF- κ B activation and cell survival. *Cell Reports*. 2017; 19(4): 785–797.
89. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers*. 2014; 6(3): 1769–1792.
90. Howells LM, Mitra A, Manson MM. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *International Journal of Cancer*. 2007; 121: 175–183.
91. Huang K, O'Neill KL, Li J, Zhou W, Han N, Pang X, Wu W, Struble L, Borgstahl G, Liu Z, Zhang L, Luo X. BH3-only proteins target BCL-xL/MCL-1, not BAX/BAK, to initiate apoptosis. *Cell Research*. 2019; 29: 942–952.
92. Hwang DS, Kim SK, Bae H. Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*. 2015; 7(7): 2413–2421.
93. Ibrahim MFM, Ibrahim HA, Abd El-Gawad HG. Folic acid as a protective agent in snap bean plants under water deficit conditions. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2021; 96(1): 94–109.
94. Ikehata M, Ogawa M, Yamada Y, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different effects of epigenetic modifiers on the cytotoxicity induced by 5-fluorouracil, irinotecan or oxaliplatin in colon cancer cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2014; 37(1): 67–73.

95. Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Can CYP Inhibition Overcome Chemotherapy Resistance? *Trends in Pharmacological Sciences*. 2020; 41(8): 503–506.
96. Ivanisenko NV, Lavrik IN. Mechanisms of procaspase-8 activation in the extrinsic programmed cell death pathway. *Molecular Biology*. 2019; 53(5): 732–738.
97. Jain D, Kumar S. Snake venom: a potent anticancer agent. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012; 13(10): 4855–4860.
98. Jan R, Chaudhry GS. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2019; 9(2): 205–218.
99. Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2006; 2(3): 351–366.
100. Jeong CH, Joo SH. Down regulation of reactive oxygen species in apoptosis. *Journal of Cancer Prevention*. 2016; 21(1): 13–20.
101. Jiahua C, Xiaoyang L, Larry MCC. Flavonoids as P-gp Inhibitors: A systematic review of SARs. *Current Medicinal Chemistry*. 2019; 26(25): 4799–4831.
102. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*. 2017; 24: 1380–1389.
103. Karabuva S, Lukšić B, Brizić I, Latinović Z, Leonardi A, Križaj I. Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Toxicon*. 2017; 139(1): 94–100.
104. Kasi A, Handa S, Bhatti S, Umar S, Bansal A, Sun W. Molecular pathogenesis and classification of colorectal carcinoma. *Current Colorectal Cancer Reports*. 2020; 16(5): 97–106.
105. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. Fourteenth Edition, Lange medical book, 2018.
106. Kaushik N, Uddin N, Sim GB, Hong YJ, Baik KY, Kim CH, Lee SJ, Kaushik NK, Choi EH. Responses of solid tumor cells in DMEM to reactive oxygen species generated by non-thermal plasma and chemically induced ROS systems. *Scientific Reports*. 2015; 5: 8587.
107. Kim AY, Kwak JH, Je NK, Lee YH, Jung YS. Epithelial-mesenchymal transition is associated with acquired resistance to 5-fluorouracil in HT-29 colon cancer cells. *Toxicological Research*. 2015; 31: 151–156.
108. Kim SJ, Kim HS, Seo YR. Understanding of ROS-inducing strategy in anticancer therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; (2019): 1–12.
109. Koha CYR, Kini M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*. 2012; 59(4): 497–506.

110. Kumar A, Jaitak V. Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 176(15): 268–291.
111. Kumari A, Ameri S, Marraiki N, Elgorban AM, Aroulmoji V, Ponnuchamy K, Govarthanan M, Selvankumar T. Isolation, characterization and in-silico study of conotoxin protein from *Conus lorioisii* and its anti-cancer activity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021; 27: 385–395.
112. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–685.
113. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *Journal of Cell Science*. 2005; 118(2): 265–267.
114. Lawen A. Apoptosis—an introduction. *BioEssays*. 2003; 25(9): 888–96.
115. Lee HL, Park SH, Kim TM, Jung YY, Park MH, Oh SH, Yun HS, Jun HO, Yoo HS, Han SB, Lee US, Yoon JH, Song MJ, Hong JT. Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice. *Oncotarget*. 2015; 6(9): 7280–92.
116. Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2005; 2: 397319.
117. Lee WR, Pak SC, Park KK. The protective effect of bee venom on fibrosis causing inflammatory diseases. *Toxins*. 2015; 7(11): 4758–4772.
118. Leonardi A, Fox JW, Trampuš-Bakija A, Križaj I. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. *Toxicon*. 2007; 49(6): 833–842.
119. Leonardi A, Gubenšek F, Križaj I. Purification and characterisation of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. *Toxicon*. 2002; 40(1): 55–62.
120. Leonardi A, Sajevec T, Latinovic Z, Pungercar J, Lang Balija M, Trampus Bakija A, Vidmar R, Halassy B, Krizaj I. Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie*. 2015; 109: 78–87.
121. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 204(3): 216–237.
122. Lester GE. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *Horticultural Science*. 2006; 41: 59–64.

123. Li D, Zhou L, Huang J, Xiao X. Effect of multidrug resistance 1/P-glycoprotein on the hypoxia-induced multidrug resistance of human laryngeal cancer cells. *Oncology Letters*. 2016; 12(2): 1569–1574.
124. Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu J, Zheng X, Li Q. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 2017; 8(14): 23996–24008.
125. Li ZY, Yu TF, Lian CY. Purification and characterization of l-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon*. 1994; 32(11): 1349–1358.
126. Lin Z, Lin J, Shen J, Jiang M, Hou Y. Flavonoids in *Ageratum conyzoides* L. exert potent antitumor effects on human cervical adenocarcinoma HeLa cells *in vitro* and *in vivo*. *BioMed Research International*. 2020; 2020: 2696350.
127. Lindblom AMD. Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Current Opinion in Oncology*. 2001; 13: 63–69.
128. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*. 2010; 44(5): 479–496.
129. Liu CC, Yang H, Zhang LL, Zhang Q, Chen B, Wang Y. Biotoxins for cancer therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014; 15(12): 4753–4758.
130. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Research*. 1991; 51(12): 3075–3079.
131. Logonder U, Jenko-Pražnikar Z, Scott-Davey T, Pungerčar J, Križaj I, Harris JB. Ultrastructural evidence for the uptake of a neurotoxic snake venom phospholipase A2 into mammalian motor nerve terminals. *Experimental Neurology*. 2009; 219(2): 591–594.
132. Luo X, O'Neill KL, Huang K. The third model of Bax/Bak activation: a Bcl-2 family feud finally resolved? *F1000Research*. 2020; 9(Faculty Rev): 935.
133. Mamlouk S, Simon T, Tomás L, Wedge DC, Arnold A, Menne A, Horst D, Capper D, Morkel M, Posada D, Sers C, Bläker H. Malignant transformation and genetic alterations are uncoupled in early colorectal cancer progression. *BMC Biology*. 2020; 18(1): 116.
134. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2017; 7(3): 339–348.
135. Manzat Saplacan RM, Balacescu L, Gherman C, Chira RI, Craiu A, Mircea PA, Lisencu C, Balacescu O. The role of PDGFs and PDGFRs in colorectal cancer. *Mediators of Inflammation*. 2017; 2017: 1–9.
136. Marques SM, Šupolíková L, Molčanová L, Šmejkal K, Bednar D, Slaninová I. Screening of natural compounds as P-glycoprotein inhibitors against multidrug resistance. *Biomedicines*. 2021; 9(4): 357.

137. Martin SJ, Dilsb V, Billen J. Morphology of the Dufour gland within the honey bee sting gland complex. *Apidologie*. 2005; 36(2005): 543–546.
138. Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2016; 43–87.
139. Matsuura K, Canfield K, Feng W, Kurokawa, M. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2016; 43–87.
140. Mazur P. Cryobiology: The freezing of biological systems: The responses of living cells to ice formation are of theoretical interest and practical concern. *Science*. 1970; 168(3934): 939–949.
141. Mescher A. Junqueira's Basic Histology. 13 Ed. McGraw-Hill Education, USA, 2013.
142. Milašinović G. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka kolona i rektuma. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije Klinički vodič 15/12 Beograd, 2013.
143. Mills CC, Kolb EA, Sampson VB. Development of chemotherapy with cell cycle inhibitors for adult and pediatric cancer therapy. *Cancer Research*. 2018; 78(2): 320–325.
144. Milutinović M, Čurović D, Nikodijević D, Vukajlović F, Predojević D, Marković S, Pešić S. The silk of *Plodia interpunctella* as a potential biomaterial and its cytotoxic effect on cancer cells. *Animal Biotechnology*. 2020; 29(4): 1-9.
145. Milutinović MG, Maksimović VM, Cvetković DM, Nikodijević DD, Stanković MS, Pešić M, Marković SD. Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019; 240: 111951.
146. Mitra J, Sharma K, Bhattacharyya D. Molecular modelling approaches for designing inhibitors of L-amino acid oxidase from *Crotalus adamanteus* venom. *Current Science*. 2015; 108(6): 1086–1096.
147. Moga MA, Dimienescu OG, Arvătescu OA, Ifteni P, Pleş L. Anticancer activity of toxins from bee and snake venom—an overview on ovarian cancer. *Molecules*. 2018; 23(3): 692.
148. Mojarad E, Kuppen PJK, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2013; 6(3): 120–128.
149. Moon DO, Park SJ, Choi JH, Kim ND, Gi CL, Kim Y. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells. *Toxicon*. 2008; 51(1): 112–120.

150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2): 55–63.
151. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, Arango D, Strausberg RL, Buchanan D, Wormald S, O'Connor L, Wilding JL, Bicknell D, Tomlinson IPM, Bodmer WF, Mariadason JM, Sieber OM. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Research*. 2014; 74(12) 3238–3247.
152. Mudri-Stojnić S, Andrić A, Markov-Ristić Z, Đukić A, Vujić A. Contribution to the knowledge of the bee fauna (Hymenoptera, Apoidea, Anthophila) in Serbia. *ZooKeys*. 2021; 1053(2021): 43–105.
153. Muñoz I, Dela Rúa P. Temporal analysis of the genetic diversity in a honey bee mating area of an island population (La Palma, Canary Islands, Spain). *Journal of Apicultural Science*. 2012; 56(1): 43–105.
154. Muriithi W, Macharia LW, Heming CP, Echevarria JL, Nyachio A, Filho PN, Neto VM. ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance. *Cancer Biology & Medicine*. 2020; 15;17(2): 253–269.
155. Nikolić S. Venomous snake bites in Serbia through 125 years: What we do (not) know in comparison with neighboring countries. A literature review. *Acta Medica Medianae*. 2020; 59(4): 95–103.
156. Nooter K, Brutel de la Riviere G, Look MP, van Wingerden KE, Henzen-Logmans SC, Scheper RJ, Flens MJ, Klijn JGM, Stoter G, Foekens JA. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *British Journal of Cancer*. 1997; 76: 486–493.
157. Orhan H, Karakuş F, Ergüç A. Mitochondrial biotransformation of drugs and other xenobiotics. *Current Drug Metabolism*. 2021; 22(8): 657–669.
158. Pagani MD. The complex clinical picture of presumably allergic side effects to cytostatic drugs: symptoms, pathomechanism, reexposure, and desensitization. *Medical Clinics*. 2010; 94(4): 835–852.
159. Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 19: 1946–2025.
160. Paloschi MV, Pontes AS, Soares AM, Zuliani JP. An update on potential molecular mechanisms underlying the actions of snake venom L-amino acid oxidases (LAAOs). *Current Medicinal Chemistry*. 2018; 25(21): 2520–2530.

161. Pandey BK, Ahmad A, Asthana N, Azmi S, Srivastava RM, Srivastava S, Verma R, Vishwakarma AL, Ghosh JK. Cell-selective lysis by novel analogues of melittin against human red blood cells and *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 2010; 49(36): 7920–7929.
162. Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon DY, Han SB, Song S, Song MJ, Hong JT. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- κ B. *The Prostate*. 2011; 71(8): 801–812.
163. Parkinson A, Ogilvie BW. Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 2008; 7: 161–304.
164. Pauwels EKJ, Erba P, Mariani G, Gomes CMF. Multidrug resistance in cancer: Its mechanism and its modulation. *Drug News Perspect*. 2007; 20(6): 371.
165. Pelicano H, Carneya D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*. 2004; 7(2): 97–110.
166. Pennington MW, Czerwinski A, Norton RS. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018; 26(2018): 2738–2758.
167. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, Castoria G, Migliaccio A. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020; 52: 192–203.
168. Petrilla V, Flešárová S, Šulla I. Poison apparatus in snakes. *Folia Veterinaria*. 2008; 52(1): 22–23.
169. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Science*. 2018; 19(2): 448.
170. Piasek A, Bartoszek A, Namieśnik J. Phytochemicals that counteract the cardiotoxic side effects of cancer chemotherapy. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*. 2009; 63: 142–158.
171. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*. 2016; 387: 95–105.
172. Premratanachai P, Chanchao C. Review of the anticancer activities of bee products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014; 4(5): 337–344.
173. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Bioscience Reports*. 2007; 27: 189–223.
174. Ramya J, Rajagopal D. Morphology of the sting and its associated glands in four different honey bee species. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 2008; 47(1): 46–52.
175. Ranhotra HS, Flannigan KL, Brave M, Mukherjee S, Lukin DJ, Hirota SA, Mani S. Xenobiotic receptor-mediated regulation of intestinal barrier function and innate immunity. *Nuclear Receptor Research*. 2016; 3: 101199.

176. Rattray NJW, Charkoftaki G, Rattray Z, Hansen JE, Vasiliou V, Johnson CH. Environmental influences in the etiology of colorectal cancer: the premise of metabolomics. *Current Pharmacology Reports*. 2017; 3(3): 114–125.
177. Ritonja A, Machleidt W, Turk V, Gubenšek F. Amino-acid sequence of Ammodytoxin B partially reveals the location of the site of toxicity of ammodytoxins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 1986; 367: 919–923.
178. Rodrigues RS, Izidoro, Luiz FM, de Oliveira J, Robson J, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. Snake venom phospholipases A2: a new class of antitumor agents. *Protein and Peptide Letters*. 2009; 16(8): 894–898.
179. Roh JL, Jang H, Kim EH, Shin D. Targeting of the glutathione, thioredoxin, and Nrf2 antioxidant systems in head and neck cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017; 27(2): 106–114.
180. Roy A, Bharadvaja N. Venom-derived bioactive compounds as potential anticancer agents: A review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021; 27: 129–147.
181. Saberwal G, Nagaraj R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1994; 1197(2): 109–131.
182. Sachet M, Liang YY, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*. 2017; 22: 1189–1204.
183. Safa AR. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Experimental Oncology*. 2012; 34(3): 176–184.
184. Sauna ZE, Ambudkar SV. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein: the two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(15): 11653–11661.
185. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel)*. 2021; 22;13(9): 2025.
186. Schendel V, Rash LD, Jenner RA, Undheim EAB. The diversity of venom: the importance of behavior and venom system morphology in understanding its ecology and evolution. *Toxins*. 2019; 11: 666.
187. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*. 2008; 3: 1101–1108.

188. Shaw P, Kumar N, Hammerschmid D, Privat-Maldonado A, Dewilde S, Bogaerts A. Synergistic effects of melittin and plasma treatment: A promising approach for cancer therapy. *Cancers*. 2019; 11(8): 1109.
189. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*. 2017; 86: 715–48.
190. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, Jorge R, Oliveira D, Carvalho F, Lourdes Bastos M, Remião F. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015; 149: 1–123.
191. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000; 5: 415–418.
192. Simone Fulda. Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*: 2009; 124: 511–515.
193. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019; 20: 175–193.
194. Singh R, Singh AP, Kumar S, Giri BS, Kim KH. Antibiotic resistance in major rivers in the world: A systematic review on occurrence, emergence, and management strategies. *Journal of Cleaner Production*. 2019; 234: 1484–1505.
195. Sjøstedt N, Holvikari K, Tammela P, Kidron H. Inhibition of breast cancer resistance protein and multidrug resistance associated protein 2 by natural compounds and their derivatives. *Molecular Pharmacology*. 2017; 14(1): 135–146.
196. Soliman C, Eastwood S, Truong VK, Ramsland PA, Elbourne A. The membrane effects of melittin on gastric and colorectal cancer. *PLoS ONE*. 2019; 14(10): e0224028
197. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 115: 246–270.
198. Stábeli RG, Sant’Ana CB, Ribeiro PH, Costa TR, Ticli FK, Pires MG, Nomizo A, Albuquerque S, Malta-Neto NR, Marins M, Sampaio SV, Soares AM. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007; 41(2): 132–140.
199. Stepanic V, Gasparovic AC, Troselj KG, Amic D, Zarkovic N. Selected attributes of polyphenols in targeting oxidative stress in cancer. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015; 15(5): 496–509.
200. Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996; 224(1): 134–139.

201. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: Globocane estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020; 71(3): 209–249.
202. Sung SH, Kim JW, Han JH, Shin BC, Park JK, Lee G. Animal venom for medical usage in pharmacopuncture in korean medicine: current status and clinical implication. *Toxins*. 2021; 13: 105.
203. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews|Drug Discovery*. 2006; 5(3):219–34.
204. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; 11: 621–632.
205. Tasoulis T, Isbister KG. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins*. 2017; 9(9): 290.
206. Tender T, Rahangdale RR, Balireddy S, Nampoothiri M, Sharma KK, Chandrashekar HR. Melittin, a honeybee venom derived peptide for the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Medical Oncology*. 2021; 38: 52.
207. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003; 22: 7369–7375.
208. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008; 10(8): 1343–1374.
209. Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews*. 2017; 277: 76–89.
210. Turnpenny P, Ellard S. Emerijevi Osnovi molekularne genetike, 13. Izdanje, Data Status, Beograd, 2007
211. Ullah A. Structure–function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11:110.
212. Varpaei HA, Yavari M, Salesi Z, Derakhti A, Azimzadeh S, Esmaeili H, Jafari M. Melittin and Breast Cancer: A Brief Review of the Evidence. *Journal of Nursing and Patient Safety*. 2020.
213. Wang C, Chen T, Zhang N, Yang M, Li B, Lu X, Cao X, Ling C. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B α kinase-NF κ B. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(6): 3804–3813.
214. Weinberg RA. The Biology of Cancer. 2nd ed., Garland Science, New York and London, 2014.

215. Wickham R, Lassere Y. The ABCs of colorectal cancer. *Seminars in Oncology Nursing*. 2007; 23(1): 1–8.
216. Williams RT. Species variations in drug biotransformations. *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. 1971; 187–205.
217. Winston ML. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, 1991.
218. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011; 30: 87.
219. Wu G, Fang JZ, Yang J, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *Recent Advances in Nutritional Sciences*. 2003; 489–492.
220. Yao K, Gietema JA, Shida S, Selvakumaran M, Fonrose X, Haas HB, Testa J, O'Dwyer PJ. In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo. *British Journal of Cancer*. 2005; 93(12): 1356–1363.
221. Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013; 21(4): 501–15.
222. Yuan Y, Liu C, Qian J, Wang J, Zhang Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials*. 2010; 31(4): 730–740.
223. Zainal Abidin SA, Rajadurai P, Chowdhury EH, Othman I, Naidu R. Cytotoxic, anti-proliferative and apoptosis activity of L-amino acid oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) venom on human colon cancer cells. *Molecules*. 2018; 23: 1388.
224. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013; 138(1): 103–141.
225. Zarrinnahad H, Mahmoodzadeh A, Hamidi MP, Mahdavi M, Moradi A, Bagheri KP, Shahbazzadeh D. Apoptotic effect of melittin purified from Iranian honey bee venom on human cervical cancer HeLa cell line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2018; 24: 563–570.
226. Zheng J, Lee HL, Ham YW, Song HS, Song MJ, Hong JT. Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. *Oncotarget*. 2015; 6(42): 44437–51.
227. Zhou J, Qi Y, Diao Q, Wu L, Du X, Li Y, Sun L. Cytotoxicity of melittin and apamin in human hepatic L02 and HepG2 cells *in vitro*. *Toxin Reviews*. 2013; 32(4): 60–67.

228. Zhou J, Wan C, Cheng J, Huang H, Lovell JF, Jin H. Delivery Strategies for Melittin-Based Cancer Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2021; 21;13(15): 17158–17173.
229. Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biološka ispitivanja „Siniša Stanković“, Beograd, Vojnomedicinska akademija, Beograd. 2000, str.1-150.
230. Žledner V. Apoptosis - programmed cell death. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2003; 54: 267–274.

Коришћене интернет странице:

- НСТ-116 ћелијска линија АТСС - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-247.aspx#generalinformation>
- SW-480 ћелијска линија АТСС - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-228.aspx#generalinformation>
- НТ-29 ћелијска линија АТСС - <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx#generalinformation>
- HaCaT ћелијска линија CLS - https://www.clsgmbh.de/p800_HaCaT.html
- Обрада имунофлуоресценце - <https://theolb.readthedocs.io/en/latest/imaging/measuring-cell-fluorescence-using-imagej.html>
- Програм ImageJ - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Globocan база - <https://gco.iarc.fr/>
- Слика 3. - <https://www.istockphoto.com/photos/apoptosis>
- Слика 9. - <https://www.researchgate.net/>
- Слика 12. - <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/reactive-oxygen-species>
- База података за гмизавце - <http://www.reptile-database.org/>

VIII ПРИЛОГ

Табела 1. Проценат вијабилних НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија под утицајем отрова пчеле, 24 и 72 h од третмана.

Отров пчеле	µg/ml	НСТ-116		SW-480		НТ-29	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
0.1		100.00±1.52	100.00±8.72	82.50±3.19*	85.12±5.61*	97.74±0.45	100.00±2.07
1		83.59±1.52*	100.00±2.76	81.08±0.83*	87.56±3.17*	93.24±0.45*	100.00±0.42
2		80.68±1.52*	93.58±2.75*	76.42±0.54*	79.26±2.19*	94.59±0.90*	100.00±0.01
5		77.66±1.52*	54.13±10.09*	79.87±0.89*	67.56±0.24*	72.53±4.05*	100.00±0.83
10		8.83±1.82*	34.41±1.38*	6.77±0.32*	10.49±1.22*	70.27±0.91*	100.00±0.83

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 2. Проценат вијабилних НСТ-116, SW-480 и НТ-29 ћелија под утицајем мелитина, 24 и 72 h од третмана.

Мелитин	µg/ml	НСТ-116		SW-480		НТ-29	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
0.1		100.00±9.49	100.00±0.25	100.00±0.01	100.00±0.05	100.00±0.05	100.00±0.10
1		100.00±4.32	100.00±4.39	76.54±1.92*	74.25±0.25*	100.00±13.59	89.12±1.62*
2		91.48±2.38*	92.64±0.23*	100.00±2.70	93.50±5.50*	100.00±6.79	90.93±0.20*
5		82.18±0.77*	88.17±3.35*	90.77±1.54*	79.50±0.50*	100.00±3.40	96.98±3.03*
10		81.42±1.54*	87.5±2.68*	36.16±1.54*	50.50±1.00*	81.56±7.76*	84.88±2.22*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента ± стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 3. Проценат вијабилних HaCaT ћелија под утицајем отрова пчеле и мелитина, 24 и 72 h од третмана.

HaCaT							
Отров пчеле	$\mu\text{g/ml}$	24 h	72 h	Мелитин	$\mu\text{g/ml}$	24 h	72 h
	0.1	100.00 $\pm$ 1.01	100.00 $\pm$ 0.50		0.1	100.00 $\pm$ 0.50	100.00 $\pm$ 0.13
	1	83.76 $\pm$ 4.27*	100.00 $\pm$ 0.14		1	87.18 $\pm$ 10.26*	100.00 $\pm$ 0.21
	2	98.29 $\pm$ 4.27	100.00 $\pm$ 1.07		2	100.00 $\pm$ 10.26	100.00 $\pm$ 0.17
	5	100.00 $\pm$ 1.28	100.00 $\pm$ 0.17		5	96.16 $\pm$ 3.85*	96.99 $\pm$ 0.16*
	10	91.03 $\pm$ 2.14*	68.42 $\pm$ 1.11*		10	78.10 $\pm$ 1.28*	57.89 $\pm$ 0.03*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 4. Проценат вијабилних HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелија под утицајем отрова змије, 24 и 72 h од третмана.

Отров змије	$\mu\text{g/ml}$	HCT-116		SW-480		HT-29	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
	0.1	100.00 $\pm$ 11.70	100.00 $\pm$ 0.94	45.38 $\pm$ 2.31*	93.50 $\pm$ 0.13*	78.83 $\pm$ 2.25*	100.00 $\pm$ 3.31
	1	100.00 $\pm$ 4.90	79.85 $\pm$ 0.24*	59.23 $\pm$ 0.05*	87.50 $\pm$ 0.14*	83.33 $\pm$ 2.25*	80.99 $\pm$ 1.65*
	2	11.66 $\pm$ 0.56*	4.61 $\pm$ 0.24*	23.08 $\pm$ 0.03*	59.50 $\pm$ 0.19*	76.13 $\pm$ 1.36*	70.25 $\pm$ 0.01*
	5	2.78 $\pm$ 0.55*	0.99 $\pm$ 0.03*	6.92 $\pm$ 0.01*	1.50 $\pm$ 0.006*	55.86 $\pm$ 0.91*	7.03 $\pm$ 0.42*
	10	2.66 $\pm$ 0.33*	0.68 $\pm$ 0.01*	1.54 $\pm$ 0.03*	1.00 $\pm$ 0.001*	19.37 $\pm$ 0.45*	0.79 $\pm$ 0.05*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 5. Проценат вијабилних HCT-116, SW-480 и HT-29 ћелија под утицајем LAAO, 24 и 72 h од третмана.

LAAO	$\mu\text{g/ml}$	HCT-116		SW-480		HT-29	
		24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
	0.1	100.00 $\pm$ 7.76	99.03 $\pm$ 0.49	100.00 $\pm$ 1.61	100.00 $\pm$ 0.06	100.00 $\pm$ 4.49	100.00 $\pm$ 9.26
	1	100.00 $\pm$ 0.87	38.78 $\pm$ 3.17*	92.31 $\pm$ 1.54*	96.00 $\pm$ 2.50*	100.00 $\pm$ 16.02	94.76 $\pm$ 3.63*
	2	9.22 $\pm$ 0.01*	0.70 $\pm$ 0.07*	35.00 $\pm$ 2.69*	12.25 $\pm$ 0.75*	100.00 $\pm$ 11.65	5.04 $\pm$ 0.20*
	5	3.23 $\pm$ 0.16*	0.52 $\pm$ 0.03*	4.62 $\pm$ 0.77*	3.25 $\pm$ 0.25*	86.90 $\pm$ 1.46*	8.87 $\pm$ 2.02*
	10	2.59 $\pm$ 0.86*	0.71 $\pm$ 0.03*	4.62 $\pm$ 0.10*	1.50 $\pm$ 0.005*	4.37 $\pm$ 0.49*	2.36 $\pm$ 0.61*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 6. Проценат вијабилних HaCaT ћелија под утицајем отрова змије и LAAO, 24 и 72 h од третмана.

HaCaT							
Отров змије	$\mu\text{g/ml}$	24 h	72 h	LAAO	$\mu\text{g/ml}$	24 h	72 h
	0.1	100.00 $\pm$ 1.67	100.00 $\pm$ 3.40		0.1	100.00 $\pm$ 4.93	100.00 $\pm$ 2.43
	1	100.00 $\pm$ 1.17	99.25 $\pm$ 0.14		1	100.00 $\pm$ 10.67	95.49 $\pm$ 1.12*
	2	100.00 $\pm$ 6.41	48.87 $\pm$ 1.01*		2	97.01 $\pm$ 2.14	60.90 $\pm$ 1.50*
	5	61.11 $\pm$ 2.14*	22.56 $\pm$ 1.07*		5	85.05 $\pm$ 2.14*	29.32 $\pm$ 0.10*
	10	38.47 $\pm$ 2.57*	9.02 $\pm$ 0.05*		10	26.07 $\pm$ 2.14*	11.28 $\pm$ 0.05*

Резултати су приказани као средња вредност три независна експеримента $\pm$ стандардна грешка. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама.

Табела 7. Коефицијенти Пирсонове корелације за цитотоксичност третмана, након 24 и 72 сата.

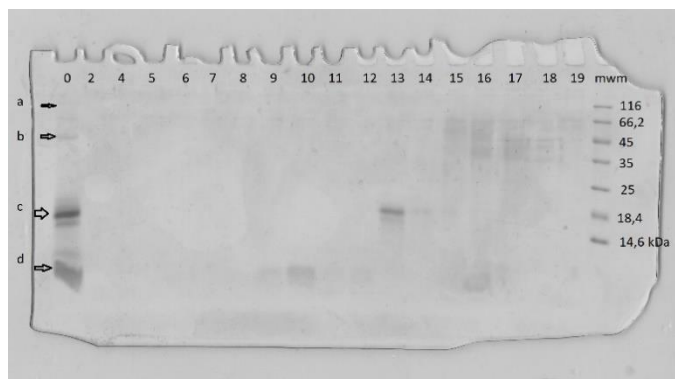
	Ћелијске линије	24 h		72 h	
		Коефицијент (r)	Опис корелације	Коефицијент (r)	Опис корелације
Отров пчеле	HCT-116	-0.829*	веома јака, негативна	-0.878*	веома јака, негативна
	SW-480	-0.785	јака, негативна	-0.855*	веома јака, негативна
	HT-29	-0.907*	веома јака, негативна	/	нема корелације
	HaCaT	-0.241	слаба, негативна	-0.655	јака, негативна
Мелитин	HCT-116	-0.927**	веома јака, негативна	-0.931**	веома јака, негативна
	SW-480	-0.688	јака, негативна	-0.809	веома јака, негативна
	HT-29	-0.655	јака, негативна	-0.706	јака, негативна
	HaCaT	-0.637	јака, негативна	-0.691	јака, негативна
Отров змије	HCT-116	-0.895**	веома јака, негативна	-0.920**	веома јака, негативна
	SW-480	-0.929**	веома јака, негативна	-0.939**	веома јака, негативна
	HT-29	-0.911**	веома јака, негативна	-0.936**	веома јака, негативна
	HaCaT	-0.843*	веома јака, негативна	-0.940**	веома јака, негативна
LAAO	HCT-116	-0.891*	веома јака, негативна	-0.916*	веома јака, негативна
	SW-480	-0.939**	веома јака, негативна	-0.907*	веома јака, негативна
	HT-29	-0.722	јака, негативна	-0.893*	веома јака, негативна
	HaCaT	-0.762	јака, негативна	-0.950**	веома јака, негативна

Критеријуми за значајност корелације * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$

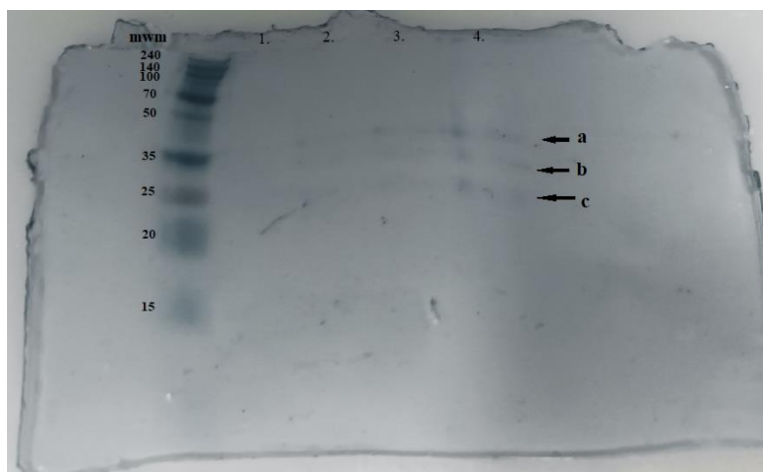
Табела 8. Коефицијенти Пирсонове корелације за утицај третмана на параметре редокс статуса, након 24 сата.

24 h	Ћелијске линије	O ₂ ⁻		GSH		MDA	
		r	Опис корелације	r	Опис корелације	r	Опис корелације
Отрова пчеле	HCT-116	0.723*	јака, позитивна	0.731*	јака, позитивна	-0.913**	веома јака, позитивна
	SW-480	0.718*	јака, позитивна	0.719*	јака, позитивна	0.756*	јака, позитивна
	HT-29	0.925**	веома јака, позитивна	0.959**	веома јака, позитивна	0.780*	јака, позитивна
Мелитин	HCT-116	0.465	умерена, позитивна	0.888**	веома јака, позитивна	-0.132	веома слаба, негативна
	SW-480	0.704*	јака, позитивна	0.648*	јака, позитивна	0.799**	јака, позитивна
	HT-29	-0.847**	веома јака, негативна	0.658*	јака, позитивна	0.231	слаба, позитивна
LAAO	HCT-116	0.953*	веома јака, позитивна	0.938*	веома јака, позитивна	0.778**	јака, позитивна
	SW-480	0.894*	веома јака, позитивна	0.892*	веома јака, позитивна	-0.620	јака, негативна
	HT-29	0.711	јака, позитивна	0.719	јака, позитивна	-0.893*	веома јака, негативна

Критеријуми за значајност корелације * $p > 0.05$; ** $p > 0.01$



Слика 1. Протеински профил отрова пчеле добијен методом електрофорезе на гелу; 0-иницијални узорак, mwt- молекуларна тежина маркера, масе су у килодалтонима (kDa); а) неидентификовано; b) хијалуронидаза; c) фосфолипаза А; d) мелитин.



Слика 2. Протеински профил отрова змије добијен методом електрофорезе на гелу; 4.- узорак отров змије концентрације 50 µg/ml, mwt- молекуларна тежина маркера, масе су у килодалтонима (kDa); а) металопротеиназе PII; б) металопротеиназе PI; с) серин протеазе/CRISPs.

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ABC - *ATP Binding Cassette*
AIC - *Apoptosis Inhibitory Complex*
AIF - *Apoptosis Inducing Factor*
Apaf-1 - *Apoptotic Protease Activation Factor-1*
APS – *Ammonium Persulfate*
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATP - *Adenosine Triphosphate*
Bcl-2 - *B-cell Lymphoma 2*
BCRP - *Breast Cancer Resistance Protein*
BH - *Bcl-2 Homology Domain*
Bid - *BH3 Interacting-domain Death-agonist*
BSA - *Bovine Serum Albumin*
CAD - *Caspase Activated DNase*
CARD - *Caspase Activation and Recruitment Domain*
CEA - *Carcinoembryonic Antigen*
CIMP - *CpG Island Methylator Phenotype*
CIN - *Chromosomal Instability*
c-Jun - *Cellular Jun-nanna*
CRISP - *Cysteine-Rich Secretory Proteins*
CYP - *Cytochrome P450*
Cyt c - *Cytochrome C*
DAPI - *Diamidino-2-Phenylindole*
DCC - *Deleted in Colon Cancer*
DD - *Death Domain*
DED - *Death Effector Domain*
DISC - *Death Inducing Signaling Complex*
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - *Dimethyl Sulfoxide*
DR - *Dead Receptor*
DTNB - *5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*
EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic Acid*
ETC - *Electron Transport Chain*
FAD - *Flavin Adenine Dinucleotide*
FADD - *Fas Associated Death Domain Protein*
Fas - *First Apoptosis Signal*
FasL - *First Apoptosis Signal Ligand*
FBS - *Fetal Bovine Serum*
FBXW7 - *F-box/WD Repeat-Containing Protein 7*
GR - *Glutathione Reductase*
GSH - *Glutathione - γ -glutamyl-cysteinyl-glycine*
GSS - *Glutathione Synthetase*

GSSG - *Glutathione Disulfide*
GST - *Glutathione S-transferase*
GS-X - *ATP-dependent Glutathione S-conjugate Export Pump*
H₂O₂ - *Hydrogen Peroxide*
HCA - *Heterocyclic Amines*
HCl - *Hydrochloric Acid*
HIF-1 α - *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*
HNC - *Head and Neck Cancer*
HNPPC - *Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer*
IAPs - *Inhibitor of Apoptosis Proteins*
ICAD - *Caspase Activated DNase Inhibitor*
KRAS - *Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*
LAAO - *L-amino acid oxidase*
NH₃ - *Ammonia*
MDA - *Malondialdehyde*
MIN - *Microsatellite Instability*
MLH1 - *MutL Homolog 1*
MOATs - *Multispecific Organic Anion Transporters*
MRPs - *Multidrug Resistance-Associated Proteins*
MSH2 - *MutS Homolog 2*
MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*
NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*
NBT - *Nitro Blue Tetrazolium*
NF- κ B - *Nuclear Factor Kappa-light-chain B*
NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) - *NF-kappaB*
NGF - *Nerve Growth Factor*
Nrf2 - *Nuclear (Erythroid-derived 2)-like Factor 2*
¹O₂ - *Singlet oxygen*
O₂⁻ - *Superoxide anion radical*
OH - *Hydroxyl radical*
PAH - *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*
PAPS - *3'-Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate*
PBS - *Phosphate Buffer Saline*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PDGFRs - *Platelet-Derived Growth Factors Receptors*
PDGFs - *Platelet-Derived Growth Factors*
PGP1 - *Multidrug resistance related P-glycoprotein*
PLA2 - *Phospholipase Isoenzymes*
POR - *Cytochrome P450 Oxidoreductase*
PTEN - *Phosphatase and TENsin Homolog*
RCS - *Reactive Carbonyl Species*
RNS - *Reactive Nitrogen Species*
ROO $\cdot$ - *Peroxyl radical*

ROOH - *Lipid hydroperoxide*
ROS - *Reactive Oxygen Species*
RSeS - *Reactive Selenium Species*
RSS - *Reactive Sulfur Species*
SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*
SMAC - *Second Mitochondria-derived Activator of Caspase*
SMAD2, SMAD3, SMAD4 - *Mothers Against Decapentaplegic Homologs*
SNACLEC - *C-type lectins*
SPI - *Serine Protease Inhibitors*
SSA- *Sulfosalicylic Acid*
SVMP - *Snake Venom Metalloproteinases*
SVSP - *Snake Venom Serine-Proteinases*
TBA - *Thiobarbituric Acid*
tBid - *truncated Bid*
TCA - *Trichloroacetic Acid*
TCF7L2 - *Transcription Factor 7-`like 2*
TEMED - *N'-Tetramethylethylenediamine*
TL - *Trombin-like proteinases*
TNF - *Tumor Necrosis Factor*
TRAIL - *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*
TXN1, 2 - *Thioredoxin 1, 2*
UGT - *Uridine 5'-Diphosphate (UDP)-Glucuronosyl Transferases*
VDAC - *Voltage-Dependent Anion Channel*
VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*
XIAP - *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*
XME - *Xenobiotic-Metabolizing Enzymes*
APAF-1 - *Apoptosis Protease Activating Factor-1*
mRNA - *messenger RNA*
MMR - *DNA mismatch repair genes*
MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
PPP - *Pentose Phosphate Pathway*

RESEARCH ARTICLE



Impact of bee venom and melittin on apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cell lines

Danijela D. Nikodijević^a , Milena G. Milutinović^a , Danijela M. Cvetković^a , Maja D. Čupurdija^a ,
Milena M. Jovanović^a , Ivan V. Mrkić^b , Marija D. Jankulović-Gavrović^b  and Snežana D. Marković^a 

^aDepartment of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; ^bDepartment of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

ABSTRACT

This study provides data about anticancer properties of bee venom and its dominant compound, melittin on colorectal carcinoma cells (HCT-116 and SW-480) in regard to their proapoptotic activity and expression of genes involved in biotransformation process. Based on results, they are strong cytotoxins, where the melittin showed also selectivity against cancer cells compared to normal, HaCat. They induce proapoptotic activity by affecting apoptosis signaling molecules (Fas receptors, caspase 9, and members of Bcl-2 family of proteins) and mainly suppress expression of genes involved in their biotransformation, suggesting their ability to develop the resistance of colorectal cancer cells.

ARTICLE HISTORY

Received 13 February 2019
Accepted 8 October 2019

KEYWORDS

Animal products; apoptosis;
cell death;
honeybee; venom

Introduction

Colorectal carcinoma most frequently occurs due to malignant transformation of epithelial cells of the gastrointestinal tract (Torre *et al.* 2015). At the molecular level, hereditary factors play a crucial role, followed by diet, obesity, smoking, and physical activity (Antić 2014). Various genetic mutations of oncogenes and tumor suppressor genes, especially the *APC*, *KRAS*, and *p53* genes as most prominent and together with epigenetic mutations are crucial molecular mechanisms in colorectal carcinoma development (Guanti 2000).

The discovery and design of novel anticancer substances, especially of natural origin, that are less harmful than the commercially available cytostatics and development of targeted strategy to improve current therapy are desirable. One of the strategies could be induction of apoptosis due to activation of the external, death receptor-mediated pathway, targeting the specific caspases, by affecting the mitochondria and regulators of mitochondria membranes permeability such as members of Bcl-2 protein family, etc. (Mayer and Oberbauer 2003). Although plants are considered the most common resource of bioactive substances, the accelerated research of new natural products includes animal products as well (Gomes *et al.* 2010).

Bee venom is used in the treatment of different diseases like rheumatoid arthritis and inflammatory diseases due to its impact on various proinflammatory molecules (Son *et al.* 2007). Anticancer effects of bee venom were also investigated (Premratanachai and Chanchao 2014). Their effectiveness is mainly mediated by the induction of apoptosis via activation of initiator and effector caspases and death receptor expression, such as Fas (*First apoptosis signal*) (Lee *et al.* 2015). Bee venom is a mixture of compounds that have diverse effects individually (Bogdanov 2017). Melittin, as a dominant constituent of bee venom, induces apoptosis and eliminates tumor cells without initiating an immune response (Zheng *et al.* 2015). There are some literature data which confirm that melittin leads to apoptosis by activating cell membrane death receptors on the human ovarian cancer cells SKOV3 and PA-1 (Jo *et al.* 2012) and significantly reduces the level of mitochondrial potential and induces apoptosis in MCF-7 cells (Ip *et al.* 2008).

One of the most common problems in cancer therapy is development of cancer cell resistance which occurs through various mechanisms, like impossible entry of the anticancer substance into the cell, their biotransformation, increased efflux from the cell, ability of cancer cells to avoid apoptosis, and many others

CONTACT Milena G. Milutinović  milenagen@gmail.com  Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, 34000, Serbia

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells

Danijela D. Nikodijević^{a,*}, Jovana V. Jovankić^a, Danijela M. Cvetković^b, Marko Z. Anđelković^c, Aleksandra G. Nikezić^a, Milena G. Milutinović^a

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000, Kragujevac, Serbia

^c University of Belgrade, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", National Institute of Republic of Serbia, Department of Evolutionary Biology, Bulevar Despota Stefana 142, 11060, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Anticancer
ABC transporters
Drug resistance
Vipera ammodytes

ABSTRACT

This study evaluated the potential of antitumor activity of snake venom from *Vipera ammodytes* and L-amino acid oxidase from *Crotalus adamanteus* on different colorectal cancer cell lines through determination of cytotoxic activity by MTT assay, pro-apoptotic activity by acridine orange/ethidium bromide staining, and concentrations of redox status parameters (superoxide, reduced glutathione, lipid peroxidation) by colorimetric methods. The expression of genes involved in the biotransformation process and metabolite efflux was determined by qPCR method, while protein expression of glutathione synthetase and P-glycoprotein were analysed by immunocytochemistry. The analysis of cell death shows that snake venom dominantly leads cells to necrosis. Induction of apoptosis by L-amino acid oxidase was in correlation with oxidative disbalance in cancer cells. Gene expression profile of membrane transporters and CYP genes were different in each cell line and in correlation with their sensitivity of treatment. Our results show that L-amino acid oxidase from snake venom is a potent cytotoxic substance with pronounced pro-apoptotic activity. The inhibition of P-glycoprotein suggests that L-amino acid oxidase is a good substance for further research of antitumor effect, with unexpressed potential for occurrence of drug resistance *in vitro*.

1. Introduction

There is an increased incidence of colorectal cancer globally, taking the third position in frequency ranking among the most common cancers according to the data of World Health Organization (Sung et al., 2020). The conventional treatment of this disease is demanding, and in addition to standard procedure requires the examination of new therapeutic agents. Recently, due to their numerous favourable pharmacological effects, additional therapies with substances of natural origin have proved to be excellent. Among them, animal products mainly from animal venoms have been increasingly investigated (Roy and Bharadvaja, 2020).

Snake venom is a mixture of many substances with numerous side effects on humans; however, some of them can be useful. Nose-horned viper (*Vipera ammodytes*) is the most venomous snake in Europe (Latinović et al., 2016). It belongs to the subfamily of Viperinae, characterized by venoms, composed of a combination of neuro and chemo

toxins (Latinović et al., 2016). It contains many active compounds mostly of protein structure such as proteinases, lipases, disintegrins, L-amino acid oxidases, and other molecules (Georgieva et al., 2008). L-amino acid oxidase is a flavoprotein, the enzyme that catalyzes oxidation of L-amino acids. On antitumor investigation, L-amino acid oxidases are only reported to induce apoptosis and disbalance of redox status in cancer cells by producing hydrogen peroxide (Izidoro et al., 2014). Thus, they are a good starting point in preclinical testing of anticancer properties of snake venom, regardless of the fact that they are not a predominant component of the venom, with destructive effects on human cells (Du and Clemetson, 2002).

In anticancer treatment, one of the main mechanism of action of natural products is their ability to induce apoptosis (Wang et al., 2018; Milutinović et al., 2019; Nikodijević et al., 2019). Cancer cells avoid apoptosis, which may be associated with the development of resistance to potential anticancer agents. Numerous intracellular mechanisms can lead to resistance such as avoiding apoptosis, biotransformation of drug,

* Corresponding author.

E-mail address: danijela.nikodijevic@pmf.kg.ac.rs (D.D. Nikodijević).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174466>

Received 14 April 2021; Received in revised form 23 July 2021; Accepted 30 August 2021

Available online 3 September 2021

0014-2999/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

БИОГРАФИЈА

Данијела Д. Никодијевић је рођена 25.03.1991. године у Ћуприји. Основно образовање је стекла у ОШ „Вук Караџић“ у Трешњевици. Средњу медицинску школу завршила је 2010. године у Ћуприји, и исте године уписала Природно-математички факултет у Крагујевцу. Основне академске студије биологије завршила је 2013. године са просеком 8,72. Школске 2013/2014. године уписала је мастер студије биологије које је завршила 2015. године, и стекла звање дипломирани биолог-мастер, одбраном завршног рада под називом „Ефекти екстракта биљака из рода *Teucrium* на механизме апоптозе у ћелијама карцинома дојке и колоне” са оценом 10 и просечном оценом током студија 8,86. За време студија, била је члан ЕИД „Младен Караман“, а од 2014-2015. године била је председник овог Удружења.

Докторске академске студије биологије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2015/2016. године. У звање истраживач-приправник изабрана је 11.05.2016. године, а у звање истраживач сарадник 10.07.2019. године, за научну област Биологија, на истој Институцији.

Од јула 2016. до 2019. године је била ангажована на пројекту МПНТР Републике Србије - „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ (ПИБАС, бр. ИИИ41010), где је активно радила на пољу испитивања биоактивних супстанци на карциномским ћелијским линијама. У Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета, успешно се бави научно-истраживачким радом, где је овладала савременим техникама лабораторијског рада и била укључена као демонстратор у реализацији практичне наставе.

Током докторских академских студија у фокусу њеног интересовања су истраживања везана за антитуморску активност животињских отрова на ћелијским линијама карцинома дебелог црева, као главном модел систему.

Библиографски подаци

У току научно истраживачког рада, Данијела је објавила 10 научних радова у међународним часописима (SCI листа): 5 радова у категорији M21, 2 рада у M22 и 3 у M23 категорији. У националним часописима публиковала је 4 рада, 11 саопштења на конференцијама са међународним и 5 саопштења на конференцијама од националног значаја, што укупно чини 30 библиографских јединица. На резултате који су објављени из докторске дисертације односе се референце под редним бројевима 1., 4., 18., 24., и 29.

Радови објављени у међународним научним часописима

1. **Nikodijević DD**, Milutinović MG, Cvetković DM, Ćupurdija MĐ, Jovanović MM, Mrkić IV, Jankulović-Gavrović MĐ, Marković SD. Impact of bee venom and melittin on apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cell lines. *Toxin Reviews*. 2019; 40(4): 1272-1279. M21
ISSN: 1556-9543. IF₂₀₁₈: 3.84
DOI: 10.1080/15569543.2019.1680564
2. Milutinović MG, Maksimović VM, Cvetković DC, **Nikodijević DD**, Stanković MS, Pešić MS, Marković SD. Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019; 240(2019): 1-10. M21
ISSN: 0378-8741. IF₂₀₁₉: 3.690

3. Milutinović M, Čurović D, **Nikodijević D**, Vukajlović F, Predojević D, Marković S, Pešić S. The silk of *Plodia interpunctella* as a potential biomaterial and its cytotoxic effect on cancer cells. *Animal Biotechnology*. 2020; 31(3):195-202. M21
ISSN: 1049-5398. IF₂₀₁₀: 2.282
DOI: 10.1080/10495398.2019.1575848
4. **Nikodijević D**, Jovankić J, Cvetković D, Anđelković M, Nikezić A, Milutinović M. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2021; 910(2):174466. M21
ISSN: 0014-2999. IF₂₀₂₁: 5.195
DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174466
5. Marković KG, Grujović MŽ, Koraćević MG, **Nikodijević DD**, Milutinović MG, Semedo-Lemsaddek T, Djilas MD. Colicins and microcins produced by Enterobacteriaceae: characterization, mode of action, and putative applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19: 11825. M21
ISSN: 1660-4601. IF₂₀₂₁: 4.614
DOI: 10.3390/ijerph191811825
6. Grujović MŽ, Mladenović KG, **Nikodijević DD**, Čomić LjR. Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology Letters*. 2019; 1-13. M22
ISSN: 0141-5492. IF₂₀₁₈: 2.154
DOI: 10.1007/s10529-019-02729-8
7. Milutinović MG, Milivojević NN, Đorđević NM, **Nikodijević DD**, Radisavljević SR, Đeković Kesić AS, Marković SD. Gold(III) complexes with phenanthroline-derivates ligands induce apoptosis in human colorectal and breast cancer cell lines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022. M22
ISSN: 0022-3549. IF₂₀₂₁: 3.784
DOI: 10.1016/j.xphs.2022.09.021.
8. Cvetković D, Jovankić J, Milutinović M, **Nikodijević D**, Grbović F, Ćirić A, Topuzović M, Marković S. The anti-invasive activity of *Robinia pseudoacacia* L. and *Amorpha fruticosa* L. on breast cancer MDA-MB-231 cell line. *Biologia*. 2019; 74(5): 1-14. M23
ISSN: 0006-3088 IF₂₀₁₉: 0.811
DOI: 10.2478/s11756-019-00257-4
9. Mladenović KG, Grujović MŽ, **Nikodijević DD**, Čomić LjR. The hydrophobicity of enterobacteria and their co-aggregation with *Enterococcus faecalis* isolated from Serbian cheese. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. 2020. 39(4): 227-233. M23
ISSN: 2186-3342. IF₂₀₁₈: 2.488
DOI: 10.12938/bmfh.2020-004
10. Jovankić JV, Cvetković DM, Milutinović MG, **Nikodijević DD**, Nikezić AG, Grbović FJ, Vuković NL, Vukić MD, Jakovljević DV, Marković SD. The impact of medicinal plant *Ocimum minimum* L. on fatty acid synthesis process in breast cancer cells. *Biologia*. 2021. M23
ISSN: 0006-3088. IF₂₀₂₀: 1.350.
DOI: 10.1007/s11756-021-00939-y

Радови објављени у националним часописима:

11. Jovankić JV, **Nikodijević DD**, Blagojević SZ, Radenković NM, Jakovljević DZ, Grbović FJ, Cvetković DM. The biological activity of *Ocimum minimum* L. flowers on redox status parameters in HCT-116 colorectal carcinoma cells. *Kragujevac J. Sci.* 44 (2022) 155–168. M24
ISSN: 1450-9636
doi: 10.5937/KgJSci2244155J
12. Jovanović MM, Ćupurdija MĐ, **Nikodijević DD**, Milutinović MG, Cvetković DM, Rakobradović JD, Marković SD. Effects of royal jelly on energy status and expression of apoptosis and biotransformation genes in normal fibroblast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science*. 2018; 40: 175-192. M51
ISSN: 1450-9636
DOI: 10.5937/KgJSci1840175J
13. Milutinović MG, **Nikodijević DD**, Stanković MS, Cvetković DM, Marković SD. Altered apoptosis and biotransformation signaling in HCT-116 colorectal carcinoma cells induced by *Teucrium chamaedrys* L. extract. *Kragujevac Journal of Science*. 2019; 41(2019): 77-86. M51
ISSN: 1450-9636
DOI: 10.5937/KgJSci1941077M
14. **Nikodijević D**, Milutinović M, Cvetković D, Stanković M, Živanović M, Marković S. Effects of *Teucrium polium* L. and *Teucrium montanum* L. extracts on mechanisms of apoptosis in breast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science*. 2016; 38: 147-159. M52
ISSN: 1450-9636
DOI: 10.5937/KgJSci1638147N

Саопштења на конференцијама од међународног значаја:

15. **Nikodijević D**, Milutinović M, Cvetković D, Stanković M, Marković S. Effects of different *Teucrium* species on mechanism of apoptosis in colon and breast cancer cell lines. Third Congress of the Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology “Redox Medicine. Reactive Species Signaling, Analytical Methods, Phytopharmacy, Molecular Mechanisms of Disease”. September 25-26, 2015, Belgrade; P17. M34
ISBN: 978-86-912893-3-1
16. Milutinović M, Stanković M, Cvetković D, **Nikodijević D**, Marković S. Effects of different plants used in traditional medicine for digestive disorders on metabolic enzymes in colon cancer cell lines. Third Congress of the Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology “Redox Medicine. Reactive Species Signaling, Analytical Methods, Phytopharmacy, Molecular Mechanisms of Disease”. September 25-26, 2015, Belgrade; P49, M34
ISBN: 978-86-912893-3-1
17. Jovankić J, Cvetković D, Milutinović M, **Nikodijević D**, Živanović M, Grbović F, Marković M. Molecular mechanisms of redox status and antitumor activity of extracts of invasive plant species (*Robinia pseudoacacia* and *Amorpha fruticosa*) in MRC-5 and MDA-MB-231 cell lines. Serbian Biochemical Society Sixth Conference "Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of field". November 18, 2016, Belgrade; 123-125. M34
ISBN: 978-86-7220-081-2.

-
18. **Nikodijević D**, Jovanović M, Milutinović M, Cvetković D, Čupurdija M, Jovankić J, Marković S. Effects of the bee products on energy status and relative expression of biotransformation and apoptosis genes in healthy and colon cancer cells. Seventh Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemistry of Control in Life and Tehnology", 11 november, 2017, pp. 173-175, Belgrade, Serbia. M34
ISBN: 978-86-7220-091-1 (FOC)
19. Cvetkovic MD, Cvetkovic MA, Milošević ZM, Ninković MS, Milutinović GM, **Nikodijević DD**, Jovankic VJ and Marković DS. The role of molecular mechanisms of neoangiogenesis as tumor markers in the treatment individualization of breast cancer patients. 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation "Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment". Belgrade, 6-7th October 2017. page 49-50. M34
ISBN: 978-86-919183-1-6
20. Milutinović M, **Nikodijević D**, Stanković M, Cvetković D, Marković S. Anti/pro-oxidant and proapoptotic activities of *Centaureum erythrea* extracts on colon cancer cells. The Fourth International Congress of Serbian Society for Mitochondrial and Free Radical Physiology Belgrade, 28-30 September 2018. page 75, p29. M34
ISBN: 978-86-912893-4-8 (SSMFRP)
21. Milutinović M, **Nikodijević D**, Cvetković D, Jovankić J, Stanković M, Marković S. Proapoptotic activity of *Gentiana punctata* L. on colorectal cancer cells. 9th Conference of Serbian Biochemical Society "Diversity of Biochemistry", Belgrade, Serbia. November 14-16. 2019, pp. 135. ISBN: 978-86-7220-101-7 (FOC). M34
22. Nikezić A, Jovankić J, **Nikodijević D**, Milutinović M, Blagojević S, Planojević N, Grbović F, Marković S. Anticancer potential of *Alchemilla vulgaris* L. on triple negative breast cancer cell lines. 10th Conference of Serbian Biochemical Society "Biochemical Insights into Molecular Mechanisms", Kragujevac, Serbia. September 24. 2021, pp. 110. M34
ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)
23. Jovankić JV, **Nikodijević DD**, Milutinović MG, Nikezić AG, Planojević NP, Blagojević SZ, Cvetković DM. Anti-obesity drug Orlistat (Xenical®) induces antiangiogenic potential in breast cancer cell lines. The 5th Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation „Translational potential of cancer research in Serbia“, Virtual event, December 3, 2021., pp. 53. M34
ISBN: 987-86-919183-3-0
24. **Nikodijević D**, Jovankić J, Cvetković D, Nikezić A, Blagojević S, Planojević N, Milutinović M. Bee venom and melittin induce apoptosis in colon cancer cell lines by Caspase 8 activation. The 5th Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation „Translational potential of cancer research in Serbia“, Virtual event, December 3, 2021, P48, page 75. M34
ISBN 978-86-919183-3-0
25. Cvetković D, Cvetković A, **Nikodijević D**, Jovankić J, Milutinović M, Stojić V, Zdravković N, Mitrović S. Determination of VEGF and CXCR4 in Tumor and Peritumoral Tissue of Patients with Breast Cancer as a Predictive Factor. 2021 BIEEE 21st International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), Kragujevac, Serbia 25-27.10.2021. Page 1. M34
ISBN: 978-1-6654-4261-9

Саопштења на конференцијама од националног значаја:

26. Milutinović M, **Nikodijević D**, Stanković M, Maksimović V, Marković S. Antitumorski potencijal listova i plodova biljke *Ligustrum vulgare* L. na SW480 ćelijama kolorektalnog karcinoma. XXIV savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 15-16. mart 2019. godine, Čačak, Srbija. Zbornik radova 2, str. 757-764. M63
27. Cvetković D, Milutinović M, **Nikodijević D**, Jovankić J, Filipović N i Marković S. Efekat elektrohemioterapije na ćelijskim linijama karcinoma dojke. Drugi kongres biologa, Kladovo, Srbija, 25-30.09.2018. Knjiga sažetaka, strana 268. M64
ISBN: 978-86-81413-08-1.
28. Milutinović M, Čurović D, Cvetković D, **Nikodijević D**, Vukajlović F, Predojević D, Jovankić J, Pešić S, Marković S. Svila moljca *Plodia interpunctella* kao potencijalni biomaterijal i citotoksični agens na HCT-116 ćelijama karcinoma kolona. Drugi kongres biologa, Kladovo, Srbija, 25-30.09.2018. Knjiga sažetaka, strana 277. M64
ISBN: 978-86-81413-08-1
29. **Nikodijević DD**, Jovankić JV, Radenković NM, Cvetković DM, Milutinović MG. Uticaj otrova pčele na redoks ravnotežu u ćelijskim linijama karcinoma debelog creva. Treći Kongres biologa Srbije, 21-25.9.2022., str. 300, Zlatibor, Srbija. M64
ISBN: 978-86-81413-09-8
30. Jovankić JV, **Nikodijević DD**, Milutinović MG, Radenković NM, Nikezić AG, Cvetković DM. Citotoksični efekat Simvastatina na MDA-MB-231 ćelijama karcinoma dojke. Treći Kongres biologa Srbije, Zlatibor, Srbija 21-25.9.2022. str. 310. M64
ISBN 978-86-81413-09-8.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Ефекти пчелињег и змијског отрова на сигналне путеве апоптозе и биотрансформације у ћелијским линијама карцинома дебелог црева”

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 17.11.2022. године,

Данијела Николијевић
потпис аутора

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

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Ефекти пчелињег и змијског отрова на сигналне путеве апоптозе и
биотрансформације у ћелијским линијама карцинома дебелог црева”**

истоветне.

У Крагујевцу, 17.11.2022. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Данијела Д. Никодијевић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

„Ефекти пчелињег и змијског отрова на сигналне путеве апоптозе и биотрансформације у ћелијским линијама карцинома дебелог црева”

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

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 17.11.2022. године,



потпис аутора

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